

# VÉRSEJTEK LABORATÓRIUMI MÉRÉSE – VÉRKÉP AUTOMATÁK ÉS A FLOW CYTOMETRIA KLINIKAI LABORATÓRIUMI ALKALMAZÁSA

**Bevezetés:** Mi, élőlények, a legegyszerűbb baktériumtól az emberig, valamennyien **sejtekből épülünk fel**. E sejtek a prokarióta (=„elősejtes”, viszonylag egyszerűbb bakteriális) és eukarióta („valódi sejttaggal rendelkező”) állati valamint növényi sejtek néhány különbségtől eltekintve (sejtmag membrán, növényi sejtfa, chlorophyl) teljesen azonos anyagokból és szubcelluláris alkotóelemekből (organellumok) épülünk fel. A NASA minapi bejelentése óta - t.i. a foszfor helyett arzént felhasználó baktériumokat találtak extrém természeti körülmények között - már nem zárható ki az a lehetőség sem, hogy más molekulákon alapulva is mint a COHNSP (szén-oxigén-hidrogén-nitrogén-kén-foszfor) kialakulhatott az élet, ennek létre és megjelenési formájára azonban jelenleg nincs bizonyíték. Így, jelenlegi tudásunk szerint az **élet alapvető építőeleme a sejt, mely a Föld speciális evolúciós körülményeinek köszönhetően alakult ki** [nagy bumm=13,7 milliárd év, Föld kialakulása=4,2-4,6 milliárd év (radiometrikus kőzetmérési adat), az élet kialakulása a Földön=3,8-4 milliárd éve (Miller kísérlet aminosavak in vitro előállítás)]. Ha figyelmen kívül hagyjuk a „már a görögök” (Parmenidész=„létező”, Thalész, Anaximandros=„arkhé”, Pithagorasz=„törvény”) közhelyszerű kijelentést - az **élőlények sejt felépítését nem is olyan régtől ismerjük**. A növényi szövetek sejtjeit először a cseh **Purkyňe** (Purkinje kisagyi idegsejt viseli ma a nevét) írta le 1837-ben, **Schwann és Schleiden** 1839-ben megalkották a sejtant, miszerint az élőlények alapvető életfunkcióikat (mozgás, anyagcsere, szaporodás=információ átadás) azonos szerkezetű egységekben végzik, ezeket az egységeket nevezte el aztán **Robert Hook** parafa metszeteket tanulmányozva saját szerzetesi cellájára utalva sejtnek (**cellula**). Az emberi test megközelítőleg 100.000 milliárd sejtet tartalmaz, amelynek mindegyike tízezerszer annyi molekulát tartalmaz, mint a Tejút összes csillaga. Az emberi sejtek száma az emberiség létszámának mintegy százezerszerese. Ennek ezredrésze hal el naponta, ami még mindig az emberiség létszámának százszorosa. Rudolf **Virchow** (1821-1902) porosz pathológus Swann, Remak és Morgani munkáit tanulmányozva megalkotta a celluláris pathológia tanát mely a pathológiai szövettani és cytológiai valamint klinikai pathológiai gondolkodás alapját, a betegségek megértésének kulcsát adja ma is. Virchow kortársai közt találjuk a bakteriológia, járványtan és immunológia megalapítóit (**Louis Pasteur** 1822-1895 francia és **Robert Koch** 1843-1910 porosz orvosokat). Valamint a Mechnikovval együtt 1908-ban Nobel díjat elnyerő porosz-zsidó kémikus **Paul Ehrlichet** 1854-1915, aki a chemotherápia „atyjaként” Dr. Hata Sahachiro tanítványával együttműködve (1909) először kezelte Arzénnel (Salvarsan, Hoechst) a syphilit, ami az egyetlen hatékony gyógymód volt egészen a **pencillin** (A.Fleming 1928, Howard Florey és Ernst Chain 1940) feltalálásáig és izolálásáig. Felismerte az autoimmunitás („horror autotoxicus”) jelenségét, felismerte, hogy a szérumban immunológiailag aktív antigén-antitest reakció keletkezik a fertőzések kapcsán („side chain theory”), ezt a gyakorlatba is átütve megalapította az *Institut für Serumforschung und Serumprüfung* laboratóriumot. Mindez előrevetíti korunk forradalmi felfedezését (Köhler és Milstein 1984 Nóbél díj), mely lehetővé tette a monoklonális antitest korszakot. Bevezette a bakteriológiában alapvető Gram festés elődjét, s a kórokozó bakteriális és emberi daganatos sejtek szelektív festésének tanulmányozása során rájött, hogy bizonyos anyagok (festékek) nemcsak szelektíven festenek bizonyos sejteket, hanem azok

szelektív elpusztítására is képesek (chemoterápia). Ehrlich chemoterápia elmélete ihlette a német bakteriológus pathológus Gerhard Domagkot (Nobel-díj 1939) a **szulfonamid antibiotikumok** felfedezésében (Prontosil, Bayer IG Farben Industry), de ez az alapelv érvényesül a modern haematológia chemoterápiás gyakorlatában is.

**Mióta vizsgálunk laboratóriumban (vér)sejteket?** Mint láthattuk kezdetben a pathológusok és microbiológusok vizsgáltak sejteket (szövetminta, cytológiai minta, baktérium kultúrák formájában) abból a célból, hogy kóros állapotokat, betegségeket diagnosztizáljanak. A **haematológia** a pathológiai háttér mellett elsősorban gyakorlati klinikai alapokon állt. Már az egyiptomiak végeztek vércsapolást érvágással (venosectio), William Harwey 1628-ban leírta a vénás és artériás érrendszert, Christopher Wren 1656-ban adta az első intravénás (iv) injectiót állatnak, James Blundell 1818-ban végezte az első sikeres transzfúziót, 1840-től Angliában haemofilias betegeket már emberi vérrrel kezeltek, 1867-től az angol sebész John Lister bevezette a transzfúzióban a sterilitási szabályait. Miközben Virchow (Die Cellularpathologie 1858) leírta a gyulladásos reakció és immunválasz sejtes elemeit valamint a leukaemiát, s mielőtt Landsteiner (1901) felfedezte a vércsoportokat (A,B,AB,O) egy jól ismert kémikus Ehrlich (majd Romanowsky) bevezette a **(vér)kenetfestés** gyakorlatát (1877). Ma is nélkülözhetetlen módszerként alkalmazzuk a savi (cytoplasma) és bázikus (sejtmag) festékekkel festett vérkenetek mikroszkópos vizsgálatát. A klasszikus **May-Grünwald-Giemsa** festés mellett natív (nem fixált) keneteken ún. **cytokémiai reakciókat** is végzünk: ami azt jelenti, hogy a keneten szétterített (kihúzott) sejtek még élő állapotban vannak, s képesek bizonyos enzimeiket in vitro is működtetni (myeloperoxidáz=**MPO**, granulocytá alkalikus foszfatáz=**GAPA**), azaz, ha a megfelelő szubsztrátummal és festékanyagokkal inkubáljuk a kenetet, a működő sejtek mikroszkóp alatt látható színreakció révén kimutathatóvá tehetők. A vérkenetek értékelése kapcsán azonban felmerült egy alapvető szemléleti probléma. A kenetektől a vérben keringő sejtek abszolút számára legfeljebb csak indirekten tudunk következtetni (pl. Fonio féle vérlemezke=thrombocytá számlálás, ahol a vörösvértest:thrombocytá arány alapján próbálunk következtetni a vérlemezkek számára, hasonlóan egy kiemelkedően magas vagy alacsony fehérvérsejt szám is feltűnhet a kenetekben ilyen alapon). Így azonban könnyen félrevezetődhetünk, hisz a viszonyítási alap, a vörösvértest szám – bár ez még a legstabilabb – nem mindig azonos (lásd anaemiák időnként extrém alacsony vörösvértest=RBC számmal : akár 1-2 millió/ µl-re is csökkenhet az átlagos 4-5 millió/ µl-ről ill. polycythaemia igen magas, akár 7-9 millió/µl vagy T/L RBC számmal). Arról nem is szólva, hogy a „tyuk-tojás” problémával kerülünk szembe, azaz minimum 1 paramétert valahogy le kell mérni, hogy legyen mihez hasonlítani az eredményt. Az **első manuális abszolút sejtszámlálás** módszerét a **Bürker kamra** bevezetése (Vierordt 1852) tette lehetővé. **Türk (fehérvérsejtekhez, ecetsav+gentiana ibolya hypotoniás oldat, a vörösvértesteket lizálja, Merck)** és **Hayem oldattal (vörösvértestekhez izotoniás NaCl + HgCl<sub>2</sub> + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Skarbeus Kft)** **Melangeur pipettával** („vampir” = ilyenekkel felfegyverkezve cikáztak nemrég még a vérvevő labor asszisztensek az osztályokon a betegek között). A vérmintából a pipettával **1:10 (fehérvérsejt)** illetve **1:100-200 (thrombocytá, vörösvértest)** hígítást végeztünk, s mikroszkóp alatt Bürker kamrában hajtottuk végre a sejtek számlálását. Az abszolút sejtszám a Bürker kamra sejszuszpenziós folyadékot befogadó standard volumene miatt (3D-ban standard méretek) pontosan kiszámítható, kalkulálható. A kamra mélysége 0,1 mm, így attól függően, hogy milyen négyzetekben illetve téglalapokban számoljuk meg a sejteket, különböző szorzófaktorral számíthatjuk át azokat 1 cm<sup>3</sup>(ml)-re. Az átszámítási faktorokat az alábbi táblázat tartalmazza:

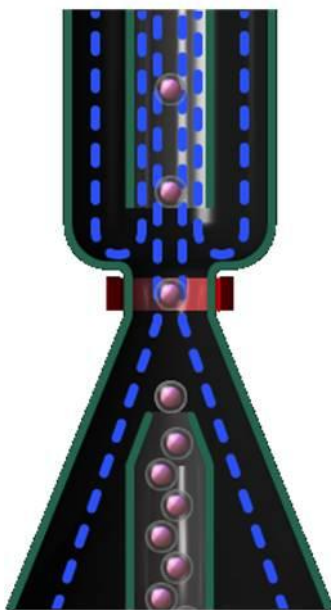
	<b>Kamra Méret</b>	<b>Térfogat (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Szorzófaktor</b>
<b>Nagy négyzet</b>	0,2*0,2	0,04*0,1	2,5*10 <sup>5</sup>
<b>Kis négyzet</b>	0,05*0,05	0,0025*0,1	4*10 <sup>6</sup>
<b>Téglalap</b>	0,2*0,05	0,01*0,1	1*10 <sup>6</sup>

[http://www.mtk.nyme.hu/fileadmin/user\\_upload/elelmiszer/Mikro/segedanyag/Mikro\\_2hetente/2.gyak\\_2hetente.pdf](http://www.mtk.nyme.hu/fileadmin/user_upload/elelmiszer/Mikro/segedanyag/Mikro_2hetente/2.gyak_2hetente.pdf)

A kimutathatóság alsó határa  $10^6$  sejt/cm<sup>3</sup>(ml). Nagyon sűrű szuszpenziók hígítással tehetőek számlálhatóvá. A számlált részecskék eloszlása statisztikailag a Poisson eloszlással jellemezhető, ezért az átlagértékek becslésének relatív hibája csak úgy csökkenthető 20 % alá, ha annyi négyzetet vagy téglalapot vonunk be a számlálásba, hogy a bennük lévő összes sejtek száma 300-500 körüli érték legyen. A módszer ma már legfeljebb csak történeti érdekességgel bír, a modern klinikai laboratóriumi gyakorlatban a sokkal nagyobb eseményszámból (10.000/minta) pontosabb statisztikai eredményt adó sejtszámláló automatákat (vérkép automata, „hematological analyser”) alkalmazzuk. A Bürker kamra, mint problémás eseteket eldöntő alternatív sejtszámlálási módszer – figyelembe véve a manuális módszer megbízhatatlanságát - az orvosi laboratóriumi gyakorlatban nem ajánlott. Az anaemia/normalitás/polycythaemia kimutatására azonban egy további módszer is ismert, mely az anaemia mértékével arányos **Hgb (haemoglobin) fotometriás mérés**en alapul : kálium-cianid (KCN) és kálium-ferricianid (vörösvérletűség,  $K_4Fe(CN)_6$ ) a vörösvérsejtek hemolizálnak, és a kiszabaduló hemoglobin cianmethemoglobinná alakul, így az extinkciója független lesz a vér oxigén telítettségétől. 5 perc várakozás után megmérjük az oldatunk extinkcióját 540 nm-en. Haemisol Standarddal (Sigma) felvett kalibrációs görbéről a kapott értékünkéből leolvashatjuk a haemoglobin koncentrációt mmol/l –ben (**CN-Hgb módszer**). E módszer módosított, nem toxicus verzióját (**SLS-Hgb**, sodium lauryl sulphate-Hgb) alkalmazzák a mai modern vérkép automatákban is.

[http://www.freeweb.hu/drndr/tigris\\_irom%E1ny/2.%20RBC,%20WBC,%20HGB,%20Htk,%20MCV.pdf](http://www.freeweb.hu/drndr/tigris_irom%E1ny/2.%20RBC,%20WBC,%20HGB,%20Htk,%20MCV.pdf)

A klinikai laboratóriumi sejtszámlálást egy amerikai mérnök Wallace H. Coulter találmánya alapozta meg 1940-ben Chicago-ban. Az ún. **Coulter elv** még ma is alkalmazzák a modern haematológiai automaták 98%-ában. Az eljárást vérsejtek gyors számlálására fejlesztették ki : egy kis nyíláson gyorsan átfolyó, szűk nyalábban fókuszált elektrolit oldatban szuszpendált részecskék (vérsejtek+ vérplazma) egyenként haladnak át egy elektromos impedancia (ellenállás) mérő detektor előtt, s az egyes sejtek méretükkel arányos – az elektrolit oldattól eltérő - impedancia impulzust keltenek, melynek nagyságát és számát le lehet mérni, s ezek az impulzusok megjeleníthetők. [http://www.beckmancoulter.com/coultercounter/homepage\\_tech\\_coulter\\_principle.jsp](http://www.beckmancoulter.com/coultercounter/homepage_tech_coulter_principle.jsp) A modern cytometereken és vérkép automatákon mindezt a digitalizált jelek computer analyse teszi teljessé, s a legtöbb automatán a vörösvértettek és thrombocyták mérése a Coulter-elven alapszik.



1. ábra: A **Coulter-elv** értelmében hydrodinamikusan fókuszált (ellenáramló fiziológiás oldattal, sheath folyadékkal egy-sejtsor-szélességűre szűkített) sejtáramban

egyenként haladnak át a sejtek az impedancia detektor előtt. A visszafolyást az ún. Behrens kamra kettős falú ellenáramlása akadályozza meg. Így az egyes sejtek egyesével, és csak egyszer haladnak át a detektor előtt.

Az ún. „**3 part diff**” vérvékp autmatákon a vörösvértestek mellett a fehérvérsejtek 3 populációját (Granulocyta, Monocyta, Lymphocyta) is a Coulter-elv alapján mérik, míg az ún. „**5 part diff**”-es robustusabb vérvékp automatákon a morfológiailag igen variábilis megjelenésű, legalább 5 „normál” vérsajt populáció (Neutrophil-eosinophil-basophil granulocyta, Monocyta, Lymphocyta) mérésére ennél modernebb, de jóval költségesebb, lézer optikai mérési módszert alkalmaznak, az egyes automaták esetében meglehetősen jelentősen eltérő technikai megoldásokkal. Kívánatos lenne az olcsóbb, de a kvalitatív fehérvérsejtkép szempontjából elégtelen (az eosinophil és basophil sejteket figyelembe nem vevő) „3-part diff”-es gépeket modernebb, „5-part diff”-es típusokra cserélni, azonban ennek jelenleg elsősorban finaciális gátjai vannak. Szakmailag azonban feltétlenül indokolt egy nagyobb laborrendszeren belül a „**3 part diff**”-es **tájékoztató értékű mérések** mellett a rendszerben legalább egy „5 part diff”-es készüléket is üzemeltetni, mellyel a problémás esetek a precízebb eredményt adó „**5 part diff-es**” **automatákon megismételt méréssel** megoldhatókká válhatnak. Alternatívaként nagyszámú **kiegészítő vérkenet festést** alkalmaznak a legtöbb kis laboratóriumban (válogatott esetekben a nagyobb laboratóriumokban is), ami rendkívül munkaigényes, képzett munkaerőt kíván, s így is nagy a tévesztés lehetősége. A Bürker kamrás sejtszám kontrollálás annak rendkívül nagy szórása miatt teljes mértékben elavult, annak kontrollként való alkalmazása egyáltalán nem javasolható. Az „5 part diff”-es készülékek szélesebb körű elterjedését látszik segíteni a technológia gyors fejlődése, mely egyúttal olcsóbbá és megbízhatóbbá teheti a jövőben a vérvékp automaták klinikai laboratóriumi alkalmazását (pl. klasszikus Argon lézer helyett hosszú élettartamú, olcsóbb LED-ek alkalmazása, a szuszpenziós folyadék fókuszálásának, a folyadékrendszer technológiájának egyszerűsödése, a költségesen előállítható humán vér kontrollok kiváltása művi particulumokkal, pl. microbead műanyag részecskékkal). A kiegészítő kenetfestés automatizálása is megkezdődött (Sysmex’s Cell Image Analysis system), amely forradalmasíthatja a vérvékp automaták által kiszűrt „problémás” minták értékelését.[http://www.sysmex.com/us/files/CellaVision\\_1200\\_Brochure\\_13\\_Web\\_cc.pdf](http://www.sysmex.com/us/files/CellaVision_1200_Brochure_13_Web_cc.pdf)



2.ábra: kenetfestő és értékelő „Cell Image Analysis” rendszerrel kiegészített vérvékp automata sor („Sysmex utca”)

**A vérvékp automaták enormis minta feldolgozási kapacitásuk (90-120 minta/óra) és mérési precizitásuk (mintánként 10.000 eseményből számolnak statisztikát) miatt mára már nélkülözhetetlenné váltak a modern klinikai laboratóriumi munkában (PTE ÁOK LMI-ben kb. 250.000 vérvékp minta/év). Ennek óriási előnyei (pl. leukaemiák korai kiszűrése még a tünetmentes szakaszban) és hatalmas ára is van. „A vérvékp automaták alkalmazása számos kérdést megoldott, s számos olyan új kérdést vetett fel, amelyek az automaták nélkül nem is léteznének” (ismeretlen böcs). A hatalmasra növekedett numerikus és grafikus információra fokozott figyelmet kell fordítanunk (a vérvékp készülék mellett számos problémát megoldhatunk a numerikus és grafikus**

információ együttes, gondos tanulmányozásával), s természetesen az sem mindegy, hogy milyen típusú gépet (gépeket) használunk, illetve mennyire ismerjük a készülékeink „lelkét” (a méréstechnikából adódó kisebb-nagyobb előnyöket és hátrányokat). Ezt a vérkép diagnosztika szempontjából alapvető jártasságot csak a klinikai laboratóriumi normál és pathológiás minták időigényes, rendszeres nyomon követésével, a problémás esetek kiszűrésével, utóbbiak tovább vizsgálásával szerezhetjük meg. A **vérkép automata igen jellegzetes diagram típusait** tankönyvek kevésbé írják le, **magunknak kell megtanulnunk** munkánk során a klinikailag is fontos eltérések megjelenési formáját úgy, hogy ehhez felhasználjuk a kiegészítő **vérkenet festés**, cytochemia, áramlási cytometria eredményeit és az általános **laboratóriumi adatokat** (pl. We, CRP, PCT, LDH, Haptoglobin, vas háztartás serum paraméterei, B12, Ca, P, ALP, elektroforesis, immunfixáció, Ig-ok...stb). Igénybe kell vennünk emellett általában mindenféle **konzultációs lehetőséget**, ami a beteg vérképében észlelt gyanús eltérés megfelelő értékelését, s a beteg sorsát a továbbiakban alapvetően befolyásoló vizsgálatok elvégzésére történő mielőbbi javaslattételünket lehetővé teszi (pl. csontvelő, nyirokcsomó vizsgálat). Könnyen belátható, hogy **„mind az alul- mind a túldiagnosztizálás” súlyos károk okozhat** a beteg diagnózisának felállításában és késleltetheti a kezelést. Az amúgy is nagyszámú vérkép mérést tovább duzzasztja, hogy a kezelések **monitorozásához is** szükség van a vérkép alakulásának követésére. A vérképes asszisztensek és orvosok legtöbbször elsőként találkoznak váratlan, még nem diagnosztizált vérkép eltérésekkel, s elsőként kell jelezniük, ha a kezelés során valami rendellenes eredmény jelentkezik. A további **specifikusabb vizsgálatok** meglehetősen **költségesek** és **munkaigényesek** valamint **megterhelőek** lehetnek a beteg számára is (pl. flow cytometria, csontvelő-, nyirokszöveti vizsgálat, molekuláris vizsgálatok, CT, MR...stb), s e vizsgálatok szükségességére amúgy gondolni is kell (nem automatikusan „végződnek el”), s indokoltság esetén külön kérni kell ezeket. A vérkép automata őrei „mint tűt a szalmakazalból” kell kiemeljék a további vizsgálatokat igénylő eseteket, ami nagy türelmet és alapos haematológiai valamint technológiai háttér ismereteket igényel. A vérkép vizsgálatnak, mint **az egyik legrobosztusabb laboratóriumi szűrő jellegű tesztnek** egyúttal **gazdaságosnak** (legalábbis nem deficitesnek) kell lennie ahhoz, hogy a vérkép mérések kellő számban folyamatosan fenntarthatók legyenek a laboratriumi „budget” keretein belül. Ezirányú – a PTE ÁOK LMI-ben 1996-óta, különféle automatákkal szerzett - tapasztalatainkat szeretném megosztani a jelen összefoglalóban.

## FEJEZETEK

1. Technikai alapelvek.....5-7
2. Thrombocyta, erythrocyta, retikuloocyta mérés.....8-11
3. Anaemiák és vörösvértest anomáliák.....11-25
4. Fehérvérsejt populációk mérése.....25-36
5. Leukaemiák haemocytometriai mérése.....36-40
6. Flow cytometria.....40-52
7. Esetbemutató.....52-57

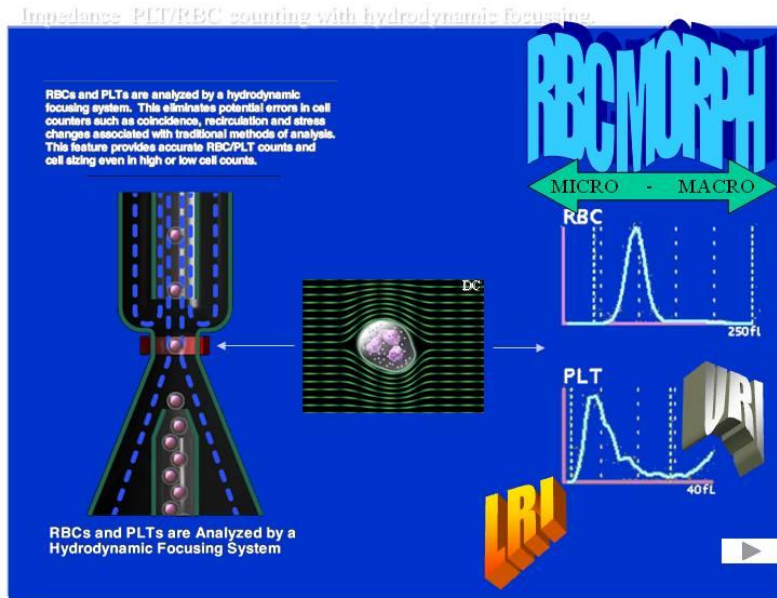
/1/ Technikailag a vérkép automaták („hematology analyser”) lényegében a többi automatizált laboratóriumi műszerhez hasonló elven épülnek fel. A nagyszámú minta feldolgozását lehetővé tevő mintaváltó (rack) rendszerbe kerülnek be a vérminták, melyeknek preanalitikai minősége a vérkép esetén kiemelt fontosságú. Vérkép mérést csak friss (4 órán belül feldolgozott) ún. „teljes vér” mintából végezhetünk, a minta nem eltehető (mint a lecentrifugált, szétválasztott szérum ill. plazma minta esetén), a szállítás és tárolás mérésig szobahőn történik, a sejtes elemek mérésekor különösen figyelniük kell a preanalitikai (vérvételi) zavaró tényezők kiküszöbölésére („kíméletes” vérvételi technika, alvadék, lipémiás, hemolizált vér kizárása), mert ezek zavart okozhatnak a mérő rendszerben (dugulás) vagy fals eredményhez vezethetnek (magas MCHC lipémiában, hemolizált

