Hodnocení nátěru aspirátu kostní dřeně

Buliková A, Mikulenková D

dle doporučení laboratorní sekce ČHS JEP s akceptováním doporučení mezinárodních s platností od 1.2.2016

Příprava materiálu

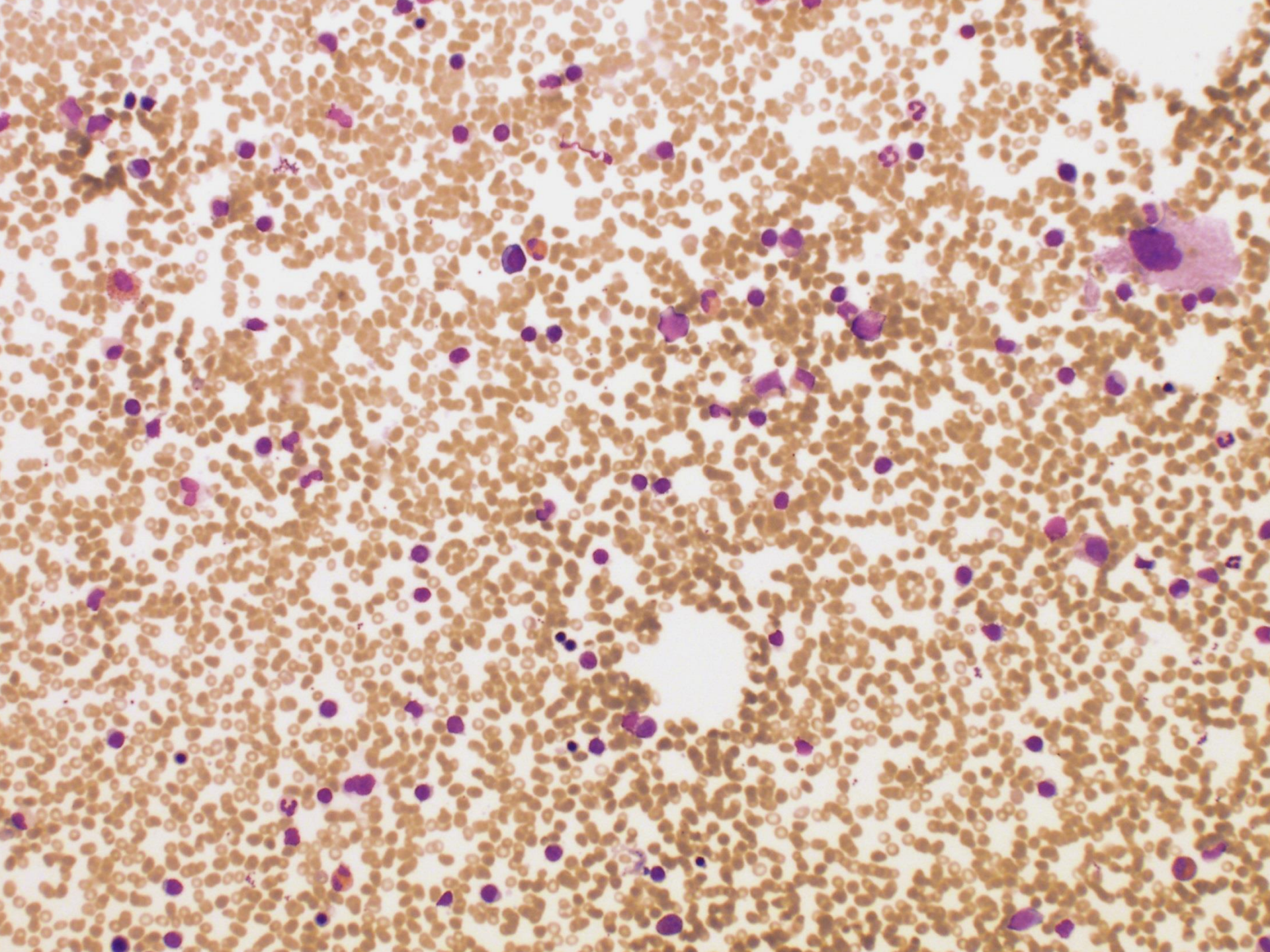
Odběr aspirátu pro cytologické zhodnocení kostní dřeně se provádí speciální punkční jehlou a to z hrudní kosti, či z lopaty kosti kyčelní. Standardně se dřeňová krev odebírá do větší (20 ml) injekční stříkačky bez přidání protisrážlivých činidel. Doporučuje se při prvním nasátí vzorku odebrat maximálně 0,5 ml (optimálně 0,3 ml) a z tohoto odběru provést vlastní nátěry. První porce aspirované dřeně (částice!) se bez časového prodlení nanese na podložní sklo, či na Petriho misku. Roztěrovým sklem se co nejrychleji rozetře na připravená podložní skla, doporučuje se provést alespoň 6 nátěrů. Alternativní možností je provést nátěry aspirátu kostní dřeně, která je transportována v antikoagulačním činidle soli EDTA (pak je nutné provést nátěry co nejrychleji, maximálně do 5 hodin). Aspirát se po zaschnutí při laboratorní teplotě (nejméně však 30 minut dle množství částic či tukových složek) barví panoptickým barvením dle May-Grünwald-Giemsy. Nelze-li ve výjimečných případech nelze aspirát odebrat, je nutné vyšetřit kostní dřeň histologicky a k event. k orientačnímu cytologickému zhodnocení kostní dřeně zhotovit otiskové preparáty válečku z trepanobiopsie (není rovnocené nátěru – hodnocení morfologie limitováno)

