

1 Τεχνικής φύσης εισαγωγικές παρατηρήσεις

Η αυτόματη ανάλυση των διαφόρων εικόνων του αίματος έχει περιορίσει σε σημαντικό βαθμό την οπτική διαγνωστική της κυτταρομορφολογικής σύνθεσης της φυσιολογικής αιματολογικής εικόνας. Ακόμη και παθολογικά κυτταρικά στοιχεία καταγράφονται αυτομάτως, χωρίς ωστόσο να αναγνωρίζονται ποιοτικά, με αποτέλεσμα να μην παρέχονται τα δεδομένα της οπτικής μικροσκοπικής εξέτασης. Επιπλέον, σε πολλά μικρά νοσοκομεία δεν υπάρχουν ακόμη διαθέσιμοι αυτόματοι αναλυτές της διαφροποίησης των λευκοκυττάρων. Αυτό ισχύει και για πολλά ιατρεία. Όπως και παλαιότερα, η μορφολογική εκτίμηση επιχρισμάτων αιμάτος και παρασκευασμάτων μυελού των οστών αποτελεί τη βάση της αιματολογικής διάγνωσης. Η διάγνωση αυτή συμπληρώνεται με την ανίχνευση χαρακτηριστικών ενζύμων και άλλων συστατικών του κυττάρων, μέσω της κυτταροχημείας και με την εξέταση ειδικών αντιγόνων μέσω της ανοσοκυτταρολογίας. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να γίνει μία αρχική επισκόπηση των μεθόδων αυτών και των προϋποθέσεών τους.

1.1 Επιχρίσματα

Είναι αυτονόητο ότι η δημιουργία ικανοποιητικών επιχρισμάτων δεν μπορεί να διδαχθεί με ένα βιβλίο. Μόνο μία αρκετά μακρόχρονη κλινική πράξη εξασφαλίζει τις απαραίτητες δεξιότητες. Από την άλλη πλευρά, η άψογη εκτίμηση των κυτταρικών ευρημάτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα των επιχρισμάτων και την κατάλληλη χρώση αυτών. Για τον λόγο αυτό θα πρέπει να γίνουν ορισμένες υποδείξεις προκειμένου να αποφεύγονται διαφόρων ειδών σφάλματα.

Καταρχήν ουσιώδης είναι η άψογη καθαρότητα των αντικειμενοφόρων πλακών. Οι τελευταίες υπάρχουν σήμερα διαθέσιμες για άμεση χρήση και φέρουν ένα τραχύ τμήμα κατάλληλο για γράψιμο, ενώ δεν

χρειάζεται κάποια ιδιαίτερη προετοιμασία. Η διατήρηση των αντικειμενοφόρων πλακών πρέπει να γίνεται σε περιβάλλον χωρίς σκόνη. Επίσης θα πρέπει να υπάρχει επάρκεια αποθεμάτων.

Κατά την παρασκευή επιχρισμάτων αιμάτος απαιτείται προσοχή ώστε το επιχρισμάτα να καταλάβει τα μόνο 2/3 ως 3/4 της αντικειμενοφόρου πλάκας. Η επιστρώση μπορεί να γίνει είτε με μία λεία καλυπτρίδα είτε με μία αντικειμενοφόρο πλάκα με λεία χειλή. Το πάχος του επιχρισμάτος πρέπει να είναι κατά το τελευταίο τριτημόριο τόσο λεπτό ώστε τα ερυθροκύτταρα να βρίσκονται εν μέρει μεμονωμένα το ένα από το άλλο και εν μέρει σε μικρούς σωρούς. Τα επιχρισμάτα που έχουν μεγάλο πάχος υφίστανται υπέρχρωση με αποτέλεσμα η ανάλυση λεπτών κυτταρικών δομών να καθίσταται δυσχερής, δεδομένου ότι τα διάφορα κυτταρικά στοιχεία δεν απλώνονται επαρκώς. Η εκμάθηση της σωστής τεχνικής των επιχρισμάτων εξαρτάται από την κλινική πράξη.

Η οστεομυελική βιοψία μπορεί σε γενικές γραμμές να επιστρώθει όπως το αίμα. Το αναρροφηθέν υλικό συλλέγεται με ή χωρίς την προσθήκη ενός αναστολέα της πήξης σε ένα τριβλίο Petri με επίπεδη επιφάνεια στο οποίο το επιπλέον αίμα του μυελού απομακρύνεται και στη συνέχεια με τη βοήθεια μίας αντικειμενοφόρου πλάκας με λεία χειλή λαμβάνονται τεμάχια μυελού από το έδαφος του τριβλίου σε μικρές ποσότητες για επιστρώση. Τα επιχρισμάτα θα πρέπει τελικά να περιέχουν ικανοποιητικό αριθμό μικρών τεμαχιδίων μυελού.