vérben). A véralvadás gátló típusa és a vérvétel módja is döntő lehet a helyes eredmény szempontjából. Csak a vacutainer (BD) rendszerben, lila-kupakos csőbe, standard EDTA:vér arányú „vérképes csőbe”, kíméletesen levett vénás vérminta alkalmas. Különböző minta volumenű csövekkel felnőt, gyermek és csecsemők részére ajánlott teljes vérvételi rendszerek (csövek+tűk+illesztékek) elérhetők <http://www.bd.com/vacutainer/products/venous/>. A nemzetközi ajánlások szerint a korábbi Melangeur pipettás, Bürker kamrás, ujjbegyből vett, „vámpir” módszerek **nem alkalmasak** a modern laboratóriumi vérkép mérésre, használatuk kerülendő! A helyes – NCCLS előírásoknak megfelelő - preanalitikai eljárás részletei megtalálhatók az interneten <http://www.bd.com/vacutainer/labnotes/2004winterspring/>. Nem alkalmasak vérkép mérésre a nem vénás, s az egyéb alvadásgátlóval vett minták sem. A heparin a thrombocyták összetapadása miatt fals alacsony thrombocytá számot eredményezhet, a citrát a sejtmorphológiát változtatja meg (zsugorodás) – bár utóbbi mintatípust bizonyos esetekben (pseudothrombocytopenia) ennek tudatában az EDTAs mérés kiegészítéseként alkalmazhatjuk célzott esetekben. Természetesen ilyenkor csak a thrombocytá számra vonatkozó információ lesz hiteles (lásd később). Az **alvadékos minta**, a „kíméletlen” vérvételi technika mellett abból is származhat, hogy a minták nincsenek jól összekeverve az EDTA-val (8-10x kell „átforgatni” a csöveket 180°-os szögben „óvatosan döntögetve” mindjárt a vérvételt követően), vagy rossz a vér:EDTA arány (pl. lejárt és/vagy helytelenül tárolt csövek csökkent vacuma miatt kevesebb mintafelszívás, súlyos hiba a vacutainer rendszer mellőzése – utóbbi remélhetőleg senki fejében nem fordul meg, a saját jól felfogott érdekében–infectio-sem!). A microalvadékok legtöbbször a vérkép automatába történő minta behelyezés előtt végzett gondos átvizsgálás ellenére sem szűrhetők ki teljes mértékben, így a készülék gyakori eldugulásához, s ami még rosszabb, **hibásan alacsony thrombocytá szám** mérési eredményhez (vérlemezék a helytelen preanalitika miatt aktiválódnak, a cső falához letapadhatnak), durvább esetben **fehérvérsejt számbeli és minőségi** összetétel eltéréshez (általában a granulocyták a legsérülékenyebbek) vezethet. Hasonlóan előnytelen változások történhetnek a minta helytelen szállítása és tárolása valamint az időn túl (max. 4-6 óra) mért un. „**előregedett vérminta**” mérésekor. A vörösvértest és reticulocytá paraméterek még a legstabilabbak (óvatos mérlegeléssel, s e vonatkozásban preferált mérési ill. műszer típusok mellett–lásd később) ezek az eredmények korlátozottan elfogadhatók akár még előző napi (max.24 órás) mintákon. Ilyenkor azonban a thrombocytá és fehérvérsejt eredmények biztosan nem adhatók ki. A vérkép automaták további specifikus tulajdonsága, hogy nem homogén folyadékból (szérum, plazma) mérnek, hanem egy esetenként gyors ülepedési tendenciát mutató (sülyedés=We) teljes vér sejtuszuspenziót kell mérnünk. A **minta felkeverés** és az ezt követő **mintafelszívás** technikai megoldása az egyes vérkép automata típusoknál igen sokféle (forgatás, döntögetés eltérő számban és szögekben). Ebből elsősorban a legkisebb részecske, a thrombocytá mérésében (számban) adódhat eltérés. Az elégtelenül felkevert mintában a letapadt vérlemezék miatt **alacsonyabb thrombocytá számot**, a túlzottan kevert mintában széteső sejtek törmeléke miatt vérlemezke méretű részecskék megjelenése miatt **fals magasabb thrombocytát** mérhetünk. A minőségi vérkép automata gyártók természetesen akceptálható mérési tartományt és hiba arányt szavatolnak, azonban így is a legkritikusabb a thrombocytá szám mérése, különösen az alacsony tartományban (20 ill. 10 G/L alatti tartományban), ahol egyébként a therápia szempontjából (vérlemezke transfúzió szükségessége?) a legfontosabb a korrekt eredmény. Ezesetben ráadásul a **klinikai szövödmény (vérzés) megjelenése nem feltétlenül korrelál az alacsony thrombocytá számmal** (pl. chronicus esetekben akár 5 G/L értéknél sincs vérzés), így a klinikus a thrombocytá pótlás indikációjának eldöntésekor (pótlás=immunizálódás veszélye, költségek versus pótlás nélkül=súlyos, fatális vérzés lehetősége) **elsősorban a korrekt laboratóriumi thrombocytá mérés eredményére kell hagyatkozzon**. A vérkép automaták további lényeges alkatrésze a minta higító és elosztó rendszer. A korábban ismertetett manuális vérsejt mérési technikákra utalva, a vérkép automatákban is legalább **3 féle minta hígítással** történik az egyes vérkép alkotók mérése: 1. a **Hgb** mérését a vérminta teljes lyzise révén (**Lyse oldat**), a felszabadított hemoglobin oldatban történő fotometriás mérésével valósítjuk meg (l. korábban: 510 nm, SLS-Hgb módszer); 2. a vörösvértestek **RBC** számát és méretét (MCV) valamint a thrombocyták **PLT** számát (és méretét) a Coulter elv segítségével fiziológias osmolaritású oldatban (**Sheath oldat**) mérjük [alapelv mint a Hayem oldatnál

lásd korábban].; míg 3. a fehérvérsejtek **WBC** mérése érdekében a relatív számfőlényben lévő vörösvértestektől először egy kíméletes lysissel (hypotoniás oldat, **Lyse+Diluens oldat**) szabadulhatunk meg, hogy a nagyságrenddel kevesebb fehérvérsejteket számlálni tudjuk [alapelv mint a Türk oldatnál lásd korábban a manuális módszernél]. Azon kívül, hogy láthatjuk, hogy a legegyszerűbb esetben is egy **vérkép automata legalább 3 féle oldattal** (+hypo alapú mosó-öblítő=**Wash/Clean oldat**) dolgozik, világos, hogy az egyes frakciók **Hgb-RBC/PLT-WBC** mérése külön-külön történik (a mintaelosztó az egyik legkényesebb mechanikai része a gépeknek). Részben az ebből levezethető **technikai hibák** a rendszer ismeretében könnyen felismerhetők (pl. a származtatott RBC paraméterek különböző mérések hányadosaiból képződnek, alkalmasak a gép technikai állapotkövetésére is – pl. magas MCHC=fals magas fotometriás Hgb mérés vagy MCV méret detektálási hiba pl. oldat osmolaritás miatt, szelektív WBC vagy RBC és PLT mérési hibák az adott csatornák dugulására vagy szennyeződésére utalhatnak). Részben pedig a **biológiai okok a mérés technikával karöltve** hozhatnak létre meglepő mérési eredményeket, „hibákat”. Utóbbira kiváló példa az, amikor az **extrémén magas fehérvérsejt szám** (egyed leukaemiákban, pl. CLL-ben ez akár 500.000-1.000.000/μl WBC is lehet !) mérése interferál a betegség miatt súlyosan alacsony RBC szám (anaemia akár 1-2 T/L) mérési eredményével. Miért interferál a két mérés, hisz a gépek külön csatornákon mérik a két paramétert, s a gyártók is általában igen széles mérési tartományban garantálják a mérések linearitását? Nos, ehhez azt kell tudnunk és megértenünk, hogy a RBC/PLT-csatornában a 2 mért komponens mellett – bár elhanyagolható számban – a fehérvérsejtek is jelen vannak. Normálisan ezek száma nagyságrenddel kisebb mint a RBC szám (T/L vs G/L) és nagyobb méretükkel nem zavarják a PLT mérést sem. Ha azonban a RBC méretnél csak alig nagyobb fehérvérsejtek a fent említett extrém mértékben felszaporodnak (1.000.000/μl WBC = 1.000 G/L = 1 T/L) már szignifikáns mértékben zavarhatják az egyúttal anaemia miatt igen alacsony RBC szám (1-2 T/L) mérését (fals magasabb RBC-t ad ki a gép!). Fordítva (WBC csatorna, csak lizált fehérvérsejtekkel) természetesen ez a tétel már nem érvényesül. A későbbiekben különböző vérkép automatákon konkrét példákat hozunk annak bemutatására, hogy a mérés technikai háttér alapos ismerete esetenként (készülék-technológia típustól függően) hogyan befolyásolhatja akár alapvetően egy-egy eredmény interpretálása kapcsán a klinikai vonatkozású döntésünket. Végül, mielőtt e konkrét, tanulságos esetek ismertetésére térnénk a vérkép automaták még egy jellegzetességére szeretném felhívni az olvasó figyelmét. A véralvadás és vérgáz méréshez hasonlóan (ahol szintén kötelezően csak friss mintából és/vagy teljes vérrel dolgozhatunk) igen nehéz a vérkép automaták minőség biztosítása. A **QC (quality controll)** célokra gyártott egyes teljes vér kontrollok a sejtmorphologia megőrzésének igényével rendkívül problematikus, költséges, s jelenleg sem tökéletesen megoldott. Az egyes cégek által forgalmazott **gyári kontrollok** rövid lejáratúak, drágák, többnyire csak a főbb sejtszámok mérésére, s nem a fehérvérsejt morphologia mérésére alkalmasak, általában csak a célkészüléken mérhetők megbízhatóan, éppen a legkritikusabb extrém alacsony és magas tartományokban nem elérhetőek. Mint ahogy nem találták még fel a megbízhatóan transzfundálható „művért”, úgy a vérkép kontrollok is humán vagy állati alapúak, a fixálási eljárások miatt jelenleg csak torzított karikatúrái a friss humán vér kontrollnak. A helyzetnek megfelelően a **nemzeti szintű QC** programokban (melyek a gyártói érdekektől független non-profit szervezetek) az egyik legnagyobb kihívás a megfelelő (mindenki számára gyorsan elérhető, stabil minőségű, az összes használatban lévő géptípusra érvényes, az alapvető paramétereken túl minőségi vérképre is adaptálható) vérkép és flow cytometriai körkontrollok biztosítása. Az előírásoknak megfelelő **napi belső és rendszeres külső kontrollok**, a gépek rigorózusan korrekt **karbantartása** mellett kiemelt jelentőségű a vérkép automaták esetében a **kezelő és validáló személyzet** folyamatos odafigyelése, a kóros esetek kiemelése mellett a normál vérképi variációk és a gép állapotának folyamatos nyomonkövetése. Mindez alapvető feltétele annak, hogy a vérképes rezorton a káosz helyett olyan **diagnosztikus fegyelem** uralkodjon, amely az ismert (és gyakran váratlanul felismert) haematológiai betegségek súlyosságával összhangban áll.

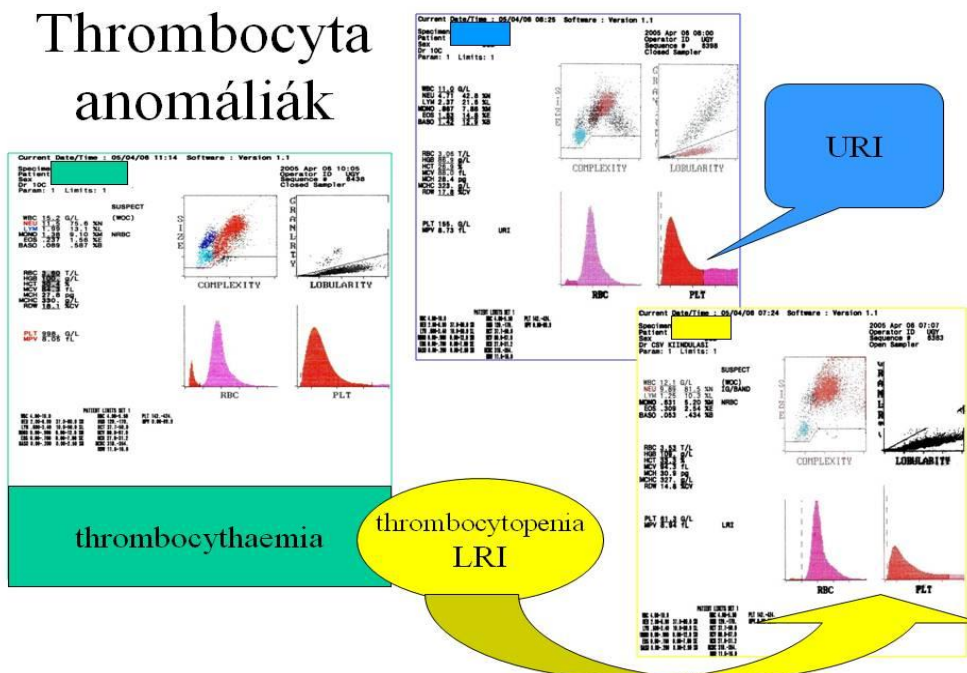
/2/ Thrombocyta, erythrocyta és reticulocyta mérés:

# RBC és PLT paraméterek mérése



3. ábra: Coulter-elven mért vörösvértest (RBC) és vérlemezke (PLT). Az RBC morphologia a histogramon (micro – macro) mérhető, a PLT csúcs alsó régiói (LRI=lower range interference) ill. felső határa (URI=upper range interference) kérdéses lehet, hogy ott thrombocyta-e a mért részecske, vagy más partikulum, vagy kisebb méretű RBC? Sysmex demo anyag (módosított).

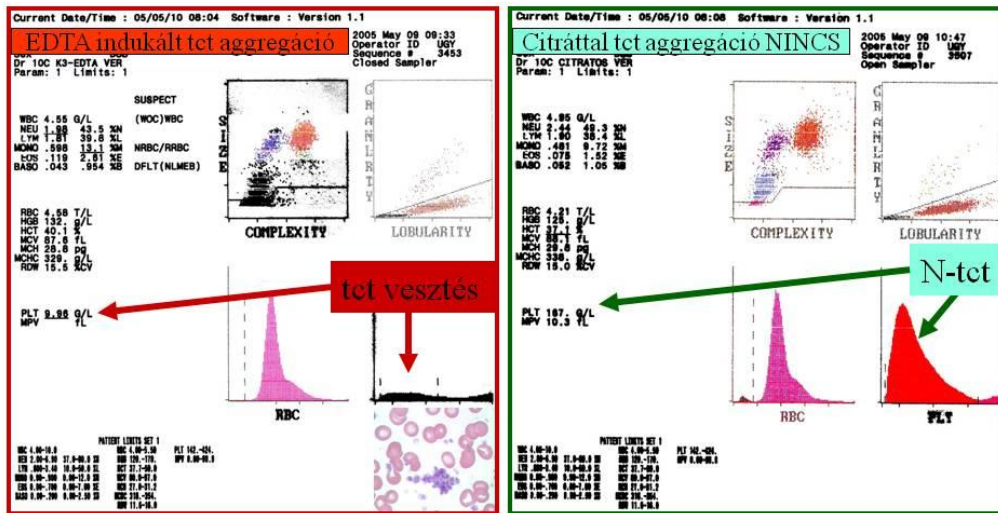
## Thrombocyta anomáliák



4. ábra: Klinikai példák a sok thrombocytára (thrombocytosis), thrombocytopeniára LRI-vel valamint az URI (kis vörösvértest átfed a nagy thrombocytával) CD3700-es gépen (saját anyag).



# Pseudothrombocytopaenia



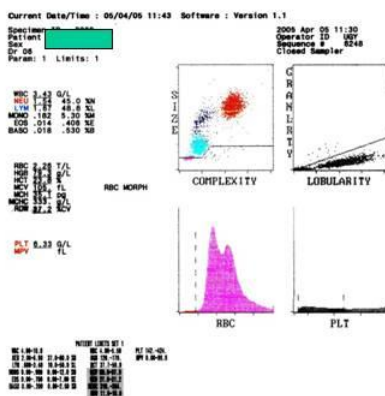
5.ábra: Az EDTA alvadásgátló anyag indukált un. Pseudothrombocytopaenia CD3700-es gépen. Az EDTAs vérvétel néhány betegen látszólagos vérlemezke hiányt okoz a mérésnél, a kenetben aggregátumok láthatók (bal oldali ábra). A jobb oldali ábrán a citrátos vérvétellel korrigált helyes eredmény (zöld) látható. A pseudothrombocytopaenia többnyire veleszületett ritka állapot, legfeljebb a laborvizsgálatnál kellemetlen (felesleges aggodalom ill. beavatkozások). Lehet azonban tumoros betegeken szerzett is, ezt még nehezebb az alapbetegség mellett azonosítani, s zavarhatja a kezelést is (fals alacsony PLT miatt indokolatlan pótlás, fals dg). CD3700 mérések, saját anyag.

## RBC származtatott paraméterek

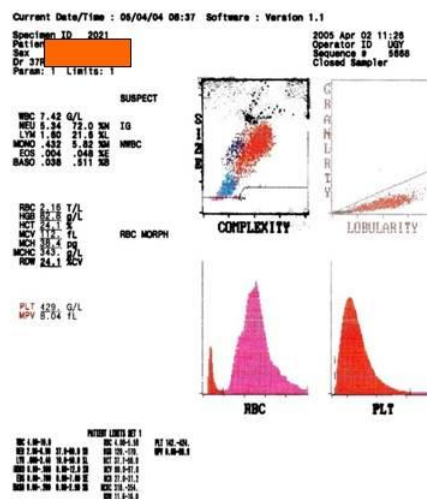
1. **MCV (Mean Cell Volume) =  $\frac{Htc}{RBC}$**   
 A hematokrit és a vörösvérsejtszám hányadosa, az átlagos (vörösvér) sejtterfogatot adja.  
 Mértékegysége: fl.
2. **MCHC (Mean Cell Hemoglobin Concentration) =  $\frac{Hgb}{Htc}$**   
 Átlagos celluláris hemoglobin koncentrációt jelent, értékét a hemoglobin koncentráció és a hematokrit hányadosa adja.  
 Mértékegysége: g/l.
2. **MCH (Mean Cell Hemoglobin) =  $\frac{Hgb}{RBC}$**   
 Az egy sejtre eső hemoglobin mennyiségét jelenti, a hemoglobin koncentráció és a vörösvérsejtszám hányadosa.  
 Mértékegysége: pg.
3. Az **RDW (Red Cell Distribution Width)** érték a vörösvérsejt-csúcs magasságának 20 %-nál mért eloszlás-szélessége, az esetleges poikilocytosis mérőszáma.

6.ábra: A vérkép automaták a mért paraméterek (RBC, Hgb, MCV) mellett származtatott paramétereket is kiadnak. Ezek ismerete az anaemiák osztályozásában lényeges. Természetesen a gépeink technikai monitorozásánál is figyelniük kell ezekre (pl. magas MCHC = szabad Hgb lehet haemolítikus anaemia miatt, azonban hibás lenne minden esetben biológiai jelentőséget tulajdonítani ennek, a folyadékrendszer szennyeződésére is utalhat – döntés a kezelő - egyéb adatok, pl. LDH, indirekt bilirubin, Haptoglobin figyelmbe vétele).

## Vörösvértest diagram anomáliák



**Bimorph RBC  
(transfusio)**

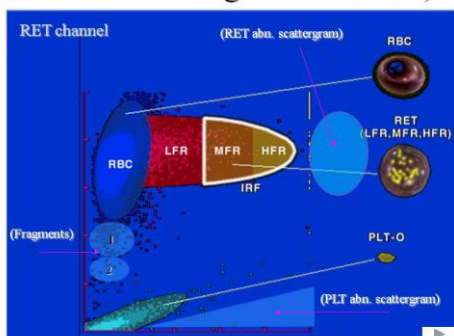


**Haemolyticus anaemia**

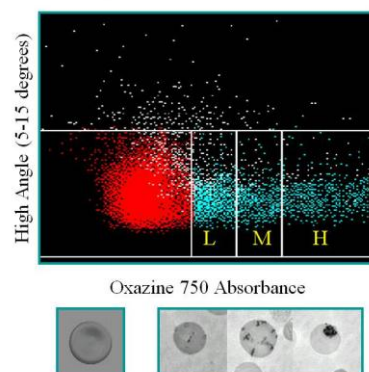
7.ábra: Példák a RBC morfológiai eltérésekre (kettős RBC populáció transzfúziót követően). Haemolyticus RBC görbe egyenetlenség a lizáló RBC-k miatt. CD3700 saját anyag.

8.ábra: A reticulocyták (a csontvelőből frissen kikerült, még nem teljesen kiérett, retikulált=DNS,RNS<sup>+</sup> korai vörösvértest alak). A kiérett RBC fluorescens negatív, a reticulocyták érettségüknek megfelelően magas (HFR), közepes (MFR) vagy alacsony (LFR) fluorescenciájú reticulocyták. A reticulocyták néhány napig keringenek még a vérben míg kiérnek. Sysmex demo.

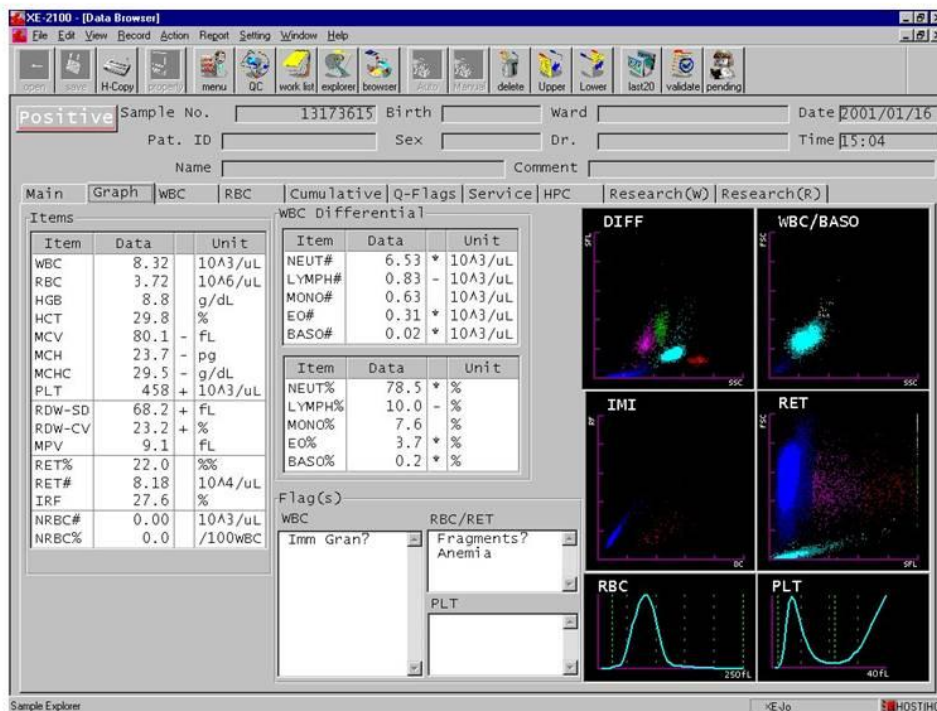
Reticulocyták mérés (acridine orange fluoreszcencia = gold standard)



Reticulocyte Cytogram and Relationship to Maturity



# Reticulocyta mérés



9.ábra: Kezeletlen anaemiában általában alacsony RET számot mérünk. Kevesen tudják (és még kevesebben alkalmazzák) azonban, hogy ha az anaemia hypoproliferatív vagy aplasticus (csökkent képzés) hátterű, az IRF viszonylag alacsony arányú, míg a tisztán vashiányos anaemia magas IRF-el jár. <http://www.beckmancoulter.com/literature/ClinDiag/recticliterature.pdf> Az IRF lehet korai erythropoiesis marker is pl. csontvelő transzplantáció legkorábbi, graft megtapadási időszakában [http://www.nzimls.org.nz/121.html?articles\\_id=124](http://www.nzimls.org.nz/121.html?articles_id=124) Sysmex XE2100-on mért, vashiányos anaemia saját anyag.

### /3/ Anaemiák és erythroid anomáliák:

## ANAEMIÁK

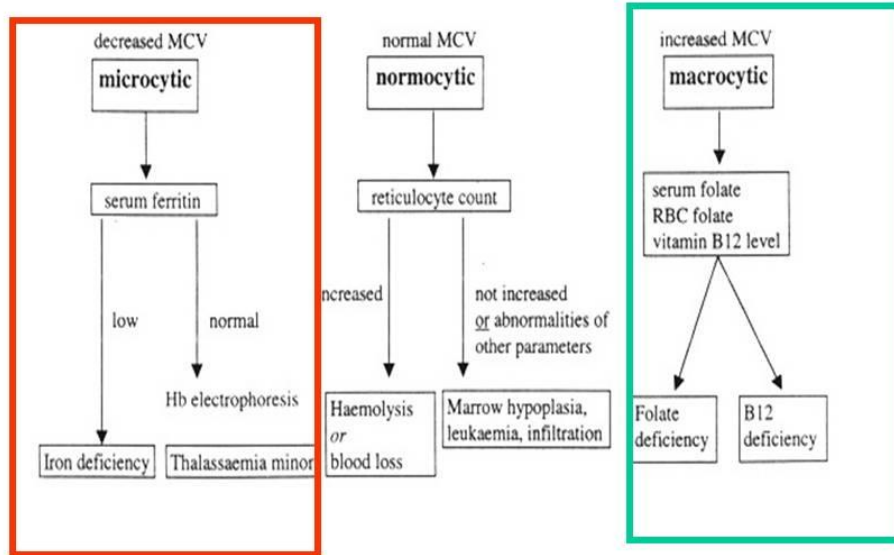
1. Microcyter / hypochrom anaemiák
2. Macrocyter / hyperchrom anaemiák
3. Normocyter / normochrom

- veleszületett
- Szerzett

- Csökkent termelés (pl. aplasticus)
- Fokozott lebomlás (pl. haemolyticus)
  - intrinsic
  - extrinsic

10.ábra: Az anaemiák sokfélék, többféle kategorizálás fut egymással párhuzamosan.

## Anaemiák típusai



11. ábra: A három fő anaemia típus, amely a sejt méreten (MCV=micro-normo-macrocyter) alapul alapvetően eltérő okokból alakul ki, a megfelelő kezeléshez korrekt diagnózis kell. Ezt legpontosabban és legolcsóbban a vérkép automaták tudják lemérni.

## Tünetek



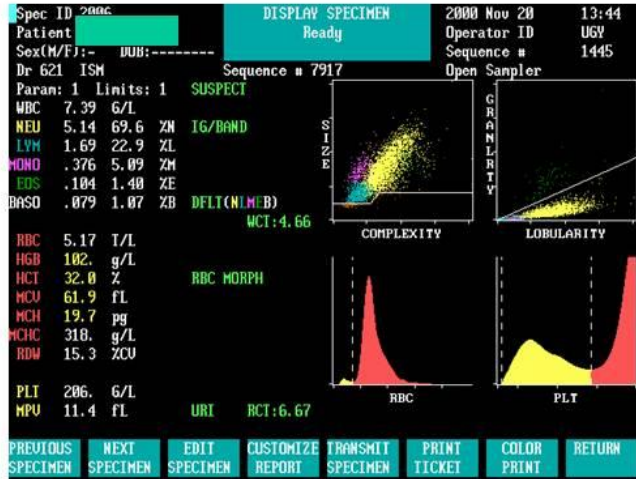
A vörösvérsejtképzés és az anaemiák általános jellemzői



deformitások thalassaemia major és más súlyos congenitalis haemolyticus anaemia esetében.  
Ha az anaemia infekcióval vagy spontán vérzésekkel társul, neutropenia vagy thrombocytopenia egyidejű fennállása valószínűsíthető.

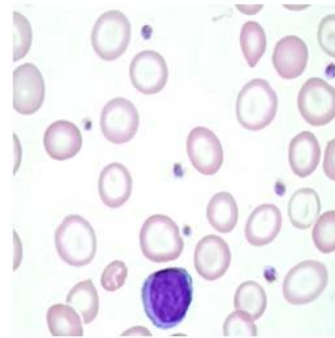
12. ábra: Az anaemiáknak kevés specifikus tünete van, sokszor inkább csak fáradtság, levertség jelzi. Forrás: Hoffbrand-Petit: Haematologia.

13.ábra: Microcyter / hypochrom anaemia CD3700 képe. A sárga színnel jelzett számok és a keskeny, „balratolt” piros hisztogram jelzi az alacsony MCV-t. Kis RBC-ben ugyanakkor általában arányosan kevesebb Hgb (MCH) mérhető. Ez igaz a tiszta vashiányos anaemiában. Saját anyag.



