

Speciální hematologická vyšetření

Bourková L., OKH FN Brno

Vyšetřování anémií

Sledování vyšetření

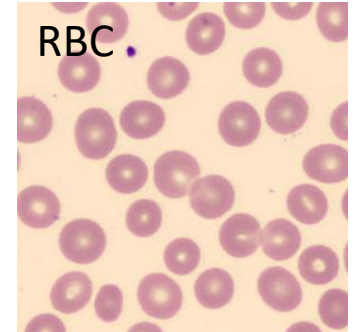
Hodnotit:

- hloubku anémie v KO
 - ✓ změny v hodnotách měřených i počítaných parametrů RBC
 - ✓ početní změny WBC i PLT
- morfologické změny erytrocytů v periferní krvi (barevné, tvarové, inkluze)
 - ✓ morfologické změny WBC i PLT v celém nátěru
- morfologické a množstevní změny erytrocytární populace v KD
 - ✓ morfologické změny i leukocytární populace a MGK
- komplexně výsledek celého KO a nález v KD: může se jednat o první příznaky nádorového onemocnění
- souvislost se speciálními vyšetřeními

Vyšetření retikulocytů

➤ retikulocyty

- ✓ přítomné RNA → schopnost tvorby HGB (*analýza HGB v Retic*)
- ✓ odráží schopnost KD produkovat RBC
- ✓ během 1 – 2 dnů dospívá Retic ve zralý erytrocyt
- ✓ ↑ počet Retic → aktivace KD (*zvyšování IRF*)
- ✓ ↓ počet Retic → útlum KD (*snižování IRF*)

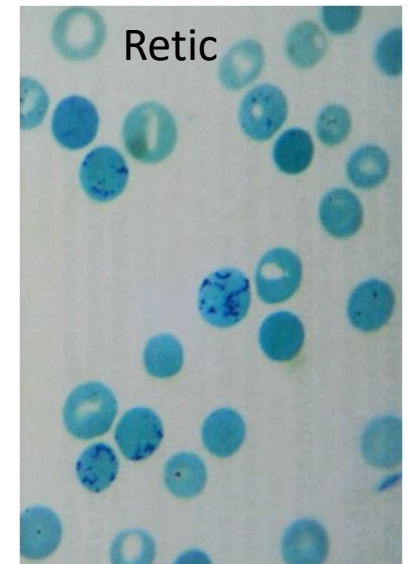


➤ mikroskopicky

- ✓ supravitální barvení RNA v buněčných organelách (*zbytky ribozomů a endoplazmatického retikula*)

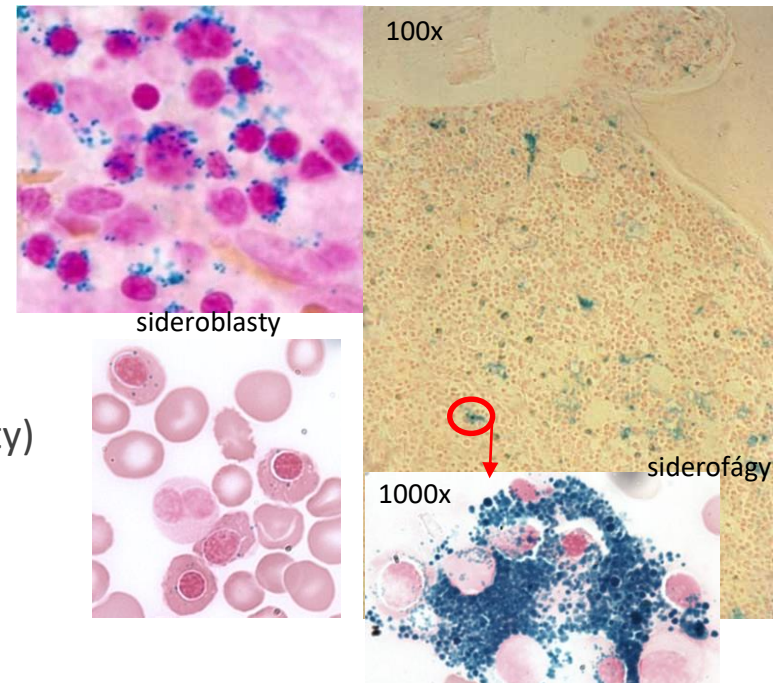
➤ analyzátořem

- ✓ analýza prošlého a odraženého světla:
probíhá na precipitovaných síťových strukturách RNA
- ✓ analýza fluorescence:
vlákna RNA jsou obarvena fluorescenčními barvami



Cytochemické vyšetření zásobního železa

- Zásobní železo Fe^{3+} :
ferritin, hemosiderin (agregované molekuly feritinu)
- *Princip vyšetření:*
(Fe^{3+}) + ferrokyanid draselným - $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] + \text{HCl}$
→ barevný komplex = berlínská (pruská) modř - $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$
- *Hodnocení:*
 - ✓ ve 100 NRBC
 - ✓ zelenomodrá granula v:
 - erythrocytech (siderocyty), NRBC (sideroblasty), NRBC okolo 2/3 jádra (prstenčité sideroblasty), makrofázích (siderofágy), extracelulárně
- *Normální hodnoty:*
20 – 60 % pozitivních NRBC
2-4 siderofágy ze 6 nalezených makrofágů
- *Klinický význam:*
 - ✓ snížení hodnoty:
 - sideropenické anémie
 - ✓ zvýšené hodnoty:
 - sideroblastické (přítomné prstenčité sideroblasty)
 - hemolytické anémie, megaloblastové anémie
 - MDS, leukémie



Screeningová vyšetření pro hemolytické anémie

- Obecné testy:
 - ✓ volný hemoglobin v plazmě (*základní metodika pro vyšetřování intravaskulární hemolýzy*)
 - ✓ osmotická rezistence
 - ✓ test autohemolýzy
 - ✓ hemosiderin v moči
 - ✓ Heinzova tělíska
- Testy na průkaz abnormálních hemoglobinů
 - ✓ hemoglobin F
 - ✓ hemoglobin A2
 - ✓ elektroforéza hemoglobinu
- Testy na průkaz nedostatku enzymů
 - ✓ glukózo-6-fosfátdehydrogenáza
 - ✓ pyruvátkináza