Nutné informace – žádanka

- Pro náležité zhodnocení preparátu z aspirace či z aspirační biopsie kostní dřeně je vhodné mít k dispozici hodnoty krevního obrazu a nátěr periferní krve. Dále je nutné mít informace o pacientovi, ať už uvedené na žádance, či v nemocničním informačním systému.
- Každá laboratoř, v níž se hodnocení preparátů z aspirace či aspirační biopsie provádí, musí mít nastaven vlastní systém získávání těchto informací. Za minimální rozsah informací se považuje:
  - vstupní suspektní klinická diagnóza resp. diferenciálně diagnostická rozvaha od klinického lékaře
  - zhodnocení stavu hemopoetických orgánů (uzliny, slezina, játra)
  - další dostupné relevantní klinické a laboratorní nálezy včetně podávané léčby, zejména té, která může stav kostní dřeně podstatným způsobem ovlivnit

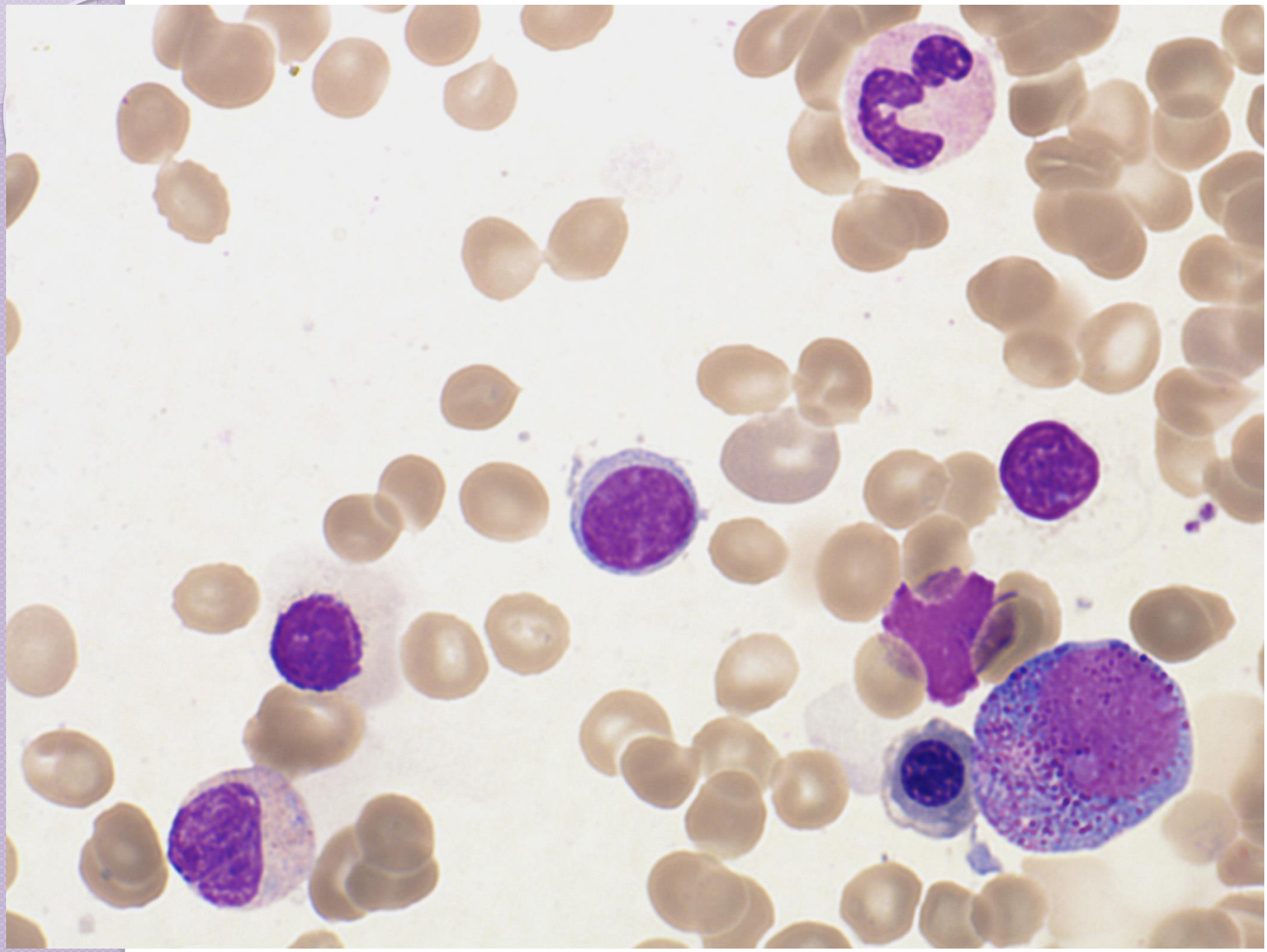
Vlastní hodnocení – I

Mikroskopické hodnocení obarveného nátěru aspirátu začíná vždy přehledným zhodnocením nátěru při menším zvětšení (100 – 400×), a to i v okrajích a konečných cípech nátěru, kde mohou být vytlačeny větší buňky či kompaktní shluky patologických buněk. Pak následuje vlastní hodnocení při zvětšení 1000×. Vyšetření provádí