

## B-Diff (mikroskopi), B-Neutrofila

B-Neutrofila	NPU02902
B-Eosinofila	NPU01933
B-Basofila	NPU01349
B-Lymfocyter	NPU02636
B-Monocyter	NPU02840
B-Metamyelocyter	NPU03978
B-Myelocyter	NPU03976
B-Promyelocyter	NPU03974
B-Blastceller	NPU03972
B-Plasmaceller	NPU04708
B-Leukocyter, ospec	NPU17053
B-Erythroblaster	SWE05314
B-Megakaryocyter	SWE05329
B-Erytrocytmorfologi	NPU04221
B-Leukocytmorfologi	NPU18577
B-Trombocytmorfologi	NPU18671
B-Diff (mikroskopi)	NPU17580
B-Diff (maskinell)	NPU18156

### Bakgrund, indikation och tolkning

*B-Diff (mikroskopi)* (B-Differentialräkning, mikroskopi) innebär manuell bedömning av blodets cellklasser i mikroskop. Analysen används vid misstanke om avvikande leukocyt-, erytrocyt- eller trombocyt-morfologi och kräver att en specifik frågeställning anges på remissen. Vid beställning av B-Diff, mikroskopi lämnas svar dagtid vardagar.

Differentialräkning av celler i blod och benmärg utförs som mikroskopisk bedömning av May Grünwald-Giemsafärgade utstryk. Denna metod är referensmetod [1] för alla typer av cellklassifikation av blod och benmärg, som t.ex. cellräknare och flödescytometri. May Grünwald-Giemsas färgningsmetod är en s.k. Romanowsky-färgning. Färgmetoden publicerades 1891 av både Romanowsky och Malachowsky [2,3], som oberoende av varandra upptäckte att blandningar av Metylenblått och Eosin färgar malariaparasiternas cellkärna purpurviolett, i stark kontrast till cytoplasman som färgas gråblå. Den purpurvioletta färgen som uppkommer på DNA och vissa granula kallas för Romanowsky-effekten. Romanowsky-effekten är fortfarande den känsligaste detektionsmetoden inom malariadiagnostiken. Den viktigaste tillämpningen inom differentialräkningen av leukocyter är att identifiera nukleoler och olika granula.

Om det totala antalet leukocyter är förhöjt eller sänkt, bör komplettering ske med differential-räkning för att utröna i vilket/vilka cellsystem en rubbning föreligger. Differentialräkning bör också företas vid

Metodbeskrivning

**B-Diff (mikroskopi), B-Neutrofila**Gäller för  
Klinisk kemi

SKÅNE

normalt antal leukocyter om klinisk misstanke föreligger om ett förändrat antal av något särskilt cellslag eller leukemi. Differentialräkning i cellräknare är bara tillämpligt på normala leukocytpopulationer. Atypiska eller maligna cellpopulationer flaggas ut från cellräknaren för vidare analys med mikroskopi.

Vid akut leukemi kännetecknas den vita blod bilden av omogna cellformer vilka påvisas genom mikroskopering.

De viktigaste celltyperna att känna igen är blaster och promyelocyter. Leukemidiagnostiken är beroende av att vi kan identifiera dessa celler och leukemier dyker upp på alla akutmottagningar, ofta med ospecifika symptom. Promyelocytleukemi är speciellt viktigt eftersom förloppet ofta är urakut och patienten riskerar att avlida i koagulationsrubbnings på väg in i sjukvården.

Neutrofil, d v s ökning av antalet neutrofila granulocyter, är ett ospecifikt tecken på inflammatorisk reaktion. Vid svåra infektioner och sepsis kan stegringen bli mycket kraftig och man kan då se omogna former, stavar, metamyelocyter och myelocyter. En liknande bild med neutrofili och alla celltyper ur granulopoesen representerade i blodet ses vid kronisk myeloisk leukemi (KML).

