

Cytospinpræparation og differential-tælling på CellaVision DM96

Det er nu også muligt at differentieltælle celler i cytospinpræparat fra diverse kropsvæsker på CellaVision DM96. KB3011 var med til at teste denne applikation og har fra december 2008 benyttet den rutinemæssigt. Dette har betydet betydelig bedre analysekvalitet og bedre ergonomi - alt i alt en stor forbedring af arbejdspladsen.

CellaVision kontaktede os i 2007 for at spørge, om vi ville teste en ny softwareapplikation "Body Fluid Application", der muliggjorde differentieltælling af leukocytter i diverse kropsvæsker. Det syntes vi, lød meget spændende, og vi sagde straks ja. Vi har i en årrække benyttet CellaVisions udstyr til differentieltælling af celler i blod og har været yderst tilfreds med deres produkter.

M.h.t. kropsvæsker havde – og har vi – i gennemsnit 5-10 prøver om dagen, og vi udfører automatisk en differentieltælling, hvis leukocytkoncentrationen er $> 10^6/l$. Differentieltælling foregik ved almindelig lysfelt mikroskopi.

Efter installation af softwaren på vores DM96 startede et pilotforsøg, hvor vi forsøgsvis analyserede på vores rutine cytospin-præparater. Det blev hurtigt klart, at kvaliteten af præparaterne ikke var tilfredsstillende. Ofte lå cellerne for tæt, og det medførte, at softwaren kunne have problemer med at adskille dem.

KB3011 havde i en årrække (> 20 år) benyttet Cytospinpræparation, men Cytospinpræparationen skete efter forudgående dråbevis tilsætning af kropsvæske alt efter leukocytkoncentrationen. En ikke særlig nøjagtig præparation.

CYTOSPIN OPTIMERING

Superbruger Birte Sturm gik målbevidst i gang med at optimere cytospinpræparationen. Ved gentagne forsøg hvor antal celler, væskemængde og cytocentrifugens hastighed blev varieret, fandt vi en egnet opsætning, som vi har benyttet lige siden. Vi får gode præparater så godt som hver gang, så i stedet for at fremstille 2 præparater, er det nu nok med 1 præparat.

Vi benytter Shandon Cytospin-centrifuge. Vores "opskrift" til præparation på denne er:

Optimalt antal leukocytter per præparat:	ca. 5000
Optimal væskemængde:	300 – 500 μl
Tilsætning af 20 % albumin	1 dråbe (50 μl)
Cytocentrifugens hastighed:	1000 RPM

Ud fra formlen: $5000/\text{antal leukocytter} \times 10^6/l$ beregnes μl kropsvæske, der skal benyttes.

Der fremstilles en suspension, hvori ønsket antal μl kropsvæske afpipeteres med pipette, yderligere tilsættes altid 20 % albumin og evt. tilsættes NaCl for at komme op på optimal væskemængde. Denne suspension blandes forsigtigt og tilsættes holder i Cytospincentrifuge. Cellesuspensionen centrifugeres skånsomt gennem hul i filterpapir og til objektglas ved 1000 RPM. Filterpapirer opsuger væske, hvorved skrumpning af celler minimeres.

Når Cytospinpræparation er tilendebragt, fjernes filterpapirer forsigtigt fra præparatet, som tørrer inden farvning, der foregår på samme måde som blod-præparater i vores Sysmex SP1000i. Præparatet er nu klar til analysering.

HVORFOR SKAL CYTOSPINPRÆPARATION BENYTTES, OG HVORFOR TILSÆTTES ALBUMIN?

Ved Cytospinpræparation koncentrerer cellerne (ca. 20x). Der er minimal ødelæggelse af celler, og der fremstilles et "monolayer" af celler på et lille areal af objektglasset (pellet). Centrifugeringen er så skånsom, at cellerne næsten ligner celler i blod – de kan dog virke en anelse større og mere uregelmæssige.