garant výkonu (lékař se specializovanou odbornou způsobilostí v oboru Hematologie a transfuzní lékařství), který je zodpovědným pracovníkem ke konečnému uvolnění výsledku tohoto vyšetření pro klinické lékaře a který je schopen uvést interpretaci s event. klinickou rozvahou, která by měla být součástí výsledku. Na vyšetření mohou podílet i oprávnění pracovníci (laborant, VŠ nelékař), kteří ale nejsou garanty výkonu a kteří výsledek tohoto vyšetření nemohou uvolňovat pro klinické lékaře.



Vlastní hodnocení - III (zvětšení 1000x)

Při tomto zvětšení popisujeme jednotlivé buňky (morfologický popis) a počítáme jejich zastoupení (myelogram). K hodnocení si – pokud to lze – vybíráme část nátěru, ve které jsou buňky rovnoměrně rozprostřeny. U vstupního vyšetření aspirátu kostní dřeně se doporučuje spočítat 500 jaderných buněk, u kontrolních či hypocelulárních nátěrů pak alespoň 250 - 300 jaderných buněk, pokud to lze. V případech, kdy není splnění tohoto početního zastoupení možné či účelné, je nutný komentář v popisu. Nátěr v mikroskopu hodnotíme meandrovitým či bajonetovým rovnoměrným pohybem objektivu nad podložním sklem nejlépe na šířku skla od jednoho okraje k druhému.



