

Εισαγωγή στις διαγνωστικές τεχνικές της αιματολογίας

Roger Powell και Andrew Torrance

Εισαγωγή

Η εισαγωγή και η ευρεία εφαρμογή των αιματολογικών αναλυτών τεχνολογίας λέιζερ, της κυτταρομετρίας ροής, της ανοσοφαινοτυπικής μελέτης των κυττάρων και της ψηφιακής απεικόνισης κυτταρολογικών εικόνων αποτελούν τις πιο σημαντικές καινοτομίες στην αιματολογία των ζώων συντροφιάς τα τελευταία χρόνια. Η παρατηρητικότητα ενός αιματολόγου-κτηνιάτρου κατά τη διενέργεια των εργαστηριακών εξετάσεων, σε συνδυασμό με τον ειδικό σχολιασμό των εκάστοτε ευρημάτων, αποτελούν την πιο χρήσιμη και ουσιαστική συμβολή στη διαγνωστική διερεύνηση των αιματολογικών νοσημάτων.

Η εφαρμογή εργαστηριακών τεχνικών αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της διάγνωσης στην αιματολογία. Η γενική εξέταση του αίματος περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης (*hemoglobin*, Hb), της τιμής του αιματοκρίτη (*hematocrit*, Hct ή packed cell volume, PCV), των διαφόρων ερυθροκυτταρικών δεικτών [μέσος όγκος ερυθρών (mean corpuscular volume, MCV), μέση ποσότητα αιμοσφαιρίνης ανά ερυθρό αιμοσφαιρίο (mean corpuscular hemoglobin, MCH), μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης ανά ερυθρό αιμοσφαιρίο (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)], των συνολικών αριθμών των αιμοπεταλίων, των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των λευκών αιμοσφαιρίων, των αριθμών των επιμέρους λευκών αιμοσφαιρίων (λευκοκυτταρικός τύπος), καθώς και την εκτίμηση της μορφολογίας των κυττάρων του αίματος.

Σε πολλά αιματολογικά νοσήματα, η μικροσκοπική εξέταση του επιχρίσματος αίματος ενδέχεται να είναι αρκετή για τη διάγνωσή τους. Αντίθέτως, σε άλλα νοσήματα απαιτείται η συνεκτίμηση των διαφόρων εργαστηριακών εξετάσεων (αιματολογική και βιοχημική εξέταση, ανάλυση ούρων) του ζώου, καθώς και του ιστορικού και της κλινικής του εικόνας, προκειμένου να επιλεγούν στη συνέχεια οι κατάλληλες απεικονιστικές και λοιπές εργαστηριακές εξετάσεις που θα θεμελιώσουν την οριστική διάγνωση. Τόσο οι σκύλοι όσο και οι γάτες παρουσιάζουν ευρύτερο φάσμα αιματολογικών διαταραχών σε σχέση με άλλα είδη, γεγονός που καθιστά την αιματολογία έναν ιδιαιτέρως σημαντικό κλάδο για την ιατρική των ζώων συντροφιάς.

Λήψη δείγματος αίματος

Η διαγνωστική αξία της αιματολογικής εξέτασης εξαρτάται από το κατά πόσο αντικατοπτρίζεται η επίδραση των διαφόρων παθολογικών καταστάσεων στα έμμορφα συστατικά του αίματος. Ειδικότερα, η σύσταση του αίματος μεταβάλλεται διαρκώς και με γρήγορο ρυθμό, ακόμη και σε φυσιολογικά φαινόμενα, όπως η σύσπαση του σπλήνα ή η μετακίνηση ουδετερόφιλων από το αγγειακό τοίχωμα στην κυκλοφορία του αίματος. Οι παραπάνω καταστάσεις

προκαλούνται λόγω της καταπόνησης της αιμοληψίας και επιδρούν άμεσα στην αιματολογική εικόνα του ζώου, με αποτέλεσμα να περιπλέκεται η ερμηνεία της. Για παράδειγμα, η ουδετεροφίλια λόγω καταπόνησης στη γάτα μπορεί να αποδοθεί εσφαλμένα σε φλεγμονή, ενώ αντιστοίχως στον σκύλο η αυξημένη τιμή του αιματοκρίτη που προκύπτει λόγω της σύσπασης του σπλήνα ενδέχεται να αποδοθεί σε αφυδάτωση. Τα ηρεμιστικά και αναλγητικά φάρμακα επηρεάζουν σημαντικά την αιματολογική εικόνα των ζώων, με αποτέλεσμα να αποκρύπτονται υποκείμενες παθολογικές καταστάσεις. Ειδικότερα, στις επιδράσεις των παραπάνω φαρμάκων περιλαμβάνονται η μη αναγεννητική αναιμία, η ουδετεροπενία και η λεμφοκυτταροπενία. Επιπλέον, φυσιολογικοί παράγοντες, όπως η ηλικία, μπορούν να επιδράσουν σημαντικά στην αιματολογική εικόνα ενός ζώου. Για παράδειγμα, οι νεαρές γάτες εμφανίζουν εντονότερη λεμφοκυττάρωση, λόγω της καταπόνησης της αιμοληψίας, σε σχέση με τις ενήλικες. Το παραπάνω γεγονός οφείλεται κατά ένα μέρος στη σύσπαση του σπλήνα, καθώς και στον υψηλότερο αριθμό λεμφοκυττάρων που έχουν -φυσιολογικά- τα νεαρά ζώα σε σχέση με τα μεγαλύτερα σε ηλικία. Εύκολα, λοιπόν, συνάγεται ότι κάθε φορά που λαμβάνεται δείγμα αίματος για εξέταση, στην τελευταία αποτυπώνεται ότι συμβαίνει στον οργανισμό τη στιγμή της αιμοληψίας. Μάλιστα, καθώς οι αριθμοί των επιμέρους κυττάρων του αίματος -και πιθανώς η μορφολογία τους- ενδέχεται να μεταβληθούν εντός κάποιων ωρών -και οπωσδήποτε εντός λίγων ημερών- από την αιμοληψία, συνιστάται η διενέργεια συχνών επαναληπτικών εξετάσεων, προκειμένου να ληφθούν οι απαραίτητες πληροφορίες για την πρόγνωση.