Cell Dyn3700

2. sz. ábra: Vashiányos anaemia

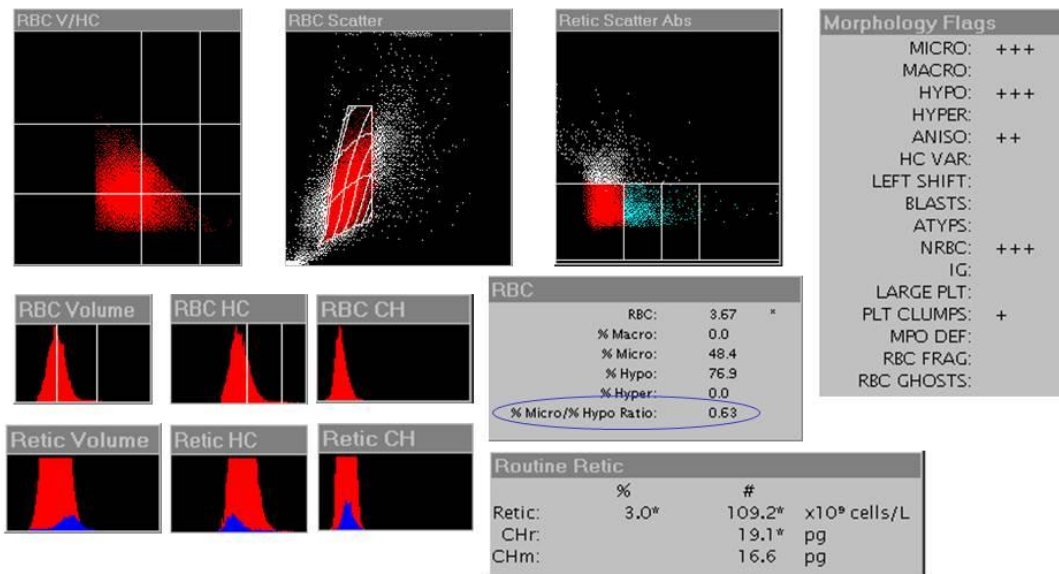


3. sz. ábra: Perifériás vérkenet vashiányos anaemiában

\*\*\*

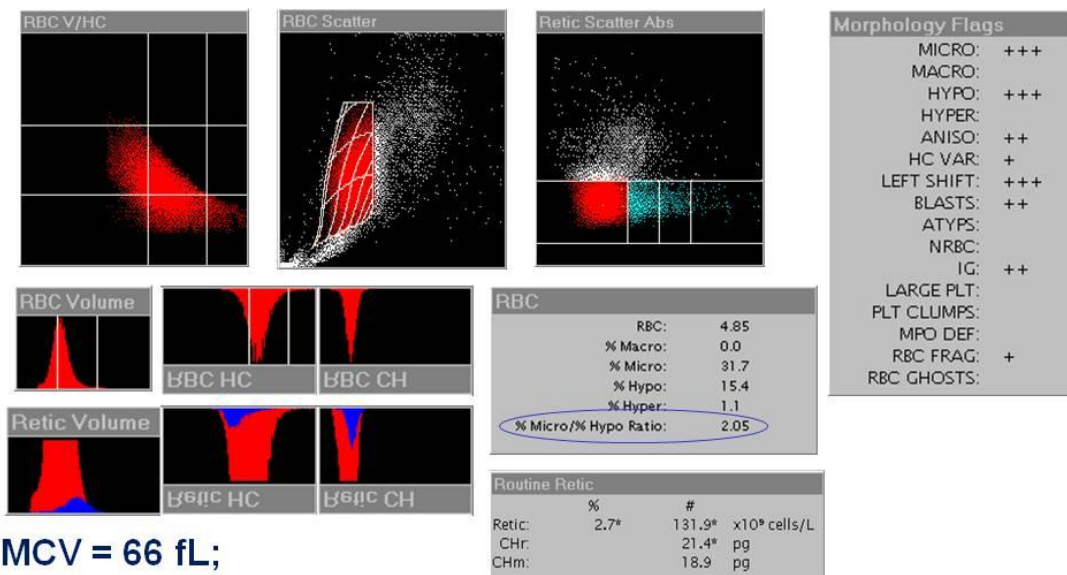
14.ábra: Az Advia (korábban Technikon) automaták nem Coulter elven, hanem lézer optikai elven mérik a vörösvértesteket. Egy vashiányos anaemia esetén látható, hogy nemcsak az RBC Volume (MCV), de az RBC és Retic HC (MCH,reticulocytá Hgb Concentráció) egyedi sejteloszlás is a hisztogramokon és a felső 2D dot-plot diagramokon is mérve és ábrázolva van (a legtöbb, Coulter elven működő automata csak az MCV eloszlást méri, az MCH-t származtatott átlagértékként adja meg). Ennek a 2D-s RBC mérési technikának a korai vashiányos anaemiában nagy számban jelenlévő un. Hypochrom RBC (Hypo%) lehet jelentősége. A korai anaemia diagnózist szolgálhatja, amikor az átlag MCH még alig mozdult el. Jól monitorozható pl. a dializált betegek anaemiája, akiknél a vaspótlás mellett rendszeres erythropoietin kezelésre is szükség van. A vérkép azért is igen fontos, mert ezeknél a betegeknél a vas háztartás egyéb okok miatt nehezen megítélhető (akut fázis reakció=fals ferritin és transferrin serum szintek). A sTFR vizsgálat és az EPO mérés pedig meglehetősen költséges eljárások. Bayer Advia demo anyag.

## Vashiányos Anemia



- **MCV = 61.1 fL; M/H ratio = 0.63**
- **Diagnosis: vashiányos anaemia**     **M/H < 0.9 : Vas hiány**

## $\beta$ -Thalassemia

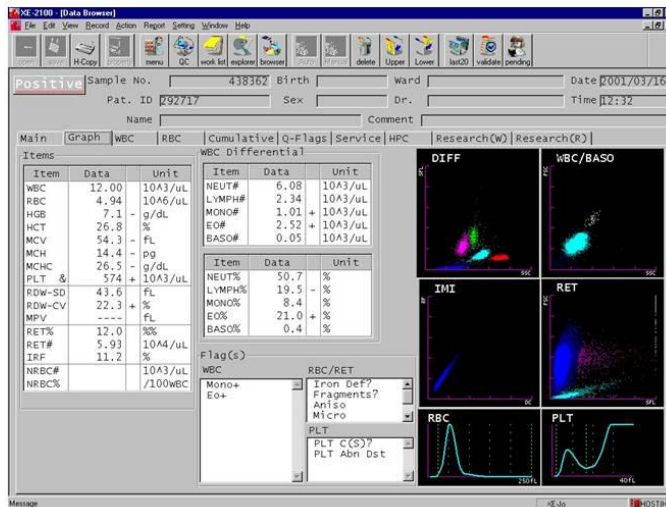


- MCV = 66 fL;**  
**M/H ratio = 2.05**  
**Nincs vashiány**  
**(iatrogén vastúlterhelés)**

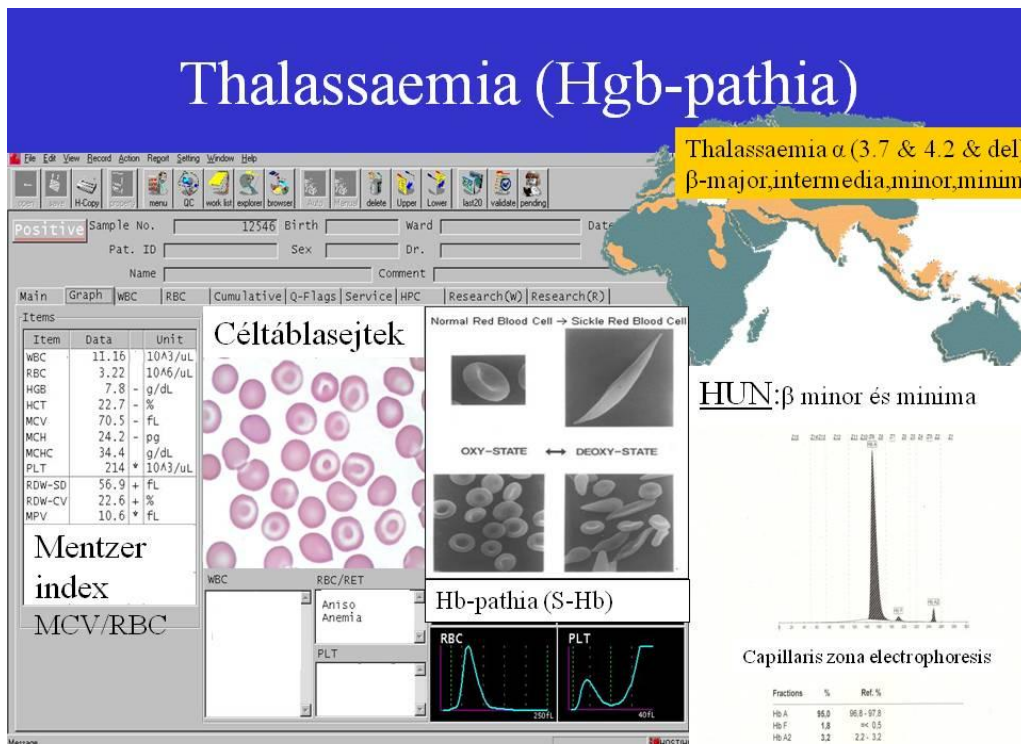
**M/H > 0.9: Nem igazolható vashiány**

15. ábra: Segíthet az Advia a  $\beta$ -thalassemia gyanús betegek kiemelésében is. Ezen esetben 30% feletti microcyter RBC-hez mindössze 15% hypochrom sejt tartozik, ez az arányeltolódás az MCV/MCH arányban thalassemia gyanúját veheti fel. Bayer Advia demo anyag.

## VASHIÁNYOS ANAEMIA? Sysmex



16.ábra: A Sysmex automata flag üzenet jelzi is a microcyter / hypochrom anaemia lehetséges vashiányos okát. Ezen esetben azonban a mérsékelt alacsony MCV-vel (54,3 fL) nem arányos a rendkívül alacsony MCH (14 pg) és a csaknem normál RBC (4,94 T/L) értékekkel. Az IRF sem magas. Az esetről nem zárható ki Thalassaemia lehetősége sem. Saját anyag.



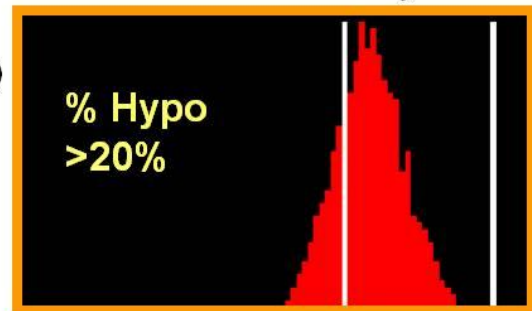
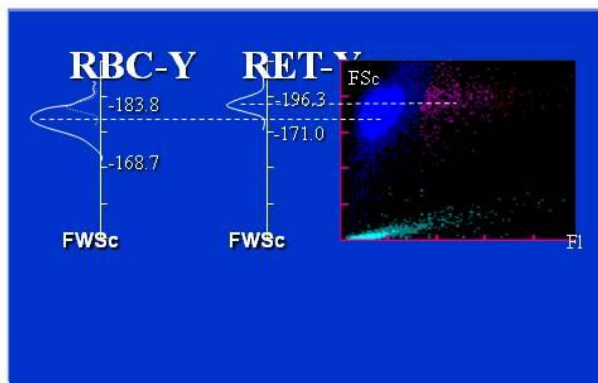
17.ábra: Azért sem kell elkeserednünk, ha nem Adviánk van, mert bármely gépen mért Mentzer index (MCV/RBC<19) meghatározással kiszűrhetők, majd kenetnézéssel és capillaris zóna elektroforézissel vagy HPLC-vel tipizálhatók, molekuláris vizsgálattal sequenálhatók az egyes specifikus haemoglobinopathiák között a thalassaemiák. Saját tapasztalatunk szerint hazánkban nem kevés a  $\beta$ -thalassaemia minima és minor. Ha a microcyter anaemia nem vashiányos eredetű, szigorúan tilos vaspótló kezelést (különösen iv vaspótlást alkalmazni) ezzel ugyanis iatrogén (orvos által okozott) súlyos haemosiderosist (a szervekben toxikus vas felhalmozódást) okozhatunk oktanul betegünknek.

## Vashiány meghatározására alkalmazott új laboratóriumi tesztek

### 1. Ferritin index (sTfr/log ferritin arány)

- emelkedett szint funkcionális vashiány

### 2. Hypo% (RBC Hb-Fe marker)



### 3. Ret Hb tartalom

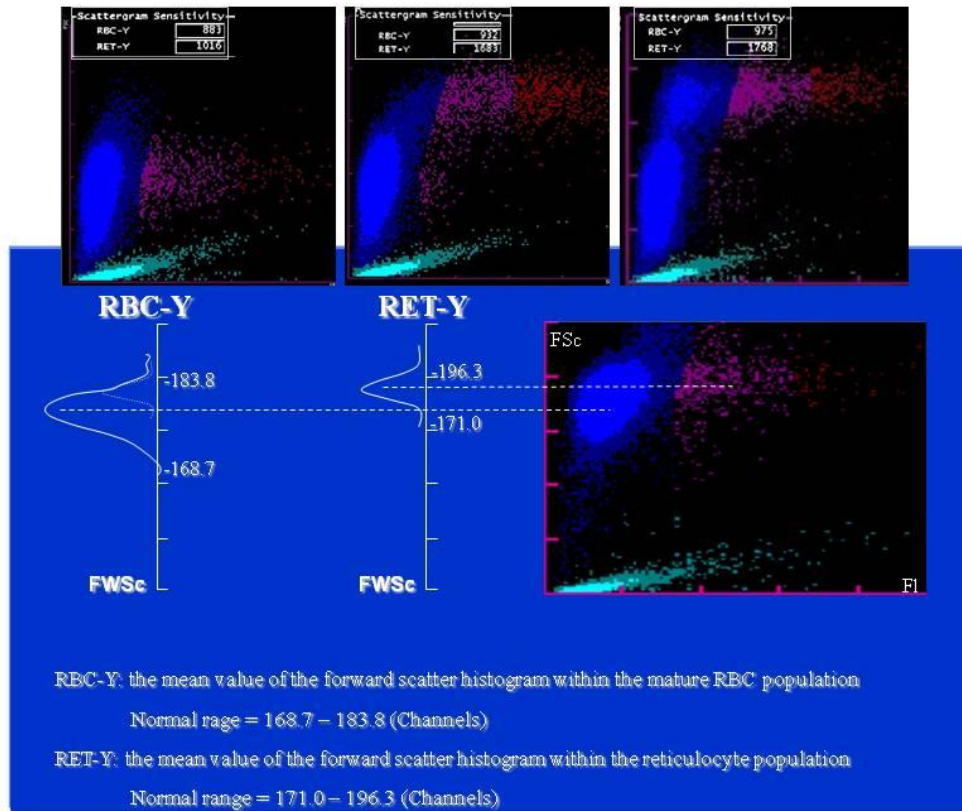
(korai RET Hb-Fe marker)

18.ábra: Microcyter anaemiákban számos laboratóriumi eszközünk van még annak igazolására vagy kizárására, hogy – az egyébként leggyakoribb – vashiányos állapot okozta anaemiával állunk-e szemben? Az Advia vérkép automatákon mérhető un. Hypo% mint gold standard korai vashiányos anaemia marker mellett a Thomas-féle osztályozásban alkalmazható két további paraméter mérhető részben serumból : 1./solubilisTransferrinReceptor / log Ferritin arány = tükrözi a szervezet vassal való ellátottságának mértékét), másrészt a Sysmex XE2100 automatán mérhető 2./ reticulocytá Hgb (RET-Y), mely a hypo%-al egyenértékű információt ad a haemoglobin szintézis „legfrisebb” (reticulocytá szintű) állapotáról. Vagyis arról, hogy aktuálisan mennyi Hgb épül be a reticulocytákba (néhány napra visszavetíthető információ). Ezek a paraméterek a thérapia hatásának gyors követésére is alkalmasak.



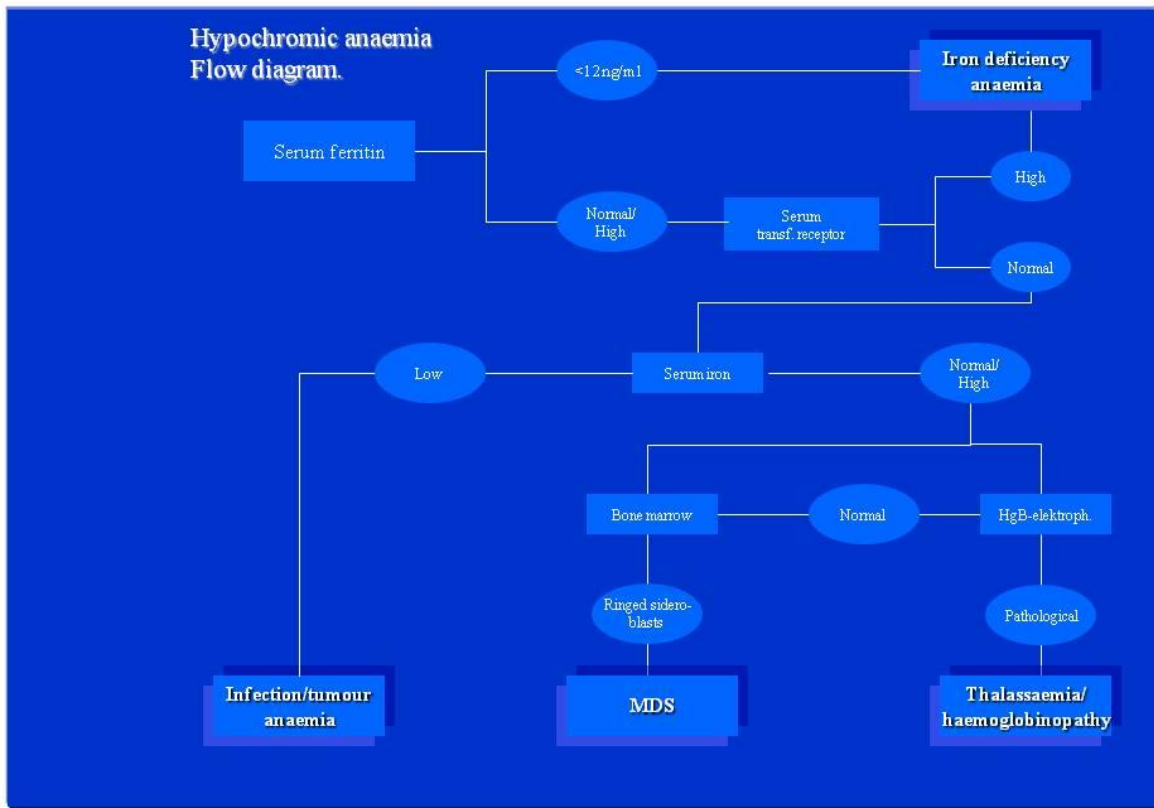
19.ábra: Vashiányos anaemia kezelésének monitorozása reticulocyta és ret-Hgb (RET-Y) méréssel. Látszik a vas kezelési napok során emelkedő tendencia. Sysmex demo.

## VASHIÁNYOS ANAEMIA KEZELÉSÉNEK KÖVETÉSE



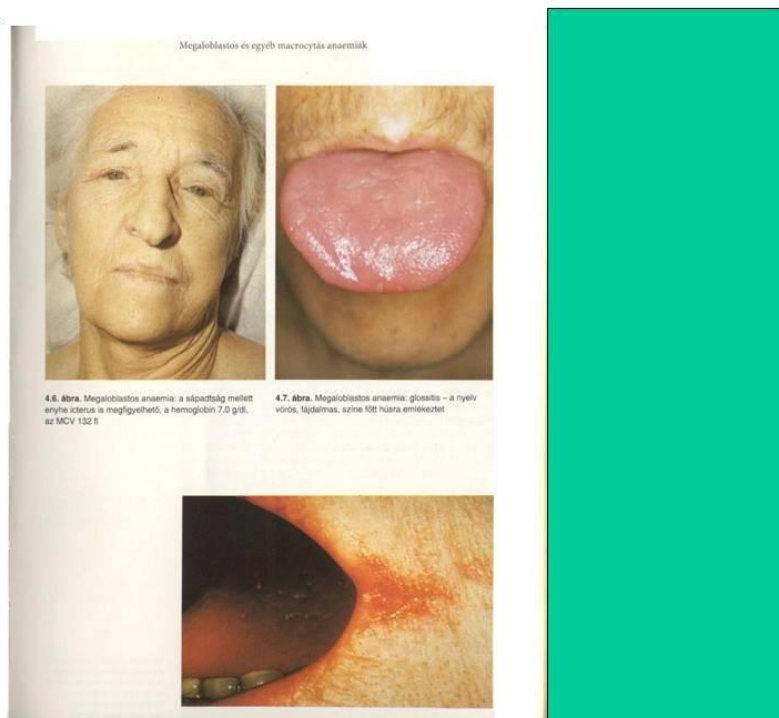
\*\*\*

20.ábra: A microcyter / hypochrom anaemiák laboratóriumi differenciál diagnosztikájában a serumból mérhető vas háztartás paramétereknek döntő szerepe van, azonban a vizsgálati sorrend logikai alapon jelentősen eltér az általában helytelenül értelmezett gyakorlattól: 1. ferritin=a vasraktár telítettségét jelzi, a „valódi vashiány, vashiányos anaemia” ezzel a vizsgálattal diagnosztizálható, a Se-TransferrinR emelkedés (és a Se-Trf és saturáció csökkenés) ezt alátámasztja 2. Normál Se-TransferrinR + alacsony Se vas „funkcionális vashiányra” utal (a vas felhasználás csökken gyulladásban, tumorban, holott a vasraktárak teltek), 3. ugyanez normál serum vas mellett (haemoglobinopathia) vagy akár emelkedett serum vas értékekkel (MDS-Ring Sideroblastos) a Hgb szintézis és vas felhasználás súlyosabb zavarára utal. A sTrfR mérés lehetősége nem mindenhol adott (meglehetősen költséges is), a serum transferrin + saturáció mérés is beilleszthető a fenti sémába.



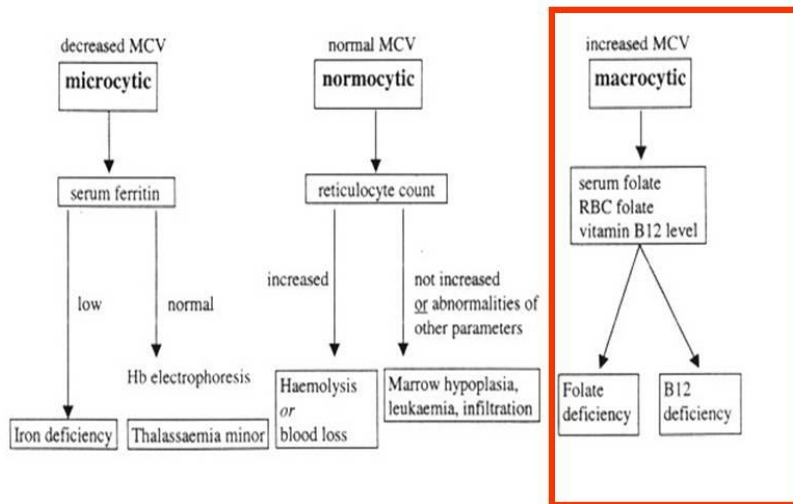
21.ábra: Macrocyter anaemia jellegzetes tünetei. Ösz haj, hypopigmentáció, macroglossia, szájjúg sebek. Forrás: Hoffbrand-Petit: Haematologia.

## Tünetek



22. ábra: A macrocyter (hyperchrom=„nagy RBC-be sok Hgb fér”) anaemia két legfőbb oka a B12 ill. a Fólsav vitamin hiány.

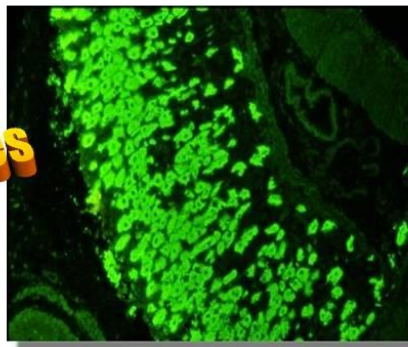
## Anaemiák típusai



23. ábra: Az anaemia perniciosa hátterében legtöbbször a gyomor parietális sejtjei ellen termelődött autoantitest áll, mely az intrinsic factoron (IF) keresztül gátolja a B12 vitamin felszívódását. A régebben fatális, ismeretlen okú betegség gyógyításához kezdetben nyers máj kivonatot alkalmaztak (a máj termeli az IF-t), a felfedezésért 1934-ben hárman (G.Whipple, G.Minot és W.Murphy) nobel díjat kaptak.

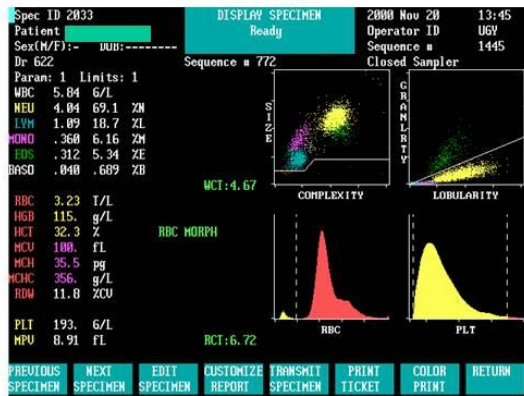
## Anaemia perniciosa pathogenesis

immunfluorescens festés

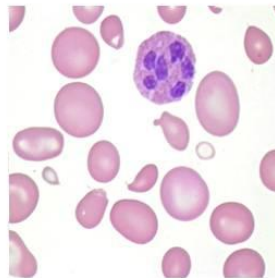


gyomorparietális sejtjei elleni autoantitestek

24.ábra: Macrocyter / hyperchrom anaemia vérkép megjelenése CD3700 automatán. A sárga számok az anaemiát, a lila számok annak macrocyter/hyperchrom jellegét mutatják. A kenetben a macrocyter / hyperchrom és nagyságban-alakban-festődésben variábilis (anisocytosis + poikilocytosis + polychromasia) beteg vörösvértestek mellett jellemző, hogy a fehérvérsejtek (és általában minden más humán sejt is) macrocyterek (magnagyobbodtak) ill. sejtmag kiérési zavarokat mutatnak a B12 hiánnyal összhangban, mely vitamin a sejtosztódásban játszik fontos szerepet (itt hypersegmentált neutrophilt látunk).