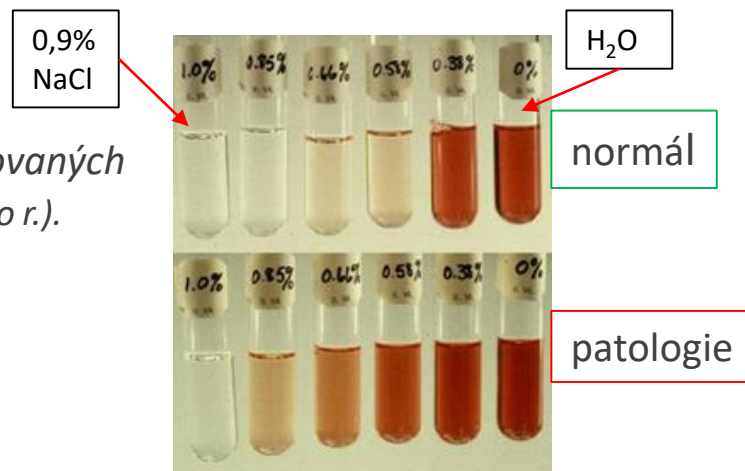
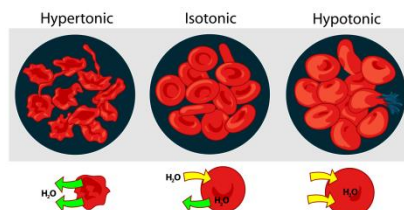
Obecné testy

➤ stanovení volného HGB v plazmě

- ✓ *Princip - spektrofotometricky:*
oxidace HGB (Fe^{2+}) $\rightarrow$ methemoglobin (Fe^{3+}) + KCN $\rightarrow$ barevný komplex - hemiglobinkyanid.

➤ vyšetření osmotické rezistence

- ✓ *Princip – makroskopicky (fotometricky):*
stanovení odolnosti RBC v různě koncentrovaných hypotonických roztocích NaCl (fyziologického r.).



➤ test autohemolýzy

- ✓ *Princip – spektrofotometrické vyšetření volného HGB:*
sledování hemolýzy RBC v prostředí:
 - fyziologického roztoku
 - fyziologického roztoku s glukózou
 - fyziologického roztoku s ATP.

➤ vyšetření hemosiderinu v moči

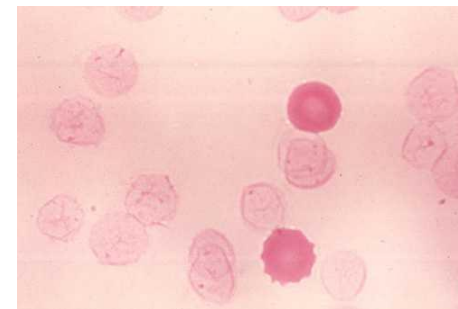
- ✓ *Princip - mikroskopicky:*
 Fe^{3+} v hemosiderinu + HCl + $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
 $\rightarrow$ krystalky - berlínská (pruská) modř - $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$



Testy na průkaz abnormálních hemoglobinů

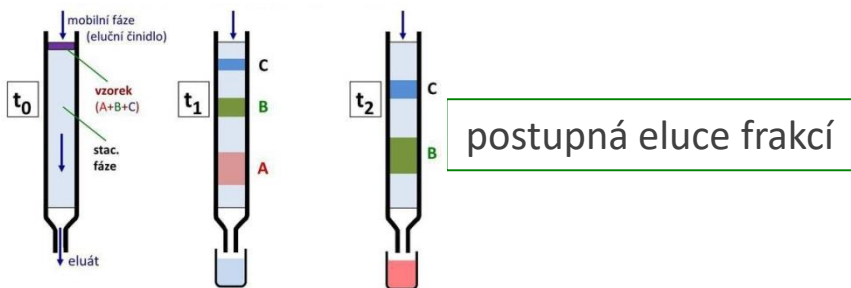
➤ hemoglobin F

- ✓ *Princip - mikroskopicky:*
Inkubace nafixovaných preparátů v kyselém prostředí (pH 3,3). HGB A je z erytrocytů vyplaven. HGB F je vůči prostředí rezistentní, v erytrocytech zůstává.
- ✓ *Hodnocení – [%] :*
novorozenci (50-90%), věk < 2 roky (0-4%), věk > 2 roky (0-4%)



➤ hemoglobin A2

- ✓ *Princip - chromatograficky:*
Na pozitivně nabitě částice pryskyřice se se naváží negativně nabitě části HGB, jednotlivé frakce HGB se vymývají pufrům, 1. frakce je s HGB A2, 2. frakce je s HGB S.
- ✓ *Hodnocení:*
Podíly jednotlivých frakcí HGB se stanovují spektrofotometricky.



➤ elektroforéza hemoglobinu

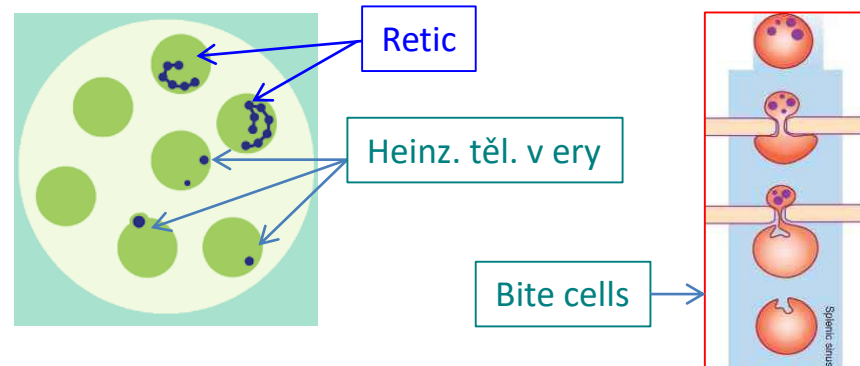
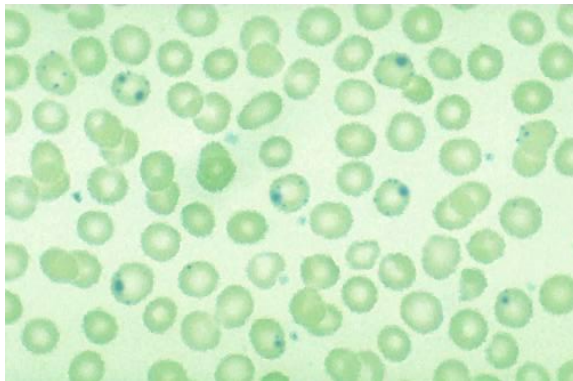
- ✓ *Princip:*
V elektrickém poli a zásaditěm prostředí se hemoglobiny pohybují různě rychle, na základě velikosti negativního náboje globinového řetězce, v závislosti na přítomných aminokyselinách. Negativně nabitě molekuly HGB se pohybují k anodě (+).