Το συνηθέστερο αίτιο για τη χαμηλή ποιότητα των εξεταζόμενων δειγμάτων αίματος είναι ο μηχανικός τραυματισμός των έμμορφων συστατικών του κατά την αιμοληψία, ο οποίος συχνά οδηγεί σε μη ικανοποιητικά αποτελέσματα. Ωστόσο, τόσο η ευθραυστότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων όσο και η συσσωρευτική ικανότητα των αιμοπεταλίων είναι αστάθμητες παράμετροι και ποικίλλουν ανά άτομο ή παθολογική κατάσταση.

Η εμφάνιση των παραπάνω προβλημάτων μπορεί να περιοριστεί κάθε φορά, με την εφαρμογή άρτιας αιμοληπτικής τεχνικής. Τόσο η μειωμένη ροή του αίματος όσο και η άσκηση μη σταθερής αρνητικής πίεσης κατά την αιμοληψία από περιφερική φλέβα καταπονούν μηχανικά τα ερυθρά αιμοσφαιρία και ευνοούν τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Αντιθέτως, η αιμοληψία με άσκηση σταθερής αρνητικής πίεσης από κεντρική φλέβα προτιμάται, καθώς περιορίζει τον μηχανικό τραυματισμό των κυττάρων. Στον σκύλο και στη γάτα, η λήψη αίματος από τη σφαγίτιδα φλέβα αποτελεί μία εύκολη, λιγότερο στρεσογόνο για το ζώο διαδικασία (Εικόνα 1.1), η οποία και αποδίδει καλύτερη ποιότητα δειγμάτων αίματος. Σημειώνεται ότι η λήψη δείγμάτων αίματος με την ταυτόχρονη χρήση σύριγγας αιμοληψίας και φιαλιδίων κενού



1.1 Αιμοληφία από τη σφαγίτιδα φλέβα σε σκύλο. Διακρίνεται ο τρόπος συγκράτησης για τη λήψη, καθώς και το σημείο δειγματοληψίας. (Ευγενική παραχώρηση από Jonathan Bray.)

Θα πρέπει να αποφεύγεται, καθώς το δείγμα υποβάλλεται σε έντονη αρνητική πίεση, με συνέπεια την καταστροφή των έμμορφων συστατικών του αίματος. Ο ορθός χειρισμός του δείγματος μετά από την αιμοληφία με σύριγγα περιλαμβάνει την αφαίρεση της βελόνας, την τοποθέτηση του δείγματος σε ανοικτό φιαλίδιο με κατάλληλο αντιπηκτικό και, στη συνέχεια, τον πωματισμό του φιαλίδιου και την ήπια ανάδευση του δείγματος.