Neutropeni, brist på granulocyter, ses bl.a. vid benmärgsskada, leukemi eller som läkemedelseffekt. Risk för svår infektion förekommer om antalet sjunker under  $1,0 \times 10^9/L$ . Neutropeni kan även vara autoimmunt betingad.

En ökning av antalet hypersegmenterade granulocyter ses vid megaloblastanemi, typiskt till följd av B12- och folatbrist. Hyposegmentering ses hos individer med Pelger-Hüets kärnanomali som är ett medfött, godartat tillstånd. Hyposegmentering kan dock även ses vid myeloiska sjukdomar (MDS, AML, KML) och vissa andra tillstånd.

Eosinofili ses vid allergiska tillstånd som astma, läkemedelsallergier och infektioner med vissa parasiter. Även vid bl.a. reumatiska sjukdomar kan eosinofili föreligga. Mycket sällan är orsaken till eosinofili en primär rubbning i eosinofilerna (hypereosinofilt syndrom, eosinofil leukemi). Basofili ses framför allt vid myeloproliferativa tillstånd.

Lymfocytos förekommer vid akuta virusinfektioner. Höga och mycket höga värden med en enförmig, mogen bild, ses vid kronisk lymfatisk leukemi. Hårceller ses, tillsammans med monocytopeni, vid hår-cellsleukemi.

Lymfopeni, brist på lymfocyter, ses bl.a. vid behandling med kortikosteroider och cytostatika samt vissa immundefekter. Vakuoliserade lymfocyter ses vid Spielmeyer-Vogts eller Battens sjukdom, en medfödd sjukdom som påverkar nervsystemet och brukar debutera mellan 5 och 10 års ålder.

Endast enstaka plasmaceller ses normalt i blod. Förhöjd andel ses vid maligna plasmacellssjukdomar (plasmocytom).

Monocytos ses vid långdragna inflammatoriska tillstånd, såväl infektiösa som icke infektiösa, liksom vid maligna sjukdomar.

Erythroblaster förekommer vid grav anemi oavsett anemimekanism (dock ej aplastisk anemi) men är vanligast vid svår hemolytisk anemi. Vid rubbad benmärgsfunktion (leukemi, benmärgsmetastaser) kan erythroblaster återfinnas i perifert blod utan att den erythropoetiska aktiviteten behöver vara hög [4].

Signifikanta fynd av schistocyter kan ses vid trombotisk mikroangiopatisk anemi, TMA.

TMA innefattar två huvudsakliga tillstånd; trombotisk trombocytopen purpura, TTP samt hemolytiskt uremiskt syndrom, HUS. Schistocyter tillsammans med andra former av poikilocytos är inte specifikt för TMA diagnosen utan kan ses vid membrandefekter, thalassemi, myelofibros, megaloblastanemi, HELLP syndromet, metastaserande cancer och DIC bl a.

Metodbeskrivning

**B-Diff (mikroskopi), B-Neutrofila**Gäller för  
Klinisk kemi

SKÅNE

**Analysprincip**

May-Grünwald-Giemsa är en s.k. Romanowskyfärg som syftar till att färga de tre huvudkomponenterna i cellen, kärnan, cytoplasma samt granula, på olika sätt.

Utstryk färgas med May-Grünwald-Giemsa enligt Pappenheim och görs i två steg. Det första steget görs i metanol och ger snabb infärgning på kort tid (3-5 min). Det andra steget görs i fosfatbuffert under lång tid (15 min) och syftar till att få fram purpurfärgen för att differentiera vissa cellkomponenter. May Grünwaldfärgen i första steget innehåller Metylenblått och Eosin Y lösta i ren metanol. Giemsa-färgen i andra steget innehåller en blandning av metylenblått och dess degradationsprodukt Azur B samt eosin Y lösta i fosfatbuffert pH 6,8. Metylenblått och Azur B (basiska, positivt laddade) färgar negativt laddat DNA och RNA och heparinnehållande (basofila) granula i basofiler och trombocyter. Eosin Y (röd, sur, negativt laddad) binder till basiska proteiner och acidofila granula i eosinofiler. Infärgningen är pH-beroende. Nukleolerna innehåller RNA och färgas ljus blå, medan kromatinet innehåller DNA och färgas purpurviolett. Neutrofila granula färgas purpurviolett, basofila granula färgas blåsvart medan eosinofila granula färgas tegelröda, se tabell nedan.