Testy na průkaz nedostatku enzymů

➤ Heinzova tělíska

✓ Princip - mikroskopicky:

Heinzova tělíska znázorňují vysrážený degenerovaný hemoglobin v případě, že glykolytické enzymy erytrocytů nejsou schopny zabránit oxidaci hemoglobinové molekuly. Precipitáty se jeví jako oválná tělíska v erytrocytech. Objevují se těsně u buněčné membrány, ke které přiléhají, barví se supravitálně brillantcresylovou modří přímo nebo po inkubaci s acetylfenylhydrazinem. Mohou být také přítomna např. u hemoglobinopatii.



➤ glukózo-6-fosfát dehydrogenáza (G-6-PDH)

✓ Princip - spektrofotometricky:

Kinetické měření aktivity enzymu v UV oblasti. G-6PDH se podílí na redukci NADP^+ na NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát), nárůst NADPH je přímo úměrná aktivitě G-6-PDH.

➤ pyruvátkináza

✓ Princip - spektrofotometricky:

Kinetické měření aktivity enzymu v UV oblasti. V přítomnosti pyruvátkinázy dochází při katalytické reakci ke spotřebě NADPH, jejíž pokles je nepřímo úměrné aktivitě pyruvátkinázy.

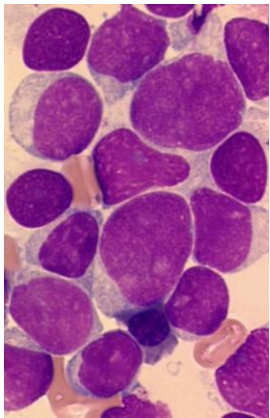
***Cytomorfologická vyšetření krevních
buněk v souvislosti s onkologickou
hematologií***

AML (M0 – M7)

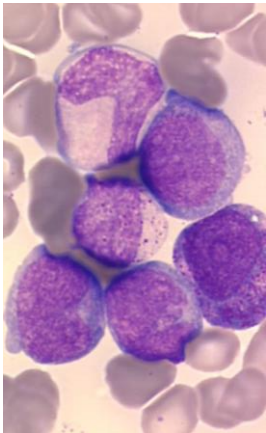
Hodnotit:

- celý krevní obraz
 - ✓ početní změny WBC, RBC, PLT, přístrojová hlášení
 - morfologické změny v periferní krvi
 - ✓ WBC spolu s diferenciálním rozpočtem, RBC, PLT
 - morfologické a množstevní změny v kostní dřeni
 - ✓ u leukocytární, erytrocytární a trombocytární populace, včetně MGK
 - *referenční meze myelogramu dospělých:*
https://labsekce.hematology.cz/wp-content/uploads/2022/11/Doporuceni_LS_CHS_CLS_JEP-Referencni_meze-myelogram_dospelych_v02_rev01.pdf
 - cytochemická vyšetření
-
- ❖ počet blastů pro diagnostiku akutní leukémie:
 - dle WHO klasifikace > 20%

M0

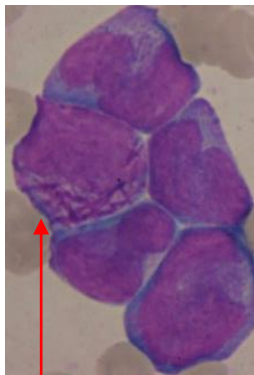


M2



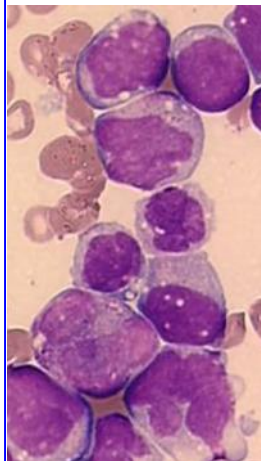
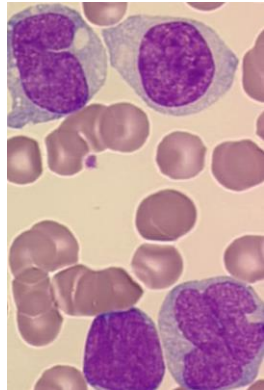
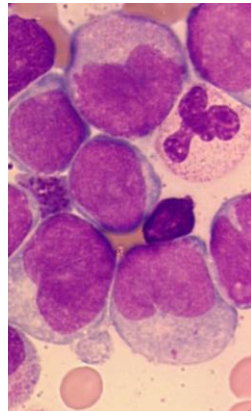
M3

Hypergranulární M3



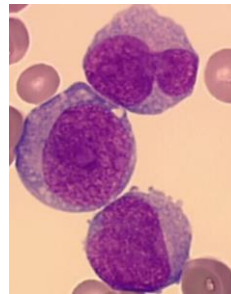
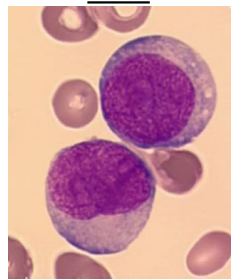
Snopce A.t.