Vi blev bekendt med en guideline: "Body Fluid Analysis for Cellular Composition, Approved Guideline" (IFCC 2006). Der er mange interessante oplysninger i denne, bl.a kan citeres:

*".....Use properly prepared **cytocentrifuge slides** optimally stained with Romanowsky stains (May-Grünwald-Giemsa)."*

*"...In the nucleated differential, **all cells** derived from the Hematopoietic system should be included. The term mononuclear cell should be avoided, since the term does not adequately distinguish **monocytes from lymphocytes**, a distinction that has diagnostic significance."*



Af Margit Grome //
Afdelingsbioanalytiker
Klinisk-biokemisk afdeling, KB 3011
Rigshospitalet



Fig. 1. CellaVision DM96 (i forgrunden) samt andre arbejdspladser til manuelle hæmatologiske analyser.

Denne guideline anbefaler også, at der tilsættes albumin, da dette øger cellernes "tilklæbning" til objektglasset, reducerer antal ituslåede celler, samt forhindrer, at celler går i opløsning (dette gælder specielt for væsker med lavt proteinindhold som CSV).

VALIDERING

Da præparaternes kvalitet nu var tilfredsstillende, begyndte vi den egentlige validering.

Hidtil havde vi differentialtalt 100 celler på cytospinpræparater ved almindelig lysfeltmikroskop og opdelt celler i 3 celletyper:

1. Neutrocytter, 2. Lymfocytter og monocytter (mononukleære celler) og 3. Uspecificerede celler (resten – kaldet "other" i DM96).

Pg.a at cellerne nu fremstod meget tydeligere og mere karakteristiske, samt pga anbefalinger i guideline, opdelte vi i valideringen cellerne i flere celletyper.

1. Neutrocytter 2. Lymfocytter. 3. Eosinofilocytter. 4. Monocytter, makrofager samt mesothelceller og 5. uspecificerede celler (resten).

METODE

- Der blev fremstillet 2 Cytospin-præparater (A og B) fra hver prøve.
- 200 celler på hvert præparat blev differentialtalt af 2 bioanalytikere
- Tælling blev foretaget såvel ved daværende rutine-metode (mikroskopi) samt på DM96.
- Middeltal af de 2 resultater (A og B) blev benyttet til sammenligning.

Under valideringen blev det hurtigt klart for de 2 bioanalytikere at analysering på DM96 absolut var at foretrække – cellerne fremstod meget mere overskuelige på PC-skærmen, de morfologiske karakteristika fremtrådte meget tydeligere her

end i mikroskopet, og det var et stort kvalitetsløft, at man kunne sammenligne de forskellige celleklasser. Netop det at man – efter eget valg – kan få de forskellige celleklasser fra samme prøve linet op på skærmen, er en af de virkelig gode funktioner i DM96. En funktion, som vi jo i mange år har haft stor gavn af ved differentialtælling af celler i blod.

I valideringen blev flg. kropsvæsker analyseret: 38 cerebrospinalvæsker (CSV), 1 perikardie-væske, 24 peritoneal-(ascites)-væsker samt 4 pleura-væsker.

DATAANALYSE (MIKROSKOPI VERSUS CELLAVISION DM96)

Statistikberegninger viste for CSV (n=38) flg:

Neutrophils	y = 0.97x + 0.02	R² = 0.98
Lymphocytes	y = 0.96x + 0.02	R² = 0.96
Mono/ Macrophages	y = 1.01x - 0.01	R² = 0.92
Eosinophils	y = 0.86x + 0.00	R² = 0,98
Other cells	y = 1.01x + 0.00	R² = 0.99

Og for alle væsker (n=66):

Neutrophils	y = 0.98x + 0.01	R² = 0.99
Lymphocytes	y = 0.96x + 0.02	R² = 0.96
Mono/Macrophages	y = 0.96x + 0.00	R² = 0.97
Eosinophils	y = 0.93x + 0.00	R² = 0.99
Other cells	y = 1.00x + 0.00	R² = 0.96

KONKLUSION AF VALIDERING

Som beregninger (og X-Y plot som er udeladt her) viser, var der fin overensstemmelse mellem metoderne.