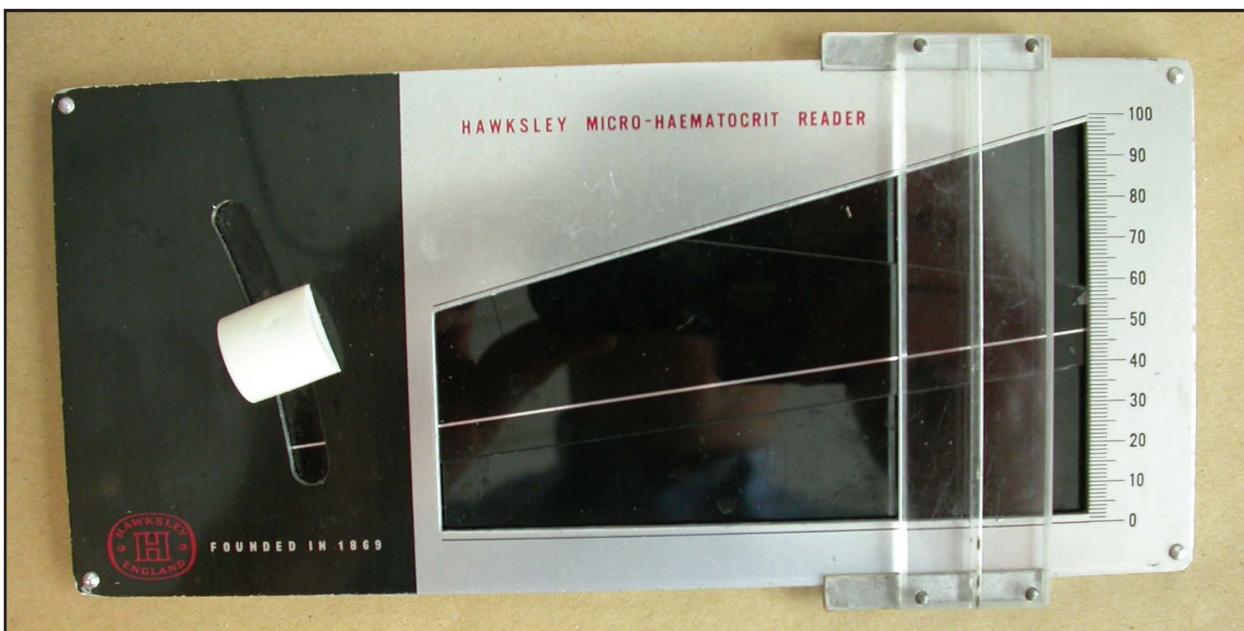
Το αντιπηκτικό εκλογής για τη γενική εξέταση του αίματος είναι το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylenediamine tetra-acetic acid, EDTA), καθώς με την προσθήκη του διασφαλίζεται διατήρηση της μορφολογίας –και κατ' επέκταση του μεγέθους– των κυττάρων. Το τελευταίο είναι απαραίτητο τόσο για την αναγνώριση όσο και για την καταμέτρηση των κυττάρων από τον αυτόματο αναλυτή. Ειδικότερα, τα φιαλίδια αιμοληφίας περιέχουν EDTA με τη μορφή αλάτων (Na_2EDTA , K_2EDTA , K_3EDTA). Ωστόσο, η παρατεταμένη ή υπέρμετρη *in vitro* έκθεση του δείγματος σε αυτά (αποθήκευση, παρατεταμένος χρόνος αποστολής στο εργαστήριο, υποπλήρωση φιαλίδιου) ενδέχεται να επηρεάσουν τόσο τη μορφολογία όσο και το μέγεθος των κυττάρων του αίματος (Hinchcliffe *et al.*, 1992). Για παράδειγμα, η υποπλήρωση του φιαλίδιου αιμοληφίας –και κατά συνέπεια, η αύξηση της συγκέντρωσης του αντιπηκτικού στο δείγμα– οδηγεί αρχικά σε έντονη συρρίκνωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, με αποτέλεσμα τη μείωση του PCV έως και κατά 5%. Σε αντίθεση, ο Hct –ως παράμετρος που υπολογίζεται αυτομάτως– ενδέχεται να μην επηρεαστεί, καθώς τα κύτταρα κατά την εξέταση τους από τον αναλυτή αναμειγνύονται με αραιωτικά μέσα, χάρη στα οποία ο όγκος τους επιστρέφει στο φυσιολογικό (Cornbleet, 1983). Σε δεύτερο χρόνο, με δεδομένο ότι η εξέταση του δείγματος καθυστερεί 24 περίπου ώρες λόγω του χρόνου αποστολής στο εργαστήριο, η αυξημένη συγκέντρωση του αντιπηκτικού προκαλεί τη διόγκωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η τελευταία αποτυπώνεται στη γενική εξέταση του αίματος με αύξηση του Hct και του MCV, καθώς και μείωση του MCHC. Τα φιαλίδια αιμοληφίας που περιέχουν ως αντιπηκτικό το κιτρικό νάτριο χρησιμοποιούνται για τις εξετάσεις πηκτικότητας. Σημειώνεται ότι τόσο το EDTA όσο και το κιτρικό νάτριο δρουν δεσμεύοντας τα ιόντα ασβεστίου, που είναι απαραίτητα για τον μηχανισμό της πηκής. Ωστόσο, το κιτρικό νάτριο αποτελεί το αντιπηκτικό εκλογής για τις εξετάσεις πηκτικότητας (εκεί, δηλαδή, που απαιτείται αντιστροφή της αντιπηκτικής δράσης), καθώς η σύνδεσή του με το ασβέστιο αντιστρέφεται πιο εύκολα με την προσθήκη ασβεστίου. Η ηπαρίνη χρησιμοποιείται σε ελάχιστες περιπτώσεις ως αντιπηκτικό για τη γενική εξέταση του αίματος, καθώς ενδέχεται να επηρεάσει τα αποτελέσματά της. Ειδικότερα, στα ηπαρινισμένα δείγματα αίματος, η χρώση των λευκών αιμοσφαιρίων δεν είναι ικανοποιητική, τα μεγέθη των επιμέρους κυττάρων διαταράσσονται και η συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων ευνοείται. Επιπλέον, σε βαριά με χρωστική Wright επιχρίσματα, παρατηρείται κυανό φόντο, η παρουσία του οποίου δυσχεραίνει την εκτίμηση της μορφολογίας των κυττάρων. Ωστόσο, στα ηπαρινισμένα δείγματα μπορεί να γίνει μία βασική εκτίμηση του αριθμού και των κύριων παραμέτρων των ερυθρών αιμοσφαιρίων, με προσαρμογή, ωστόσο, των κριτηρίων αξιολόγησή τους.

Βασικές τεχνικές ποσοτικοποίησης των έμμορφων συστατικών του αίματος

Ο προσδιορισμός της τιμής του PCV και του αριθμού των κυττάρων του αίματος μπορεί να πραγματοποιηθεί και χωρίς τη μεσολάβηση αυτόματου αναλυτή (χειρωνακτικός προσδιορισμός), με τη χρήση τριχοειδών σωληναρίων μικρο-αιματοκρίτη και ενός αιμοκυτταρόμετρου, αντιστοίχως.