M4

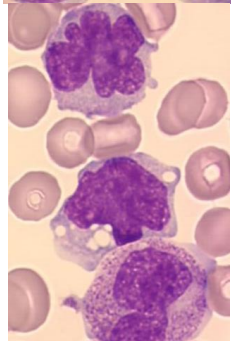
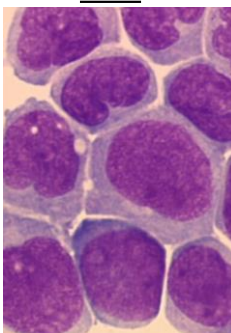


M5

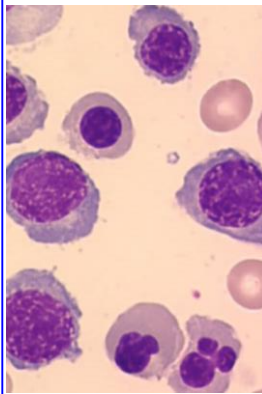
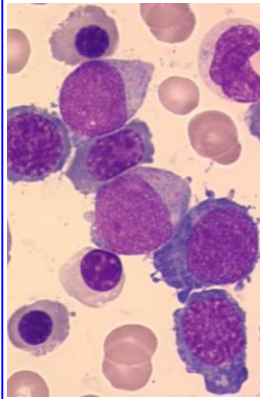
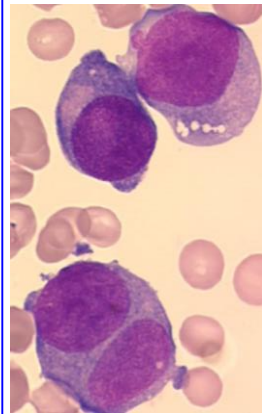
M5A



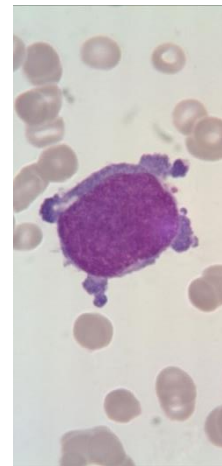
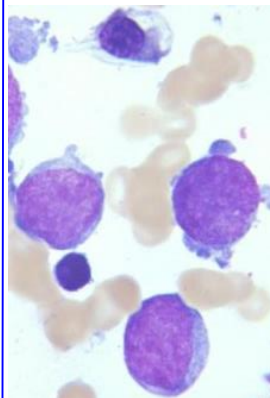
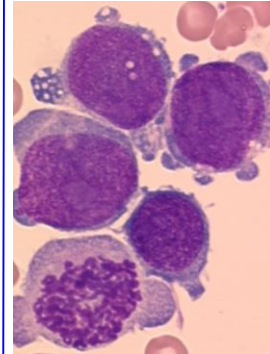
M5B



M6



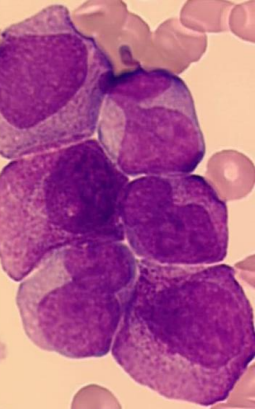
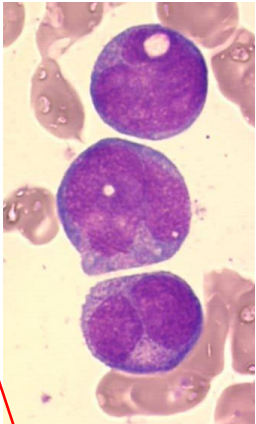
M7