Mens vi testede produktet, blev der udvist stor interesse fra vores kollegaer, og gentagne gange fik vi spørgsmålet: "Kommer applikationen ikke snart i rutinebrug?".

I RUTINEN

Vi måtte lige afvente FDA-godkendelsen, der heldigvis hurtigt kom på plads, og siden december 2008 har vi benyttet applikationen i rutinen.

Vi valgte at bibeholde at differentialtælle 200 celler, samt at opdele dem i 5 cellyper. Dog valgte vi at placere mesothelceller i "other", da de jo ikke er fra samme cellelinje som monocytter og makrofager.

Vi blev også bekendt med en anden bog: "Color Atlas of Body Fluids" – udgivet af CAP i USA. Den fik vi anskaffet, og den var - og er - til stor hjælp under indkøring og oplæring. Der er en del teoretisk materiale, men også meget illustrative tegninger og fotos. Den er god til at sætte fokus på forvekslingsproblematikken.

I og med, at vi i forvejen benyttede DM96 til differentialtælling i blod, var det forholdsvis nemt at få oplært personalet (32 bioanalytikere) i den nye applikation. Vi er akkrediteret efter ISO 15189, og dette medfører bl.a., at der skal udfyldes et kompetancekort ved de analyser, hver enkelt bioanalytiker kan bestride.

Det krævede naturligvis nogen tilvænning, at cellerne nu optrådte i større forstørrelse og med mange flere morfologiske detaljer, end man var vant til. Men ved fremvisning af eksempler på skærmen, sidemandsoplæring og ved udprintning af diverse cases, blev personalet hurtigt fortrolig med den ny teknik. Der kan selvfølgelig stadig være celler, der kan være svære at identificere (fx cancerceller, blaster eller reaktive mesothelceller). Disse celler placeres under "other" med en tilhørende kommentar. I høj grad benytter vi standardkommentarer, men der er i øvrigt også mulighed for fritekst.

Differentialtælling af leukocytter i kropsvæsker er en forholdsvis grov metode, og vi skal ikke stille diagnoser, men beskrive, hvad vi ser. Til gengæld er vi hurtige. Vi kan aflevere et celledællingssvar indenfor 2 timer – og efter yderligere 1 time

udkommer differentialtællingssvaret. Jeg har indtryk af, at klinikerne er tilfredse med at neutrocytter og lymfocytter nu optræder hver for sig, idet spørgsmålet ofte er, om det drejer sig om en bakteriel eller virusbetinget-infektion. Men i øvrigt, hvis væsken er domineret af andre celler, vil man sende prøvemateriale til patologiafdelingen og afvente svar derfra. Mange eosinofilytter kan tyde på overfølsomhedsreaktion (fx ved dræn), hvorfor den information kan være vigtig.

Vi ser ofte en del plasmaceller i kropsvæskerne, disse celler kan optræde ved mange sygdomme, bl.a. borelia og sklerose. Vi placerer plasmaceller under "other" med kommentar om, at disse celler er observeret.

DISKUSSION

Vi har optimeret cytospinpræparationen og får (så godt som altid) fine præparater, som har gjort det muligt for os at opdele cellerne i flere leukocyttyper.

Med ibrugtagning af DM96 har vi opnået:

- Mulighed for at se hele pellet på PC-skærmen, zoom'e ind samt mærke og evt. kommentere områder, der kunne være interessante at studere nærmere.
- Kortere (manuel) analysetid
- Morfologiske detaljer optræder tydeligere, hvilket har muliggjort, at vi nu opdeler cellerne i flere celleklasser (5 i stedet for 3)
- Stor forbedring indenfor oplæring (man kan altid se de seneste resultater i databasen).
- Lymfocytter og monocytter/makrofager er adskilt (som guidelines anbefaler)
- Vi differentialtæller 200 celler (hvilket øger præcisionen)
- Bedre dokumentation (fotos lagres)
- **Og sidst – men ikke mindst: en mere attraktiv arbejdsplads.** □

CELLAVISION DM96

Dette udstyr kan kort beskrives som et avanceret mikroskop med videokamera, PC og software tilknyttet. Software lagrer de affotograferede celler og præ-klassificerer dem vha. neuralt netværk. Fotos af celler præsenteres i sorteret rækkefølge på en PC-skærm, hvor bioanalytikeren udfører den endelige klassifikation.