Μικροαιματοκρίτης

Η μέθοδος του μικροαιματοκρίτη αποτελεί τον πιο απλό τρόπο προσδιορισμού της μάζας των κυκλοφορούντων ερυθρών αιμοσφαιρίων, χωρίς τη μεσολάβηση αυτόματου αναλυτή. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως σε επίπεδο κλινικής μικρών ζώων, σε μονάδες εντατικής θεραπείας, καθώς και σε αιματολογικά εργαστήρια. Αρχικά,



1.2

Συσκευή ανάγνωσης της τιμής του μικροαιματοκρίτη. Αποτελείται από μία κυλιόμενη παραβολική κλίμακα, στην οποία εφαρμόζεται το τριχοειδές σωληνάριο με το φυγοκεντρημένο δείγμα αίματος.

πραγματοποιείται πλήρωση ενός τριχοειδούς σωληναρίου με αίμα σε αντιηκτικό, το οποίο στη συνέχεια φυγοκεντρείται, προκειμένου να διαχωριστούν τα έμμορφα συστατικά του αίματος από το πλάσμα. Η τιμή του PCV προσδιορίζεται διαιρώντας το ύψος της στήλης των συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων με το συνολικό ύψος της στήλης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων (buffy coat) και του πλάσματος. Μάλιστα, για τον προσδιορισμό του ύψους των διαφόρων στήλων διατίθενται διάφορες απλές συσκευές (Εικόνα 1.2). Ωστόσο, κατά περίπτωση, αρκεί και ένας απλός χάρακας.

Τα ήσονος σημασίας σφάλματα που προκύπτουν κατά τον προσδιορισμό του μικροαιματοκρίτη σχετίζονται, συνήθως, με τη διαδικασία της φυγοκέντρησης. Ειδικότερα, οι φυγόκεντροι μικροαιματοκρίτη λειτουργούν με υψηλές ταχύτητες περιστροφής (11.500–15.000 rpm), χάρη στις οποίες διασφαλίζεται η συμπύκνωση των ερυθροκυττάρων. Σημειώνεται ότι οι φυγόκεντροι πολλαπλών χρήσεων δεν ενδείκνυνται για τη φυγοκέντρηση των παραπάνω δειγμάτων, καθώς δεν υποστηρίζουν τόσο υψηλή ταχύτητα περιστροφής, ενώ η αύξηση του χρόνου φυγοκέντρησης δεν φαίνεται να βελτιώνει τη συμπύκνωση των ερυθροκυττάρων. Στις φυγοκέντρους μικροαιματοκρίτη, η τελευταία επιτυγχάνεται με τη φυγόκεντρηση του δείγματος για 5 λεπτά σε κατάλληλη ταχύτητα. Όταν η τιμή του PCV είναι πάνω από 50%, η συμπύκνωση των κυττάρων δεν ολοκληρώνεται μετά από τα 5 λεπτά φυγοκέντρησης, οδηγώντας ουσιαστικά στην υπερεκτίμηση της μάζας των ερυθρών αιμοσφαιρίων (υπερεκτίμηση της τιμής του PCV). Σε αυτές τις περιπτώσεις, ενδεχομένως να απαιτείται επιπλέον φυγοκέντρηση του τριχοειδούς για 5 λεπτά στην ίδια ταχύτητα. Η υπερπλήρωση του τριχοειδούς σωληναρίου με αίμα (περισσότερο από το 75% του συνολικού ύψους του) μειώνει, επίσης, τον ρυθμό συμπύκνωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, με αποτέλεσμα να απαιτείται αύξηση του χρόνου φυγοκέντρησης. Αντιθέτως, όταν η τιμή του PCV είναι κάτω από 25%, η συμπύκνωση των ερυθροκυττάρων είναι εντονότερη, με συνέπεια να υποεκτιμάται ο PCV και, κατ' επέκταση, να αποδίδεται στο ζώο σοβαρότερη αναιμία. Ομοίως, η υποπλήρωση του τριχοειδούς αυξάνει τη συμπύκνωση των ερυθροκυττάρων και οδηγεί σε υποεκτίμηση του PCV. Μικρές

αποκλίσεις στην τιμή του PCV μπορεί, επίσης, να προκύψουν με τη χρήση των διαφόρων αντιηκτικών, όπως και με την εσφαλμένη πλήρωση ή ανάμειξη του αρχικού φιαλίδιου EDTA. Η επιδραση των παραπάνω παραγόντων είναι εντονότερη σε ζώα με αναιμία, καθώς σε αυτές τις περιπτώσεις παρατηρούνται σημαντικές αιματολογικές διαταραχές. Σημειώνεται ότι, συγκεκριμένες φυλές σκύλων, όπως Terrier, Dachshund και Greyhound, χαρακτηρίζονται συχνά από υψηλότερη μάζα κυκλοφορούντων ερυθρών αιμοσφαιρίων (Hct/PCV, Hb και RBC) σε σχέση με άλλες φυλές.

Καταμέτρηση των κυττάρων του αίματος χωρίς τη μεσολάβηση αυτόματου αναλυτή (χειρωνακτικός προσδιορισμός)

Η χειρωνακτική καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων του αίματος πραγματοποιείται με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου τύπου Neubauer (improved Neubauer), μιας βαθμονομημένης καλυπτρίδας, μιας τριχοειδούς πιπέτας μιας χρήσης και ενός πλαστικού περιέκτη με αραιωτικό γνωστού όγκου.

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι ένας διαφανής γυάλινος θάλαμος, στον οποίο τοποθετείται το εναιώρημα των κυττάρων, για καταμέτρηση στο μικροσκόπιο. Ο θάλαμος έχει βάθος 0,1 mm και αποτελεί έναν καθορισμένο χώρο γνωστού όγκου. Ο χώρος αυτός διαιρείται σε ένα πλέγμα εννέα τετράγωνων, έκτασης 1 mm² το καθένα, το οποίο έχει χαραχθεί στη βάση του θαλάμου. Το κεντρικό τετράγωνο του πλέγματος διαιρείται περαιτέρω σε 25 τετράγωνα κατάλληλου μεγέθους για τη μέτρηση των RBC στην ανάλογη αραίωση.