***Romanowsky Staining of Blood and Bone Marrow Films*****Table I. Romanowsky stain; general scheme of colouring**

<b>Nuclear chromatin</b>	<b>Purple</b>
<b>Nucleoli</b>	<b>Light blue</b>
<b>Basophilic cytoplasm</b>	<b>Blue</b>
<b>Basophilic granules</b>	<b>Purple-black</b>
<b>Eosinophilic granules</b>	<b>Red-orange</b>
<b>Neutrophilic granules</b>	<b>Purple</b>
<b>Toxic granules</b>	<b>Black</b>
<b>Platelet granules</b>	<b>Purple</b>
<b>Haemoglobinized erythrocytes</b>	<b>Pink-orange</b>
<b>Auer rods</b>	<b>Purple</b>
<b>Doehle bodies</b>	<b>Bright blue</b>
<b>Howell-Jolly bodies</b>	<b>Purple</b>

Tabell ur referens 1.

Utstryket granskas och leukocyter klassificeras manuellt i ljusmikroskop eller genom digitala bilder från DI/DC system. Klassificeringen bör utföras på två separata glas av två oberoende granskare.

**B-Diff (mikroskopi), B-Neutrofila****Referensintervall****B-Neutrofila granulocyter**

Vuxna [5]*:	1,7–8,0 x 10 <sup>9</sup> /L
Barn [6]	
0-1 dagar:	5,5–27,5 x 10 <sup>9</sup> /L
1-7 dagar:	4,5–22,5 x 10 <sup>9</sup> /L
7 dagar-3 månader:	1,6–17,5 x 10 <sup>9</sup> /L
3 månader-1 år:	1,6–5,3 x 10 <sup>9</sup> /L
1-5 år:	1,6–6,5 x 10 <sup>9</sup> /L
5-10 år:	2,4–6,5 x 10 <sup>9</sup> /L
10-16 år:	1,2–7,0 x 10 <sup>9</sup> /L
16-18 år:	1,7–8,0 x 10 <sup>9</sup> /L

**B-Eosinofila granulocyter**

Vuxna[5]:	<0,7 x 10 <sup>9</sup> /L
Barn [6]	
0-7 dagar:	<2,6 x 10 <sup>9</sup> /L
7 dagar-1 år:	<1,1 x 10 <sup>9</sup> /L
1-10 år:	<0,9 x 10 <sup>9</sup> /L
10-18 år:	<0,7 x 10 <sup>9</sup> /L

**B-Basofila granulocyter**

Vuxna[5]:	<0,3 x 10 <sup>9</sup> /L
Barn[6]:	<0,3 x 10 <sup>9</sup> /L

**B-Lymfocyter**

Vuxna[5]:	1,1–4,8 x 10 <sup>9</sup> /L
Barn [6]	
0-7 dagar:	3,0–13,5 x 10 <sup>9</sup> /L
7 dagar-3 månader:	3,0–8,4 x 10 <sup>9</sup> /L
3 månader-1år:	4,0–8,4 x 10 <sup>9</sup> /L
1-5 år:	1,8–8,4 x 10 <sup>9</sup> /L
5-10 år:	1,8–5,0 x 10 <sup>9</sup> /L
10-16år:	1,5–4,7 x 10 <sup>9</sup> /L
16-18 år:	1,1–4,8 x 10 <sup>9</sup> /L