Kvantitativní hodnocení – myelogram (početní zastoupení jednotlivých buněk)

Myelogram odpovídá poměrnému zastoupení jaderných buněk v kostní dřeni, které je vyjádřeno v procentech. Přítomnost buněk, které se do běžného rozpočtu nezařazují, se udává v poměrném zastoupení (tj. např. N/100, N/250, N/300, resp. N/500). Zde jsou uváděna např. makrofágy, osteoklasty a osteoblasty jako elementy, se kterými se ve dřeni běžně setkáváme, ale i buňky, které do kostní dřeně fyziologicky nepatří – zde zejména buňky susp. z infiltrace dřeně solidním nádorem

Do myelogramu (procentuální vyjádření) započítáváme granulopoezu, erytropoezu, lymfocytopoezu a monocytopoezu a mastocyty. Buňky granulo- a monocytopoezy se početně zahrnují do společné skupiny myelopoézy.

Přítomnost megakaryocytů může být v popisu vyjádřena různým způsobem (počet megakarocytů je snížen, normální či zvýšen, ovlivněn periferní příměsí atd), resp. může být vyjádřen nález megakaryocytu v rozpočtu (opět N/250 atd, nikoli % vyjádření; nicméně při provádění rozpočtu nemusí být žádný megakaryocyt zachycen, což odpovídá fyziologické situaci).

Buňky granulopoezy – jsou zahrnuty

- Neutrofilní řada: jasně definované myeloblasty, promyelocyty, myelocyty, metamyelocyty, tyče a segmenty.
- Eozinofilní řada: nezralé a zralé (resp. možno rozlišovat eozinofilní promyelocyty, myelocyty, metamyelocyty, tyče jako nezralou populaci a zralé segmenty).
- Bazofilní řada: nezralé a zralé (resp. možno rozlišovat bazofilní promyelocyty, myelocyty, metamyelocyty, tyče a zralé segmenty).

Zastoupení granulopoézy je v tomto pohledu vyhodnoceno jako normální, snížené či zvýšené, je posouzeno, zda je přítomno zmnožení všech granulocytů či jen neutrofilů, eozinofilů či basofilů. Je posouzeno, zda vyzrávání v jednotlivých řadách probíhá normálně, či atypicky (posun doleva k nezralým formám, či převaha zralých forem)

Buňky monocytopoézy – jsou zahrnuty

- monocyty,
- atypické monocyty - susp. reaktivní, či susp. patologické, vč. promonocytů, s výjimkou leukemických forem (ty jsou zařazeny do nádorových blastů)

Elementy granulopoézy a monocytopoézy jsou souhrnně započítávány na elementů myelopoézy (v užším slova smyslu)

Buňky erytropoézy – jsou zahrnuty

- proerytroblasty
- bazofilní erytroblasty (resp. časné erytroblasty)
- polychromatofilní erytroblasty (resp. intermediální erytroblasty)
- ortochromní erytroblasty (resp. pozdní erytroblasty).

Alternativně lze v rámci této řady dle velikosti a N/C synchronie rozlišovat: makroerytroblasty a megaloblasty bazofilní, polychromní a ortochromní, a takto je vyjádřit v rozpočtu, resp. lze zastoupení megaloblastických elementů vyjádřit v popisu morfologických odchylek

Mastocyty

- dříve řazeny do granulopoézy, dnes samostatně

- zahrnuje
  - mastocyty normální
  - mastocyty atypické (vřetenitého tvaru, hypogranulované u systémové mastocytózy)

Buňky lymfocytopoézy rozlišujeme:

