

Nâng cao - tham khảo

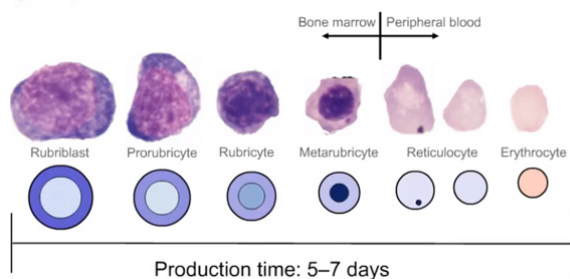
GIÁ TRỊ HỒNG CẦU LƯỚI TRONG BỆNH LÝ THIẾU MÁU (Bài tổng hợp)

Nguyễn Tấn Tài, Quách Tuyết Anh

Khoa Thú y, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

I. HỒNG CẦU LƯỚI LÀ GÌ?

Hồng cầu lưới (reticulocyte) là hồng cầu non chứa ARN tồn dư, ti thể và một số bào quan, vừa trưởng thành từ nguyên hồng cầu ưa acid trong quá trình sinh hồng cầu, là dạng chuyển tiếp giữa hồng cầu non trong tủy xương và hồng cầu trưởng thành ở ngoại vi; thời gian tồn tại ở dạng chuyển tiếp (đời sống hồng cầu lưới) khoảng 24 - 48 giờ. Sự xuất hiện của hồng cầu lưới ở máu ngoại vi là chỉ điểm cho thấy quá trình tạo hồng cầu (HC) có hiệu quả, điều đó có nghĩa là tủy xương phản ứng tốt với tình trạng thiếu máu.



Hình 1. Quá trình sinh hồng cầu

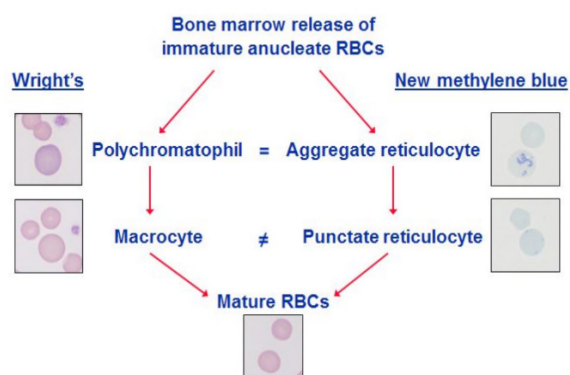
Rubriblast: Sinh nguyên hồng cầu đa sắc; Prorubricyte: Tiền nguyên hồng cầu đa sắc; Rubricyte: Nguyên hồng cầu đa sắc ưa kiềm; Metarubricyte: Nguyên hồng cầu đa sắc (ưa acid và ưa kiềm); Reticulocyte: Hồng cầu lưới; Erythrocyte: Hồng cầu. Thời gian tạo: 5-7 ngày

Sau 24 giờ ở máu ngoại vi, hồng cầu lưới sẽ “chín”- phóng xuất ARN tồn dư, tái cấu trúc màng và trở thành hồng cầu trưởng thành. Sự trưởng thành xảy ra được là nhờ sự giúp đỡ của đại thực bào ở lách.

Có thể dễ dàng xác định được hồng cầu lưới ở

máu ngoại vi bằng cách nhuộm với thuốc nhuộm xanh methylene (hoặc có thể dùng xanh cresyl). Đặc điểm hồng cầu lưới sau nhuộm methylene: có những sợi màu xanh sẫm (sợi ARN) như sợi chỉ nằm thành hình dây lưới, nằm trong bào tương của các hồng cầu non. Khi chứa một lượng lớn ARN, chúng được gọi là hồng cầu lưới kết tụ (aggregate reticulocytes) và bắt màu tím (còn gọi là polychromatophils hay polychromasia) dưới phương pháp nhuộm Wright's hoặc Diff-quick, nhưng nếu chúng chỉ chứa một ít ARN, chúng được gọi là hồng cầu lưới đốm (punctate reticulocytes) và không bắt màu tím mà có màu như hồng cầu trưởng thành. Vì vậy dưới phương pháp nhuộm Wright's, số lượng hồng cầu lưới (polychromatophils) sẽ luôn ít hơn (hình 2). Sự khác biệt này là quan trọng, đặc biệt ở mèo, vì chỉ hồng cầu lưới kết tụ được sử dụng để đánh giá mức độ phản ứng trong tái tạo hồng cầu ở tủy xương. Hồng cầu lưới kết tụ là giai đoạn sớm của hồng cầu lưới và sẽ chuyển tiếp sang hồng cầu lưới đốm, điều này được thấy rất rõ ở mèo.