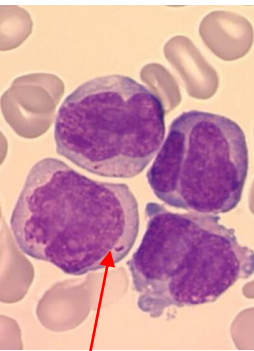
M1



Auerova tyč



Varietní M3



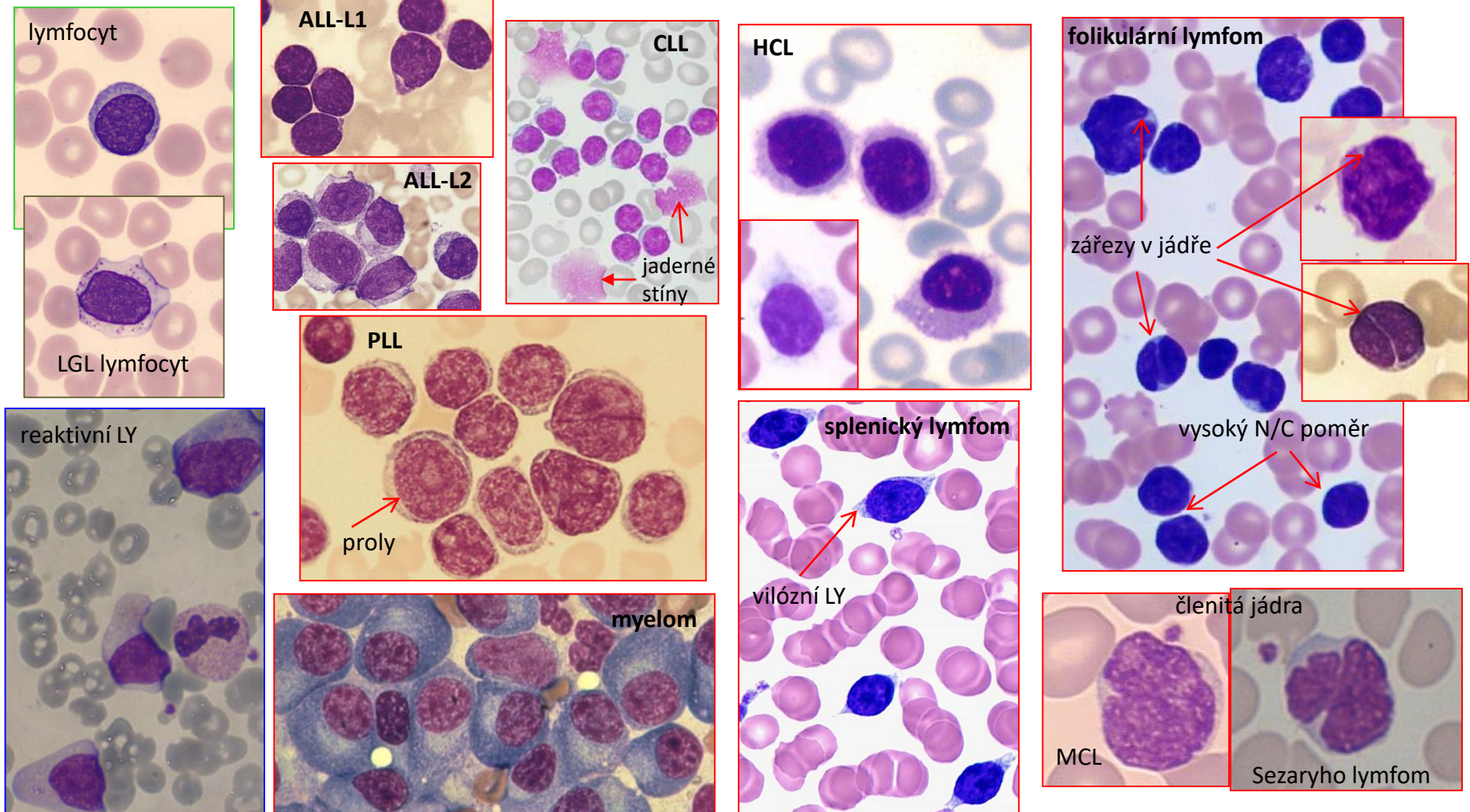
Auerova tyč

Lymfoproliferativních onemocnění

➤ základní nálezy

- ✓ změny v počtu WBC ($\uparrow \downarrow$ dle typu onemocnění až nad $100 \times 10^9/l$ i přes $500 \times 10^9/l$, lymfocytóza)
- ✓ změny morfologie: reaktivní LY, atypické LY (atypie jádra a cytoplazmy, N/C poměr), mladší lymfocyty, holá jádra (jaderné/Gumprechtovy stíny)

➤ morfologické abnormality

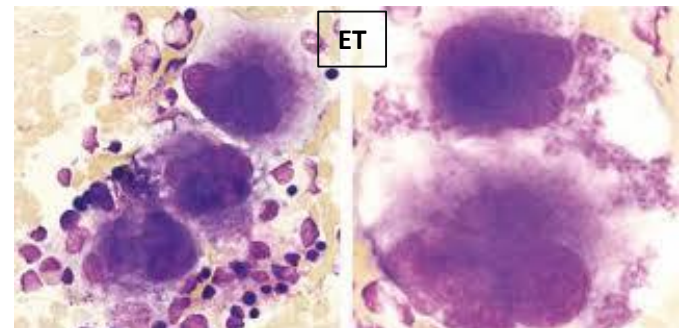
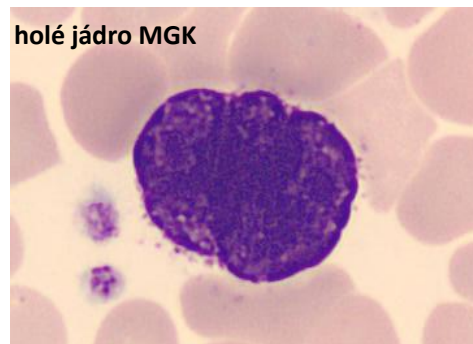
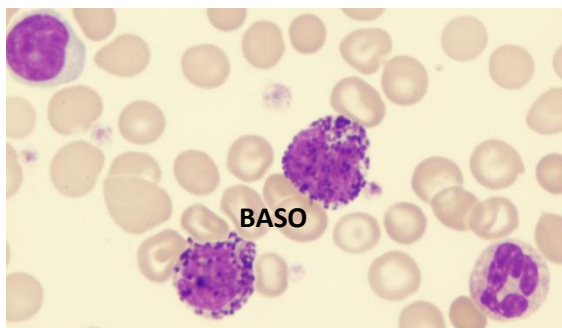
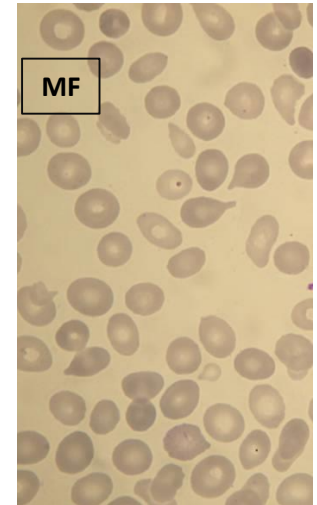
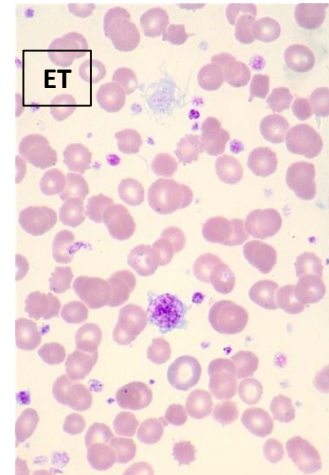
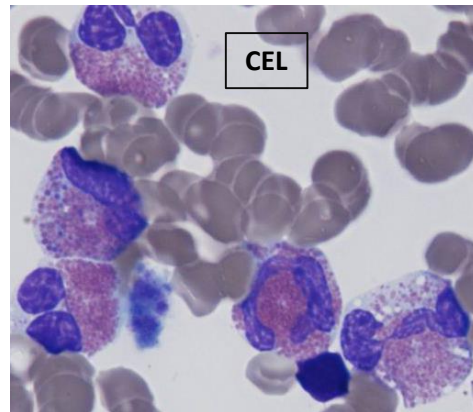
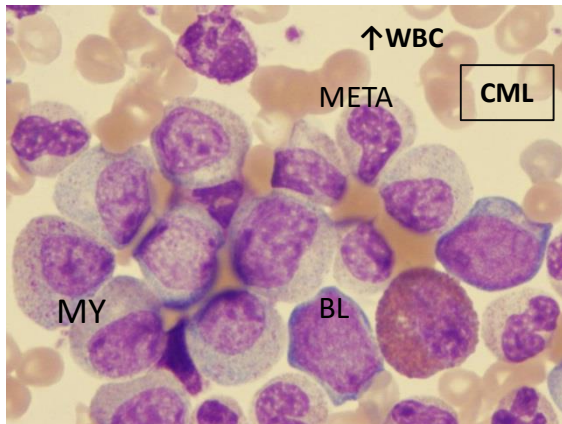