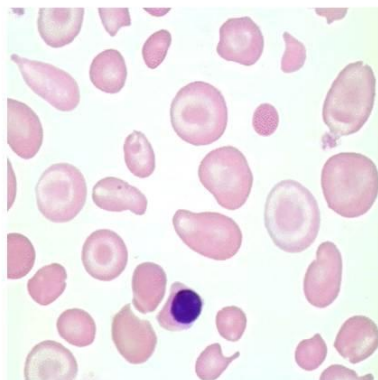
Anaemia perniciosa



Perifériás vérkenet anaemia perniciósában  
(az ábrán hypersegmentált neutrophil figyelhető meg)

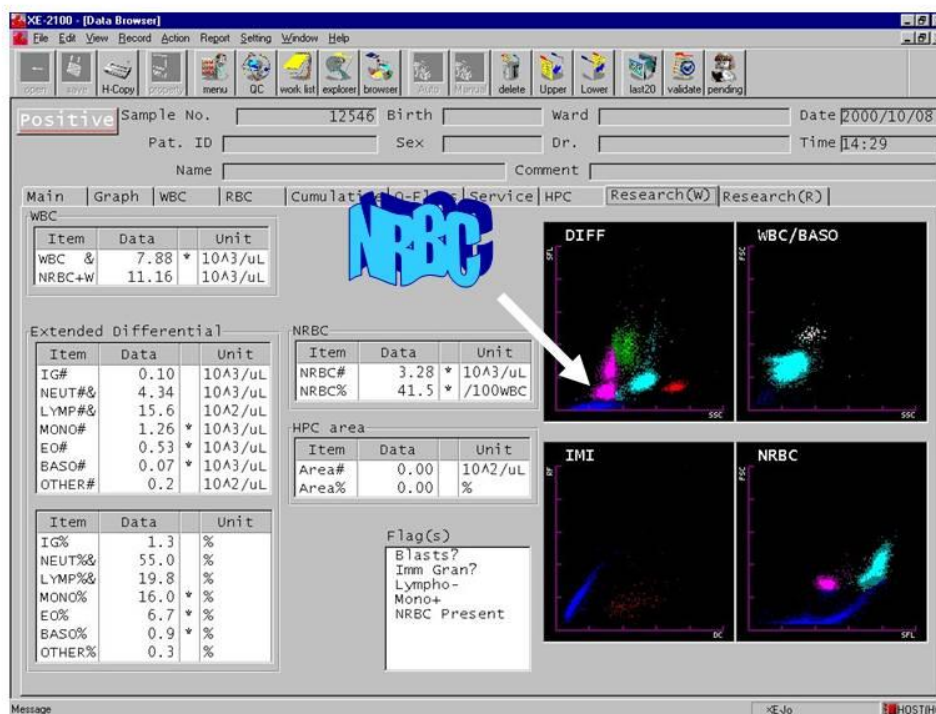
25.ábra: Egy magas vörösvérsejt látható számos céltáblasejt között.

## Haemolyticus anaemia



26.ábra: Haemolyticus anaemiás beteg magas vörösvérsejtekkel (NRBC). A magas vörösvérsejtek igen nagy számban előfordulnak újszülött vérmintákban is, ahol a fetalis Hgb helyét a felnőtt típusú Hgb váltja fel igen gyors ütemben (néhány nap alatt adaptálódik az újszülött az extrauterin élet megkövetelte adult típusú Hgb-t tartalmazó vörösvértestek termelésével, amit RBC sejtstézis és fiziológiás átmeneti sárgaság kísér). Az újszülött és koraszülött vérek korrekt mérése a kis vérvolumen mellett az NRBC-k zavaró hatása miatt sem könnyű feladat. Saját anyag.

## Magvas vörösvérsejtek vérkép automatán

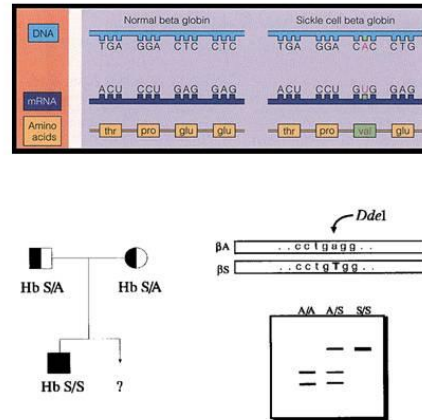
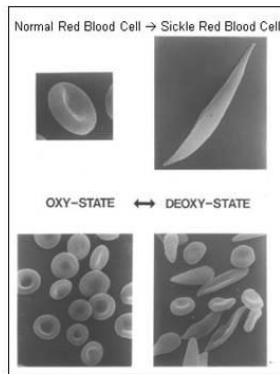


\*\*\*

A következőkben olyan vérkép morfológiai eltéréseket fogunk tárgyalni, melyeket vérkép automatáinkkal nem tudunk diagnosztizálni. Ezek a gyakoribb-ritkább eltérések teszik igazán indokolttá a kiegészítő kenetfestéseket ill. azt a törekvést, hogy a vérkép analizisét egy másik aspektusból is (Cell Image Analysis) automatizálni igyekezzünk.

## Specifikus alak eltéréssel járó anaemiák

**sarlósejtes**



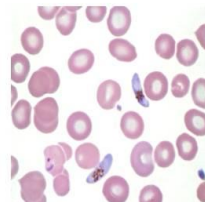
27. A híressé vált sarlósejtes anaemiában egyetlen aminosav csere a Hgb molekulában olyan sztérikus változásokat okoz, amely az oxigént nem hordozó Hgb állapotban a szerkezet (s ezzel együtt a vörösvértestek) összeesését okozza („sarlósejtes morphologia”). Ez a haemoglobinopathia monogén, recesszíven öröklődő, földrajzi halmozódást mutat, s paradox módon a maláriás területeken ezt a genetikai hibát hordozó egyéneket „megvédi” a malária fertőzésektől. Ez a „védelem” a plasmodium kórokozók vörösvértestekben (is) zajló életciklusával függ össze, t.i. a sarlósejtes RBC-ben a plasmodium nem tud szaporodni, s ez a természetes szelekció okozta túlélési „előny” okozza a maláriás területeken a nagyobb számú sarlósejtes anaemia esetet is.

## Specifikus alak eltéréssel járó anaemiák

**malária**



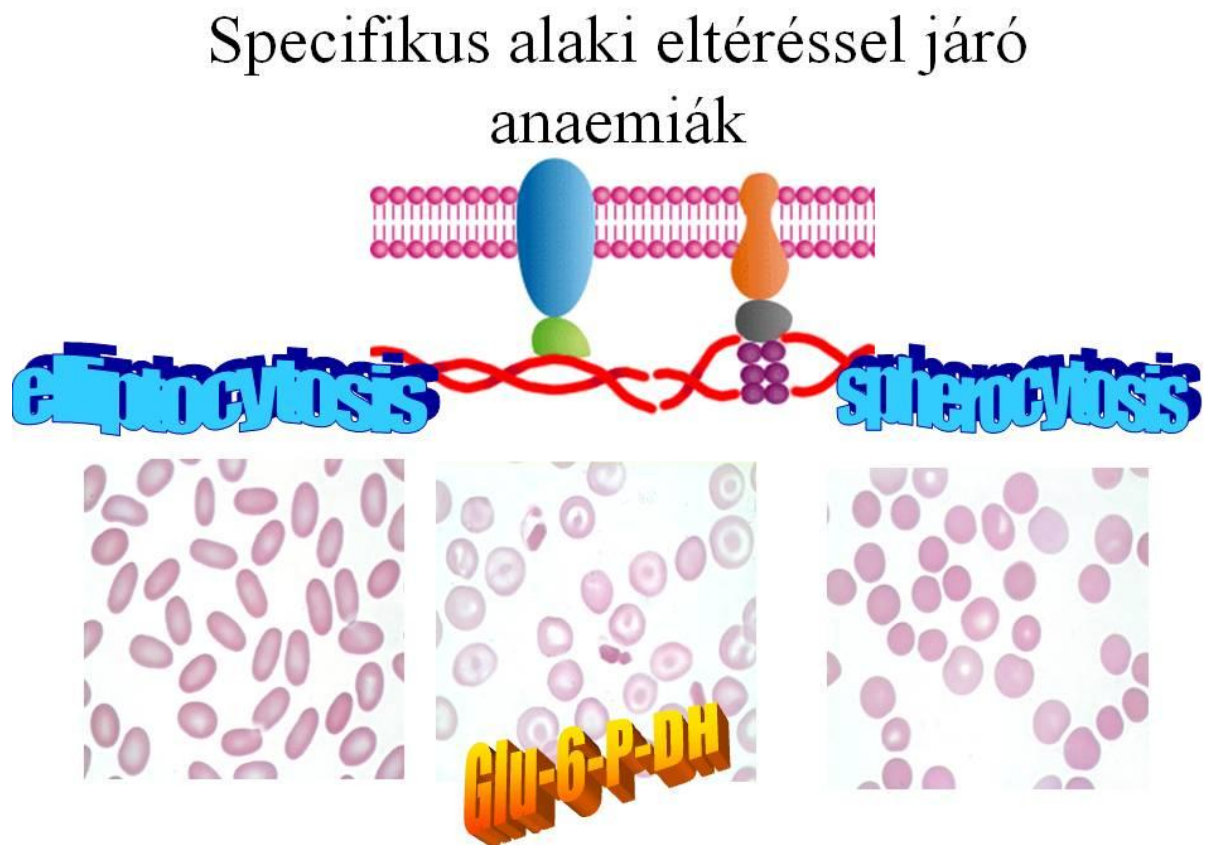
**Plasmodium**



28. ábra: A maláriát (ciklikus lázas betegség) az egyiptomi szúnyog közvetíti az emberre. A harmadik világ AIDS mellett legelterjedtebb betegsége. Sajnos a kinin rezisztens törzsek száma egyre növekszik, a malária máig megoldatlan és egyre növekvő probléma. A vérben (balra lent vérkenet) látható a plasmodium vörösvértesteken belüli szaporodása, ami a morphologia és a

klínikum alapján diagnosztizálható. Kezeletlen malária súlyos szövódményeket (pl. veseelégtelenség) és halált okozhat.

29.ábra: Bizonyos (általában ritka öröklődő) vörösvértest alaki eltéréseket (elliptocytosis, spherocytosis, Glucose-6-P-dehydrogenáz deficiencia) általában a RBC membrán cytoskeleton hibái vagy bizonyos enzim defektusok okozhatnak. Az ilyen betegeknek nyugvó, normál állapotban legfeljebb a vérkenet vizsgálat derítheti ki az elváltozást, gyakoribb azonban, hogy lázas állapot, egyéb betegség kapcsán indukált haemolysis, Hgb-uria kivizsgálása háttérében észleljük a keneteltérést. RBC lysis tesztekkel és végső soron specifikus fehérje sequenálási technikákkal lehet e betegségeket igazolni vagy kizárni. A meglehetősen jellegzetes kenet morfológián túl azonban a specifikus diagnózis elérése legtöbbször igen nehéz vagy egyáltalán nem kivitelezhető. Hasonlóképpen a thérápia is igen korlátozott. Ezek az elváltozások vérkép automatákkal nem diagnosztizálhatók.

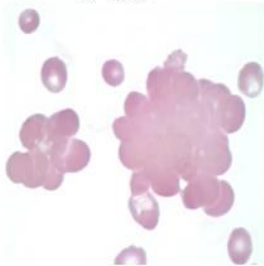


30.ábra: Ugyancsak nem diagnosztizálhatók a következő alaki eltérések vérkép automatákkal csak kenetekben – kivéve az első esetet. A hidegagglutinin megjelenését úgy észleljük a vérkép automatán, hogy szobahőn kb. 30 percet állni hagyott mintánkat újra lemérve kb. fele / harmada annyi RBC értéket mérünk, mint annak előtte. E késlekedés spontán is előidéződhet, de észrevehetjük a már lement csövön szemlátomást is a precipitációt (a cső falán olyan kis piros pontok láthatók mint az ABO vércsoport meghatározáskor a pozitív próba). Ha reális eredményt akarunk kapni, a csövet 37°C-ra kell melegítenünk újramérés előtt, vagy ha ez sem segít a mintavételtől a mérésig a mintacsövünket végig 37°C-os vízfürdőn kell tartani. Ilyenkor ugyanis a

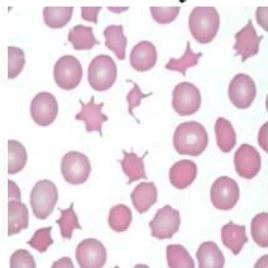
hideg agglutininek, testhőmérsékleten maradván, nem aktiválódnak. Azonban a szobahő (kb. 20-25°C) már „hidegnek” számít ezen IgM típusú agglutinineknek. A betegek végtagjainak szélső részein (acrák=kéz és lábujjak) ezek az antitestek in vivo is összecsapzódhatnak, súlyos vérellátási zavarokat okozva az ujjakon, amikor a beteg hideg időben éppen kint tartózkodik. A hideg agglutináció a fehérvérsejt képet is mérhetetlenné teheti, s gyakori, hogy egy ilyen fals eredményt adó vérkép hívja fel a figyelmet egy addig fel nem fedezett myeloma multiplex betegségre (hideg agglutinin tulajdonságú paraproteinnel), melyet serum elektroforézissel és fixációval kell a továbbiakban tisztázni. A többi elváltozás kenet diagnózist jelent, de jellegzetes a labor konstellációja is. A könnyecsepp sejtek az MDS (myelodysplasiás szindróma) részjelenségeként az időskori dysplasticus myeloid leukaemia előfutárai lehetnek, a buzogány sejtek uraemiás vérben hyperosmoláris okokból keletkeznek. Az acanthocyták, schistocyták, fragmentocyták pedig leginkább a DIC (disszeminált intravasculáris coaguláció) elnevelésű súlyos alvadási betegségben vagy a hasonlóképp igen veszélyes, TTP (thromboticus thrombocytopaeniás purpura) ill. HUS (haemolíticus uraemiás szindróma) thromboticus zavarai kapcsán keletkezhetnek. Bár a TTP vonatkozásában az ADAMTS serum enzim vWF lebontó aktivitásának zavarát kísérő fokozott PLT aktiválódás és ennek következtében vérlemezke fogyás volt bizonyítható, e kórképek diagnózisa konkrét esetekben sokszor igen nehéz, a vérkenet észlelet csak kiegészítő jellegű lehet.

## Egyéb anaemiák vörösvértest alaki eltérésekkel

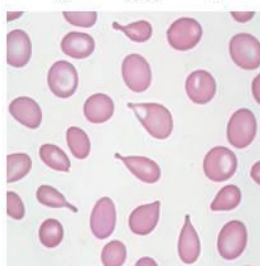
hidegagglutinin



acanthocyták



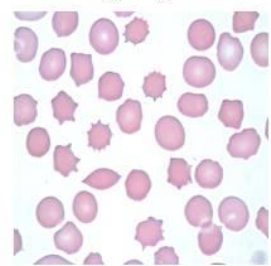
könnyecsepp sejtek



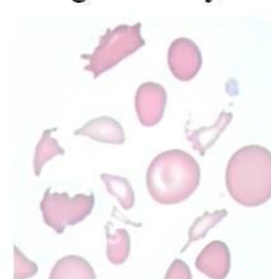
schistocyták



buzogány vvt



fragmentocyták

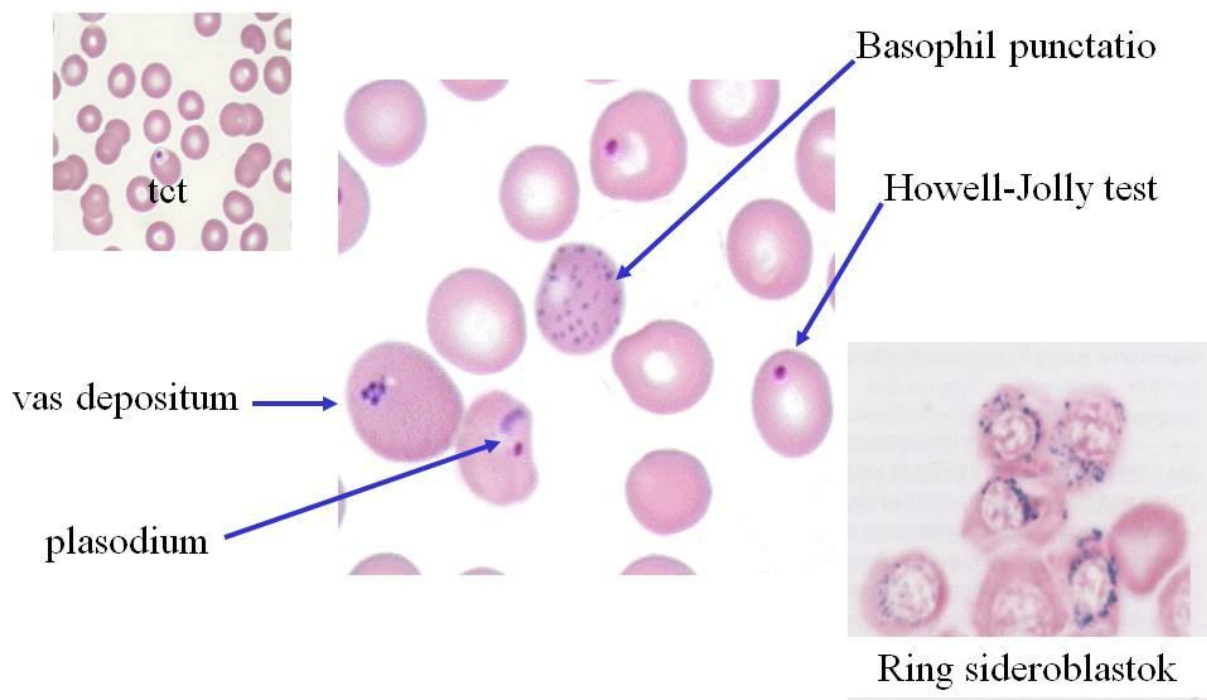


31. ábra: Az ún. „inclusios testek” is természetesen csak kenetből (mégpedig korrekten kihúzott vékony és jól – nem túlfestett mintákból) diagnosztizálhatók. Az egyik legtipikusabb hiba itt a kenetértékelő részéről, amikor a kenetben a vörösvértestek fölé sodródott vérlemezkéket (tct-balra fent insert) valamilyen inclusios testnek (leginkább maláriának) diagnosztizálja. Az anaemézis, a



malária hazánkra jellemző ritka megjelenése mellett a mikroszkóp microméterének fel-le mozgatására hívnam fel a figyelmet: a „superponálódott” thrombocyta mindig jól kivehető világos udvarral, többnyire excentrikus basophil szemcsés anyag tartalommal (ergastoplasma, tct-granulumok) rendelkezik, s a microméter mozgatásával hol a tct, hol pedig a RBC hozható éles nagyításba, de együtt soha nem láthatók élesen. A Howell-Jolly testek gyakran splenektomizált betegeken fordulnak elő, degenerált Hgb maradéknak felelnek meg az előregedet, a splenektomia miatt lassabban eltakarított vörösvértestekben. Előfordulhat, hogy vas depositumot látunk vas túlterheléses állapotokban (haemosiderosis), bár ez nem konzekvens, ehhez a csontvelő ún. „ring sideroblastok” vizsgálata szükséges (jobb alsó insert). Az igazán fontos, s igen finom, nagy figyelemmel észrevehető elváltozás a basophil punctatio. E finom basophil hgb kicsapódás ólommérgezésben, porphyriában fordul elő (előbbi gyakorlatilag nem észlelhető a benzinkutak és nyomdák technológiai fejlődése miatt), de sokkal inkább bizonyos haemoglobinopathiákban, amelyeket kísérő fontos diagnosztikus jel lehet. Az ilyen észlelet, melyet egyéb Hgb-pathiára gyanús laboreltérések is kísérnek, feltétlenül további kivizsgálást igényelnek (Hgb electrophoresis, szükség esetén sequenálás, családfa vizsgálat).

## Vörösvértest inclusios testek



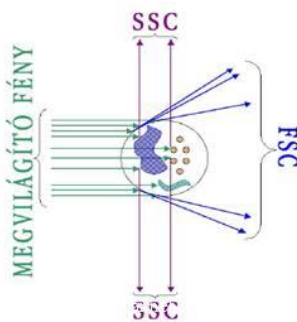
\*\*\*

### /4/ Fehérvérsejt populációk cytometriai mérése:

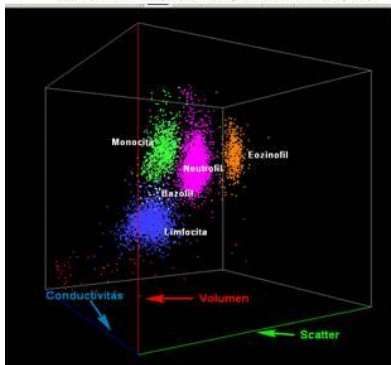
A fehérvérsejt populációk olyan sokféle és változatos populációt alkotnak, hogy ezek vizsgálatára már legtöbbször nem elegendő a Coulter elven végzett impedancia mérés. A lézeroptikai technika felfedezése lehetővé tette, hogy az egyes vérkép automatákban meglehetősen diverz technikai megoldásokkal, de alapjában véve azonos alapelven a perifériás vérsejtek minimum 5 populációja

(Neutrophil – eosinophil – basophil – monocyta - lymphocyta) elkülöníthető legyen. Ehhez a hydrodinamikusan fókuszált sejtáram egyedi sejtjeiről egyenként gyűjtik be a készülék detektorai az áthaladó sejteken keletkező szórt fény (scattered light) jeleket, melyeket a detektorok-erősítők-computer elektromos impulzussá, majd az impulzusokat digitalizált jelekké, ezeket histogramokká és dot plot diagramokká alakítja, melyekkel már a mérés során (és később elektronikus tárolt formában előhívhatóan) a felhasználó – a numerikus adatok mellett – grafikusan is láthatja a vérsejt populációk megoszlását. Ez a grafikai kép egyedileg jellegzetes az egyes betegekre és betegségekre, s párhuzamba állítható a kenetekben észlelhető morfológiai jelekkel. Ez a „digitális morfológia” kiapadhatatlan kincsesbánya a finom morfológiai jelek és azoknak lehetséges klinikai jelentősége iránt érdeklődő felhasználóknak. Párhuzamos kenetfestésekkel, szokatlan diagram manifesztációk („felhőképek”) kapcsán „felgöngyöltett” klinikai tanulmányok révén valóságos önképzést valósíthatunk meg a vérvkép automatánk mellett. Nézzük most néhány alapvető vérvkép automata vérsejt detektálási típust, s a technikai lehetőségek és korlátok közt néhány tipikus klinikai eset interpretálását.

## Vérvkép direkt optikai mérési elv (488 nm Argon laser)



2. ábra. Fényszórási paraméterek (15)



- 0°:** Egyenes szögű fényszórás ( $1^{\circ}$ – $3^{\circ}$ ): a sejtek nagyságának mérésére szolgál.
- 10°:** Kés szögű szórás ( $7^{\circ}$ – $11^{\circ}$ ): a sejt szerkezetének és felépítésének relatív indikátora
- 90°:** Derékszögű fényszórás ( $70^{\circ}$ – $110^{\circ}$ ): elsődlegesen a sejtek belső granulátságát és lebonyozottságát méri.
- 90 DEP:** 90 fokos depolarizált fényszórás ( $70^{\circ}$ – $110^{\circ}$ ): az eosinophiloknak a neutrophiloktól és a többi sejtől való elkülönítését teszi lehetővé, az eosinophil sejtek azon egyedülálló tulajdonsága alapján, hogy azok granulumai az eredetileg derékszögben polarizált lézer fényt depolarizálják.

CellDyn,

Coulter

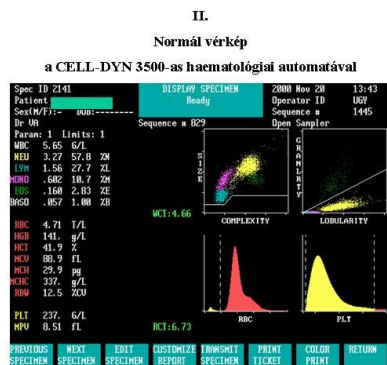
← +CONDUCTIVITÁS

32.ábra: A legegyszerűbb – talán a való viszonyokhoz is, de a flow cytometriához biztosan leginkább közel álló – az ún. direkt lézer optikai mérés (Abbott CellDyn és Coulter series). Itt tulajdonképpen forward scatter (Fsc=„csaknem szemből”  $1-3^{\circ}$  egyenes szögben) és különböző side scatter (Ssc=különböző oldaszórási szögekből  $10^{\circ}-90^{\circ}$ ) történik a gépen áramló sejteken szóródó lézer fény detektálása. A flow cytométerek ugyanezt a Fsc/Ssc populáció morfológiai megjelenítési módot alkalmazzák (ehhez csatoltan természetesen fluorophore konjugált monoclonális antitestekkel jelölt anyagon a fluorescens fényszórási jelek információit is értékelik, a jelek segítségével akár fizikailag is szeparálhatják az egyes sejtpopulációkat=„fluorescence activated cell sorter”=FACS). A direkt optikai elven működő vérvkép automatákon észlelt

„gyanús” vérsejt populációk könnyen azonosíthatók a flow cytometerekkel is, s így további részletesebb analízisük akadálytalan. Az ábrán a Fsc és Ssc keletkezését mutatja egy sémás rajz, a szöveges mezőben pedig az egyes sejttulajdonságok különböző szórási szögekkel összefüggő mérhetőségét mutatja. Könnyen belátható, hogy az alapvetően 5 vérsejt populáció (neu-eo-ba-mo-ly) „szétválasztásához” 4 szeparátor („-”) szükséges. Ez a 4 szeparátor a 4 detektor által mért, populációként szignifikánsan eltérő mérési adat. Ezen adatok grafikus ábrázolásával elérhetjük, hogy egy-egy tulajdonság (pl. O°=méret: kis ly versus nagy neu) alapján az egyes sejtcsoportok határozottan szétválaszthatók legyenek (kapuzás). Ha már 4 tulajdonságot egyszerre vizsgálunk (ezt már nehéz lenne grafikusán 4 dimenzióban ábrázolni, ehelyett színekkel jelöli az automata az egyes populációkat egyetlen 2D vagy 3D diagramon), akkor belátható, hogy ennek segítségével 4 populációt „pozitív” módon azonosíthatunk, az 5. populáció pedig a „maradék” elv alapján kerül azonosításra. A CellDyn és a Coulter készülékek 3 paraméterben lényegében azonosak, azonban a 4. detektor vonatkozásában eltérnek. A CellDyn 4. detektora „pozitív” módon azonosítja a depolarizált 90°-os fényszórás révén az eosinophileket, míg a Coulter a 4. dimenzióban a sejtek elektromos fizikai vezetőképességét (conductivitás) detektálja. Mindkét módszerrel a végeredmény hasonló (a kontrollok és legtöbb beteg esetében azonos eredményt hoz), azonban nem azonos. A „direkt” eosinophil mérésnek eosinophiliás betegségek értékelésében lehet egyedülálló értéke, míg a conductivitás mérése bizonyos éretlen blasztos sejtelemek (megváltozott membrán szerkezetű leukaemiás sejtek) elemzésekor lehet előny. A vérkép automaták mérési kapacitásával kapcsolatos ún. „gyári” adatok elsősorban egészséges kontrollokra (esetleg gyakoribb kóros elváltozásokra) vonatkoznak, az egyedi kórképeket magunknak kell megismerni.

Neu (0°=nagy, 10°=lebenyezett, 90°=granulált, dep90°=nem polarizál) =++++  
Eo (0°=nagy, 10°=lebenyezett, 90°=granulált, dep90°=polarizál) =++++  
Mo (0°=közepes 10°=enyhén lebenyezett, 90°=min. granulált, dep90°=nem polarizál) =+ - + - + - -  
Ly (0°=kicsi, 10°=nem lebenyezett, 90°=nem granulált, dep90°=nem polarizál) = - - - -  
Ba (0°=kicsi, 10°=lebenyezett, 90°=granulált, dep90°=nem polarizál) = „maradék” = - - + + -

A mintánként 10.000 átfutó sejthez egyenként, listaszerűen kapcsolódnak a 4 detektor adatai, s a software ennek megfelelő színnel jelölt csoportba és helyre teszi a sejteket a diagramokon. Látható, hogy ezek a gépek, melyek a basophil populációt csak „maradék”-ként kezelik, az ilyen típusú (szerencsére ritka) kórképek esetében nem feltétlenül a legoptimálisabbak.  
 33.ábra: Normál vérkép CD3500 automatával. Saját anyag.