Đánh giá hồng cầu lưới giúp xác định xem một bệnh nhân thiếu máu có đáp ứng tùy đủ với tình trạng thiếu máu hay không hoặc số lượng hồng cầu non được tạo ra để thay thế các tế bào hồng cầu mất đi đã đủ hay chưa. Ngoài ra hồng cầu lưới còn có những ứng dụng quan trọng khác như đánh giá một bệnh nhân nhận thuốc hóa trị liệu gây độc tế bào, theo dõi bệnh nhân được cung cấp sắt khi thiếu máu do thiếu sắt (đã được chẩn đoán trước đó), hoặc theo dõi phản ứng với erythropoietin tái tổ hợp của người (rhEPO) khi tiêm cho bệnh nhân suy thận mạn tính.



Hình 2. Nhận diện hồng cầu lưới bằng hai phương pháp nhuộm Wright's và xanh methylene

Polychromatophil: Nguyên hồng cầu đa sắc ưa kiềm, *Macrocyte*: Đại hồng cầu, *Mature RBC*: hồng cầu trưởng thành, *Aggregate reticulocyte*: hồng cầu lưới kết tụ, *Punctate reticulocyte*: hồng cầu lưới đốm.

II. PHƯƠNG PHÁP NHUỘM HỒNG CẦU LƯỚI

2.1. Chuẩn bị mẫu

Cần 1-3ml máu tĩnh mạch được cố định với chất kháng đông EDTA trong ống mẫu. Mẫu có thể được sử dụng để nhuộm nếu trữ trong 2-4h ở nhiệt độ phòng hoặc 48h ở 2°C–8°C.

2.2. Cách nhuộm

- Trộn mẫu máu và thuốc nhuộm (xanh methylene hoặc xanh cresyl) với tỷ lệ bằng nhau.
- Ủ ở nhiệt độ phòng khoảng 10-20 phút.
- Phết mẫu và để khô tự nhiên.
- Đếm 1000 hồng cầu và đếm số lượng hồng cầu lưới kết tụ (ở cả chó và mèo) và hồng cầu lưới đốm (ở mèo).
- Mẫu đã được nhuộm có thể lưu nhiều năm nếu được tránh ánh nắng và độ ẩm.

III. VAI TRÒ HỒNG CẦU LƯỚI TRONG PHÂN LOẠI THIẾU MÁU

Trong bệnh lý thiếu máu, hồng cầu lưới được giải phóng sớm khỏi tủy xương để đáp ứng với nồng độ erythropoietin tăng cao gây ra bởi tình

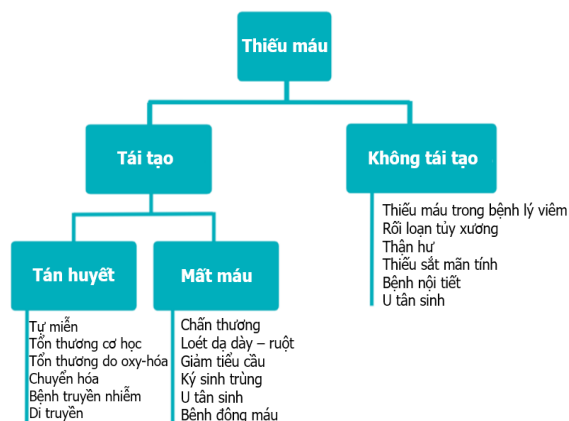
trạng thiếu oxy ở mô và cho thấy sự tăng cường tạo hồng cầu của tủy xương. Do đó, hồng cầu lưới được sử dụng để phân loại thiếu máu thành ba dạng:

- Thiếu máu tái tạo (tăng hồng cầu lưới)
- Thiếu máu trước tái tạo (pre-regenerative): giảm hồng cầu lưới trong mắt máu cấp tính hoặc tan huyết cấp tính nhưng sẽ tăng dần (tái tạo) sau 2-5 ngày.
- Thiếu máu không tái tạo (giảm hoặc không tăng hồng cầu lưới), để đánh giá tính toàn vẹn của tủy xương, định hướng nguyên nhân thiếu máu tại tủy xương hay ở ngoại vi (hình 4) cũng như theo dõi liệu pháp điều trị bệnh lý thiếu máu.