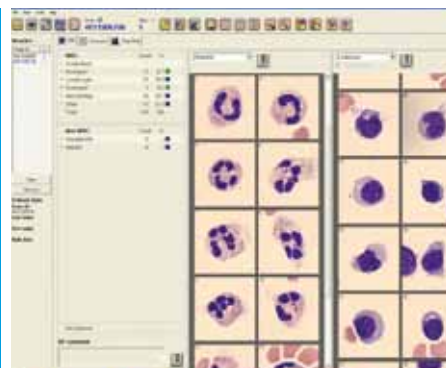


Fig 2:

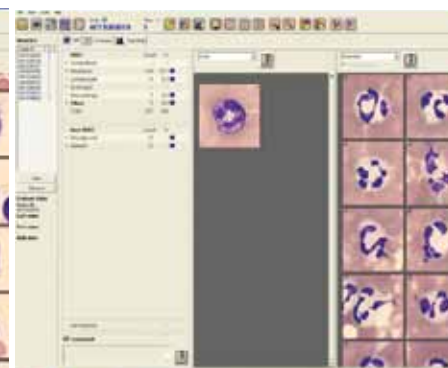


Fig 3:

Referencer

Fig 2. Til venstre neutrocytter - til højre lymfocytter.

Fig 3. Til venstre en basofilycyt – til højre neutrocytter. Bemærk at selv om der findes mange erythrocytter i prøven, der det stadig muligt at identificere cellerne. (Det er desværre ikke altid tilfældet – mange erythrocytter kan stadig udgøre et

problem.)

Fig 4. Til venstre en eosinofil – til højre mesothelceller. Eosinofilytter ligner fuldstændigt "sig selv" fra blodet, de er meget lette at identificere. Det sammen gælder basofilytter (men de er ikke interessante i denne sammenhæng, hvorfor de placeres under "other").

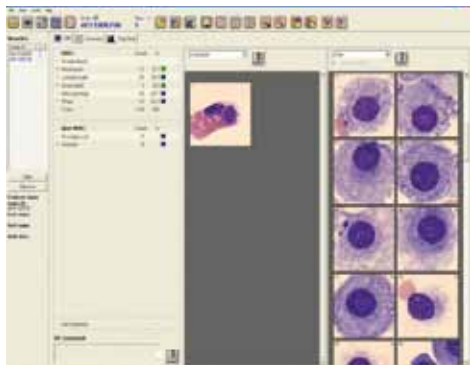


Fig. 4:

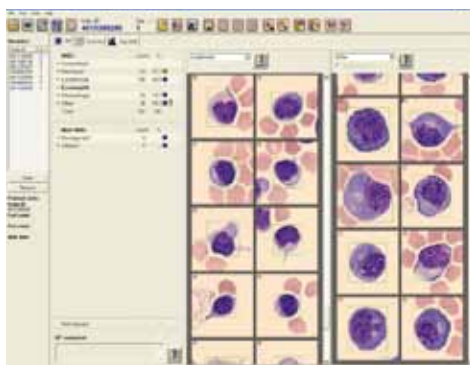


Fig 5:

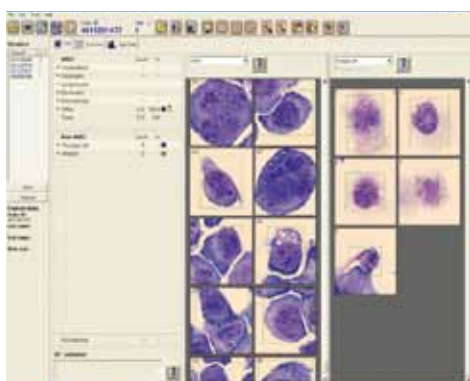


Fig 6.