34.ábra: Eosinophila CD3700 automatán (a jobb felső diagram a polarizált 90°-os kapuzás).

## Eosinophilia

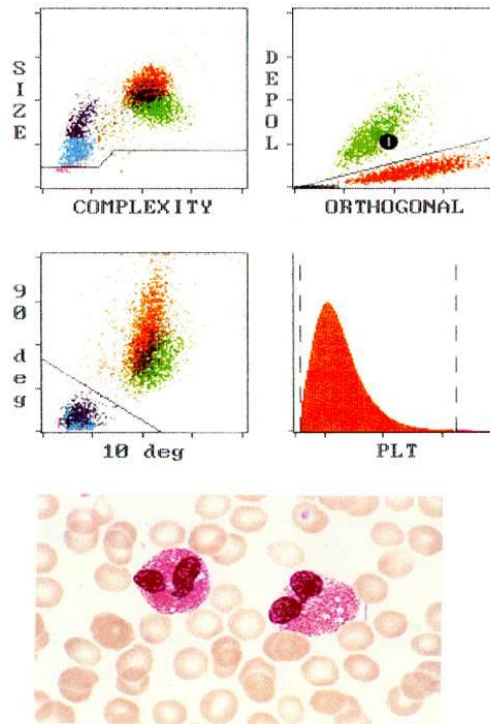
WBC: 13.4 10e9/L  
 Neu: 45.1%  
 Lym: 15.8%  
 Mono: 7.73%  
 Eos: 30.9%  
 Baso: 0.45%

RBC: 3.10 10e12/L  
 Hgb: 103 g/L  
 Ht: 0.29 L/L  
 MCV: 94.1 fL  
 MCH: 33.3 pg  
 MCHC: 354 g/L  
 RDW: 13.7%CV

PLT: 502 10e9/L  
 MPV: 8.26 fL

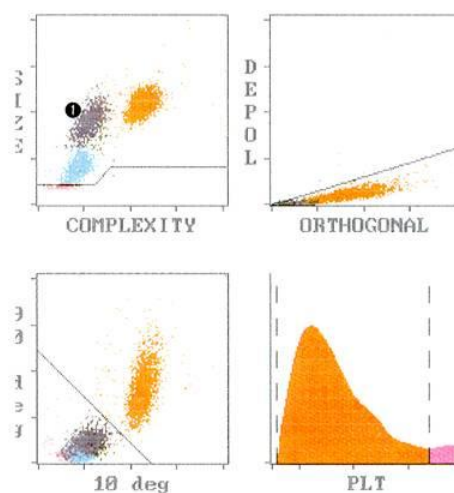
### Eosinophilia okai:

atopia, parazita, gyógyszer allergia,  
 polyarteritis, acut infectio  
 gyógyulása, Hodgkin-kór,  
 Eosinophil sejtes CML (ritka  
 forma), Hypereosinophil syndro-ma  
 (HES, idiopathiás)



35.ábra: Tipikus reaktív monocytosis CD3700 automatán. Saját anyag.

## Reaktív monocytosis



36.ábra: Basophilia CD3700 automatán (1=a basophil populáció a kapuzásban az un. „maradék”)

## Basophilia

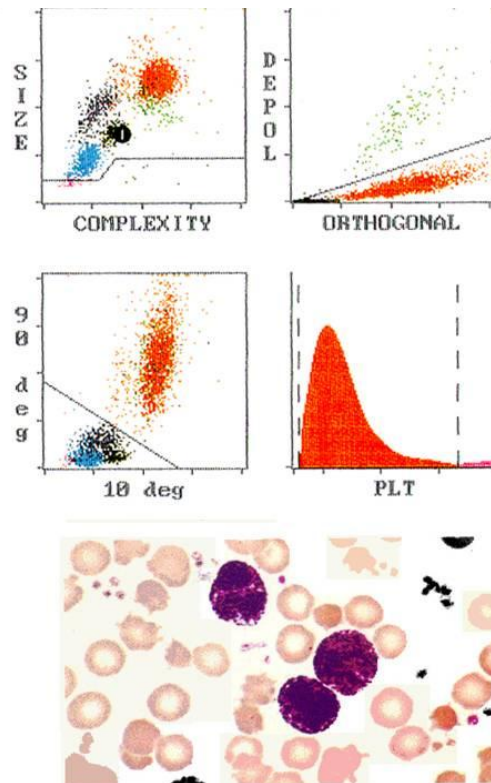
**WBC:** 4.01 10e9/L  
**Neu:** 57.3%  
**Lym:** 22.5%  
**Mono:** 10.7%  
**Eos:** 3.78%  
**Baso:** 5.64%

**RBC:** 3.83 10e12/L  
**Hgb:** 124 g/L  
**Ht:** 0.35 L/L  
**MCV:** 91.8 fL  
**MCH:** 32.3 pg  
**MCHC:** 352 g/L  
**RDW:** 14.4%CV

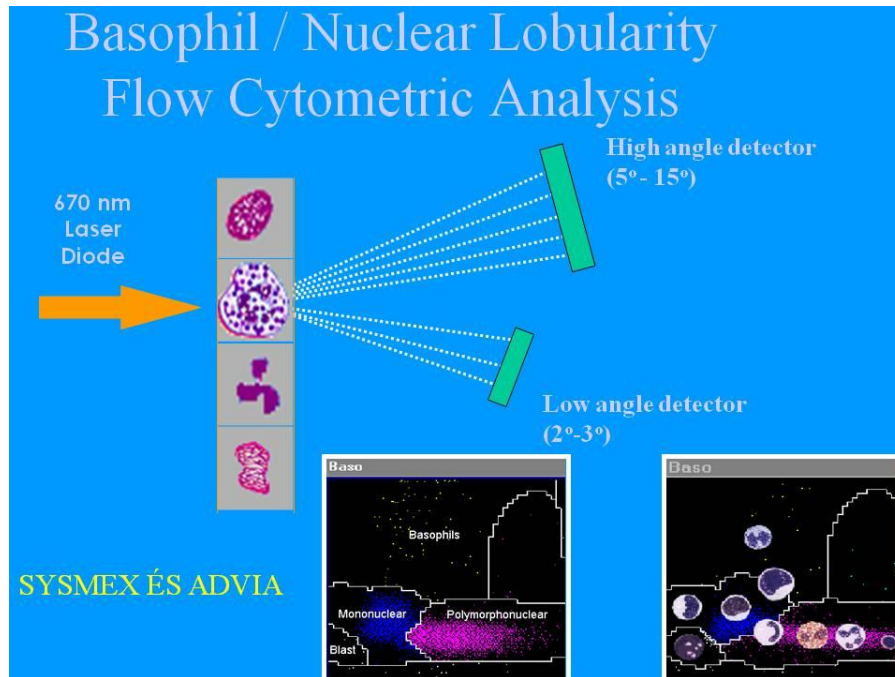
**PLT:** 249 10e9/L  
**MPV:** 8.56 fL

### Basophilia okai:

**Chr. myeloproliferatív  
 syndroma (CML, PRV),  
 reaktív (myxoedema,  
 variola, varicella, colitis  
 ulcerosa)**

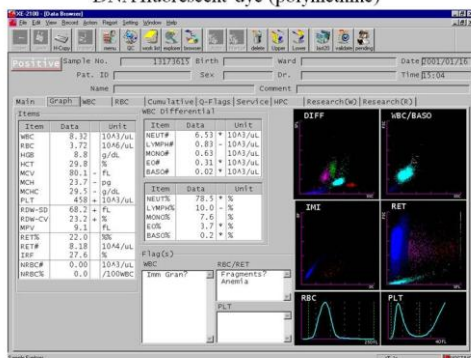


37.ábra. A baso/lobularity módszerrel, a mintát egy alacsony pH-jú reagenssel kezeljük („Stromatolyser”), mely az összes RBC-t feloldja, s eltávolítja a fehérvérsejtek (WBC) sejtmembránját, csupán a pusztá sejtmagokat meghagyva. Kizárólag a Basophil populáció marad ép, sértetlen. Így ez a módszer – kipótolvva az előbbieken ismertetett CellDyn és Coulter rendszer „basophil gyengéit” - alkalmas a basophil granulocyták „pozitív” szelekciós meghatározására. A minta a flow cellába kerül, ahol a piros lézer dioda (670 nm) világítja át a sejteket. A Fsc (2-3°) és Ssc (5-15°) dimenziókban a fehérvérsejtek magjait és szelektíven a Basophil populációt vizsgálhatjuk. A sejtmagok mind a sejtnagyságot mind a mag komplexitást (mononucleáris/polymorpholnucleáris) jól mutatják. A teljesen ép (membránnal is rendelkező, a stromatolyser oldattal szemben rezisztens) basophil sejtek természetesen jóval nagyobbak a csupasz sejtmagoknál, így méretük alapján igen jól elkülönülnek. A mérési mód teret enged néhány szokatlan magszerkezetű elem (pl. blastok, magvas vörösvérsejtek) azonosításának, ezek azonban legfeljebb mint az alappopulációkba „be-nem-illő”, „maradék” elemek („Blast”) jelennek meg a diagram bal alsó sarkában. Egy figyelmeztető (flag) üzenet azonban legtöbbször jelzi, hogy valamilyen rendellenes sejtmag is mérhető a rendszerben. A vérképest ez további felderítő lépésekre készítheti. Sysmex demo anyag.

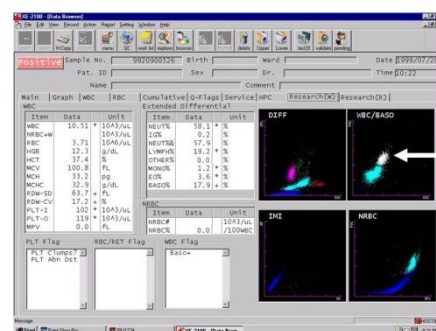


38.ábra: A Sysmex Advia rendszerben természetesen a basophil sejtek „pozitív” azonosítása mellett (ami e gép típusoknál természetesen a korábban felsorolt 3+1 rendszeroldat mellett egy 4. oldat, a stromatolyser oldat és plusz egy optikai csatorna (WBC/BASO) alkalmazását feltételezi) feltétlenül szükség van egy olyan fehérvérsejt differenciáló (DIFF) csatornára, ahol az összes fehérvérsejt (kivéve a basophil) együtt látható. A Sysmex ezt egy általános DNS festékkel (polymethine) oldja meg. A nem lizált (Diasheath) fehérvérsejtek sejtmagjai eltérő mértékben festődnek (DIFF diagram Y tengely: kék=törmelék – türkiz=Neu – piros=eo – barbie-rózsaszín=ly – zöld=mo), s ha ezt az X tengelyen a Ssc (magcomplexitás) állítjuk szembe, az egyes populációk nagyon jó elkülönülnek. A további csatornák diagramjait részben már tárgyaltuk (RET, RBC, PLT), az IMI csatornát (mint a Sysmex XE21000 egyik specifikumát) a későbbiekben részletesen elemezzük.

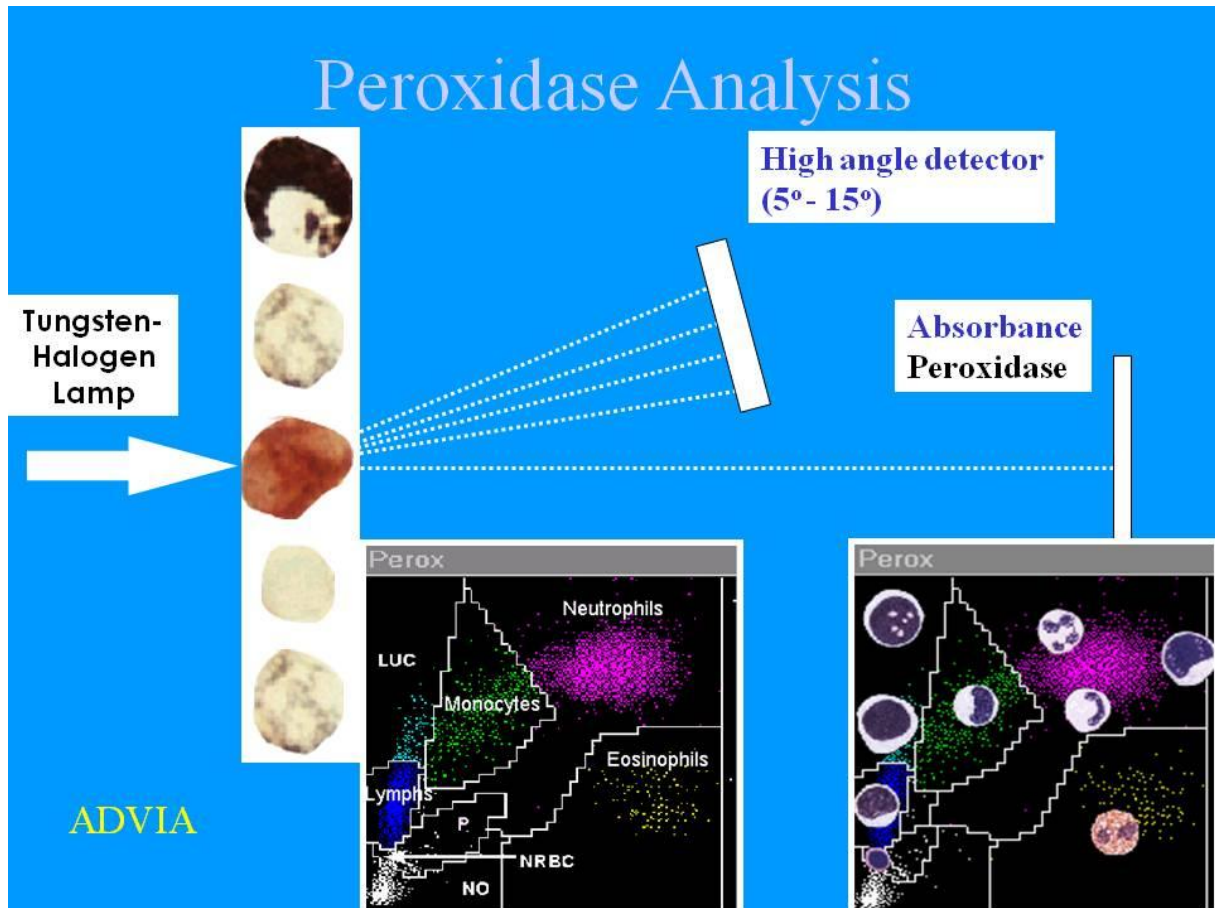
### Normál fehérvérsejtkép (Sysmex) DNA fluorescent dye (polymethine)



### Basophilia (Sysmex)

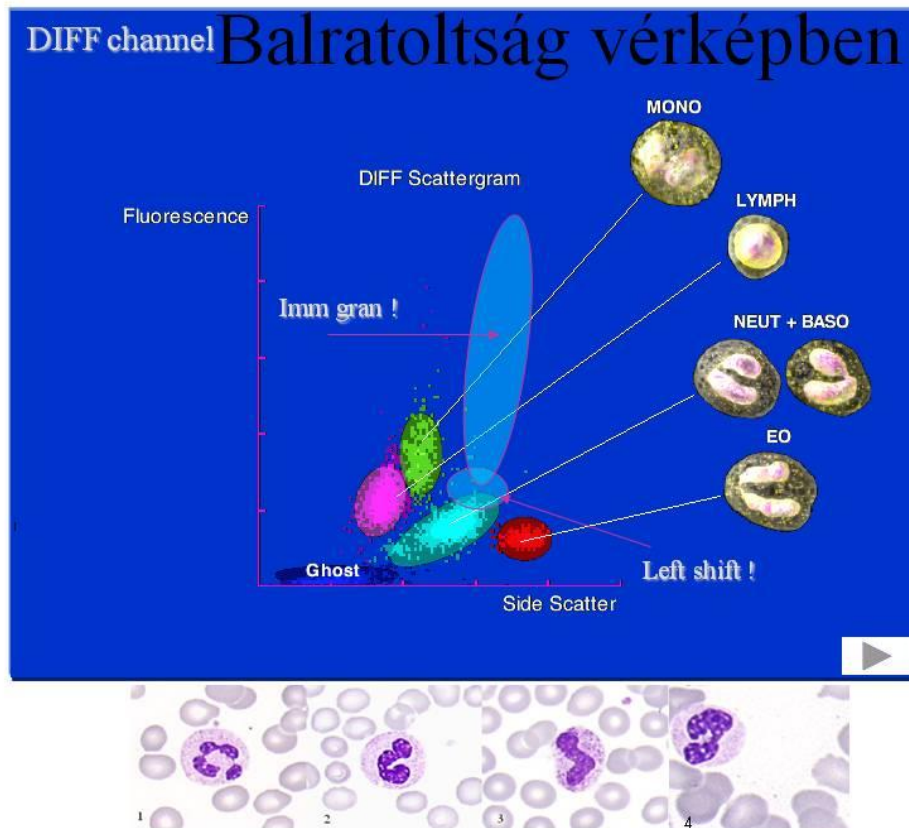


38-39.ábra: normál vérvkép és basophilia Sysmex XE2100 vérvkép automatával.



40.ábra: Az Advia az eddig részletezett fehérvérsejt differenciálás problémára egészen más technikát alkalmaz. A cytocemiából „elirigyelt” peroxidase (MPO) festést végzi el a mintákon a flow cytometriás elemzés előtt. Ez azért is nagy bravúr, mert a keneteken a myeloperoxidáz (MPO) festést legalább 30 perc 37°-on történő inkubálással érjük el, míg a vérkép automatában csupán másodpercek állnak rendelkezésre egy-egy minta váltása között. Az Advia 120 és 2120 készülékeiben 70°C-on másodpercek alatt zajlik le a MPO festés. A tungsten halogen lámpával szemből megvilágított MPO-val festett sejtek abszorbanciáját (Perox csatorna Y-tengely) a szórt lézer fény Ssc detektorával (5-15°) szemben vizsgáljuk. A Ssc nagyjából a sejt mérettel, az abszorbancia a MPO pozitivitással arányos. Azonban óvatossá kell lennünk az ilyen általánosító megállapításokkal (a két csatorna között nem várt interakciók, átfedések is lehetnek)! Pl. az eo sejtek granuluma olyan erős MPO pozitív, olyan erősen absorbeálják a fényt, hogy ez a lézer Ssc tulajdonságukra negatívan hat vissza. Látható a diagramon, hogy az eo sejtek, bár jóval nagyobbak mint a lymphocyták, az Y tengelyen mégis (fals módon) egy magasságban jelennek meg a lymphocytákkal. Ez az elkülönítést ugyan szerencsére nem zavarja, de mint mérési eredmény semmiképpen nem reális. Az Advia Perox módszere még egy meglepetést tartogat: az 5 WBC populáció mellett megjelenik egy 6. populáció = LUC (=large unstained cells). A bal alsó diagram sarokban megjelenő extra populációt már más esetben is láttuk (sejttörmelék, NRBC, blastok?, PLT), de a jobb felső sarok extra populációja a LUC a MPO festés „mellékterméke”. Bár normál vérképeknél a LUC 5-10% alatt marad (egyes klinikusok számára ez a Jolly Joker populáció így is nehezen értelmezhető, pl. gyermek vérképeknél akár ennél magasabb érték is összefér a normalitással), ugyanakkor azt figyelték meg (ez már a „gyári ajánlásokban” is szerepel), hogy a magas LUC érték jelezheti „éretlen lymphoid sejtek”, „éretlen mononucleáris sejtek” jelenlétét, ami akár mononucleosis infectiosa, leukaemiás blastok jelenlétére is utalhat! Ez

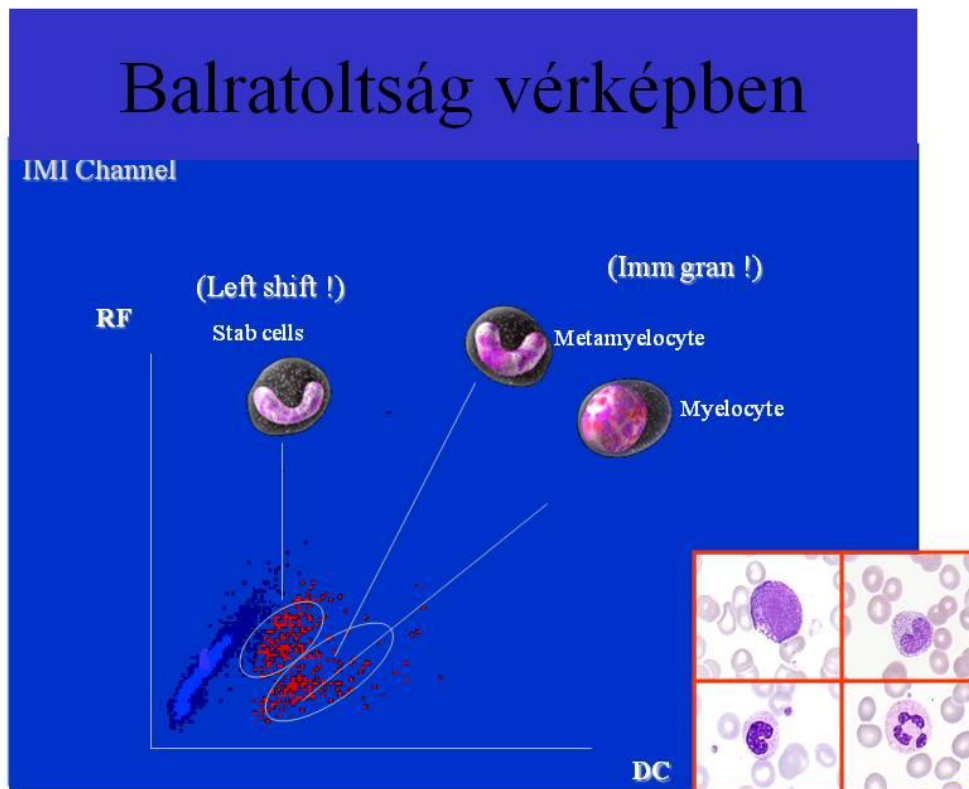
természetesen önmagában nem diagnosztikus értékű, de ha a gépünkben a MPO festés és az optika megbízhatóan működik, akkor a LUC magas érték viszonylag ritkán fordul elő, s „megér egy misét”, hogy egy-egy kiugró esetnek utána járjunk, nincs-e mögötte mononucleosis vagy leukaemia (vérkép és egyéb labor paraméterek, kenet, flow...stb). Sose felejtsük el azonban, hogy ha ez a kényes, 70°C-on másodpercek alatt lezajló MPO festés bármi okból technikailag zavart szenved, az esetben az első jelenség, amit látni fogunk, az az X-tengely populációinak LUC irányába történő „összeomlása” (s nem leukaemia!) lesz.



41. ábra: A Sysmex készüléken mutatjuk be a granulocyták un. „balratoltság” jelenségét, bár ez az összes többi automatán is hasonlóképpen megfigyelhető. Ha egy súlyosabb bakteriális fertőzés éri a szervezetet, a vérben keringő (kórokozó ölt funkciójuk során elpusztuló) granulocytákat friss csontvelői granulocyták pótolják. Ha a fertőzés üteme gyorsabb mint a granulocyták kiérése, akkor a csontvelőből „félkész termékek” is kikerülnek, hogy biztosítsák a fokozott igényt. A kiérett granulocyták mellett un. balratolt alakok („Left shift”, „Immature granulocytes”=IG, német szaknyelvi kifejezéssel élve „stáb” és „jugend” formák) kerülnek a csontvelőből a vérbe. Ezen sejthalakokban a sejtmag szegmentációja még nem tökéletes (stáb=pálca magvú, IG=jugend=éretlen magvú), azonban szemcsészettségük révén (MPO) már funkcióképesek. Megfordítva a kérdést, diagnosztikusan a sok balratolt elem jelenléte súlyos gyulladás fennálltára utalhat. Ezek a balratolt, éretlenebb sejthalakok természetesen a diagramunkon is a neu populációtól eltérő helyen fognak megjelenni. A pozíciójuk kristály tiszta logikát követve megjósolhatóan az éretlenséggel (balratoltsággal) arányos magasabb fluorescencia értékek felé tolódik, s a Ssc diszkrét változásban a sejtmag alakjának diszkrét változása is tükröződik. Ezek az „extra populációk” úgymond nem teljesen „gyárilag” validak (bár épp a Sysmex egy kiegészítő



IG-software programmal már hivatalosan is legitimálta a Left shift és IG populációkat), azonban kis gyakorlattal (párhuzamos kenet festések) jól megtanulható a balratolt populációk felismerése és elkülönítése más pathológiás állapotoktól (pl. CML=chronicus myelid leukaemia). Nem szabad azonban elfelejtenünk, hogy a CML és myeloproliferatív syndromák (CMPD) korrekt diagnózisához ma már elengedhetetlen a molekuláris szintű diagnosztikáig elmenni (bcr-abl, JAK2). S azt sem hagyhatjuk figyelmen kívül, hogy a modern therápia (pl. Neupogén stimuláció) kapcsán időnként extrém mértékű balratoltság mérhető, melynek a háttérében azonban az orvosi beavatkozás megfelelő kommunikációval jól azonosítható (nem vezet tévesen a CML gyanújának csapdájába). Összességében a balratoltság extrém formáival továbbra is igen óvatosan kell bánnunk. Sysmex demo anyag.