Có rất nhiều phương pháp để đếm hồng cầu lưới. Mặc dù việc đếm thủ công bằng kính hiển vi quang học vẫn là tiêu chuẩn vàng, nhưng các phương pháp tự động mới hơn sử dụng thuốc nhuộm huỳnh quang (fluorescent) đặc hiệu cho ARN, kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy (flow cytometry) và máy phân tích hồng cầu lưới chuyên dụng đang ngày càng trở nên phổ biến với độ chính xác và ứng dụng cao trong thực tế lâm sàng cả thú y và nhân y. Hiện nay, với sự phát triển của công nghệ hiện đại, các dòng máy phân tích huyết học tiên tiến đã tích hợp chỉ số hồng cầu lưới trong một xét nghiệm sinh lý để đánh giá như LaserCyte Dx hoặc ProCyte Dx của Idexx. Hai dòng máy này cũng có thể đo hàm lượng hemoglobin của hồng cầu lưới (REC-HGB), là chỉ số có độ nhạy cao trong bệnh lý thiếu máu thiếu sắt (hình 3).

Test	Results	Reference Interval	LOW	NORMAL	HIGH
ProCyte Dx (February 20, 2021 12:41 AM)					
RBC	3.50 Mj/L	5.65 - 8.87	LOW		
HCT	23.0 %	37.3 - 61.7	LOW		
HGB	6.8 g/dL	13.1 - 20.5	LOW		
MCV	65.7 fL	61.6 - 73.5			
MCH	19.4 pg	21.2 - 26.9	LOW		
MCHC	29.6 g/dL	32.0 - 37.9	LOW		
RDW	24.0 %	13.6 - 21.7	HIGH		
%RETIC	0.1 %				
RETIC	2.5 Kj/L	10.0 - 110.0	LOW		
RETIC-HGB	19.9 pg	22.3 - 29.6	LOW		

Hình 3. Mẫu kết quả sinh lý ở chó bị thiếu máu không tái tạo do thiếu sắt trong bệnh lý viêm (đọc trên máy phân tích huyết học ProCyte Dx, Phòng xét nghiệm Đại học Nông Lâm TP.HCM); Viết tắt: RETIC, số lượng tuyệt đối của hồng cầu lưới kết tụ trên mỗi microlit máu (absolute aggregate reticulocyte count). %REC: Phần trăm hồng cầu lưới được tính theo tỷ lệ hồng cầu lưới so với hồng cầu trưởng thành ở máu ngoại vi.



Hình 4. Sơ đồ định hướng chẩn đoán nguyên nhân thiếu máu trên chó và mèo

Thông thường phản ứng tái tạo xảy ra trong bệnh thiếu máu tán huyết (hemolysis anemia) sẽ mạnh mẽ hơn so với thiếu máu do mất máu ra ngoài (external blood loss), bởi vì sắt và protein của các tế bào hồng cầu bị vỡ có sẵn để tái sử dụng cho quá trình tạo hồng cầu. Do đó, số lượng hồng cầu lưới đáp ứng trong mất máu tán huyết sẽ lớn hơn so với mất máu ra ngoài.

3.1. Đánh giá hồng cầu lưới trên chó

Ở chó, thời gian chuyển tiếp từ giai đoạn kết tụ sang đám của hồng cầu lưới ở máu ngoại vi là rất nhanh và sẽ trở thành hồng cầu trưởng thành sau 24h. Đồng thời, hồng cầu lưới đám ở chó có thời gian tồn tại rất ngắn ở máu ngoại vi. Vì vậy hồng cầu lưới kết tụ sẽ thường được nhìn thấy hơn dưới kính hiển vi. Ở những con chó bị thiếu máu trung bình đến nặng, qua đáp ứng tái tạo từ tủy xương khỏe mạnh sẽ thấy một lượng lớn hồng cầu lưới kết tụ trong máu ngoại vi.