**B-Monocyter**

Vuxna[5]:	<1,1 x 10 <sup>9</sup> /L
Barn [6]	
0-1 dagar:	0,2-3,6 x 10 <sup>9</sup> /L
1-7 dagar:	0,2-2,7 x 10 <sup>9</sup> /L
7 dagar-3 månader:	0,2-2,0 x 10 <sup>9</sup> /L
3 månader-5 år:	0,2-1,8 x 10 <sup>9</sup> /L
5-10 år:	0,2-0,8 x 10 <sup>9</sup> /L
10-16år:	<0,9 x 10 <sup>9</sup> /L
16-18 år:	<1,1 x 10 <sup>9</sup> /L

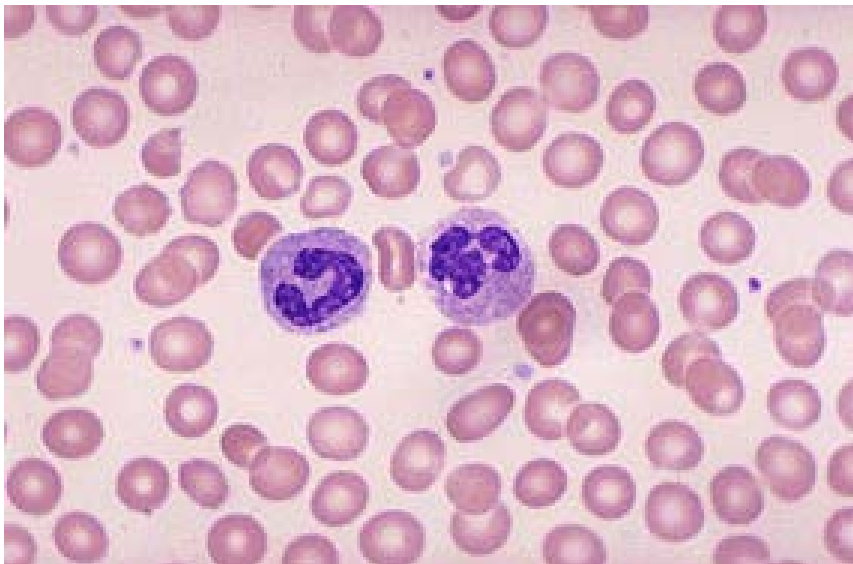
\*Referensintervall omfattar stavkärniga neutrofila (0,0-0,5 x10<sup>9</sup>/L) samt segmentkärniga neutrofila (1,7–7,5x10<sup>9</sup>/L).