Εκτός όμως από τα παραπάνω, θα πρέπει να απομονωθούν και 3-4 παρασκευάσματα από σύνθλιψη μεμονωμένων τεμαχιδίων μυελού, τα οποία λαμβάνονται είτε με το χειλός μίας αντικειμενοφόρου πλάκας είτε με τη βοήθεια ενός ξύλινου στυλεού. Όταν το δείγμα του μυελού που έχει ληφθεί είναι πτωχό, τότε χρησιμοποιείται αποκλειστικά αυτή η μέθοδος. Η σύνθλι-

ψη των τεμαχιδίων η οποία απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή για την προφύλαξη των κυττάρων πραγματοποιείται με τη βοήθεια μίας δεύτερης αντικειμενοφόρου πλάκας, η οποία φέρεται υπό ήπια πίεση κατά μήκος της πρώτης αντικειμενοφόρου πλάκας έτσι ώστε το υλικό των τεμαχιδίων να επιστρώθει σε μία λεπτή στιβάδα. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται επίσης ώστε τα επιχρίσματα οστεομυελικής βιοψίας των οστών να έχουν επαρκώς λεπτό πάχος και όσο γίνεται ομοιόμορφη κατανομή, έτσι ώστε τα ακέραια και ανευρισκόμενα σε σωρούς κυτταρικά στοιχεία να μπορούν να εκτιμηθούν ανεμπόδιστα. Επιχρίσματα μυελού με μεγάλο πάχος δεν ενδείκνυνται στη μορφολογική διαγνωστική.

Η χρώση των επιχρισμάτων αίματος και μυελού δεν θα πρέπει να πραγματοποιείται με σχηματικό τρόπο παρά το γεγονός ότι υπάρχουν συγκεκριμένες κατευθυντήριες οδηγίες που μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για τη διαδικασία της χρώσης. Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη χρώση, αυτή κατά Rappenheim, ξεκινά με βραχυχρόνια δράση του χρωστικού διαλύματος May-Grünwald (διάρκεια 4-6 λεπτά), ενώ συχρόνως γίνεται μονιμοποίηση του παρασκευάσματος με αλκοόλη. Μέχρι το σημείο αυτό η χρώση πραγματοποιείται με σχηματικό τρόπο. Η συχνά συνιστώμενη στη φάση αυτή διαφοροποίηση της διαδικασίας με τη χρήση ουδέτερου αποσταγμένου ύδατος δεν έχει κανένα αξιόλογο όφελος και μπορεί να αντικατασταθεί από απλή έκπλυση του παρασκευάσματος (επίσης με απεσταγμένο ύδωρ). Η επόμενη χρώση, που πραγματοποιείται με διαλύμα Giemsa, διαφέρει από εργαστήριο σε εργαστήριο όσον αφορά στη συγκέντρωση της χρωστικής και τη διάρκεια. Αποφασιστικής σημασίας στο σημείο αυτό είναι το pH του χρησιμοποιούμενου απεσταγμένου ύδατος που πρέπει να είναι όσο το δυνατόν ουδέτερο. Αυτή η προϋπόθεση ωστόσο δεν εκπληρώνεται σχεδόν ποτέ στην κλινική πράξη, χωρίς όμως να προκύπτουν μειονεκτήματα εφόσον οι έντονες αποκλίσεις του pH είναι γνωστές και αποφεύγονται και εφόσον η διάρκεια της χρώσης παρατείνεται σε ελαφρά όξινο pH ή περιορίζεται στην αντίθετη περίπτωση. Αν με αυτή τη διαδικασία δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί μία καλή πανοπτική χρώση, τότε συ-

στήνεται η ακόλουθη ρύθμιση του διαλύματος Giemsa, η οποία έχει αποδειχθεί αξιόλογη: 10 ml καθαρού διαλύματος Giemsa + 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος + 1000 ml διπλά αποσταγμένου ύδατος. Ρυθμιστικό διάλυμα: 1.8 ml 0.1 n NaOH + 100 ml πρόστυπο διάλυμα λιθίου (όπως παρασκευάζεται από τον οίκο Fa Netheler και Hinz για φλογοφωτομετρικές αναλύσεις του ορού του αίματος). Η διάρκεια της χρώσης με αυτό το χρωστικό ρυθμιστικό μίγμα είναι 15-20 λεπτά. Προσοχή απαιτείται για τον τακτικό καθαρισμό των γυάλινων σκευών που χρησιμοποιούνται για το διάλυμα Giemsa, καθώς και για τη διήθηση των χρωστικών διαλυμάτων.