Không nên chỉ giải thích tỷ lệ phần trăm hồng cầu lưới vì nó không tính đến mức độ thiếu máu của bệnh nhân và tỷ lệ này sẽ tăng lên khi giảm lượng hồng cầu trưởng thành. Trong thực tế lâm sàng, số lượng hồng cầu lưới kết tụ tuyệt đối (absolute aggregate reticulocyte count) là một chỉ số phù hợp và hữu ích nhất để cùng đánh giá khả năng tái tạo (tạo hồng cầu lưới của tủy xương) ở cả chó và mèo, được tính bằng công thức:

$$\text{Absolute reticulocytes count}/\mu\text{L} = (\% \text{reticulocytes}/100) \times \text{RBC count}/\mu\text{L}$$

Bảng 1. Tóm tắt % hồng cầu lưới mong đợi cho từng mức độ thiếu máu sau đáp ứng ở tủy xương trên chó

Đánh giá đáp ứng của hồng cầu lưới

Phương pháp	Chó
% hồng cầu lưới	
Bình thường	0-1,5
Nhẹ	1,5-4
Trung bình	5-20
Nặng	21-50
Số lượng hồng cầu lưới tuyệt đối (dạng kết tụ)	
Bình thường ^a	<60.000-80.000 (<1%)
Nhẹ	80.000-150.000
Trung bình	150.000-300.000
Nặng	>500.000

a: Không tái tạo nếu bị thiếu máu

Trong đáp ứng với thiếu máu trên chó, sau 2-5 ngày hồng cầu lưới kết tụ sẽ được giải phóng ở ngoại vi và đạt đỉnh điểm về số lượng ở ngày 4 đến ngày 7, và có thể trở lại bình thường vào ngày 10 đến 14 mặc dù tình trạng thiếu máu vẫn chưa hồi phục hoàn toàn (bảng 2). Do đó, có khả năng thiếu máu không tái tạo sẽ được biểu hiện ở giai đoạn này, bởi vì đỉnh tăng hồng cầu lưới và đáp ứng tái tạo ngoại vi đã xảy ra trước đó. Lúc này, theo dõi kết quả sinh lý sau 3-5 ngày là cần thiết.

Bảng 2. Thời gian đáp ứng của hồng cầu lưới trong mất máu ở chó và mèo

Đáp ứng của hồng cầu lưới trong mất máu^a

Đáp ứng	Hồng cầu lưới kết tụ (ở chó và mèo) ^b	Hồng cầu lưới đám (mèo) ^b
Giai đoạn đầu	2-5 ngày	4-11 ngày
Giai đoạn giữa	4-7 ngày	11-20 ngày
Giai đoạn cuối ^c	10-14 ngày	25-30 ngày

a: Bị mất 30 ml/kg máu, b: Ngày sau khi mất máu, c: dung tích hồng cầu (PCV) có thể thấp hơn khoảng tham chiếu, PCV nên trở về khoảng tham chiếu trong 2-4 tuần.

Ở giai đoạn cuối của thiếu máu, đánh giá số lượng của hồng cầu to nhược sắc (tăng MCV, giảm MCHC) sẽ phản ánh chính xác phản ứng tái tạo ở tủy xương hơn so với đánh giá hồng cầu lưới vì hồng cầu lưới to hơn hồng cầu trưởng thành và chứa ít hemoglobin hơn trong tế bào chất. Tuy nhiên, một số nghiên cứu trên chó cho thấy chỉ khoảng 8,3% (n=209,939; Dennis B. DeNicola *et al.*, 2006) đến 11,8% (n=1,426; Hodges J., Christopher, 2011) chó bị thiếu máu tái tạo có tăng MCV và giảm MCHC. Điều này chỉ ra rằng đánh giá phản ứng của tủy xương dựa vào hai chỉ tiêu này có sự giới hạn. Thậm chí có thể gây hiểu lầm, vì hồng cầu lưới tăng không đủ số lượng để làm thay đổi MCV, MCHC và các yếu tố gây ảnh hưởng khác.