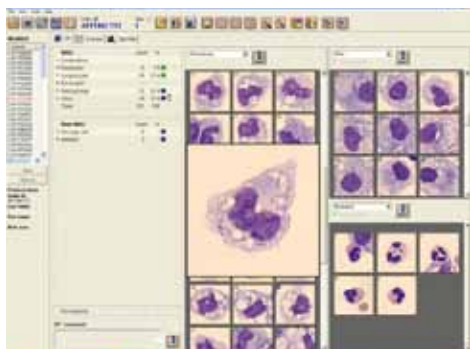


Fig 7:

FAKTA

Ved kropsvæske (engelsk bodyfluid) forstås væske i/fra kroppen, såsom blod, urin, expectorat, sput, sved, tårer, sæd, mælk, vaginal sekretion, amnionvæske, cerebrospinalvæske (CSV), ascites- og pleuravæske, perikardievæske, ledvæske mv. Artiklen omhandler kun de 5 sidstnævnte.

Visse steder findes væsken normalt i en mængde, der umiddelbart kan udtages (evt. suges ud), dette gælder f.eks. for CSV, led- og perikardievæske. Andre steder, f.eks. hvor pleura- og peritoneal (ascites)-væske dannes, vil akkumulation af væske i sig selv være unormalt, og en underliggende sygdom mistænkes. Ud over at tælle og differentialtælle celler er en række kemiske analyser meget vigtige for sygdomsudredning.

Der findes normalt meget få – eller ingen – celler i CSV. Referenceområdet for leukocytter er $< 5 \times 10^6/l$. Generelt kan man sige, at mange neutrocytter i CSV tyder på bakteriel infektion eller TB, mens lymfocytter tyder på virusinfektion, TB eller sklerose. Dominans af plasmaceller tyder på reaktive forandringer (antigenstimulering af B-lymfocytter) og ses ved mange andre tilfælde f.eks. sklerose, meningitis, syfilis mv. Ses i sjældne tilfælde ved myelom. Ses eosinofilytter, mistænkes bl.a. overfølsomhedsreaktion (ved shunt) eller infektion med parasitter.

Mange monocytter tyder på kronisk inflammation, TB eller svampeinfektion. Ses umodne, blastære leukocytter i CSV, kan dette tyde på CNS-infiltrat af leukæmiceller fra blodet. Ses tumorceller i CSV, kan det tyde på CNS tumor eller metastaser fra carcinom.

Det er normalt, at der findes højere leukocytkoncentration i de serøse væsker (pleura-ascites- og perikardievæsker), men et egentligt referenceområde findes ikke. Disse væsker vil normalt indeholde mesothelceller, lymfocytter, monocytter, neutrocytter og erythrocytter. Men kan i øvrigt indeholde alle celler som nævnt ved CSV.

Mesothelceller er et fladt, enlaget pladeepitel, som beklæder serøse hinder. Mesothelceller kan blive aktiveret, hvorved de kan være svære at skelne fra maligne celler, hertil kræves stor ekspertise samt specialfarvninger.

Obs. Man skal også være opmærksom på, at kontaminering fra blod og/eller knoglemarv kan forekomme. Øget koncentration af erythrocytter kan være et tegn på dette – eller akut opstået blødning.

KILDE: CAP HEMATOLOGY AND CLINICAL MICROSCOPY RESSOURCE COMMITTEE: COLOR ATLAS OF BODY FLUIDS, 2006, ISBN: 0930304918

Fig 5. Lymfocytter (til venstre) og plasmaceller (til højre). Plasmaceller placeres under "other" med en kommentar.

Fig 6. Til venstre "other" med beskrivelsen: umodne mononukleære celler. Patologiafdelingen har beskrevet cellerne som: "abnorme plasmacytoide celler" som led i pt's myelomatose. Til højre "smudged cells" (itusslåede celler).

Fig 7. 3 celleklasser præsenteres samtidig. Monocytter/ makrofager til venstre – zoom-funktion er anvendt til en enkelt monocyt. Til højre mesothelceller og under dem neutrocytter.