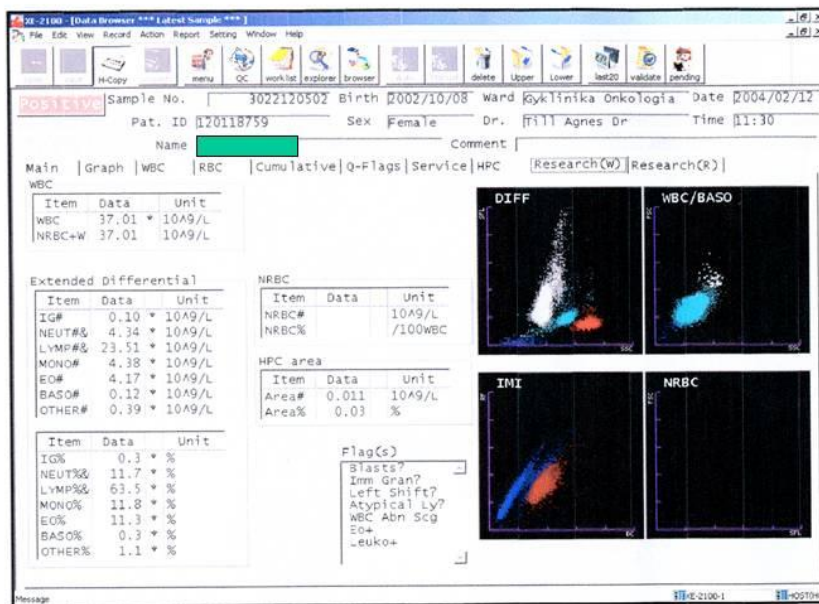


42.ábra: A balratolt (és éretlen) fehérvérsejtek azonosítására egy további mérnöki ötlet a rádió frekvencia (RF) hadrendbe állítása. A Sysmex XE2100 automatán (egy további 6.oldat, Diastromlyser-Sys-IM alkalmazásával) a RF és a hagyományos impedancia (DC) együttes vizsgálatával a fehérvérsejtek átlagos populációiból (kék átlós populáció az 5 WBC populáció összemosódva egyformán érzékeny a RF és DC jelekre) leválaszthatók az „éretlenségük” mértékével arányosan (Left shift – Imm gran = piros populációk a DC irányba távolodva a haránt tengelytől), melyek fokozott DC (impedancia) tulajdonsággal bírnak. Elvileg e sor alján a hemopoieticus őssejtek (CD34+) is kimutathatók lennének. A teoreticus háttér szerint az éretlenebbé váló sejtek sejt membránjának fehérje-lipid összetétele változik meg oly mértékben, hogy ez a conductivitás változásában (RF-csökkenéssel szemben) kimutathatóvá válik a balratoltságtól egészen az őssejtekig. Próbálkozások folynak a csontvelő transzplantációs alkalmazás területén is a módszer legitimálására, azonban tudomásom szerint eddig ez a mérés

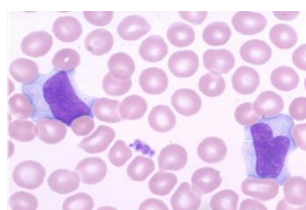
legfeljebb csak tájékoztató, kiegészítő jellegű, semmiképpen nem válthatja ki a flow cytometriás CD34 őssejt meghatározás (önmagában is meglehetősen összetett, s jelenleg „gold standard”) módszerét. A kifejezett balratoltság esetén első menetben ma is leggyakrabban a kenetfestéshez folyamodunk (insert), s a GAPA cytochemiai festés segíthet a reaktív (GAPA+) versus CML (GAPA negatív vagy alacsony érték) elkülönítésében. Pozitív esetben a további vizsgálatok természetesen nem nélkülözhetők (crista biopsia, Ph-chromosoma, bcr-abl). Sysmex demo anyag.

## Mononucleosis

### XE-2100 HardCopy

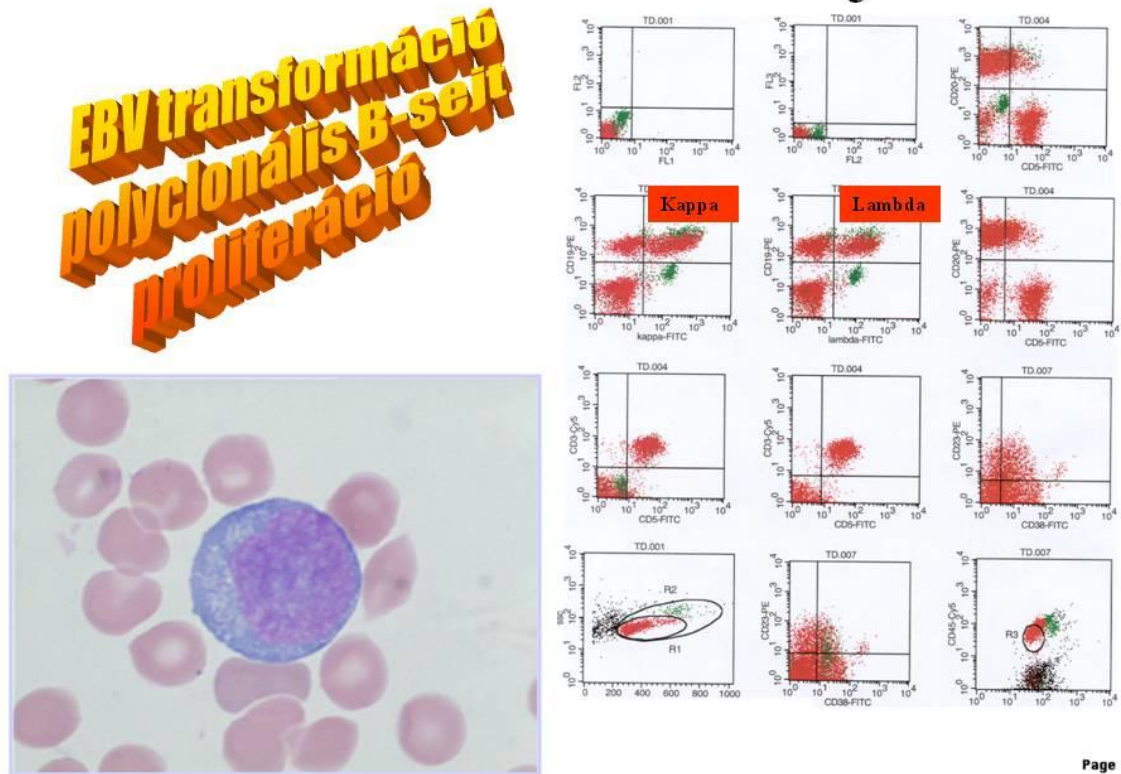


43.ábra: A mononucleáris sejtek (ly, mo) rendellenességei ugyancsak nyomon követhetők valamennyi vérkép automata típuson, függetlenül azok detektálási technikájától. A konkrét gép alapos ismerete és némi önképzés révén hamar beazonosíthatók a „sem-ly sem-mo” mononucleáris sejtek, melyek „távolsága” az eredeti ly-mo populációtól akár éretlenségükkel is arányos lehet (atypical lymph, abnormal lymph, Lymphoblast), bár e vonatkozásban mind a kóros populációk elnevezése, mind azok pontos mibenléte eléggé bizonytalan. Annyi bizonyos, hogy az a tény, hogy egy ly-mo populáció „szokatlan, aberráns” lokalizációt mutat, az mindenképpen fokozott figyelmet igényel, szükséges, hogy ilyenkor kizárjuk a súlyosabb kórképek (mononucleosis, leukaemia) lehetőségét. Ennek módzatait a korábbiakban már többször részleteztük. A jelen esetben akár egy egyszerű kenetfestés igazolhatja, hogy mononucleosis infectiosa áll fenn. 44. ábra: kenetfestés a fenti esetből. Saját anyag.



45.ábra: A mononucleosis gyanújának leggyorsabb igazolása (a serologia mellett) a flow cytometria lehet. Látható, hogy a korai Epstein-Barr vírus (EBV) fertőzésben a B-sejtek (szerencsére nem daganatos) polyclonalis transzformációja történik (mind Kappa mind Lambda könnyűláncot egyaránt hordoznak az éretlen sejtek, míg a daganat monoclonális Kappa vagy Lambda pozitív). Bár a sejtek rendkívül éretlennek látszanak (bal insert), a T- és NK sejt immunrendszer szerencsére hamar „eltakarítja” a vírus transzformált B-sejteket („atípusos mononucleáris sejtek”). Az immunválasz jeleit a mononucleosis későbbi szakában úgy látjuk, hogy az „atípusos sejtek” száma csökken, s egyre több ún. LGL (large granular lymphocyte) cytotoxicus sejt jelenik meg a vérképben.

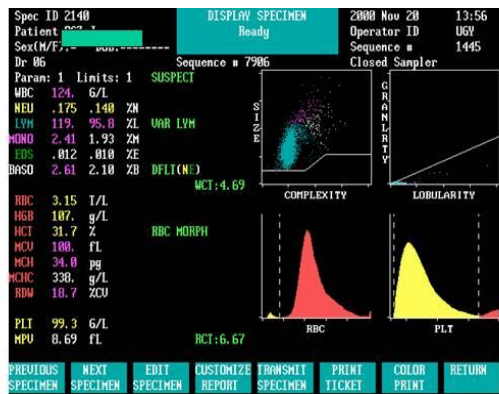
## Mononucleosis korai B-sejtes fázis



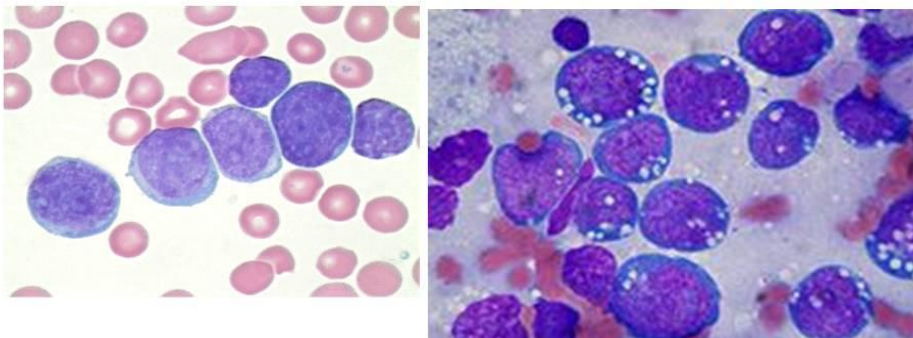
### /5/Leukaemiák vérkép automata mérése:

46.ábra: Acut lymphoblastos leukaemia mérése CD3700 automatával. A kenetkép általában önmagában nem informatív a lymphoid folyamatra vonatkozóan (T- vagy B-sejtes eredet flow cytometriával dönthető el, a blastok önmagukban MPO negatív, nem jellegzetes blastok – bal oldali kenet). Egy kivétel van, a Burkitt lymphoma sejtek, melyek FAB-L3 típusú, jellegzetesen nagy, vacuolizált egyforma blastok (jobb oldali kenet).

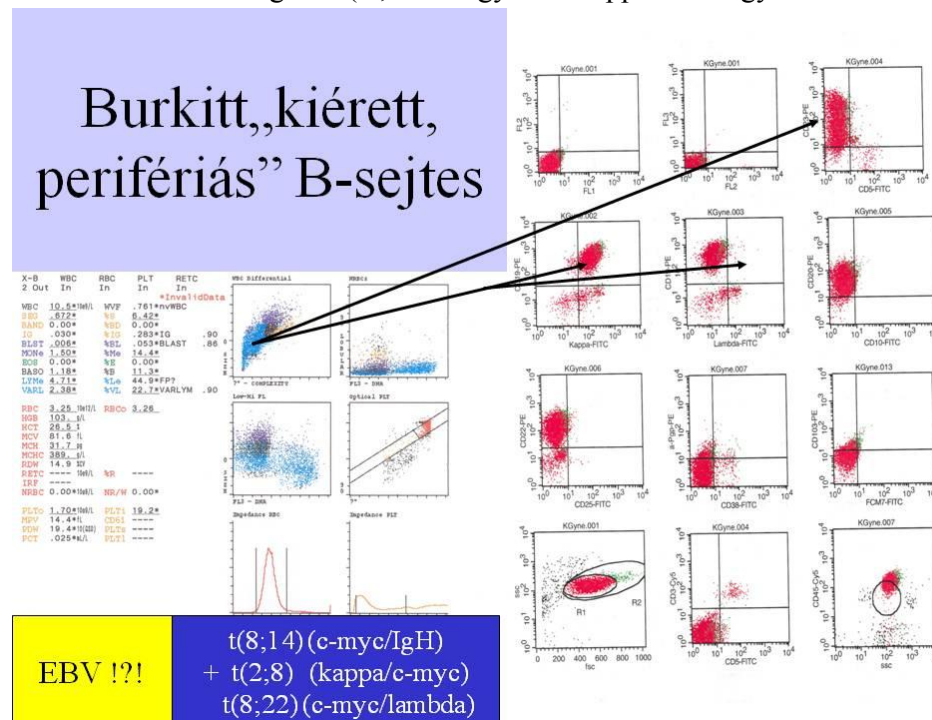
5.a: ALL:



ALL

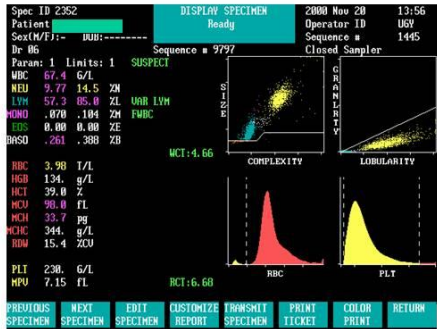


47.ábra: Burkitt lymphoma / leukaemia eset, gépi vérkép (CD4000) és flow cytometria. Monoklonális Kappa pozitív, CD23+ blastok láthatók, melyek keletkezésének hátterében az EBV is (egész pontosan nem ismert) szerepet játszik, de a monoklonális populáció (szemben a mononucleosissal) hátterében specifikus translocatiók miatt a c-myc oncogén áthelyeződés okozta konstitucionális Ig (H, vagy Kappa vagy Lambda) aktiváció áll.



**5b.: CLL:**

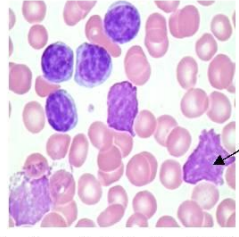
48.ábra: A chronicus lymphoproliferatív syndroma leggyakoribb képviselője a CLL (chronicus lymphocytás leukaemia). Azonban a gyakran indolens lefolyású CLL-től klinikailag (és sejteredet vonatkozásában is) alapvetően eltérő altípusok is előfordulhatnak CLL-re emlékeztető vérképpel. Ezeket csak flow cytometriai tipizálással lehet kideríteni, bár az un. Gumprecht rögök (apoptoticus „szellemsejtek” – nyíl) leginkább a B-CLL alaptípusra jellemzők.



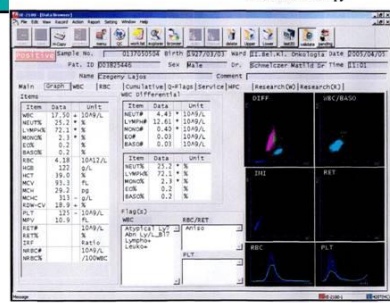
**Lymphoproliferatív sy**

- B- és T-CLL
- PLL
- FL
- MCL és MZL
- NK/T-sejtes ML

10. sz. ábra: CLL

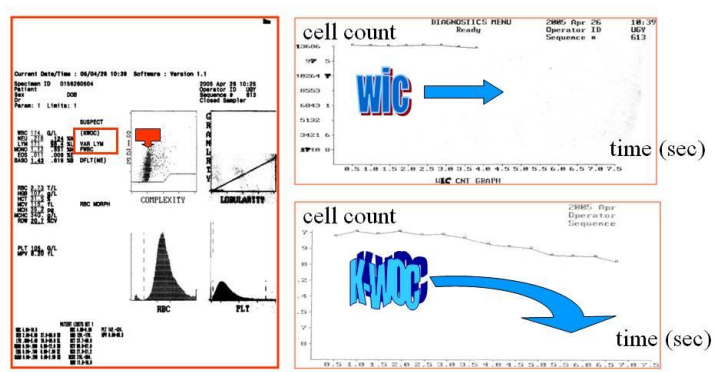


11. sz. ábra: Periferiás vérképet CLL-ben



49.ábra: A CD3700 automatán az impedancia és optikai fehérvérsejt párhuzamos számlálási lehetőségével (WIC=white blood cell impedance count versus WOC=white blood cell optical count) lehetővé válik az un. Gumprecht „szellem sejték” mérése is. A részecske szám (ly + Gumprecht) a mérés alatt változatlan, míg az optikailag detektálható lymphocyta arány (K-WOC=kinetic WOC) a mérés során, ahogy a lymphocyták fokozatosan Gumprechtté alakulnak, értelem szerűen csökken. A CD3700 automata VAR LYM (variáns lymphocyta) és FWBC=fragile WBC (törekeny) flag jelzése együttesen nagy valószínűséggel B-CLL fennálltára utalnak.

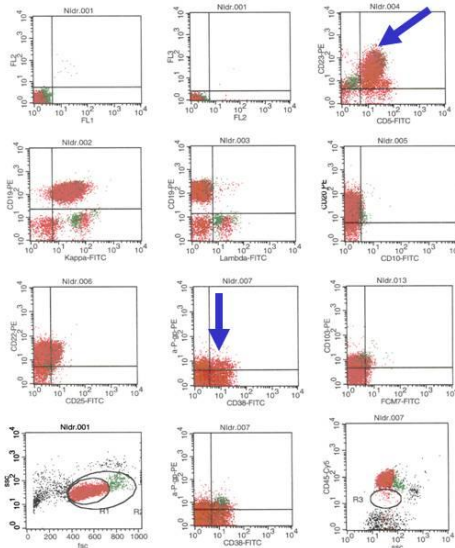
FWBC (fragilis fvs-ek)  
KWOK (kineticus optikai fvs szám)  
Gumprecht rögök CLL-ben



50.ábra: Flow cytometria igazolhatja a vérkép mérés alapján kialakult feltevésünket (Kappa monoclonális, CD5/CD23 pozitív B-CLL). A flow cytometria emellett további szubtipizálást is lehetővé tesz (pl. jelen esetben a CD38 co-expressio kapcsán – második kék nyíl – feltehetőleg egy naiv sejtes, prefolliculáris B-CLL formával állunk szemben, amit csak további molekuláris vizsgálatok igazolhatnak vagy zárhatnak ki. Ezen alcsoportoknak prognosztikus és terápiás jelentősége lehet (jelen esetben ez kedvezőtlen).

Naive-B-CLL

„Monoclonal-B”  
(B-cell low grade  
lymphoma)

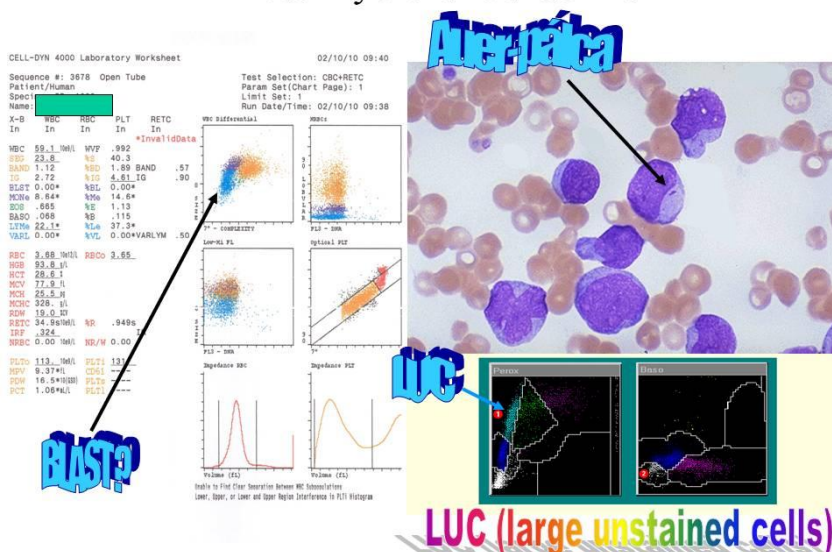


Page 1

51.ábra: A CD4000 mérés (blast?), az Advia (LUC) eredmény valamint a kenet egyaránt éretlen blastok jelenlétére utal. A kenetfestés az Auer pálca kimutathatósága kapcsán AML (acut myeloid leukaemia) diagnózist igazol. A szubtipizáláshoz természetesen flow cytometria, csontvelő vizsgálat és molekuláris vizsgálatok is kellenek.

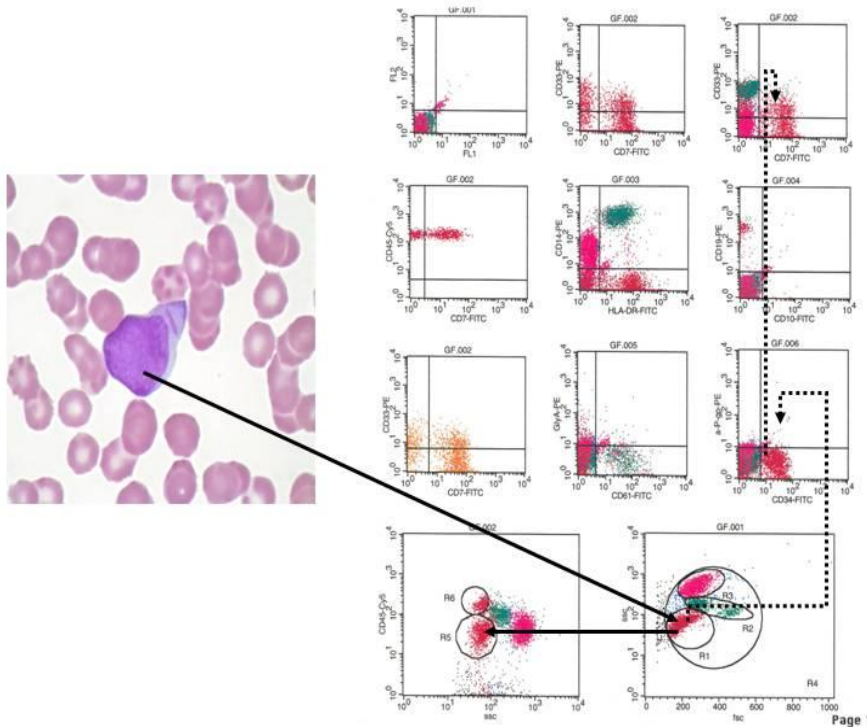
5.c: AML:

Acut myeloid leukaemia



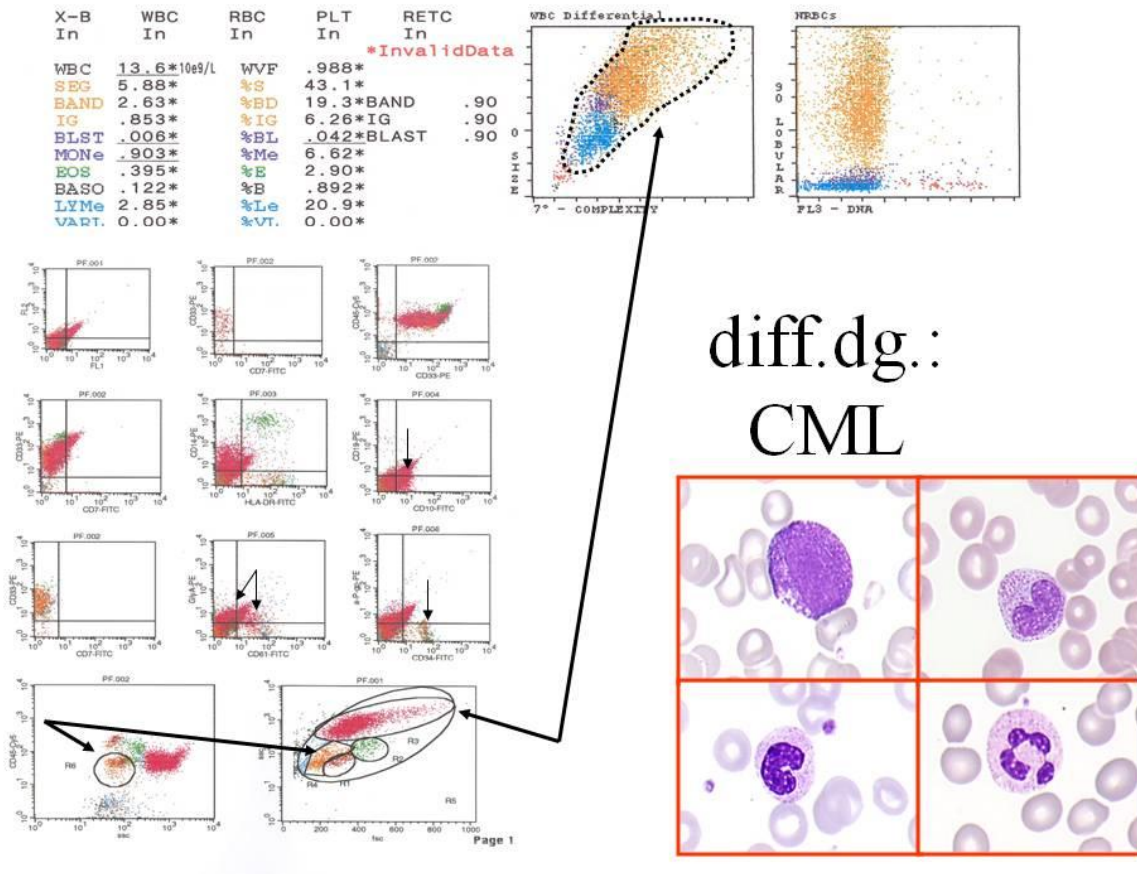
52.ábra: Az Auer pálca pozitív blast flow cytometriával az un. „blast ablakba” esik (lásd FCM irodalom), CD34 összejt marker mellett myeloid CD markereket hordoz.

## AML-M1(micromyeloblast)



### 5.d: CML:

53.ábra: A CML és CMPD (chronicus myeloproliferatív syndroma) diagnózisa a vérképből nem egyszerű, s önmagában sosem teljes. A balratoltság mértéke igen kifejezett (ez látszik mind a vérkép automata felhőképén=jobbra fent, „üstökös csóva” szerű granulocytá populáció, mind a flow cytométeres Fsc/Ssc képen=balra lent). A szokásos balratolt alakokon kívül (jugend, stáb) feltűnő a promyelocyták (insert bal felső nagy szemcsés myeloid sejtje) és 1-2% blast jelenléte (bal alsó sarok, flow mérés blast ablak). A korrekt diagnózishoz csontvelő vizsgálat, kiegészítő molekuláris vizsgálatok szükségesek már csak azért is, mert a Glivec és származékai ma már alkalmasak a specifikus molekuláris eltérések (Philadelhia 9;22 translocatio, bcr-abl fúziós génszakasz, foszforiláz kináz aktiváció) okozta változások specifikus kezelésére. Ma már a morfológiai kategóriák (FAB klasszifikáció) mellett kötelező a molekuláris genetikai altípus meghatározása is, mert ez inkább befolyásolja a kezelés módját, mint a morfológiai altípus.