Một khi HCT (hematocrit) đạt 30% đến 37% (bảng 3), tủy xương có thể đáp ứng với tình trạng thiếu máu nhẹ này bằng cách giải phóng số lượng hồng cầu trưởng thành tăng lên thay vì hồng cầu lưới. Tình trạng thiếu oxy không đáng kể sẽ không đủ để kích thích tổng hợp erythropoietin.

Bảng 3. Đánh giá mức độ nghiêm trọng của thiếu máu qua chỉ số HCT/PCV

Mức độ	Chó	Ngựa	Mèo/Nhai lại
Nhẹ	30-37 ^a	30-33	20-26
Trung bình	20-29	20-29	14-19
Nặng	13-19	13-19	10-13
Rất nặng	<13	<13	<10

^a % Hematocrit hoặc % dung tích hồng cầu

Cần thận trọng khi giải thích đáp ứng tủy xương ở chó con và ở các thú non khác, vì số lượng hồng cầu lưới cao khi mới sinh (3% - 4,5% ở chó con từ 6 đến 8 tuần tuổi) và giảm theo tuổi (lên đến 1% ở chó trưởng thành). HCT trong khoảng 26-30%. Do đó, chó non có thể bị cho là thiếu máu tái tạo do mất máu khi dùng khoảng tham chiếu ở thú trưởng thành. Ngoài ra, thú non có thể kém khả năng đáp ứng với sự mất máu hơn so với con trưởng thành vì thiếu sắt sinh lý.

3.2. Đánh giá hồng cầu lưới trên mèo

Khác với chó, thời gian trưởng thành của hồng cầu lưới và thời gian chuyển tiếp từ hồng cầu lưới kết tụ sang dạng đốm tương đối chậm, khoảng 12-24h. Hồng cầu lưới đốm lưu hành trong máu lên tới 10-14 ngày trước khi ARN được phóng xuất và trở thành hồng cầu trưởng thành (bảng 2).

Ở một con mèo khỏe mạnh, hồng cầu lưới cần 2-5 ngày trong tủy xương để trưởng thành. Dưới sự tác động của erythropoietin, chúng sẽ đi vào máu ngoại vi bằng cách xuyên mạch qua các võng nội mô ở tủy xương. Trong trường hợp mất máu nghiêm trọng, tủy xương sẽ tăng giải phóng hồng cầu lưới và có thể cả hồng cầu lưới non, thậm chí là hồng cầu có nhân ra máu ngoại vi. Chúng sẽ tiếp tục trưởng thành trong máu ngoại vi hoặc trong lách 24-48h sau đó.

Hồng cầu lưới đốm khó đánh giá hơn hồng cầu lưới kết tụ vì tỷ lệ của chúng thay đổi trong khoảng 1% đến 10% ở mèo không bị thiếu máu và cũng khó nhận diện ở các máy phân tích huyết học. Hơn nữa, hồng cầu lưới đốm có thể tồn tại dai dẳng trong máu mèo bị thiếu máu không tái tạo lên đến 30 ngày. Do đó các dòng máy phân tích huyết học hiện đại chỉ cho kết quả % của hồng cầu lưới kết tụ (ProCyte Dx/LaserCyte Dx).

Bảng 4. Tóm tắt phần trăm hồng cầu lưới mong đợi cho từng mức độ thiếu máu sau đáp ứng ở tủy xương trên mèo

Đánh giá đáp ứng của hồng cầu lưới

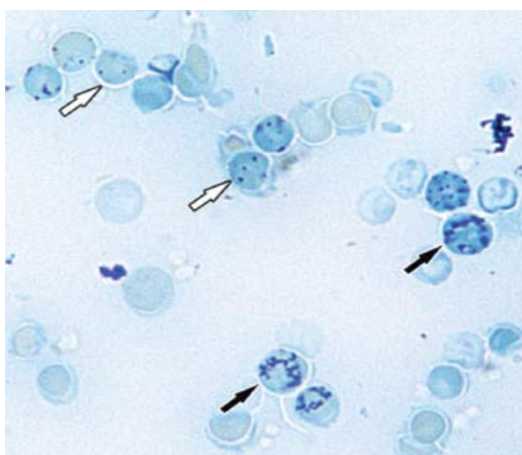
Phương pháp	Mèo
% hồng cầu lưới	
Bình thường ^a	0-0,4
Nhẹ	0,5-2
Trung bình	3-4
Nặng	5+
Số lượng hồng cầu lưới tuyệt đối (dạng kết tụ)	
Bình thường ^a	<15.000-42.000 (0-0,4%)
Nhẹ	42.000-70.000
Trung bình	70.000-100.000
Nặng	>200.000

^a: Không tái tạo nếu bị thiếu máu

Số lượng tuyệt đối của hồng cầu lưới kết tụ (absolute aggregate reticulocyte count) vượt quá 50.000/ μ L là bằng chứng cho thấy thiếu máu tái tạo ở mèo (bảng 4).