Οι ειδικές χρώσεις και οι κυτταροχημικές μέθοδοι αναφέρονται στο αντίστοιχο παράρτημα του βιβλίου. Η σωστή μικροσκοπική παρατήρηση των επιχρισμάτων περιφερικού αίματος πραγματοποιείται αρχικά με τους αντικειμενικούς φακούς 10 και 40 με προσοφθάλμιο φακό 10 x με σκοπό την ταχεία επισκόπηση της προσότητας και της ποιότητας της εκάστοτε κυτταρικής εικόνας. Στο σημείο αυτό συστήνεται η χρήση λεπτής καλυπτρίδας με σκοπό τη μείωση της αντανάκλασης του φωτός στην επιφάνεια του παρασκευάσματος. Με τη χρήση καταδιοτικού φακού 40 χωρίς κεδρέλαιο είναι δυνατόν να τεθούν αρκετές διαγώσεις κατ' αυτόν τον τρόπο, χωρίς καμία περατέρω ενέργεια. Η εκτίμηση ωστόσο της μορφολογίας των ερυθροκυττάρων προϋποθέτει τη χρήση κεδρελαίου. Η διαφοροποίηση των επιχρισμάτων αίματος πραγματοποιείται με την εξέταση με κεδρέλαιο. Η εξέταση διενεργείται μέσω κινήσεων με τη μορφή μαιάνδρου στο τελευταίο τριτημόριο της αντικειμενοφόρου πλάκας, ωστόσο δεν γίνεται εκτίμηση των άκρων του επιχρισμάτος, στα οποία συσσωρεύονται στοιχεία των λευκών αιμοσφαιρίων με διάφορες βλάβες, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή αποτελεσματά. Από την άλλη πλευρά, στα σημεία αυτά είναι δυνατόν να αναζητηθούν με συγκεκριμένο τρόπο παθολογικά κύτταρα. Από την άποψη της ακριβούς εκτίμησης της μορφολογίας των ερυθροκυττάρων θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι στα σημεία του επιχρισμάτος με μικρό και μεγάλο πάχος το σχήμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων μεταβάλλεται με αυθαίρετο τρόπο.

Οι οστεομυελικές βιοψίες θα πρέπει επίσης να εξετάζονται αρχικά με ξηρό αντικειμενικό φακό, προκειμένου να εξασφαλίζεται μία γενική άποψη της κυτταρικής εικόνας και να μην διαφεύγουν εντοπισμένες αλλοιώσεις (σωροί εξοιδημένων κυττάρων, κοκκιώματα). Σπανιότερα ευρήματα ανακαλύπτονται με τη χρήση κεδρελαίου η οποία κυριαρχεί στη δεύτερη φάση της εξέτασης. Μόνο μία τέτοιου ειδούς συνδυασμένη ανάλυση της βιοψίας μπορεί να θεωρηθεί πλήρης. Η εξέταση αυτή θεωρείται αξιόπιστη όταν εκτιμώνται τουλάχιστον 1000 κύτταρα. Η ποσοτική και ποιοτική διαφοροποίηση των επιχρισμάτων του μυελού μπορεί κατά κανόνα να παραλειφθεί στον βαθμό που δεν παρέχει απαντήσεις σε ειδικά ερωτήματα (π.χ. καθορισμός του ποσοστού των βλαστών).

Τέλος, θα πρέπει να συσταθεί σε κάθε ενασχολούμενο με την Αιματολογία ότι τα παρασκευάσματα διατηρούνται με τον καλύτερο τρόπο σε κυτία που περιέχουν 100 αντικειμενοφόρες πλάκες. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να γίνει επιμελής απομάκρυνση του κεδρελαίου από τα παρασκευάσματα αυτά.

Βασική αρχή της αιματολογικής-μικροσκοπικής διάγνωσης:

Μόνο η συνοπτική εικόνα των εξετάσεων του αίματος και του μυελού καθιστά δυνατή την ολοκληρωμένη διάγνωση.