Αρχικά, μία ποσότητα από το δείγμα του αίματος αναμειγνύεται με το αραιωτικό διάλυμα σε τέτοια αναλογία, ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη συγκέντρωση κυττάρων για καταμέτρηση. Συγκεκριμένα, για την καταμέτρηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, πραγματοποιείται αραίωση του δείγματος 1:200, ενώ για τα λευκά αιμοσφαιρία και για τα αιμοπετάλια 1:20 και 1:100, αντιστοίχως. Στη συνέχεια, ο αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται με τη χρήση ενός διορθωτικού συντελεστή, μέσω του οποίου συνυπολογίζεται ο όγκος του δείγματος που εξετάζεται στην πλάκα και οι συντελεστές αραίωσης.

Η καταμέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται εις διπλούν, σε διαφορετικές πλευρές του πλέγματος του

αιμοκυτταρόμετρου. Οι αριθμοί των ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων που προκύπτουν από τις δύο καταμετρήσεις πρέπει -εφόσον αυτές έχουν γίνει σωστά- να ποικίλλουν μεταξύ τους λιγότερο από 20% και 10%, αντιστοίχως. Εάν τα αποτελέσματα των δύο καταμετρήσεων συμβαδίζουν, ο μέσος όρος τους πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή μετατροπής, ώστε να προκύψει ο αριθμός των κυττάρων ανά μικρόλιτρο.

Η χειρωνακτική καταμέτρηση των έμμορφων συστατικών του αίματος με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου χαρακτηρίζεται από σημαντικό ποσοστό σφάλματος σε σχέση με αυτή που πραγματοποιείται από τον αυτόματο αναλυτή (απόκλιση 20% στους αριθμούς των λευκών αιμοσφαιρίων). Το τελευταίο είναι ιδιαιτέρως σημαντικό κατά τη διενέργεια μιας διαδοχικής σειράς μετρήσεων, καθώς μια παρατηρούμενη μεταβολή της τάξης του 20% μπορεί να οφείλεται απλώς στην απόκλιση μεταξύ των μετρήσεων παρά σε πραγματική μεταβολή του αριθμού των κυττάρων.

Ποσοτικός προσδιορισμός των αιματολογικών παραμέτρων με τη χρήση αυτόματου αναλυτή

Ο προσδιορισμός του αριθμού των ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων, καθώς και των αιμοπεταλίων έχει πλέον αυτοματοποιηθεί πλήρως, τόσο στα εργαστήρια όσο και στις περισσότερες κλινικές ζώων συντροφιάς. Μάλιστα, οι αιματολογικοί αναλυτές νέας γενιάς μπορούν να προσδιορίσουν αξιόπιστα το εύρος κατανομής των ερυθρών αιμοσφαιρίων (red cell distribution width, RDW), το οποίο και αποτελεί έναν σημαντικό δείκτη για την εκτίμηση της αναγεννητικότητας. Ορισμένοι αναλυτές έχουν, επίσης, τη δυνατότητα προσδιορισμού και άλλων δεικτών των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όπως της κυτταρικής αιμοσφαιρίνης (cell haemoglobin mean, CH), της μέσης συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης του κυττάρου (cell haemoglobin concentration mean, CHCM) και του εύρους κατανομής της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης (haemoglobin concentration distribution width, HDW), καθώς και επιπλέον δεικτών των δικτυοερυθροκυττάρων και των αιμοπεταλίων. Ωστόσο, η διαγνωστική αξία των παραπάνω πρόσθετων δεικτών θα πρέπει να διερευνηθεί εκτενέστερα, καθώς υπάρχει ασάφεια ως προς την κλινική σημασία και τη χρησιμότητά τους στα διάφορα είδη ζώων. Σε ότι αφορά στα λευκά αιμοσφαιρία, ο αυτόματος προσδιορισμός του λευκοκυτταρικού τύπου έχει βελτιωθεί με την έλευση των αναλυτών τεχνολογίας λέιζερ. Ωστόσο, ο λευκοκυτταρικός τύπος που εξάγεται από τον αυτόματο αναλυτή θα πρέπει να επαληθεύεται και στο επίχρισμα του περιφερικού αίματος, καθώς σε αντίθετη περίπτωση υποεκτιμώνται διάφορες μορφολογικές διαταραχές των λευκών αιμοσφαιρίων (Becker *et al.*, 2008; Segev *et al.*, 2006). Επιπλέον, με τη χειρωνακτική πραγματοποίηση του λευκοκυτταρικού τύπου, καθίσταται δυνατή η εκτίμηση της μορφολογίας των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η διαπίστωση μη φυσιολογικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα. Μάλιστα, η διαγνωστική αξία της γενικής εξέτασης του αίματος μειώνεται σημαντικά σε περίπτωση που το δείγμα εξετάζεται μόνο από τον αιματολογικό αναλυτή και παραλείπεται η εξέταση του επιχρίσματος ή και αντιστρόφων (Segev *et al.*, 2006). Σημειώνεται ότι τα σχόλια σχετικά με τη μορφολογία των κυττάρων που παρέχονται από τους αυτόματους αναλυτές στο τέλος της εξέτασης συχνά είναι παραπλανητικά (Becker *et al.*, 2008). Τόσο η ποιοτική αξιολόγηση των αυτόματων αναλυτών όσο και οι ρυθμίσεις του λογισμικού τους πραγματοποιούνται με δείγματα υγιών ζώων, τα οποία πιθανώς ανήκουν σε μία φυλή, με αποτέλεσμα μορφολογικές και άλλες διαταραχές των κυττάρων που παρατηρούνται σε ασθενή ζώα να μην ανιχνεύονται άμεσα.