Với sự hiện diện dai dẳng trong máu ngoại vi của hồng cầu lưới đốm trên mèo, chúng ta phải kết hợp số lượng tế bào hồng cầu lưới kết tụ tuyệt đối và tiêu bản máu (hình 5) để đánh giá và có thể dự đoán thời gian thiếu máu ở mèo (hình 6) như sau:

- Nếu tăng số lượng hồng cầu lưới kết tụ: Thiếu máu tái tạo; có thể <5 ngày sau khi bắt



Hình 5. Hình ảnh trên vi trường của một con mèo mắc thiếu máu tái tạo. Hồng cầu lưới đốm (Mũi tên trắng) và hồng cầu lưới kết tụ (Mũi tên đen), (Nhuộm xanh methylene, 100x)

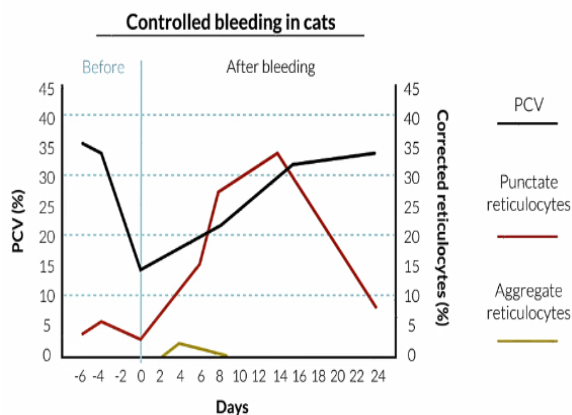
IV. KẾT LUẬN

Thiếu máu là một hội chứng, có nhiều nguyên nhân gây bệnh và có các cơ chế khác nhau. Vì vậy, để chẩn đoán nguyên nhân thiếu máu cần tiếp cận vấn đề một cách toàn diện. Trong đó, hồng cầu lưới là một chỉ số gần như thường quy trong tiếp cận chẩn đoán thiếu máu do mọi nguyên nhân, đồng thời còn ứng dụng trong theo dõi điều trị một số bệnh lý trên người và thú. Khi giải thích các phản ứng của hồng cầu lưới, cần xem xét tình trạng sức khỏe

đầu thiếu máu nếu trên vi trường có ít và thưa thớt hồng cầu lưới đốm; ngược lại, nếu nhiều và thường xuyên thì có thể đã mất máu hơn 5 ngày.

- Nếu số lượng hồng cầu lưới kết tụ bình thường và trên vi trường có nhiều hoặc thường xuyên hồng cầu lưới đốm: có thể thiếu máu tái tạo (7-21 ngày sau đỉnh tăng hồng cầu lưới kết tụ)

- Nếu số lượng hồng cầu lưới kết tụ bình thường và trên vi trường có ít hoặc thưa thớt hồng cầu lưới đốm: có thể thiếu máu không tái tạo hoặc thiếu máu trước tái tạo.



Hình 6. Đồ thị cho thấy sự thay đổi của hai dạng hồng cầu lưới theo thời gian (ngày) thiếu máu tái tạo do mất máu cấp tính trên mèo

thú cũng như nguyên nhân, mức độ và thời gian thiếu máu.

Lời cảm ơn: Chân thành cảm ơn PGS. TS. Trần Thị Dân đã đóng góp ý kiến chi tiết cho bản thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cowgill ES, Neel JA, Grindem CB., 2003. Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 33(6):1223-44, v. doi: 10.1016/s0195-5616(03)00099-8. PMID: 14664196.
2. Cramer DV, Lewis RM., 1972. Reticulocyte