1.2 Ανοσοκυτταρολογικές εξετάσεις και οι τεχνικές τους προϋποθέσεις

Εκτός από την εξέταση της μορφολογίας των επιχρισμάτων μυελού και αίματος, οι ανοσολογικές μέθοδοι για την ανίχνευση επιφανειακών αντιγόνων και αντιγόνων του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα αποκτούν ολοένα και μεγαλύτερη σημασία για τη διάγνωση. Οι ανοσοκυτταρολογικές εξετάσεις έγιναν δυνατές με βάση την ανάπτυξη των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Ο μεγάλος αριθμός μονοκλωνικών αντισωμάτων εναντίον αιμοποιητικών και λεμφικών στοιχείων οδήγησε στη δημιουργία μίας ενιαίας διεθνούς ονοματολογίας, η οποία εξελίχθηκε στη συνέχεια στο "International Workshops on Human Leukocyte Differentiation Antigens". Μονοκλωνικά αντισώματα με παρόμοια ορολογική δραστηριότητα, τα οποία ωστόσο δεν αναγνωρίζουν τα ίδια αντιγόνα ή τουλάχιστον τον ίδιο επίποπτο του αντιγόνου αυτού κατατάχθηκαν στα διάφορα Workshops σε σύνολο διαφοροποίησης (cluster of differentiation - CD) με την αντίστοιχη αρίθμηση.

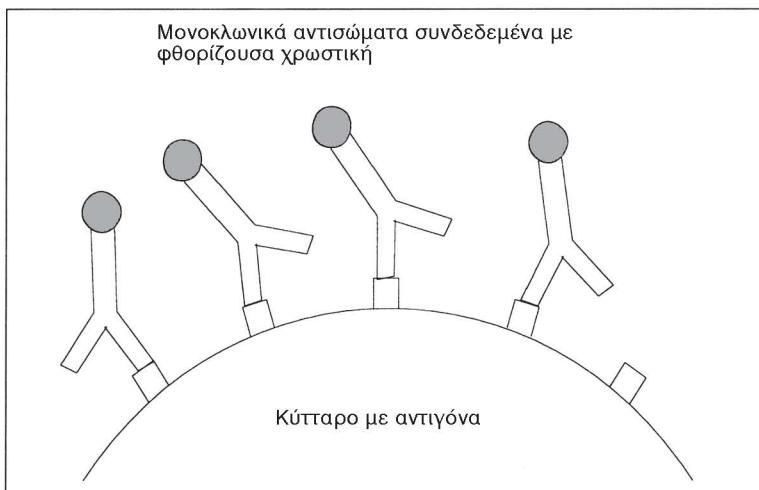
Η αντιδραση των ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων (πρωτογενή αντισώματα) είναι ορατή ή μετρήσιμη με πολλούς διαφορετικούς τρόπους: τα πρωτογενή αντισώματα μπορούν να ανιχνευθούν άμεσα με φθορίζουσες χρωστικές (Εικ. 1). Το αποτέλεσμα της αντιδρασης είναι δυνατόν να παρακολουθηθεί με ένα μικροσκόπιο φθορισμού. Το μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι η μορφολογία μπορεί να εκτιμήθει μόνο με αντίθεση φάσεων. Επιπλέον το φθοριόχρωμα εξασθενεί γρήγορα με αποτέλεσμα τα παρασκευάσματα να αποχρωματίζονται ταχέως και να μην είναι δυνατή η αρχειοθέτησή τους.

Η μέτρηση του φθορισμού είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί και με την κυτταρομετρία ροής. Κατά τη μέθοδο αυτή τα συνδεδεμένα με φθορίζουσες χρωστικές αντισώματα διεγέρονται από μία ακτίνα laser και καταμετρούνται μέσω ευαίσθητων φωτολεκτροδίων. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ο εύκολος ποσοτικός προσδιορισμός και η δυνατότητα διπλής ή και πολλαπλής σήμανσης ανάλογα με το μηχάνημα. Η μέθοδος αυτή σε γενικές γραμμές δεν επιτρέπει τη μορφολογική εκτίμηση των κυττάρων.