Επιπλέον παράγοντες που επηρεάζουν την καταμέτρηση

των κυττάρων του αίματος από τους αυτόματους αναλυτές αποτελούν ο τύπος του αναλυτή, η καταστροφή και η παλαιότητα του δείγματος, καθώς και η συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και οι διαταραχές του μεγέθους τους. Ειδικότερα, η παρουσία μικροθρόβμων σε κατεστραμμένα ή με χαμηλή συγκέντρωση αντιπηκτικού δείγματα αίματος καθιστά μη έγκυρο το αποτέλεσμα της αντόματης καταμέτρησης των κυττάρων. Σε ορισμένους αναλυτές, μάλιστα, οι μικροθρόβμοι ενδέχεται να φράξουν τους διαύλους καταμέτρησης των κυττάρων, προκαλώντας προβλήματα στη λειτουργία τους. Ειδικότερα, τα ερυθρά αιμοσφαιρία των κατεστραμμένων δειγμάτων αίματος ενδέχεται να ρηχθούν και να κατακερματιστούν, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό κυττάρων «φαντασμάτων» (*ghost cells*). Τα τελευταία καταμετρώνται εσφαλμένα από τους αναλυτές ως αιμοπετάλια, οδηγώντας σε σημαντική μείωση του αριθμού των σαθρών αιμοσφαιρίων. Ακόμη, τα αιμοπετάλια και τα λευκά αιμοσφαιρία, ιδιαιτέρως όταν είναι λευχαιμικά, μπορεί να ρηχθούν *in vitro*, λόγω της παρατεμένης αποθήκευσης του δείγματος, με αποτέλεσμα την παρουσίαση ψευδώς μειωμένων αριθμών τους από τον αναλυτή.

Τόσο η τεχνική εσφαλμένη αιμοληψία όσο και η παλαιότητα του δείγματος ευνοούν τη δημιουργία συσσωμάτων αιμοπεταλίων, τα οποία είτε καταμετρώνται από τον αναλυτή ως ερυθρά ή λευκά αιμοσφαιρία είτε δεν καταμετρώνται καθόλου, οδηγώντας σε ψευδή θρομβοκυτταροπενία. Για τον λόγο αυτόν, συνιστάται πάντα ο έλεγχος του αριθμού των αιμοπεταλίων στο επίχρισμα του αίματος, ενώ τυχόν μειωμένοι αριθμοί τους που προκύπτουν από την αυτόματη καταμέτρηση θα πρέπει να ερμηνεύονται με επιπλαξή. Η απόκλιση του σχήματος των αιμοπεταλίων από το φυσιολογικό μπορεί, επίσης, να οδηγήσει σε εσφαλμένο προσδιορισμό του αριθμού τους από τον αναλυτή. Το παραπάνω φαινόμενο έχει περιγραφεί χαρακτηριστικά σε σκύλους των φυλών Cavalier King Charles Spaniel (CKCS) και Norfolk Terrier, στα οποία ο αριθμός των αιμοπεταλίων που προσδιορίζεται με αυτόματες μεθόδους δεν προσδιάλαγει στον αντίστοιχο που προσδιορίζεται χειρωνακτικά. Οι παραπάνω σκύλοι έχουν στο περιφερικό αίμα ευμεγέθη αιμοπετάλια (μακροθρόμβοκυτταρα), καθώς και ήπια θρομβοκυτταροπενία. Τα μακροθρόμβοκυτταρα καταμετρώνται εσφαλμένα από τους αυτόματους αναλυτές ως ερυθροκυτταρα, με συνέπεια να παρουσιάζεται τεχνητά μειωμένος ο αριθμός των αιμοπεταλίων (Eckslall *et al.*, 1994; Gelain *et al.*, 2010). Σε πιο πρόσφατες μελέτες, επιχειρείται μία νέα προσέγγιση στην ποσοτικοποίηση των αιμοπεταλίων των CKCS με την εισαγωγή της «αιμοπεταλιοκρίτη». Ο τελευταίος μπορεί να προσδιοριστεί από αναλυτές με αρχή λειτουργίας τον ποσοτικό προσδιορισμό της στιβάδας λευκών αιμοσφαιρίων – αιμοπεταλίων του αίματος (*buffy coat*) (quantitative buffy coat analysis, QBC). Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι – παρά το μεγάλο μέγεθός τους – τα αιμοπετάλια των CKCS έχουν φυσιολογική συνολική μάζα, συνεπώς σε αυτούς τους σκύλους η αιμόσταση δεν επηρεάζεται από τους χαμηλούς αριθμούς αιμοπεταλίων.