Myeloproliferativních onemocnění

➤ základní nálezy

- ✓ zvýšený počet WBC (často až 100x i více), zvýšený počet PLT (možný extrémní počet až k $1000 \times 10^9/l$)
- ✓ možné morfologické nálezy v návaznosti na typ onemocnění:
 - neutrofilie a mladší vývojová stádia (myelocyty, metamyelocyty), bazofilie, může být eozinofilie, možná přítomnost různého podílu blastů, v KD hyperplazii granulocytárních řad
 - NRBC v periferní krvi, sledovat morfologické odchylky RBC (slzičkovité RBC)
 - patologická morfologie PLT, i gigantické PLT, v KD zmnožené dysplastické MGK, holá jádra MGK v periférii

➤ morfologické abnormality



Laboratorní nálezy u myelodysplastického syndromu

➤ základní nálezy v periferní krvi

* cytopenie

✓ erytrocyty:

anémie, ↑RDW, polychromázie, poikilocytóza, inkluze v RBC, dysplázie NRBC, ↓RETIC

✓ leukocyty:

obvykle ↓WBC, ↓NE, hypo/hyper(>5segmentů) - segmentace NE, pseudo-Pelgerova-Huětova anomálie, hypo/hyper/nerovnoměrná-granulace NE, vakuolizace NE, evt. přetrvávající bazofilie cytoplazmy NE, abnormální mono/promonocyty

✓ trombocyty:

většinou ↓PLT, ↑PDW, makro PLT, hypogranulární PLT, fragmenty cytoplazmy MGK, mikro MGK, jádra MGK

➤ základní nálezy v kostní dřeni

✓ dyserytropoéza:

podobné dysplastické změny jako v PK, dále:

- *jádro: mezijaderné můstky, karyorexe, vícejadernost, megaloidní rysy, zneokrouhlení jádra*
- *cytoplazma: vakuolizace, nerovnoměrná barvitelnost*

✓ dysgranulopoéza:

podobné dysplastické změny jako v PK, dále:

- *asynchronie vyzrávání jádra a cytoplazmy, Auerovy tyče, pseudo-Chediakova-Higashiho granula*

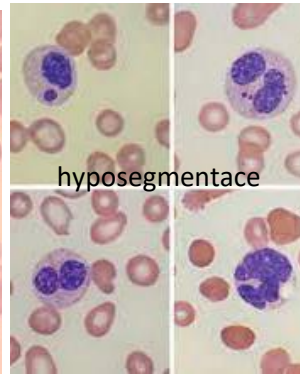
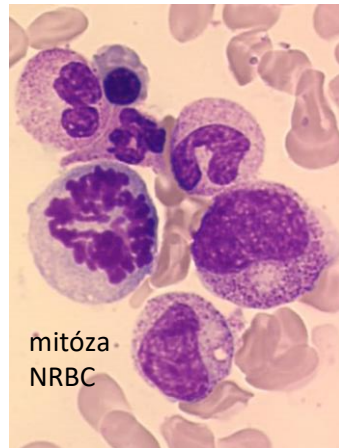
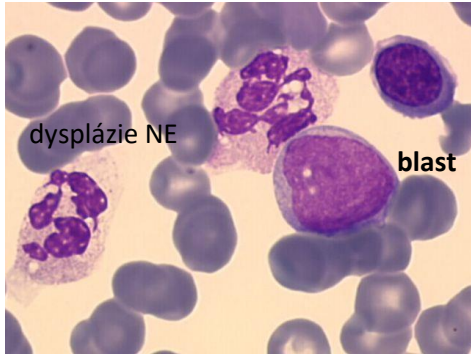
✓ dysmegakaryopoéza:

- *mikro/obrovské MGK, hypo/hyper - lobularizace MGK, vícejaderné MGK, vakuolizace, hypogranulace MGK*