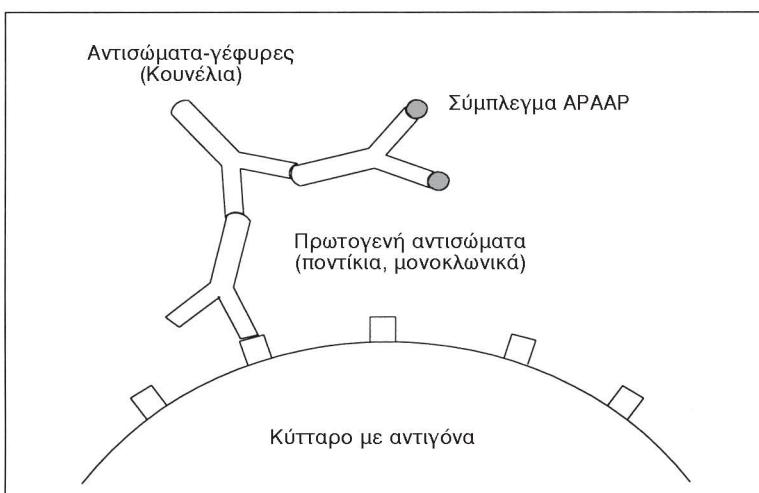
Η διενέργεια ανοσοκυτταρολογικών εξετάσεων προϋποθέτει την ακεραιότητα των επιφανειακών δομών των κυττάρων. Αντικειμενοφόρες πλάκες που πρέπει να εξεταστούν ανοσοκυτταρολογικά θα πρέπει να επομένως μετά το στέγνωμα με αέρα να υποστούν επεξεργασία ή να καταψυχθούν ταχέως, το αργότερο μέσα σε 24 ώρες. Η κατάψυξη πραγματοποιείται μετά από τύλιγμα των αντικειμενοφόρων πλακών σε αλουμινόχαρτο. Πριν από τη διε-

νέργεια ανοσοκυτταρολογικών εξετάσεων σε αντικειμενοφόρες πλάκες αποψύχονται εντός αυτής της συσκευασίας.

Κατά την αποστολή αίματος για την διενέργεια εξετάσεων με κυτταρομετρία ροής συστήνεται η χρησιμοποίηση αίματος με EDTA. Η μακροπρόθεσμή σταθερότητα των κυττάρων κατά την κυτταρομετρία ροής είναι με αυτόν τον τρόπο εξασφαλισμένη. Η αποστολή του δείγματος θα πρέπει να γίνεται το αργότερο σε 24 ώρες.



Εικ. 1 Αρχή της ανοσοκυτταρολογίας με μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσα χρωστική.



Εικ. 2 Αρχή της ανοσοκυτταρολογίας με ανοσοκυτταροχημικές μεθόδους.

Μία άλλη μέθοδος για την ανίχνευση της αντίδρασης των πρωτογενών αντισωμάτων είναι η αντίδραση APAAP (alkaline phosphatase and mouse monoclonal anti alkaline phosphatase). Κατά τη μέθοδο αυτή το πρωτογενές αντίσωμα συνδέεται μέσω ενός αντι-Ig-αντισώματος ποντικού (αντίσωμα-γέφυρα) με αλκαλική φωσφατάση συνδεδεμένη σε ένα άλλο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού. Η αλκαλική φωσφατάση αποδίδει στη συνέχεια ένα φωτεινό ερυθρό χρώμα (Εικ. 1 και 2).

1.3 Λήψη συμπυκνωμένων λευκοκυττάρων

4.5 ml φλεβικού αίματος εισάγονται σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης (μέγιστης διαμέτρου 1.5 cm) που περιέχει 0.5 ml κιτρικού Na 3.2%, αναμιγνύονται προσεκτικά και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στις 1500 στροφές επί 15 λεπτά (Εικ. 3, στάδια 1 και 2). Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου πλάσματος (3) συλλέγονται με μία

λεπτή πιπέττα αναρρόφησης 0.2 ως 0.3 ml από το λευκής χροιάς στρώμα των λευκοκυττάρων (4). Ταυτόχρονα δεν επιτρέπεται η αναρρόφηση στην πιπέττα μικρών τυμημάτων από τη στιβάδα των αιμοσφαιρίων. Πολλές σταγόνες από το αναρροφηθέν ίζημα επιστρώνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες όπως ένα επίχρισμα αίματος (5) και χρωματίζονται με χρώση Parphenheim ή με κυτταροχημικές μεθόδους.

Ενδείξεις λήψης συμπυκνωμένων λευκοκυττάρων

- Κυτταρικός εμπλούτισμός σε περίπτωση λευκοπενίας
- Ανίχνευση παθολογικών κυττάρων σε περίπτωση λευκοπενίας
- Κυτταρικός εμπλούτισμός σε περίπτωση λευκοπενίας για τη διενέργεια κυτταροχημικών αντιδράσεων
- Κυτταρικός εμπλούτισμός για την ανεύρεση προσεκβολών δίκην πλήκτρων τυμπάνου

Κιτρικό/Αίμα 0.5:4.5

PI

Φυγοκέντρηση
1500 στροφές/min L.

Sch.

Ery

15 λεπτά

Εικ. 3 Λήψη συμπυκνωμένων λευκοκυττάρων.