Αιμοσφαιρίνη

Οι μέθοδοι προσδιορισμού της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης που εφαρμόζονται μέχρι σήμερα από τους διάφορους αυτόματους αναλυτές είναι τρεις: α) η μέθοδος της κυανομεθαιμοσφαιρίνης, β) η μέθοδος μετατροπής της αιμοσφαιρίνης σε οξυαιμοσφαιρίνη και γ) η μέθοδος μετατροπής της αιμοσφαιρίνης σε νατριούχο-λαύρυλο-θειοαιμοσφαιρίνη (SLS-Hb). Ειδικότερα, η μέθοδος της κυανομεθαιμοσφαιρίνης αποτελείσε για πολλά χρόνια, διεθνώς, τη μέθοδο αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης. Ωστόσο, το αντιδραστήριο που περιλαμβάνεται στη μέθοδο

περιέχει κυανιούχο κάλιο, το οποίο ενδέχεται να δημιουργήσει προβλήματα κατά τον χειρισμό και την απόρριψή του, λόγω της τοξικής του δράσης.

Με τη μέθοδο μετατροπής της αιμοσφαιρίνης σε οξυαιμοσφαιρίνη, η συγκέντρωση της ολικής αιμοσφαιρίνης συνήθως υποεκτιμάται, καθώς προσδιορίζεται μόνο το κλάσμα της οξυαιμοσφαιρίνης. Το παραπάνω ενδέχεται να προκαλέσει προβλήματα κατά τον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας, διότι με την πάροδο της ώρας η οξυαιμοσφαιρίνη των δειγμάτων μετατρέπεται σε μεθαιμοσφαιρίνη, κάτι που αποτελεί, επίσης, πρόβλημα για τα ζώα με σοβαρή μεθαιμοσφαιριναίμια.

Προσφάτως, η χρήση ενός λιγότερο τοξικού αντιδραστηρίου, του λαύρυλο-θειικού νατρίου (SLS), για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της Hb έχει αντικαταστήσει τη μέθοδο της κυανομεθαιμοσφαιρίνης. Περιληπτικά, η μέθοδος έχει ως εξής: αρχικώς, τα ερυθροκύτταρα λύνονται και η ελεύθερη -πλέον- αιμοσφαιρίνη μετατρέπεται σε μόριο νατριού-χου-λαύρυλο-θειοαιμοσφαιρίνης (*sodium lauryl sulphate haemoglobin, SLS-Hb*) με μία αντίδραση τεσσάρων σταδίων. Ακολούθως, η συγκέντρωση του SLS-Hb προσδιορίζεται χρωματομετρικά μέσω μιας διόδου φωτοεκπομπής, η οποία και ταυτίζεται ουσιαστικά με τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης καθ' αυτή. Σημειώνεται ότι ψευδώς αυξημένη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης μπορεί να παρατηρηθεί λόγω *in vitro* αιμόλυσης, λιπαίμιας και χορήγησης ορισμένων ουσιών, όπως το διάλυμα Oxyglobin® (διάλυμα με βάση την κεκαθαρμένη βρέσια αιμοσφαιρίνη για τη μεταφορά οξυγόνου). Η επίδραση των παραπάνω παραγόντων στο αποτέλεσμα της μέτρησης περιορίζεται κατά τη χρήση φορητών αναλυτών που χρησιμοποιούν δύο διαφορετικά μήκη κύματος για τη μέτρηση των επιπέδων του αζιδίου της μεθαιμοσφαιρίνης.

Καταμέτρηση των κυττάρων του αίματος από αυτόματο αναλυτή

Η εξέταση των δειγμάτων αίματος από τους αυτόματους αιματολογικούς αναλυτές διέπεται –μέχρι στιγμής– από τέσσερις βασικές αρχές, οι οποίες εφαρμόζονται είτε μεμονωμένα είτε σε διάφορους συνδυασμούς: α) την αρχή της ηλεκτρικής αιγαγιμότητας (*conductivity analysers*), όπως αυτή μετράται από ηλεκτροχημικά όργανα που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των αερίων του αίματος, β) τον ποσοτικό προσδιορισμό της στιβάδας λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων του αίματος (*quantitative buffy coat analysis, QBC*), γ) την αρχή μεταβολής της ηλεκτρικής αντίστασης (*impedance counters*) και δ) την αρχή σκέδασης της ακτίνας φωτός με κυτταρομετρία ροής (*laser flow cytometers*). Οι παραπάνω αρχές λειτουργίας αφορούν σε αυτόματους αναλυτές, οι οποίοι αρχικά είχαν σχεδιαστεί για την εξέταση δειγμάτων ανθρώπων ασθενών και, στη συνέχεια, υποβλήθηκαν σε τροποποιήσεις, κυρίως στο λογισμικό τους που σχετίζεται με την αναγνώριση των κυττάρων, προκειμένου να υποστηρίζεται και η εξέταση δειγμάτων ζώων. Η χρήση των τροποποιημένων αυτών αναλυτών στην κτηνιατρική έχει εφαρμοστεί με ποικιλή επιτυχία και ακρίβεια μετρήσεων.