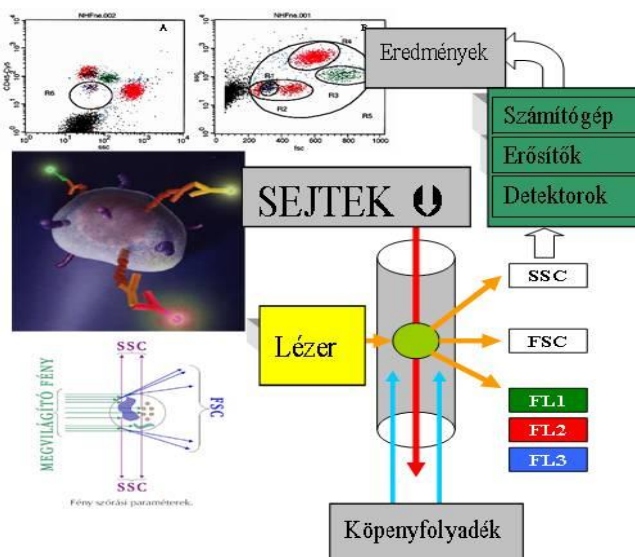
## /6/ Flow cytometria:

1. Bevezetés: A flow cytometria (FCM) vagy áramlási cytometria egy igen hatékony mérés technika, ([www.invitrogen.com/resources/education/tutorials](http://www.invitrogen.com/resources/education/tutorials)) mellyel heterogén összetételű sejt populációkban lévő egyedi sejtek multiplex paramétereit mérhetjük. A flow cytometerek sokféle szerepkörben alkalmazhatók: immunfenotipizálásban; sejt számlálásban (volumetriás vagy mikrogöngyös módszerrel); DNS ploeditás és funkcionális marker vizsgálatokban (pl. daganatos sejtek in vitro multidrog rezisztencia vizsgálatában, növekedési faktor ill. cytokin receptor expresszió kimutatásban, ... stb). Az expresszió mérésére az un. mean fluorescent intensity (MFI) = átlag fluoreszcencia értéket alkalmazzuk, mely a sejtek „egészséges” vagy „kóros” állapotát hivatott kimutatni. A FCM során olyan mérést végzünk, melynek során másodpercenként több ezer sejt egymást követve keresztezi a lézer fény útját, s a keletkezett szórt fényt minden egyes sejtről egyenként tudjuk begyűjteni analízis céljára. Ennyi adatot természetesen csak számítógép segítségével lehet begyűjteni és egy FCM analysis software segítségével statisztikailag elemezni. Az adatokból nyert eredmények információt adnak: 1/ a vizsgálati minta egyes sejteinek és összességüknek méretéről (**size**); 2/ a sejtek belső összetettségéről (**complexity**); 3/ sejt felszíni fehérjéikről (**phenotype**) és



esetenként e fehérjék; 4/ működéséről ill. állapotáról (**funcional expression**). E rövid ismertetőben áttekintjük hogyan is működnek a flow cytometerek? Hogy detektáljuk a sejtekről érkező különböző szórt fény típusokat (**forward scattered=FSC; side scatter=SSC; fluorescen scatter=FL**) a készülék különböző optikai csatornáin? Miként lehet kezelni a keletkezett rengeteg adatot? Hogyan is vizsgálhatók **specifikus fehérjék egyedi sejtekhez kötötten a FCM segítségével** a kutató és klinikai laboratóriumi munkákban?

2. **Műszeres áttekintés:** az **54. ábrán** sematikus mutatjuk be a flow cytométer elsődleges rendszerét: az egyes alkotórészek a/ a **folyadék rendszer** (centrális csőszerű alkatrész a függőlegesen beinjektált **sejtekkel** és a **köpenyfolyadékkal**), ez a rendszer hivatott biztosítani a minta sejteinek átfolyását („**hydrodinamikai fókuszálás**”) úgy, hogy e sejtek külön-külön is mérhetőek legyenek, (innen származik az áramlási cytométer név is!); b/ a **lézerek**, a látható- és fluorescens fény forrásaként; c/ az **optika**, mely összegyűjti és elvezeti a látható és fluorescens fényt; d/ a **detektorokhoz**, melyek fogadják az egyes fény nyalábokat; és e/ az **elektronikához** (amplifiers), perifériás **számítógép rendszerhez** (a computer alakítja át a detektorokról jövő szignálokat digitalizált adatokká, s ez végzi a szükséges elemzést is). Az ún. „találkozási pont” (**interrogation point=IP**) alkotja a rendszer „szívét”. Ez az a pont, ahol a minta sejtjei találkoznak a lézer sugárral (a lézer a sejteket tartalmazó folyadékáramot 90°-ban merőlegesen éri!). Az ütközésből keletkező látható- és fluorescens fényszórást az optika gyűjti be. **54.ábra:** IP=centrális zöld pont, SEJTEK, Köpenyfolyadék)



1. ábra: az áramlási cytometria (FCM) működésének elve

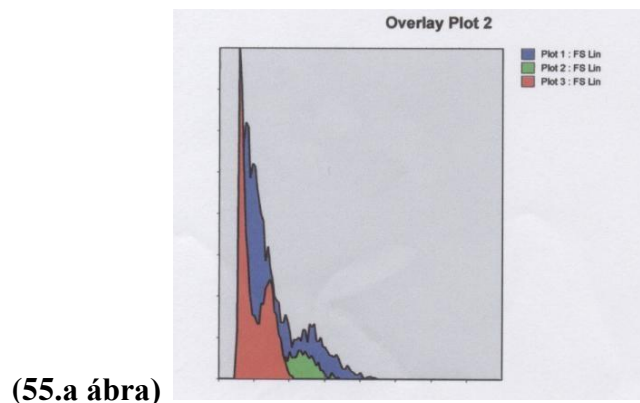
(FSC: forward scatter, SSC: side scatter, FL1-FL2-FL3:fluorescens csatornák)

A legtöbb flow cytométerben a beinjektált sejtes mintákat az áramló sheath folyadékkal vagy fiziológiás sóoldattal fókuszálják kb. **egy sejt sor átmérő** széles sejtáramra, ezzel megelőzve a „sejttorlódást” és a gyakori kapilláris dugulást. **Nézzük, hogy milyen mérettartományban tudunk a FCM-el mérni?** A FCM-ek általában 3 nagyságrendnyi részecskeméretben képesek mérésekre: a legtöbb FCM hematológiai és immunológiai applikációban az 1 től 15  $\mu\text{m}$  vérsejt tartományban működik (PLT=2-4 $\mu\text{m}$ , RBC=6-7 $\mu\text{m}$ , Ly=8 $\mu\text{m}$ , Gran=12 $\mu\text{m}$ , Mo=14 $\mu\text{m}$ ). Azonban speciális igények esetén kisebb tartományban (baktériumok =0,5 $\mu\text{m}$ , mikropartikulumok [MP] vagy mikrovezikulumok=0,1-1 $\mu\text{m}$ ) vagy nagyobb méret tartományban (tumor sejt vonalak=20-50  $\mu\text{m}$ , blastocysta=100 $\mu\text{m}$ ) is mérhetünk.

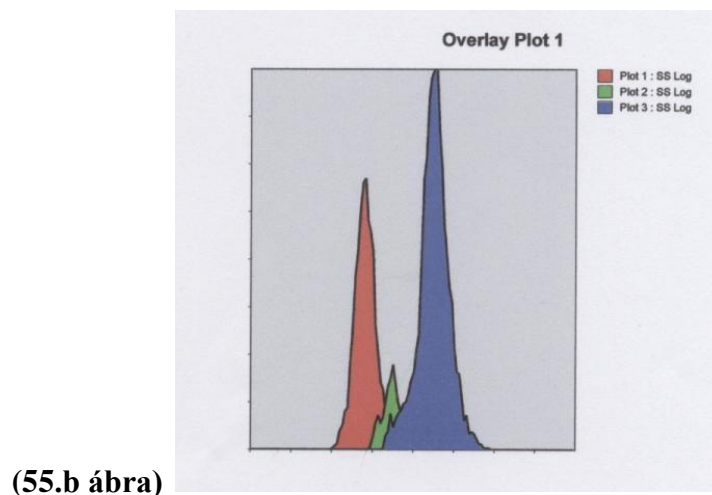
**3. Az FCM módszer alkalmas az egyes sejtek folyadékáramban lézerrel történő vizsgálatára:** amint egy-egy sejt áthalad a lézer előtt a fény fel-felvillanva töredezik/szóródik a tér összes lehetséges irányában: a/ **forward scatter (FSC)** azaz előre történő (pontosabban 0° fok körüli) szórás az a fénypászta, amelyet az előlről (a „lézerrel szemben”) detektálunk. A FSC NAGYSÁGA ARÁNYOS A SEJT NAGYSÁGÁVAL, így a FSC paramétert a sejtnagyság mérésére tudjuk alkalmazni. De hogyan lehetséges a „lézerrel szemben” sejteredetű fényszórást mérni? A FSC fényt a **FSC detector** felfogja, majd a fényerőt (intensity) elektromos feszültség impulzussá (voltage) alakítja. A legtöbb FCM-ben a detektort a lézerfény direkt hatásától az ún. **obscuration bar (OB)** védi, melyet közvetlenül a FS detektor elé helyeznek. Az OB részlegesen befedi a FS detektor elülső-központi részét, megvédve azt a direkt lézer sugárzástól. Amint a FS lézer fény eléri a FS detektort a fény az OB körül (alacsony fokban 2-3°) szóródik, így kizárólag a sejtekről származó szórt fény kerül mérésre. Mivel a kis sejtek kisméretű, míg a nagy sejtek nagyméretű FSC feszültség impulzust keltenek, ezért a regisztrált feszültség pulzusok arányosak az átfolyó sejtek méretével. A b/ **side scatter (SSC):** a sejteket érő fényszórást nemcsak előlről, de más irányokban is megfigyelhetjük. Azt a fényszórást, amely nagyobb szögből (általában 90°) detektálható, megegyezés szerint oldal szórásnak (side scatter=SSC) nevezzük. A SSC a sejtek szemcsézettségével (cytoplazma granulumok) és a sejten belüli struktúrák összetettségével (nagy részt a sejtmag alakjával) áll összefüggésben. A SSC NAGYSÁGA ARÁNYOS A SEJTEK STRUKTURÁLIS KOMPLEXITÁSÁVAL. A SSC fényt optikai lencsék és tükrök „szállítják” a lézer nyálábra rendszerint merőlegesen (90° fokban) elhelyezett detektorokhoz.

**4. Multiparaméter (többparaméteres) analízis perifériás vérsejteken (PBC):** az eljárás lényege, hogy „szín jelöléssel történő kapuzás” (colour gating) segítségével **kombináljuk a FSC és SSC hisztogramokat** – a korábban bemutatott vérkép automata

(Hematology analyser) un. „felhőkép diagramoknak” megfelelő formátumban. Például az olyan sejtcsoportok, melyek az 1D diagramokon az egyik dimenzióban homogénnek tűnhetnek (pl. összeolvadó FSC) – egy **színes hisztogram** alkalmazásával, mely „áttükrözi” egy másik dimenzióból (pl. a SSC diagramon) az ott sokkal inkább elkülönülő, eltérő színekkel ábrázolt populációkat – képesek lehetünk az egységesnek tűnő populációkat hisztogramon belül színekkel láthatóvá tenni az „egyébként átfedő” sejtpopulációkkal. A **55.a ábrán** jól láthatók a piros-zöld-kék színekkel elkülönített („colour-gated”) lymphocytamonocyt-granulocyt (Ly-Mo-Gran) sejtcsoportok:

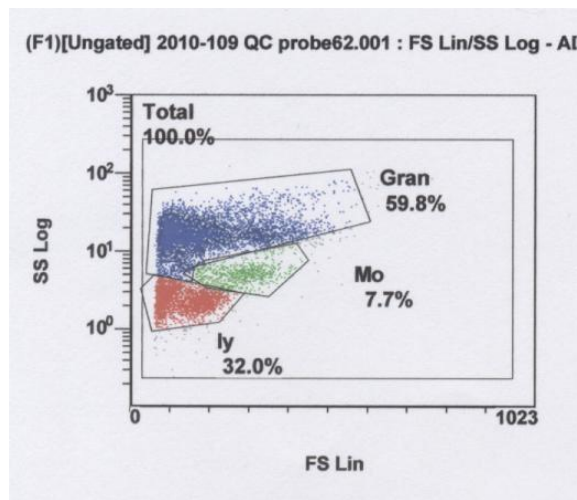


A **55.b ábrán** a SSC színes hisztogram dimenziójában ugyanazok a sejtek (Ly-Mo-Gran) természetesen azonos színekben jelennek meg, ami lehetővé teszi azonos populációk eltérő tulajdonságainak szimultán vizsgálatát.



Elegánsabb grafikai megoldás, ha a két (FSC és SSC) hisztogramot egyesítjük egy 2D pont diagramban, amit **színes dot plot („felhő-diagram”)**-nak is nevezünk (**56.ábra**): látszik, hogy az egyesítéshez a SSC hisztogramot egyenes állásban (X-tengelyhez), a SSC hisztogramot 90° fokban balra elforgatva (Y-tengelyhez) kell illeszteni, hogy a megfelelő

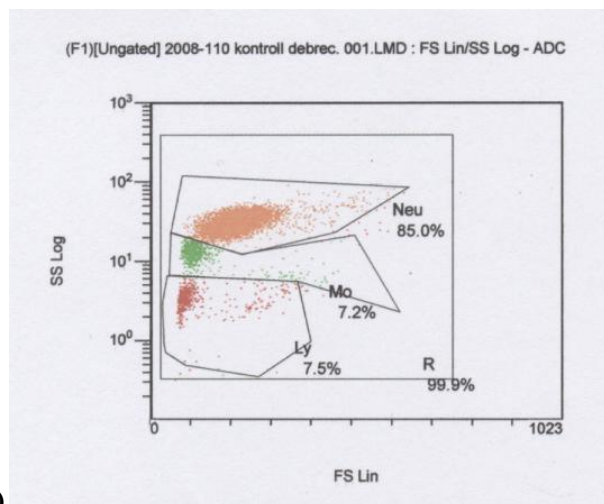
színű Ly(vörös), Mo(zöld), Gran(kék) sejtpopulációk ponthalmazai („felhőkép”) azonos kapuba kerüljenek:



(56.ábra)

b/ Íme két **emberi vérminta** „felhő-diagram” fehérvérsejt alcsoportjai a FCM-en:

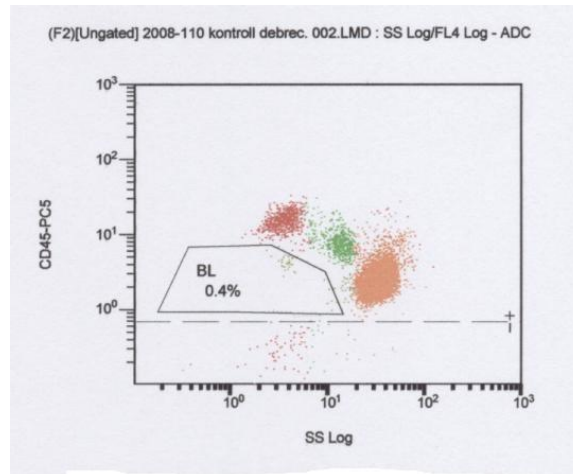
- 1./ lymphocyták (**Ly**) kis sejtek (FSC) minimális belső komplexitással (SSC);
- 2./ monocyták (**Mo**) kissé nagyobbak (FSC) mérsékelt belső komplexitással (SSC);
- 3./ granulocyták (**Gran**), nagyobb a sejt méretük (FSC) és kifejezett a komplexitásuk (polymorphonuceáris mag+cytoplasma granuláció). Általában a granulocyták legtömegesebb képviselői a 3a./ **neutrophilek** (57.ábrán: **Neu**=narancs), míg a kisebb granulocytá csoportok 3b./ **eosinophilek** (**Eo**) és 3c./ **basophilek** (**Ba**) FCM-en csak ritkán láthatóak elkülönülten.



(57.ábra)

A „felhő-diagramokon” **nem mindig különülnek el egyértelműen az egyes sejtcsoportok** (mint már láttuk, az eo és ba populációk normál mintákon sem mindig azonosíthatók, patológiás mintákon pedig gyakori az „átfedés” pl. myeloproliferatív vagy myelodysplasiás kórképekben, valamint gyakori a normáltól eltérő új populációk=blastok, lymphomás kóros sejtek megjelenése). Ezen segít a **SSC-CD45-kapuzási technika (SSC-CD45-kapuzás)**: ebben az esetben a szokásos SSC paraméter (X-tengely) mellett egy kiegészítő fluorescens

(FL=Y-tengely) monoclonális antitest jelölést, a (CD45), pan-leukocita antigén jelölését alkalmazzuk (a FL jelölési technika részleteit később a „Fluoreszcencia” fejezetben tárgyaljuk). Ha előzőleg a „felhő-diagramon” (Fig.6a) helyesen kapuztuk az egyes populációkat (Ly=vörös, Mo=zöld, Neu=narancs), akkor a koherens csoportok (Ly-Mo-Neu) azonos, „tiszta” színekben jelennek meg a SSC-CD45-kapuzásban is (**57b ábra**):



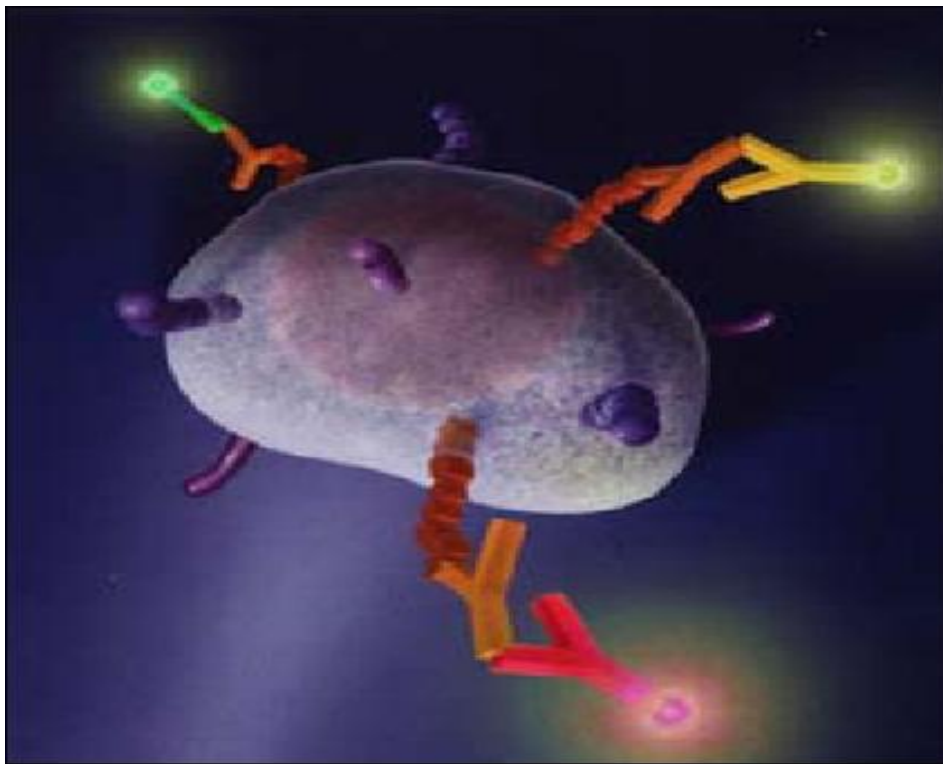
(57.b ábra)

c/ A **SSC-CD45-kapuzás** igen hasznos „mellékterméke”, hogy a CD45 negatív, alacsony SSC-el bíró **sejttörmelék**et (kevés pont közepen-lent az X-tengelyen a 10<sup>0</sup> - 10<sup>1</sup> log közötti régióban) leválasztja a mérni kívánt sejtektől (utóbbiak fűzér alakban közepén). Talán még lényegesebb előny, hogy a leírt részecske eloszlás kapcsán alakuló pontdiagramon egy központi (normálisan) jelmentes terület válik azonosíthatóvá, az ún. **blast ablak** (BL=„blast window”), mely pathodiagnosztikus szempontból lehet igen fontos. A normális sejtek helyét (a bemutatott vérmintában minimális sejtaránnyal szemben, 6b ábra, BL=0,4%) kóros állapotokban (leukémiák, lymphomák) **éretlen, blastos sejtek** foglalhatják el, melyek jelenléte támogathatja a diagnózist ill. e sejtek további fenotípus vizsgálatra kikapuzhatók. A flow cytometriában a MULTIPARAMÉTER ANALÍZIS tekinthető a legfőbb diagnosztikus vívmánynak. Így tudjuk a kóros sejtek egyedi tulajdonságait szimultán mérni (sejtes ko-expressziók) és diagnosztikus értékű hematológiai ill. immunológiai információkat gyűjteni.

5. **Fluoreszcencia:** nézzük, hogy ha a látható fény sejtes szórási paraméterei mellett a fluoreszcens fény vizsgálatát is bevetjük, milyen további strukturális és funkcionális adatokat nyerhetünk sejtjeinkről? A FCM-ban a sejtek „**fluoreszcnes jelölése**” révén, a sejtek differenciálódási fehérjéit (CD=cluster of differentiation) vizsgáljuk. E fehérjékhez kapcsolódó fluoreszcens molekulával **konjugált monoclonális antitesteket** (moat) alkalmazunk. A fluorofór (fluoreszcenciát hordozó molekula) lézerrel gerjesztett **emissziós fluoreszcenciáját** mérjük. A moat-ek CD osztályozása lehetővé teszi, hogy a sejtes differenciálódás fehérje antigénjei között egységes logikai rendszer szerint tudjunk dolgozni.

Itt csak utalunk arra az információ tömegre, mely a CD moat reagensek tulajdonságaival és diagnosztikus alkalmazhatóságával kapcsolatban az interneten elérhető: [http://en.wikipedia.org/wiki/Talk:Cluster\\_of\\_differentiation](http://en.wikipedia.org/wiki/Talk:Cluster_of_differentiation), [http://www.clinicalflow.com/Cases/Introduction to Flow Cytometric Analysis/Cluster of Differentiation \(CD Markers\)](http://www.clinicalflow.com/Cases/Introduction_to_Flow_Cytometric_Analysis/Cluster_of_Differentiation_(CD_Markers)) [http://www.lumrix.net/medical/immunology/cluster\\_of\\_differentiation.html](http://www.lumrix.net/medical/immunology/cluster_of_differentiation.html).

A vérminta egyedi sejtjeinek **FCM morfológiai paramétereit** (FSC és SSC) első menetben „festetlen” formában vizsgáltuk (1.tesztcső=autofluorescencia) un. 2D „felhő-diagramokon”. A további csövekben (2.-tól n.-ig tetszőleges számú „festett mintában”=**fenotípus panelben**) moat festéseket is alkalmazunk. Az egyes tesztcsövekben akár 2-3 vagy több eltérő színű fluorofór jelölt moat-et együtt is alkalmazhatunk=un. „**kombinált színjelölés**” (58.ábra):

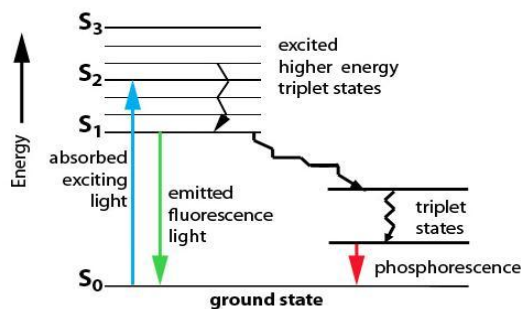


(58.ábra)

Például egy tipikus 3-as színjelölési kombinációban a FITC=fluorescent isothiocyanate(zöld), PE=phycoerythrine(vörös) és PerCP=Peridinin Chlorophyll Protein complex(kék) fluorofór konjugátumokat alkalmazhatjuk a moat-eken. De miként lehet ezeket az eltérő fluorescens szín emissziókat (általában FL1=zöld, FL2=piros, FL3=kék) létrehozni (gerjeszteni) és sejtes szinten elkülönítve mérni? A FCMs ideális eszköz erre a célra is. Hogy jobban megértsük a FCM fluorescens technikáját a fluorescencia elméleti alapjaihoz kell visszatérnünk: a/ **energia állapot**: a fluorescencia fogalma leírja azt, hogy a (lézer)fény általi gerjesztés (**excitatio**) során a fluorofór molekula magasabb energia szintre emelkedik, amit egy gyors

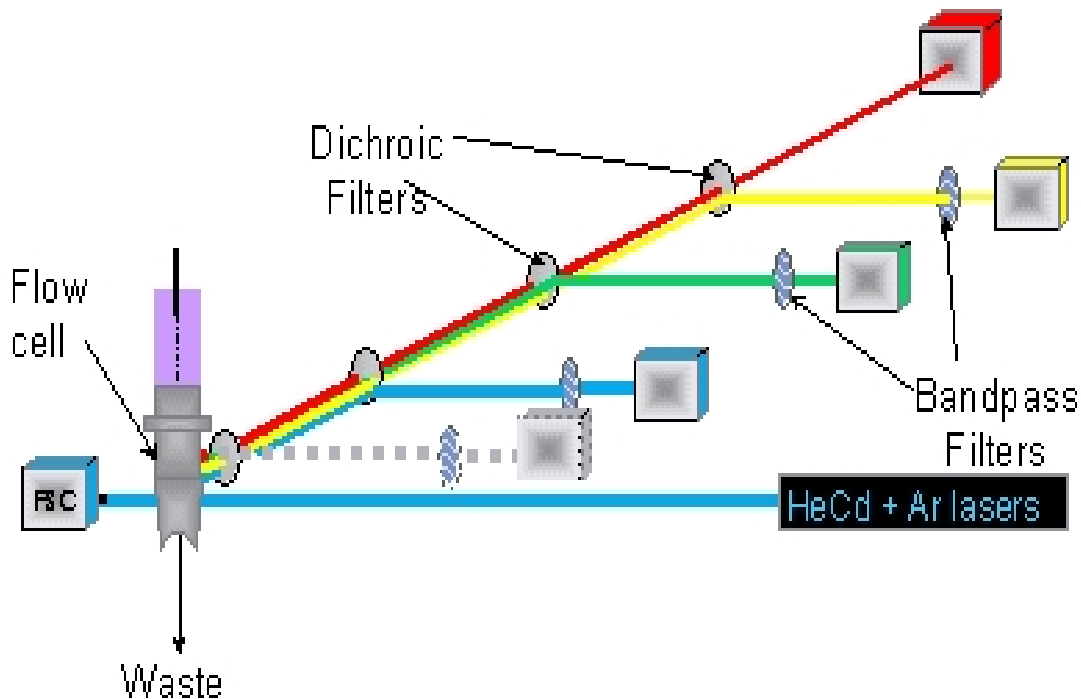
( $10^{-15}$  sec) és egy viszonylag lassabb ( $10^{-9}$  sec) visszatérés követ elérve ismét az alap állapotot. Ezenközben az első fázisban hőtermelés, a másodikban fénykibocsátás (**emissio**) kapcsán távozik a befektetett gerjesztő energia. Az emisszióknak (a hőveszteség miatt) természetesen alacsonyabb az energiája, nagyobb a hullámhossza (Stokes-shift), s persze az EMISSZIÓS FÉNY SZÍNE ELTÉR AZ EXCITÁCIÓS FÉNY SZÍNÉTŐL. Ez a fizikai tény ad alapot a gerjesztő fényforrás (FCM esetén laser) és a sejtjelölő fluorofór (a konjugált moaten) emissziós spektrumának elkülönítésére. Azaz a jelölt sejt eltérő színben fluoreszkál mint a gerjesztő lézer. Az egyes fluorofórok emissziós színe is eltér egymástól.