- normální lymfocyty
- velké granulované lymfocyty
- atypické lymfocyty
  - susp. reaktivní
  - susp. nádorové (patologické lymfocyty v rámci dg. CLL, HCL, FL, MCL, MF/SS, LGL leukémie, prolymfocyty u PLL resp. CLL/PLL a CLL),
  - nejasného významu,
- plazmocyty
  - alternativně lze vyjadřovat morfologicky abnormální formy v % zastoupení (plazmablasty, proplazmocyty, vícejaderné formy atd)

Další buňky zahrnuté do myelogramu

- morfologicky nerozlišitelné či obtížně rozlišitelné blastické elementy (blasty velmi nezralého charakteru, megakaryoblasty, či monoblasty nenádorového původu)
- hematogony, které mohou mít vzhled blastických elementů a jsou to mladé progenitorové B-lymfocyty
- leukemické blasty a jejich ekvivalenty
  - myeloblasty, monoblasty, megakaryoblasty u AML resp. i u CMMOL, promyelocyty včetně „faggot cell“ u APL, promonocyty u AML typu myelomonocytární či monocytární/monoblastická a taktéž promonocyty u CMMOL (tyto blasty se nezahrnují do granulopoezy v rámci rozpočtu a jejich přesné zařazení v rámci jednotlivých klinických diagnóz se řídí WHO klasifikací)
  - lymfoblasty u akutních lymfoblastických leukémií/prekurzorových lymfoblastických lymfomů a blastické elementy u DLBCL, BL, či jiných lymfoproliferací ze „zralých“ buněk, kdy však patologické elementy mají jasně morfologicky vzhled blastů (např. blastická forma lymfomu z plášťové zóny).

Do myelogramu nejsou zahrnuty

- makrofágy a jejich alternativy včetně buněk Gaucherových či pseudo-Gaucherových, tukových, sea-blue forem
- megakaryocyty, promegakaryocyty
- osteoblasty/osteoklasty
- buňky nádorové při metastatickém postižení dřeně solidními tumoru, buňky Reed – Sternbergové, či Hodgkinovy u Hodgkinova lymfomu.

Je možné zastoupení těchto elementů vyjádřit poměrem (např. 1/250 jaderných buněk).

Kvalitativní hodnocení – granulopoéza

- nerovnoměrné s navýšením či chyběním jednotlivých stádií, maturační blok ve vyzrávání, posun doleva (k nezralým formám), posun doprava (ke zralým formám), zastoupení neutrofilů, eozinofilů, bazofilů, mastocytů resp. přítomnost jejich hypogranulovaných či vřetenitých forem a shluků (u systémové mastocytózy)
- odchylky velikosti granulocytů – mikro- či makro- až megaloformy, anizocytóza buněk.
- N/C asynchronie = nukleo-cytoplazmatický nepoměr ve vyzrávání jádra a cytoplazmy
- atypie morfologie jádra – tvar či uložení, struktura chromatinu (atypické shlukování/políčkování jaderného chromatinu), Pelger-Huëtova anomálie či její pseudoforma, prstenčité formy jader, hypersegmentace, hyposegmentace, či opožděná segmentace, přetrvávání nukleolů, jaderné fragmenty v cytoplazmě
- atypie morfologie cytoplazmy – zbarvení vč. homogenity; granularita (snížený či chybějící, přiměřená, zvýšená resp. toxická), zbarvení a hrubost granul, jejich distribuce (dysgranularita); přítomnost inkluzí (např. Döhleho inkluzí, Auerových tyčí včetně jejich snopců, tzv. faggot cells u APL, Chédiakiho-Highashiho granula resp. jejich pseudoformy), přítomnost parazitů; vakuolizace cytoplazmy; ohraničení cytoplazmy

Kvalitativní hodnocení – monocytopoéza

- zastoupení monocytů (přiměřené, monocytóza, monocytopenie)
- morfologické změny monocytů (hypolobulizace jádra, bazofilie cytoplazmy, nadměrná vakuolizace cytoplazmy)
- přítomnost nezralých forem (promonocyty, monoblasty)
- přítomnost atypických forem monocytů

V případě monocytů nepoužíváme pojem dysplastické monocyty.