Αναλυτές ηλεκτρικής αιγαγιμότητας (*conductivity analysers*)

Τα ηλεκτροχημικά όργανα που προορίζονται για τη μέτρηση των αερίων του αίματος μπορούν, επίσης, να προσδιορίσουν τον Hct και τη συγκέντρωση της Hb. Κατά την εξέταση του δείγματος, πραγματοποιείται μέτρηση της αιγαγιμότητάς του, η οποία και μειώνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων. Μάλιστα, λόγω του ότι ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν των λευκών αιμοσφαιρίων ή των αιμοπεταλίων, το παραπάνω αφορά κυρίως στα ερυθρά αιμοσφαιρία. Επομένως, η τιμή του Hct είναι αντιστρόφως ανάλογη της

αιγαγιμότητας του δείγματος. Ωστόσο, σε ενδεχόμενη σημαντική αύξηση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων, π.χ. σε φλεγμονή ή λευχαιμία, η τιμή του αιματοκρίτη θα εμφανίζεται ψευδώς αυξημένη. Κατά την ίδια λογική, η παραπάνω συσχέτιση αιματοκρίτη-αιγαγιμότητας έχει ισχύ, όταν η συγκέντρωση των αγώγιμων και μη στοιχείων (λιπίδια, πρωτεΐνες) του δείγματος παραμένει αμετάβλητη. Αντιθέτως, σε παθολογικές καταστάσεις που προκαλεί μεταβολή της συγκέντρωσης των παραπάνω στοιχείων, οι οποίες και επηρεάζουν έμμεσα την τιμή του αιματοκρίτη. Σημειώνεται ότι σε ορισμένα όργανα υπάρχει η δυνατότητα προσαρμογής της αιγαγιμότητας του δείγματος ανάλογα με τις συγκέντρωσεις των αγώγιμων ηλεκτρολυτών (νάτριο και κάλιο). Τα λιπαίμικά δείγματα οδηγούν σε ψευδή αύξηση της τιμής του αιματοκρίτη, ενώ οι μεταβολές στη συγκέντρωση των πρωτεΐνών επηρεάζουν, επίσης, το αποτέλεσμα της μέτρησης (π.χ. η υποπρωτεΐναιμια οδηγεί σε ψευδή μείωση του αιματοκρίτη).

Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται με τη χρήση μιας μαθηματικής φόρμας μετατροπής, μέσω της οποίας συνυπολογίζεται η τιμή του αιματοκρίτη, και μιας εκτιμώμενης τιμής του MCHC (συνήθως, 33 g/dl). Επομένως, εάν η τελευταία εκτίμηση είναι εσφαλμένη για ένα συγκεκριμένο ζώο, τότε και η τιμή της αιμοσφαιρίνης που εξάγεται από τον αναλυτή θα είναι επίσης εσφαλμένη.

Αναλυτές με αρχή λειτουργίας των ποσοτικού προσδιορισμού της στιβάδας λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων του αίματος (*quantitative buffy coat analysis, QBC*)

Σε αυτήν την κατηγορία αναλυτών, ο αριθμός και ο τύπος των επιμέρους λευκών αιμοσφαιρίων προσδιορίζεται με βάση το πλάτος και τον φθορισμό των διαφόρων επιμέρους κυτταρικών στιβάδων που προκύπτουν κατά τον σχηματισμό της στιβάδας των λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων του αίματος. Η τελευταία σχηματίζεται μετά από φυγοκέντρηση ενός τριχοειδούς σωληναρίου πληρωμένου με αίμα σε αντιπηκτικό και διευρύνεται με την προσθήκη ενός αιωρούμενου πλαστικού κυλινδρου, γύρω από τον οποίο διατάσσονται οι κυτταρικές στιβάδες των λευκών αιμοσφαιρίων. Σε περίπτωση που οι στιβάδες αυτές δεν είναι διακρίτες μεταξύ τους, π.χ. λόγω αιμόλυσης ή λιπαίμιας, η μέτρηση είτε θα είναι ανακριβής ως προς το αποτέλεσμά της είτε δεν θα επιτραπεί από τον αναλυτή. Ενώ το πλάτος της στιβάδας και η ένταση του φθορισμού αντικατοπτρίζουν τους αριθμούς των κυττάρων του δείγματος (θεωρώντας ότι τα κύτταρα διατηρούν το φυσιολογικό τους μέγεθος), η διάκριση των επιμέρους λευκών αιμοσφαιρίων βασίζεται στον διαφορετικό φθορισμό που εμφανίζουν τα διάφορα λευκά αιμοσφαιρία, όταν βάφονται με τη χρωστική πορτοκαλόχρωμη της ακριδίνης (φθορίζουσα χρωστική που περιέχεται στα τριχοειδή σωληνάρια – το DNA εμφανίζει πράσινο φθορισμό, ενώ το RNA και οι λιποπρωτεΐνες εμφανίζουν ερυθρό φθορισμό). Επταί, οι παραπάνω αναλυτές διακρίνουν τα λευκά αιμοσφαιρία σε μονοπύρηνα κύτταρα (λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα) και κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα και εωσινόφιλα). Ωστόσο, προκειμένου να αξιολογηθεί ορθά από τον αναλυτή ο διαφορετικός φθορισμός των επιμέρους λευκών αιμοσφαιρίων, θα πρέπει να αποφεύγεται η παρουσία παραγόντων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το φόντο του φθορισμού (π.χ. δακτυλικά αποτυπώματα), ενώ στους πληθυσμούς των λευκών αιμοσφαιρίων θα πρέπει να περιλαμβάνονται και φυσιολογικά κύτταρα. Ειδικότερα, σε διάφορα νοσήματα, το μέγεθος, η φύση και η περιεκτικότητα των κυττάρων σε RNA συχνά μεταβάλλεται, με αποτέλεσμα την αδυναμία διάκρισης των κυττάρων από τον αναλυτή ή τον εσφαλμένο προσδιορισμό τους. Συνεπώς, ενώ αυτοί οι αναλυτές προσδιορίζουν γενικώς τον συνολικό αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων με ακρίβεια, στην περίπτωση που το ζώο δεν είναι υγιές, ο εξαγόμενος λευκοκυτταρικός τύπος είναι