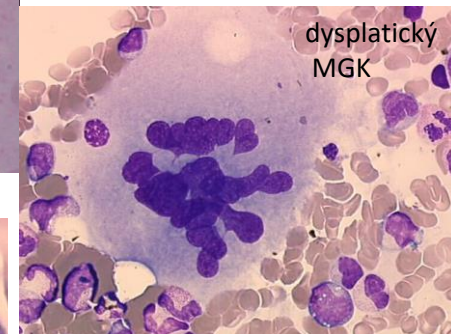
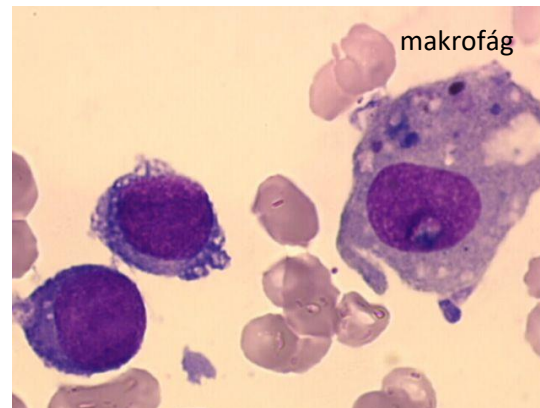
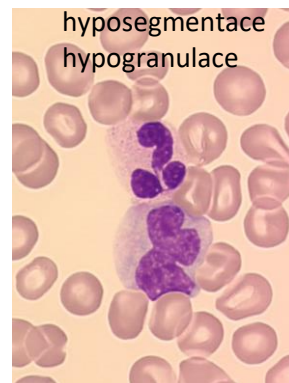
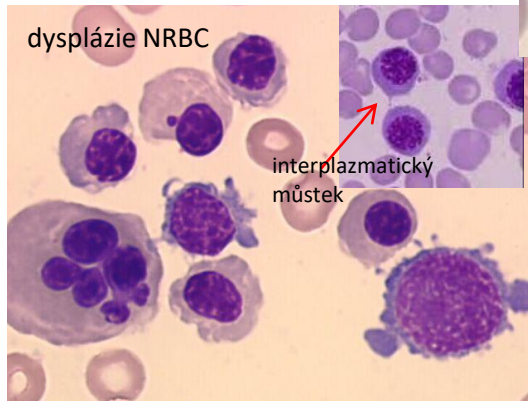
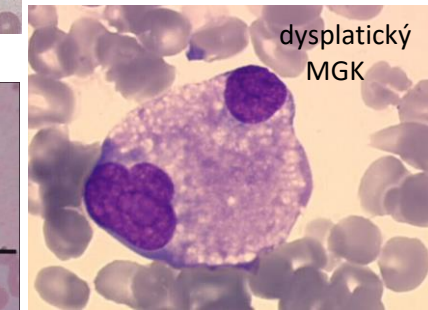
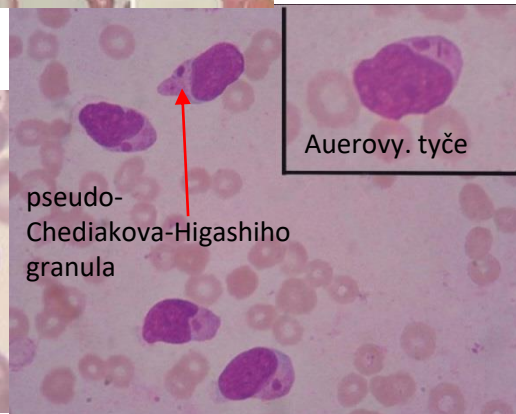
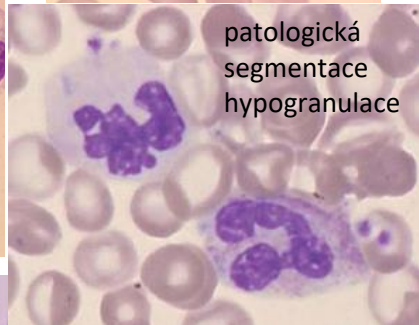
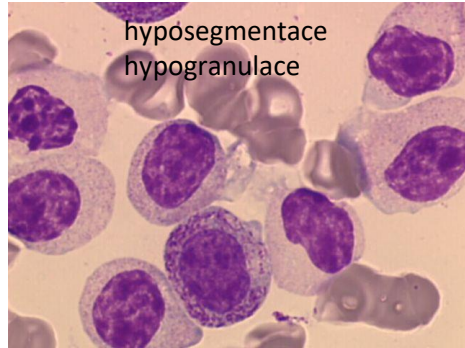
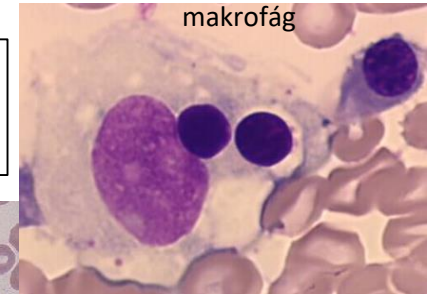
❖ Sledovat:

- *charakter dysplazie pro rozlišení typu MDS*
- *počet blastů v PK a KD*
- *cytopenie v KO (bez dysplastických změn by neměla být návaznost na diagnostiku MDS)*

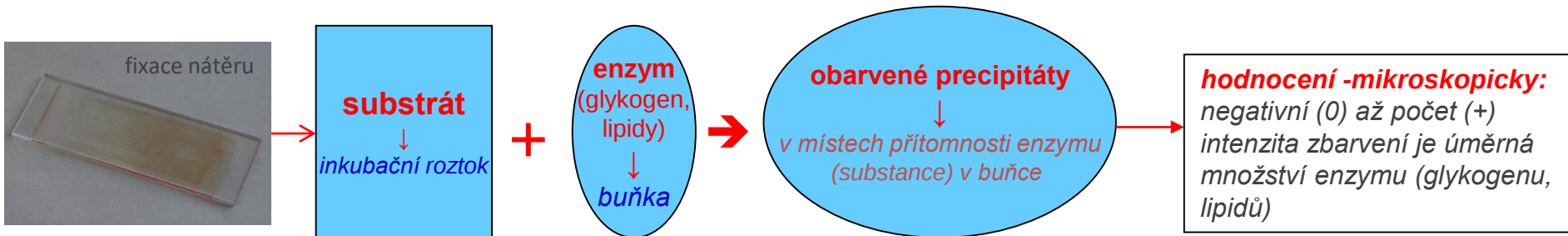
Příklady morfologických abnormalit u myelodysplastického syndromu



pseudo Pelger-Huetova anomálie



Cytochemická vyšetření



Cytochemická barvení:

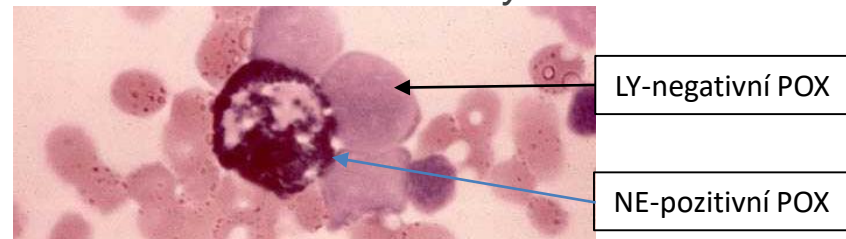
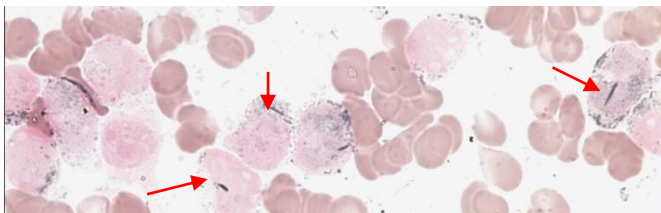
- *Myeloperoxidáza*
- *Lipidy (sudanovou černí B)*
- *Chloracetát esteráza*
- **Periodic Acid – Schiff** (*průkaz vysokomolekulárních sacharidů – glykogenu*)
- *Nespecifická esteráza (s blokádou fluoridem sodným)*
- *Kyselá fosfatáza (s rezistencí na kyselinu L-vinnou)*