U AML myelomonocytární, monocytární a monoblastické, resp. u CMMOL jsou nádorové elementy v myelogramu vyjádřeny separátně a do monocytopoézy nejsou zahrnuty.

Kvalitativní hodnocení – erytropoéza

- zastoupení přiměřené, erytropoeza snížená/zvýšená
- normoblastová, makro- či mikroblastová, megaloblastová, dimorfní, či kombinace např. makro-normoblastová, anizocytární
- odchylky jádra: megaloblastoidie (elementy s megaloblastoidií jsou větší než odpovídající normoblasty, mají N/C asynchronii, ale méně vyjádřenou než jasné megaloblasty a struktura jaderného chromatinu je hutnější a hrubší než u megaloblastů, ale jemnější než u normoblastů), karyorhexe, karyoschíza, vícejadernost, jaderné můstky, zneokrouhlení jader, jaderné pučení, lobulizace, pulverizace.
- Odchylky cytoplazmy: porucha hemoglobinizace, vakuolizace, přítomnost inkluzí (bazofilní tečkování, Howellova-Jollyho tělíska, Pappenheimerova tělíska), cytoplazmatické můstky
- N/C asynchronie
- trsy erytroblastů, rofeocytóza.

Kvalitativní hodnocení - megakaryocyty

- zastoupení přiměřené, počet megakaryocytů snížený/zvýšený, četné poškozené buňky, četnost holých jader; posun k nezralým bazofilním formám
- trsy megakaryocytů.
- dysplastické změny: hyposegmentace/ hypolobulizace (malé hyposegmentované/hypolobulizované formy), jádra bez lobulizace (monolobulizace), vícečetná (separovaná) jádra - multinuklearita mikroformy, malé dvoujaderné elementy.
- jiné morfologické odchylky: emperipoleza, vakuolizace cytoplazmy, velké až gigantické formy s pravidelnými jádry.

Kvalitativní hodnocení - lymfocytopéza

- zastoupení lymfocytů přiměřené, lymfocyty jsou sníženy/zmnoženy
- zastoupení plazmocytů normální, plazmocyty jsou zmnoženy, resp. relativně zmnoženy
- morfologie lymfocytů – popsat odchylky u atypických forem, event. vzácně detekovanou vakuolizaci (susp. na některé tesaurizmózy a poruchy metabolizmu lipidů)
- morfologie plazmocytů – popsat morfologii atypických forem (Russelova tělíska, Dutcherova tělíska, „grape cell“, plamenné buňky)

Kvalitativní hodnocení – nádorové/leukemické blasty

- popsat morfologii nádorových blastů resp. minimálně jejich pravděpodobné zařazení – myeloblasty (granulované, negranulované, výskyt Auerových tyčí, nepravidelná jádra, štěpená jádra), monoblasty, promonocyty, megakaryoblasty, resp. jejich vzájemné poměry, lymfoblasty resp. elementy Burkittova lymfomu.
- poměrné zastoupení myeloblastů k monoblastům, k promonocytům, k megakaryoblastům je nezbytné pro vyjádření jednotlivých podytpů akutní myeloidní leukemie (akutní myeloidní leukemie s vyzráváním, akutní myelomonocytární leukemie, akutní monoblastická/monocytární leukémie, akutní megakaryocytární leukémie)

Kvalitativní hodnocení – buňky do rozpočtu nezahrnuté

- makrofágy (a jejich alternativy) – přiměřené, zmnožené, makrofágy nedetekovány
- přítomnost speciálních druhů makrofágů, jako jsou buňky Gaucherovy či pseudo-Gaucherovy, tukové makrofágy, sea-blue formy, ev. přítomnost hemofagocytózy, obsah parazitů
- zvýšené zastoupení osteoblastů/osteoklastů
- přítomnost buněk dřeni cizích je nutné popsat detailně včetně přítomnosti jejich shluků, rozet či filament a tam, kde je to možné, vyslovit se k pravděpodobné genezi