(Fig.59: Jablonski diagram):



b/ **fluorescens mérés a FCM-ben:** a PBC sejtmintánkban mérendő - fluorofór konjugált moat-ekkel festett - sejtek először is a hidrodinamikusan fókuszált áramlatban ütköznek a lézer nyalábbal és minden irányban fényszórást okoznak. A fluorofórok, melyek az egyes sejteken utaznak („jelölés”), a lézer fluorescens fénye által azonos hullámhosszon (általában 488 nm) gerjesztődnek, s szinte azonnal eltérő (fluorofór specifikus) hullámhosszokon emittálják a fényt. A **fluorescens fényszóródási jel** (amely magában foglalja az egyes fluorofórok által emittált, egymástól eltérő színeket és ennek megfelelő hullámhosszakot) azután tovább utazik a műszerben (90° fokos szögben elvezetve optikai filterek és tükrök

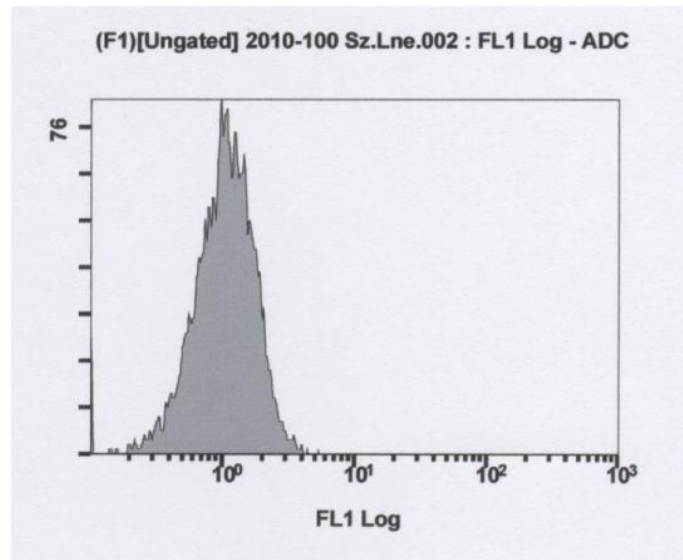
révén), hasonlóképpen mint ahogy ezt a SSC szignál esetében már leírtuk (60.ábra):



A megfelelő optikai filterek és tükrök a heterogén hullámhosszú szórt fluorescens fényjeleket azután a megfelelő hullámhosszakat kimutató detektorokhoz (FL1, FL2, FL3 ...) osztják le.

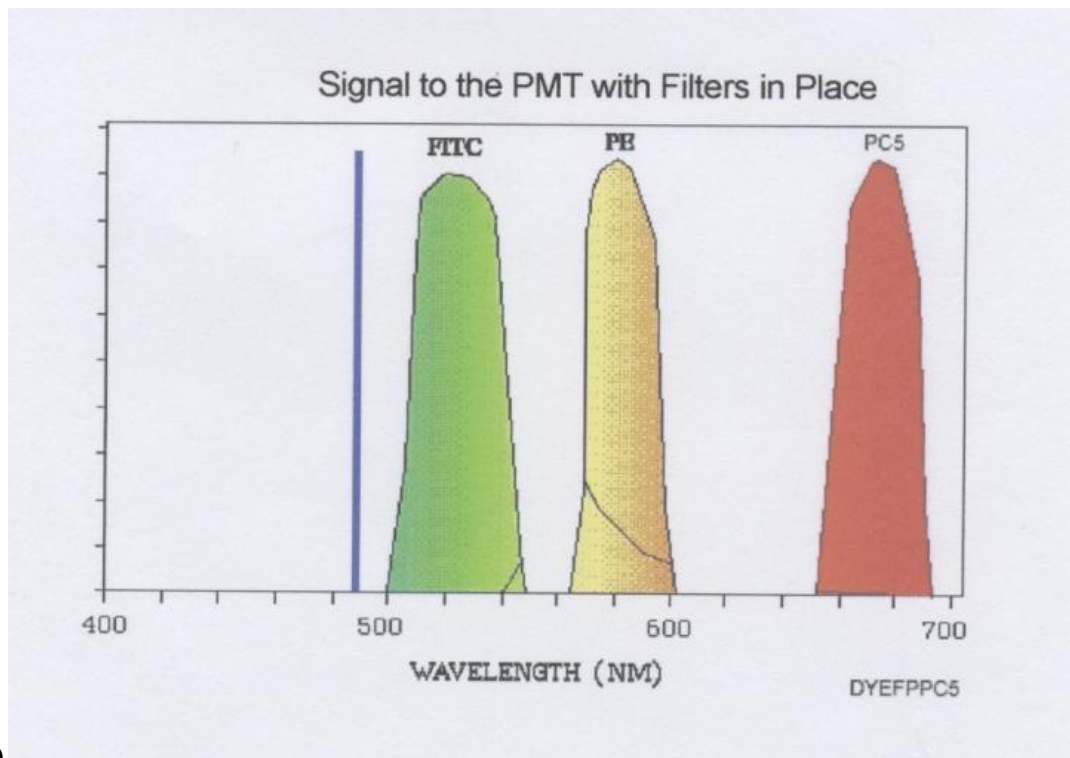
A fluorescens fényjelekből elektronikus impulzusok (voltage pulse) és a továbbiakban digitalizált computer adatok (data) valamint diagramok (histogram, dot plot) keletkeznek, csakúgy mint ahogy ezt a FSC and SSC detektálás kapcsán ezt korábban leírtuk. A fluoreszcensen jelölt sejtcsoportokban az intenzívebben festődő sejtek („bright”) több sejtfelszíni jelölődést (ennek megfelelően több sejtfelszíni fehérjemolekulát), a kevésbé festődők („dim”) kevesebb sejtfelszíni molekulát hordoznak. Előbbi jobbra, utóbbi balra halmozódik mint elektromos impulzus jel („voltage pulse” signal) a FL-hisztogramon (61 ábra): Az egyes elektromos impulzus jeleket a computer elektronikusan lesimítja a hisztogramokon, ennek megfelelően a legtöbb regisztrált fluoreszcens hisztogram szabályos, közel Gauss-szerű eloszlást mutat, melyre jellemző egy többnyire középponti helyzetű maximális eseményszám (Mean Fluoreszcens Intenzitás=**MFI**), melyet alulról és fölülől szimmetrikusan vesznek körül az alacsonyabb ill. magasabb MFI-vel (festődési intenzitással) bíró csökkenő számú „széli mérési események” (8 ábra: itt kb.  $10^2=1$  felel meg az MFI-nek az FL1 Log skálán):





(61 ábra)

c/ Kombinált színjelölés („**multicolour labeling**”): a megfelelő színekombinációhoz először is ismernünk kell az alkalmazandó fluorofórok excitációját és emissziós spektrumát (Fig.62):

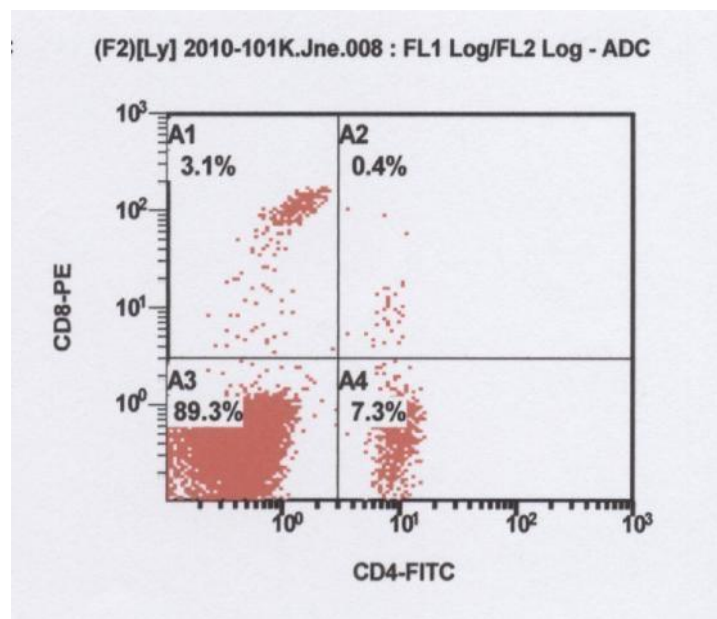


(62.ábra)

A FITC and PE gyakran szerepelnek kettős festési kombinációkban ill. gyakori a hármas kombinációként ezekkel együtt alkalmazott PC5. Ezen fluorofóroknak közös az excitációs hullámhossza (488 nm kék argon lézerer). Amint az excitációt biztosító lézer mindhárom fluorofórt a FCM-ben egyidejűleg stimulálja, akkor az emittált fény 3 féle hullámhossznak megfelelően jelenik meg (FITC=520nm=zöld, PE=580nm=sárga, PC5=Fluorochrom R Phycoerythrin cyanin 5.1 =670nm=bordó), így a specifikus emissziók külön-külön gyűjthetők. Ha ezek a spektrális maximumok közel esnek egymáshoz, előfordul, hogy hullámhossz

átfedések zavarhatják a fluorofórok specifikus emisszióinak szelektív begyűjtését („spectral overlap”). Ilyen átfedő hullámhossz területek előfordulnak a FITC and PE emissziók esetében is (62.ábrán sötét vonalak alatti területek a FITC ill. PE görbén), ezek azonban ha nem érintik a maximális emissziós hullámhosszakot, akkor az un. kompenzációs technikával elektronikusan eltávolíthatók (a részleteket később tárgyaljuk). Nincs hasonló gond az egymástól távol eső emissziós maximumú diszkrét emissziós spektrumok esetén mint pl. a PC5 a FITC-el vagy PE-el kombinálva. A 3-as és 4-es színekombinációk mindennaposá váltak a FCM-es rutin laboratóriumokban, ahol általában 1 vagy 2 lézerrel működő FCM-ek működnek. Újabban a tudományos kutató laboratóriumokban akár 10 feletti színekombináció is elérhető (több szimultán lézerrel rendelkező FCM-eket alkalmazva). Ezek a fejlesztések is minden bizonnyal bevezetésre kerülhetnek a rutin laboratóriumokban a közeli jövőben ([www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf.Par.38320.File.dat/flow\\_worksheet.pdf](http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf.Par.38320.File.dat/flow_worksheet.pdf)).

d/ **2 színű dot plot analízis:** ha 2 szín kombinációs kísérletet végzünk, ennek értékeléséhez az un. „**quadráns diagramokat**” használhatjuk, melyeken 4 féle populáció látható (**63 ábra**):

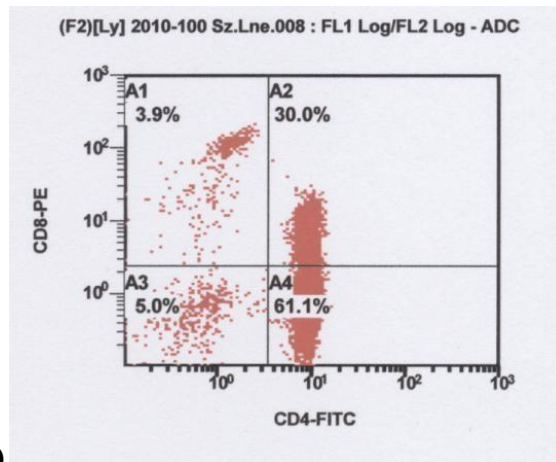


(63 ábra)

1/csak **vörös**(bright) fluoreszcens sejtek(**A1**=CD8-PE) a bal felső sarokban (**UL**=upper,left);  
2/csak **sárga**(bright) fluoreszcens sejtek(**A4**=CD4-FITC) a bal alsó sarokban (**LR**)=lower,left;  
3/ **kettős pozitív** sárga+zöld sejtek(**A2**=CD8-PE+CD4-FITC) a jobb felső (**UR**=upper,right);  
4/ valamint **kettős negatív** sejtek(**A3**=alacsony intenzitású „**dim**” CD8-PE és CD4-FITC), melyek a bal alsó **quadránsban** (**LL**=lower left) helyezkednek el.

**Normál esetben (63 ábra)** ez az eloszlás jellemző az egymás marker expresszióit kizáró, un. exkluzív CD4 és CD8 humán perifériás lymphocita populációkra (PBC), azaz gyakorlatilag nincs CD4+CD8 kettős pozitív populáció (A2-quadráns mindössze 0,4%).

Ezzel szemben **pathológiás esetekben (64 ábra)** – például egy LGL-lymphoproliferatív szindrómában, ahol a kóros sejtek LGL (large granular lymphocyte) morfológiát mutatnak - már szignifikáns mennyiségű **CD4+CD8 kettős pozitív** (A2 quadránsban 30%) **lymphocyta** található, s ennek az eredménynek akár diagnosztikus jelentősége lehet:



(64 ábra)

\*\*\*

### /7/ Esetbemutató:

Végül két esetbemutatóval szeretném zárni ezt a vérképes összefoglalót. Ezek az esetek azt mutatják, hogy vannak még további meglepetések és csapdák, melyek tanulmányozása javíthat a diagnosztikánk minőségén, s ezzel a betegek korai diagnózisát eredményezve hozzásegíthet a korábbi kezeléshez és gyógyuláshoz.

## Négy éves septicus gyermek vérkép vizsgálatának „meglepetései” és más „csapdák”



### Esetbemutató Dr. Magyarlaki Tamás PTE ÁOK LMI

MLDT Kongresszus 2010.

65.ábra: Egy látszólag ártalmatlan gyermek vérkép, az egyetlen „furcsasága” a leukopoenia mellett észlelhető extrém arányú lymphocita (VAR LYM). Az anamnézis sem különösebben gyanús. Lehetne vírus infekció okozta fehérvérsejt szám csökkenés relatív lymphocytosissal, de miért ilyen különösek ezek a lymphocyták? Miért septicus a beteg?

## Vérkép numerikus eredmény

		SUSPECT	
WBC	3.94 G/L		
NEU	.034 .853 %N		
LYM	3.86 98.0 %L	VAR LYM	
DNO	.040 1.02 %M		
EOS	0.00 0.00 %E		
ASO	.004 .114 %B	DFLT (NE)	
RBC	3.43 T/L		
HGB	108. g/L		
HCT	31.4 %		
MCV	91.7 fL		
MCH	31.4 pg		
CHC	343. g/L		
RDW	15.0 %CV		
PLT	145. G/L		
MPV	10.0 fL		

3 éves kisfiú (2009 május)

Negatív anamnézis

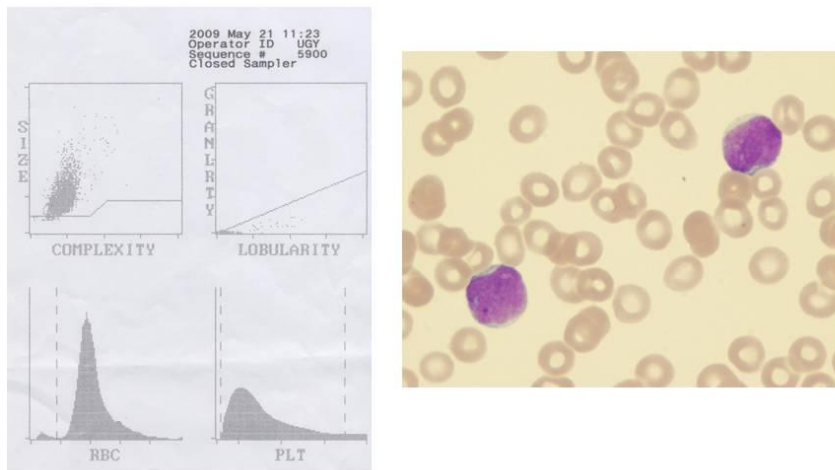
Recurráló léguti infekciók (1,5 hó)

Septicus állapot (CRP=82 mg/L)

MLDT Kongresszus 2010.

66.ábra: A „felhőkép” (balra: kis-középnagy „éretlen” mononucleáris sejtek) és a kenetek sajnos beigazolják a rossz „előérzetet”: lymphoblastok láthatók a kisgyermek kenetében, annak ellenére, hogy sem anaemia, sem thrombocytopaenia nem kíséri az észleléskor a – kornak leginkább megfelelő – akut lymphoid leukaemiát (ALL). Telefonon értesítjük a klinikust azonnali csontvelő vizsgálat végzésének szükségességéről.

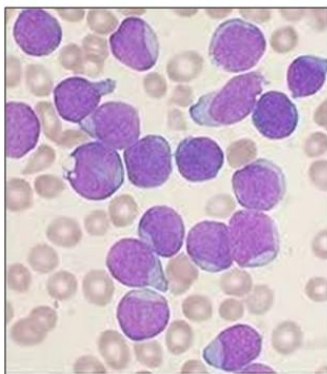
## Vérkép diagram



MLDTKongresszus 2010.

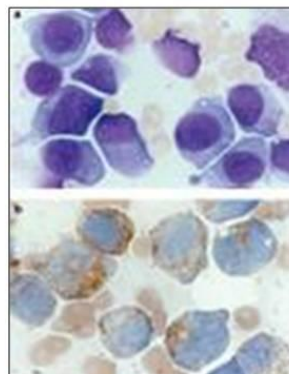
67.ábra: Néhány nap múlva a csontvelői lelet nagyfokú csontvelői infiltrációt igazol. A blast sejtek mind a csontvelőben, mind a perifárián – meglepetésre – részben MPO pozitívak, myeloid karakterűek.

## Részben MPO+ heterogén blastok



Giemsa festés

Csontvelőben: 81% blast  
(telefonos háttér információ)

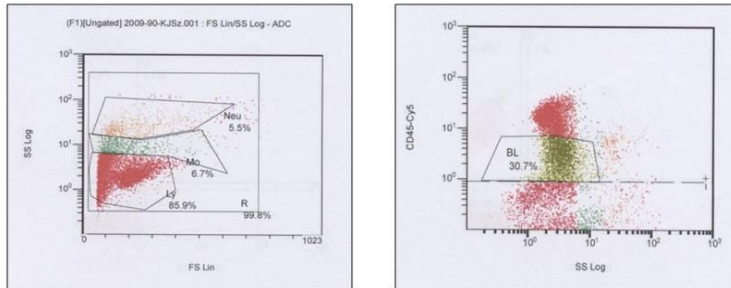


Fent: Giemsa  
Lent : MPO

MLDTKongresszus 2010.

68.ábra: A perifériás vérből elvégeztük a flow cytometriai vizsgálatot, ahol a mononucleáris sejtek a „blast kapuban” helyezkedtek el magas arányban.

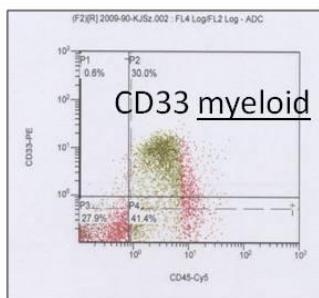
## Áramlási cytometria „morphologia”



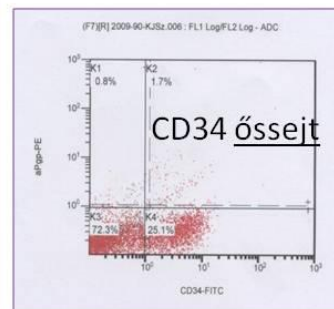
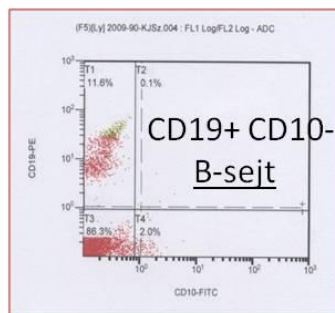
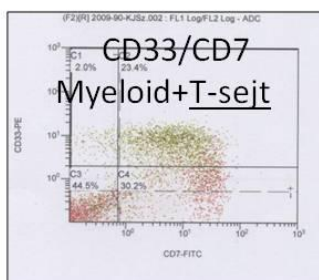
MLDT Kongresszus 2010.

69.ábra: A fenotípus eredmények pedig mind a myeloid (CD33+) mind pedig a lymphoid (CD10-/19+) proB sejtet jelleget alátámasztották alá nagyfokú éretlenség (CD34+) mellett. Ez egy bifenotypus leukaemia fennálltát támasztja alá, melyben a szokott ALL sémától eltérő, intenzívebb kezelés indokolt.

## Áramlási cytometria fenotípus



**Bifenotípus leukemia**  
(myeloid-T-B- és őssejtet kevert vonásokkal)



MLDT Kongresszus 2010.

70.ábra: A beteg a bifenotípus leukaemia ismeretében intenzív kezelésben és testvérdonoros csontvelő transzplantációban részesült.

## Therápia



Acut leukemiás gyermek TX után

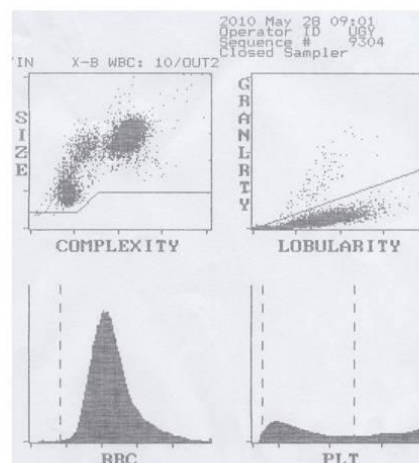
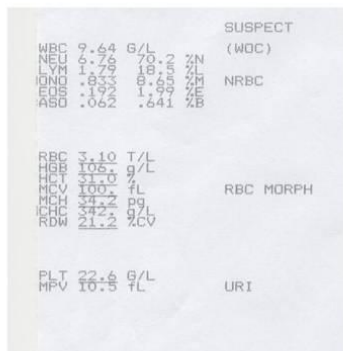
2009 május – 2010 augusztus

1. Chemoterápia I.  
(ALL IC BFM 2001 Protocol)
2. Chemoterápia II.  
(AML BFM 200 HAM block  
intenzifikált nagy dózis ARA-C)
3. Antibioticus  
(ceftazidime/amikacin)  
és antimycoticus (amfotericinB/  
flucunasol) kezelések
4. Parenterális táplálás,  
polytransfusio
5. Szedálás (Valproate)
6. Hypotensio/tachicardia – ITO
7. Allogén csv transzplantáció  
(febr.)
8. GVHR, CMV – MRD majd  
Remissio ...

MLDTKongresszus 2010.

71.ábra: Egy másik esetben – ahol a klinikai háttér ugyan ismert volt (preB-ALL) – azonban az esetleges relapsus lehetőségére semmi más nem utalt, mint az indokolatlanul alacsony PLT. A preanalytikai hiba és pseudothrombocytopaenia lehetőségének kizárása (lásd korábban) után annak ellenére kenetvizsgálat mellett döntöttünk, hogy a gépi vérkép teljesen normálisnak tűnt. A terhelő anamnézis és a thrombocytopaenia elegendő okot adott a nyugtalanságra.

## Ami egyszer megtörténhet...



22 éves fiatalember: asthma, 2008 dec:  
splenomegalia, preB-ALL(Ph<sup>-</sup>), chemoth.  
Hoelzer: indukció, halasztott konsolidációs  
kezelés, infectio, PTX, pneumonia (2009.03-05)  
Aplasia(2009.07), Sepsis - Th megszakítás, obs.

MLDTKongresszus 2010.

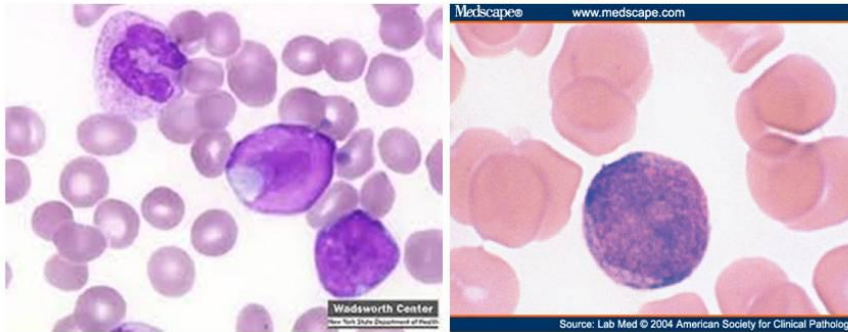
72.ábra: A kenetekben teljesen normális kvalitatív fehérvérsejt kép háttér mellett sajnos néhány% blastot (5%) találtunk. Az ezt követő csontvelő vizsgálat már 91%-os csontvelői infiltrációt mutatott (ez állhatott a thrombocytopaenia hátterében), néhány nap múlva a perifériás sejtszám is „robbant”, a lekaemia recidivált. Kb 1 év múlva a beteg sajnos meghalt.



## Kenetfestés



2010.05. – RELAPSUS (perif=5%, cs.v.=91%)

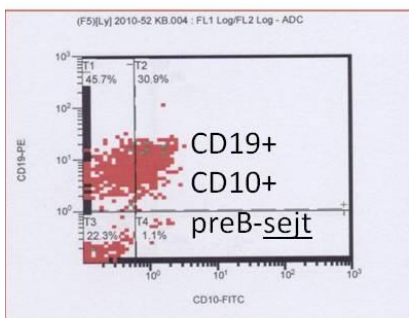


Sepsis, légzési elégtelenség, pitvarfibrilláció, cardioverzió(4x)  
2010.06.19 – Exitus letalis

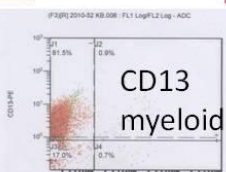
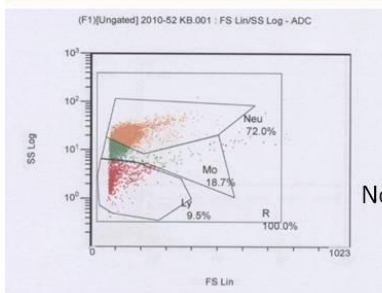
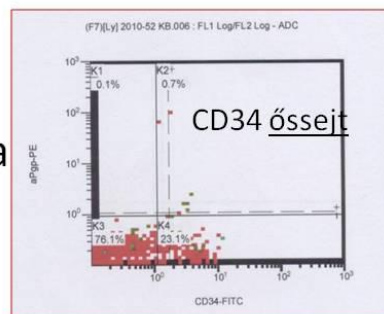
MLDT Kongresszus 2010.

73.ábra: A flow cytometria a normál granulocyta-monocyta-lymphocyta arány mögött a jellegzetes fenotípus révén (CD10+/19+ és CD34+) már viszonylag alacsony blast szám esetén is kimutatja a recidiv tumor sejteket (marker fenotípus). A módszer érzékenysége nagy: akár 1:10<sup>4</sup> arányban is kimutathatók reziduális daganatsejtek (MRD=minimal residual disease).

## Áramlási cytometria

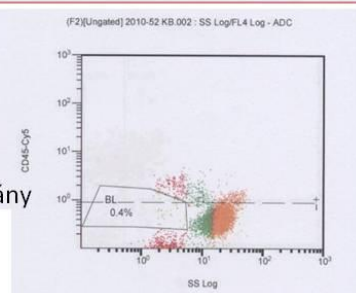


cALLA+  
leukemia



Normál Gran-Ly-Mo arány

MLDT Kongresszus 2010.





Remélem sikerült valamelyest betekintést adnom a klinikai laboratórium vérképes munkáról, annak szépségeiről, nehézségeiről és a benne rejlő további perspektívákról.

# Haematológiai betegségek diagnosztikája

1. Klinikai tünetek

2. Laboratóriumi vizsgálatok

3. Pathológia

- csontvelő aspirátum vagy biopszia
- nyirokcsomó FTAB vagy rezekció

4. Képalkotó eljárások

**THERÁPIA !!!**

Köszönöm az érdeklődést és figyelmet.

## Még van dolgunk!