Poznámka: vždy provádět kontrolní cytochemická barvení

Cytochemická vyšetření

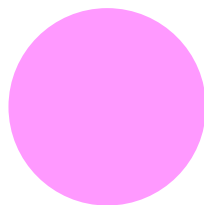
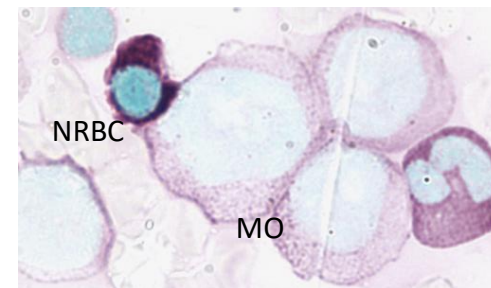
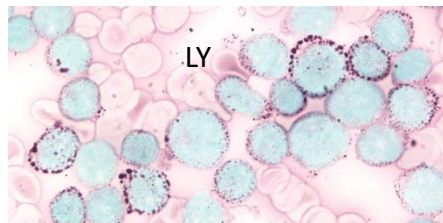
➤ myeloperoxidáza

- ✓ hodnocení: myeloidní buňky (-/+++ a Auerovy tyče), monocytní buňky (-/+)
lymfocyty jsou vždy negativní
- ✓ klinický význam: rozlišení myeloblastické nebo monoblastické leukémie od lymfoblastické

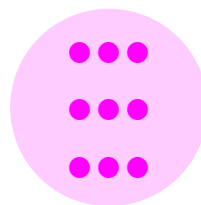


➤ PAS

- ✓ hodnocení: -/+ a **typ pozitivita** (difúzní, jemně nebo hrubě pozitivní granula)
 - fyziologická: myel.buňky (**difúzní**), monocytní buňky (**jemná granula**),
lymfocyty (mohou být **výraznější granula**), NRBC (**negativní**)
 - patologická: LY u CLL (většinou výrazná **granulární pozitivita**), lymfoblasty u ALL (většinou pozitivní),
NRBC **hrubozrná** pozitivita
- ✓ klinický význam: leukémie, MDS, anémie



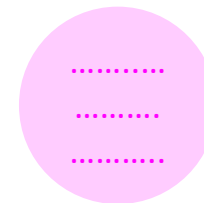
difúzní



výrazná granulace



hrubozrná pozitivita

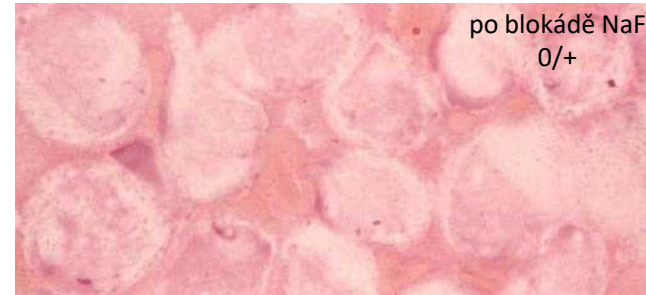
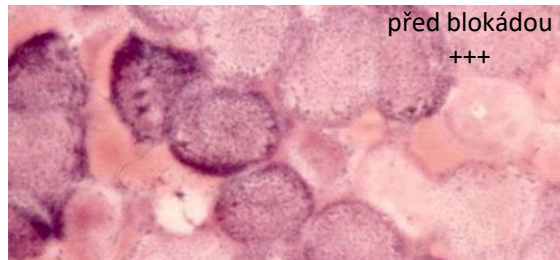


jemně granulární

Cytochemická vyšetření

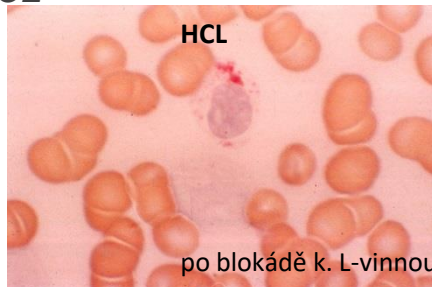
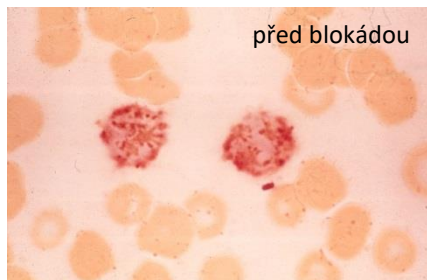
➤ nespecifická esteráza s blokádou fluoridem sodným

- ✓ princip: enzym reaguje se substrátem nebo je reakce blokována NaF (současné barvení dvou nátěrů)
- ✓ hodnocení:
 - po inkubaci bez blokády: myeloidní buňky a lymfocyty pozitivní (0/+), monocyty (+/+++)
 - po inkubaci s NaF: pozitivita u myeloidních buněk a lymfocytů stejná nebo jen lehce zeslabená, u monocytů zeslabení (0/+)
- ✓ klinický význam: k průkazu AML M4 a AML M5



➤ kyselá fosfatáza s rezistencí na kyselinu L-vinnou

- ✓ princip: enzym reaguje se substrátem nebo je reakce blokována kyselinou L-vinnou, pokud je v buňce přítomen isoenzym -5, potom je reakce na kyselinu L-vinnou rezistentní (současné barvení dvou nátěrů)
- ✓ hodnocení:
 - po inkubaci bez blokády: granulocyty, monocyty, lymfocyty pozitivní na (0/+)
 - po inkubaci s kyselinou L-vinnou: pozitivita zůstává pouze v lymfocytech s izoenzymem-5
- ✓ klinický význam: pozitivita v lymfocytech po inkubaci s kyselinou L-vinnou slouží k diagnostice klasické formy HCL



Cytochemické reakce

	MPOX	NE	NE+NaF	PAS <i>(typ pozitivita)</i>
myeloid. b.	-/+++	-/+	-/+	-/+
monocyt. b.	-/+	+ /+++	-/+	-/+
erythrocyt. b.	-	-/+	-/+	-/+
lymfoc. b.	-	-/+	-/+	-/+
MGK b.	-	-/+	-/+	-/+