Extracelulární materiál

- hmoty monoklonálního proteinu
  - kulovité šedomodře se barvící hmoty, či objemný nepravidelně tvarovaný, homogenně růžově se barvící materiál, či krystaly
- formy parazitů mimo buňky
  - malarická plazmodia
  - Leishmanie
  - toxoplazma, aj
- extra- či intracelulární baktérie v mikro- i makrofázích

Cytochemie

- slouží k posouzení změn, které nejsou detekovány resp. odlišitelné panoptickým barvením
- nejčastěji používané:
  - barvení na železo: stanovení počtu sideroblastů (nález siderocytů), přítomnost prstenčitých, atypických siderocytů, vyhodocení zásobního železa, indexu (dif. dg. sideropenie, ACD, MDS, sideroblastické anémie atd)
  - MPOX: odlišení myeloblastů, Auerových tyčí, snížená barvitelnost u MDS
  - PAS: bloková pozitivita u B-ALL, pozitivní normoblasty u MDS
  - NE/NEF: odliší monocytární/monblastickou populaci
  - TRAP: diagnostika HCL

Zdroje chyb

a) Vadný odběr – vzorek kontaminovaný heparinem, či je přítomna významná periferní příměs (nekvalitní či vadný odběr) – toto je nutné zmínit ve výsledku jako limitaci hodnocení

b) Špatně provedený nátěr, který je:

- velmi silný, hustý, krátký,

- velmi řídký, tenký,

- bez „konců“,

- sražený při rychlé aglutinaci erytrocytů při nedostatečném zahřátí vzorku, či podložního skla při přítomnosti chladových aglutininů, či při hyperkoagulaci v rámci koagulopatie

Zdroje chyb

c) Nekvalitní barvení

- staré barvy

- špatné pH barev, či pufru, či vody.

- špatná/nedostatečná fixace,

- příliš rychlé schnutí nátěru (např. na topení)

- barvení nedostatečně zaschlého nátěru,

- „rychlobarvení“,

- starý preparát

Zdroje chyb

d) Nevhodné zhodnocení

- nátěr nebyl celkově prohlédnut na malém zvětšení,

- nebyly zhodnoceny okraje a konce nátěru,

- bylo vybráno nevhodné místo pro hodnocení,

- bylo zhodnoceno málo jaderných buněk,

e) Bylo zvoleno nedostatečné zvětšení při hodnocení

f) Byl použit nekvalitní imerzní olej (rozpouští buňky již po několika dnech).

g) Ke zhodnocení aspirátu byla zvolena nevhodná síla objektivu

h) Hodnocení aspirátu provedeno na nekvalitním mikroskopu (malé zorné pole, nízká světelnost)

Kontroly kvality

- Interní
  - Druhé čtení
  - Hematologicko-diagnostický seminář
- Externí
  - SEKK
  - 2x ročně fotografie s vyhodnocením celkem 10 elementů, popis případu, vyhodnocení jednotlivých řad početně a morfologicky, diagnóza

Závěr

- vyhodnocení aspirátů/otisků kostní dřeně je nezbytnou součástí diagnostiky a diferenciální diagnostiky celé řady poruch krvetvorby
- je základem, na němž je postaven další diagnostický proces (průtoková cytometrie, cytogenetika, molekulární genetika, histologie) naprosté většiny hematologických malignit, ale i celé řady dalších vrozených a získaných poruch krvetvorby
- pro některé hematologické choroby jde o vyšetření zásadní a definitivní pro diagnózu
- principy vyhodnocení myelogramu se opírají o mezinárodní i česká doporučení a je plán jejich pravidelných revizí (zejména v souvislosti s pravidelným up-grade WHO klasifikace nádorů hemopoetických a lymfatických tkání – poslední revize letos!)
- vyhodnocení myelogramu vyžaduje poměrně značnou odbornou erudici, ale je součástí získání odborné erudice v předmětu hematologie a transfúzní lékařství pro VŠ nelékaře