## Metodkaraktistika

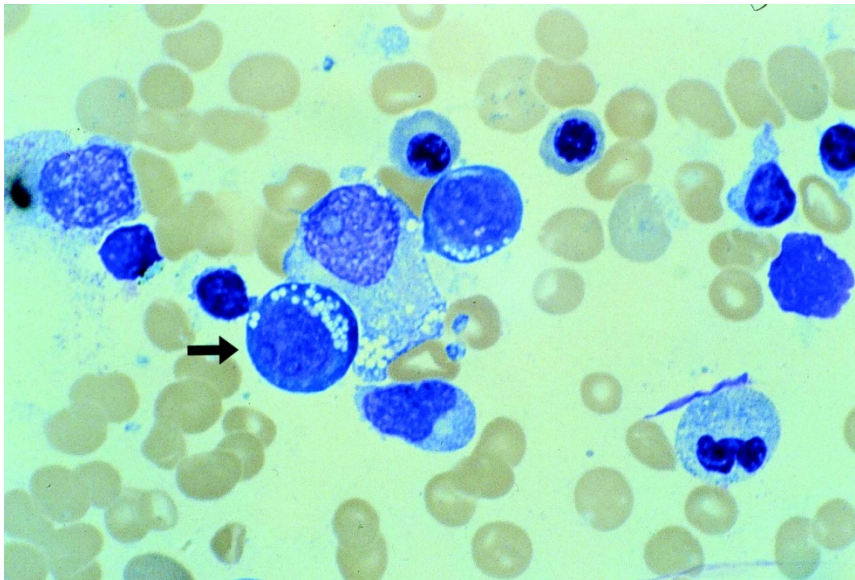
### Interferenser och felkällor

- Vid användning av EDTA-blod kan vissa morfologiska avvikelser som ökad vakuolisering, förändrad cellkärneform och degranulering förekomma.
- Provets ålder. Prov äldre än 4 tim. kan vara svåra att klassificera då cellerna degranulerar, vakuoliseras och får pyknotiska kärnor.
- En ej optimal utstryksteknik kan ge ojämn fördelning av leukocyterna och en större andel sönderstrukna celler.
- Vid dålig infärgning och högt värde på leukocyter kan infärgningstiden behöva förlängas.
- Utebliven Romanowsky-effekt kan bero på:
  1. otillräcklig tvätt för att få bort metanol efter May Grünwald-steget
  2. andelen Azur B i Giemsa-färgen. Leverantören har använt en batch med fel proportion metylen blått/Azur B.
  3. felaktigt pH i Giemsa steget. Felaktigt pH på fosfatbufferten kan ge avvikande färger; erythrocyter (normalt röda) blir blågröna om pH är för högt. Kärnfärgen (purpur) minskar vid för lågt pH. (pH ska ligga mellan 6,7 och 6,9).

Fungerande Romanowsky-färgning ska ge purpurfärgade cellkärnor och granula som kontrasterar mot blågrå cytoplasma, se nedan.



Det är vanligt med icke fungerande Romanowsky-metoder [2]. Avsaknaden av kontrast mellan kärna, granula och cytoplasma vid misslyckad färgning försvårar klassifikationen.

**Mätområde**

Ej applicerbart.

**Detektionsgräns**

Detektionsgränsen för räkning av leukocyter i utstryk är svår att fastställa men är högre än den i cellräknare då betydligt färre celler analyseras på blodutstryk (se även bilaga 1).

**Mätosäkerhet**

Se bilaga 1.

**Spårbarhet**

Equalis Rekommenderad rutinmetod för standardiserad morfologisk klassificering och bedömning av celler i blodutstryk [7].

**Ackreditering**

Metoden för B-Diff (mikroskopi) vuxna (>18 år) är ackrediterad.

Metoden för B-Diff (mikroskopi) barn (≤18 år) är ej ackrediterad på grund av att spårbarhet för referensintervallen saknas.

Metodbeskrivning

## B-Diff (mikroskopi), B-Neutrofila

Gäller för  
Klinisk kemi

SKÅNE

## Referenser

1. ICSH reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y (Romanowsky stain). International Committee for Standardization in Haematology, ed. Wittekind Br J Haematol. 1984; 57(4):707-10.
2. The color purple: from royalty to laboratory, with apologies to Malachowski. Krafts KP, Hempelmann E, Oleksyn BJ. Biotech Histochem. 2011;86(1):7-35.
3. How Romanowsky stains work and why they remain valuable - including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. Horobin RW. Biotech Histochem. 2011;86(1)
4. Blodsjukdomar, Gösta Gahrton och Bengt Lundh Tredje upplagan 1997.
5. Nilsson-Ehle P, red. Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin, 9:e upplagan. Lund: Studentlitteratur 2012, sid 274.
6. Spårbarhet för referensintervall saknas.
7. Equalis Rekommenderad rutinmetod för standardiserad morfologisk klassificering och bedömning av celler i blodutstryk. Equalis standard S001 version 3.1 2018
8. SP-10 Användarmanual. Finns på arbetsplatsen.
9. Clinical Hematology Atlas. Bernadette F. Rodak, Jaqueline H. Carr. Fourth edition 2013.
10. De fouten in de uitkomsten van de differentiatie van cellen in een uitstrijkpreparaat. Rümke, C.L. Ned Tijdschr Geneesk. 1958, 102(51):2505-8.
11. Laboratory aids. Variability of results in differential cell counts on blood smears. Rümke, C.L. Triangle. 1960, 4:154-8.
12. Blood cell morphology grading guide. Gene Gulati. 2009.
13. Atlas of Blood Disease Morphology. Yoshihito Yawata, Sysmex Corporation. 2009.