

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

Postup při hodnocení nátěru periferní krve

Zpracoval: Matýšková M., Bulíková A., Kačírková P., Bourková L.

Revize: Matýšková M., Mikulenková D., Juráňová J., Fátorová I., Bourková L.

Recenzent: Členové laboratorní sekce ČHS ČLS JEP

Schváleno Laboratorní sekcí ČHS ČLS JEP: 29.11.2019

Schváleno výborem ČHS ČLS JEP: 2014

Verze: 1, revize 1

Platnost od: 11.12.2019

Přechodné období (platí i nahrazovaný dokument) do: 11.3.2020

Poznámky:

Tento dokument nahrazuje doporučení České hematologické společnosti ČLS JEP *Postup při hodnocení nátěru periferní krve* platné od 1.1.2014.

Změny oproti předešlému dokumentu jsou vyznačeny modrou kurzívou.

Obsah

OBSAH	2
ÚVOD	3
VLASTNÍ HODNOCENÍ	3
1.1 Zvětšení 200 – 400×	3
1.2 Hodnocení při zvětšení 1000×	4
1.2.1 <i>Kvantitativní hodnocení</i>	4
1.2.2 <i>Hodnocení relativního počtu</i>	5
1.2.3 <i>Hodnocení morfologických změn</i>	5
1.2.4 <i>Zdroje chyb v hodnocení</i>	7
ZÁPIS VÝSLEDKU	7
LEGISLATIVA A NORMY	7
WEBOVÉ ADRESY SOUVISEJÍCÍ S HODNOCENÍM NÁTĚRŮ	8
POUŽITÉ ZKRATKY	8
LITERATURA	8

Úvod

Nátěr periferní krve je zpravidla vyšetřován při podezření na hematologické či hemato-onkologické onemocnění, či je doplněn při patologickém analyzátorovém diferenciálním rozpočtu. V některých případech nám jeho zhodnocení pomůže určit diagnózu, či nám pomůže v diagnostickém rozhodování o dalším postupu. Při patologickém nálezu v periferní krvi by mělo *v indikovaných případech* následovat vyšetření kostní dřeně.

Hodnocení nátěru periferní krve se týká:

- 1) hodnocení počtu jaderných buněk (kvantitativní):
 - a. diferenciální počet leukocytů (procentuální zastoupení jednotlivých typů leukocytů)
 - b. počet erytroblastů na 100 leukocytů
- 2) hodnocení počtu buněk na 1000 erytrocytů (relativní):
 - a. počet schistocytů na 1000 erytrocytů
 - b. počet trombocytů na 1000 erytrocytů
- 3) popisu morfologických změn
 - a. erytrocytů
 - b. leukocytů
 - c. trombocytů
- 4) popisu eventuálně přítomných patologických buněk, parazitů aj.

Hodnocení se běžně provádí z nátěru obarveného panoptickým barvením dle May-Grünwald Giemsa.

Vlastní hodnocení

Mikroskopické hodnocení obarveného nátěru začíná vždy přehledným zhodnocením nátěru při menším zvětšení, teprve poté následuje vlastní hodnocení krevních buněk (při zvětšení 1000×).

1.1 Zvětšení 200 – 400×

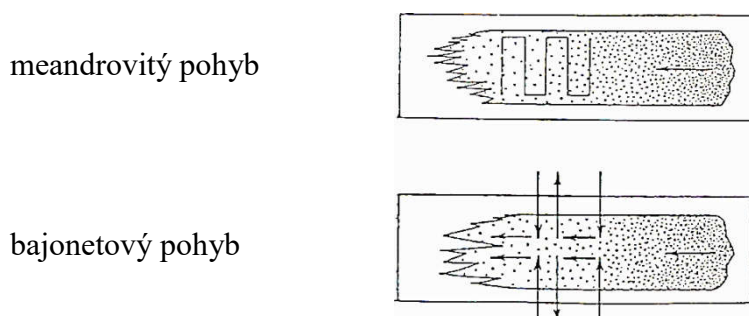
Slouží pro přehledné zhodnocení nátěru, kdy hodnotíme:

- a) buněčnost, kvalitu a obarvení nátěru,
- b) rozložení jaderných buněk,
 - hodnotí se přítomnost buněk v koncových a okrajových částech nátěru (zde mohou být nahromaděny velké a patologické buňky), i v hustých místech nátěru (zde se mohou nacházet mikrosraženiny trombocytů, které v místě s nižší buněčností můžeme přehlédnout).
- c) Malé zvětšení nám také pomůže najít optimální místo k počítání leukocytů i k hodnocení morfologie všech buněčných elementů,
 - u těžce leukopenických vzorků (např. u diagnózy akutní promyelocytární leukemie) se v nátěru periferní krve mohou nacházet leukemické promyelocyty jen zcela ojediněle a při vyšším rozlišení by mohlo dojít k jejich přehlédnutí.

1.2 Hodnocení při zvětšení 1000×

K hodnocení si vybíráme část nátěru, ve které jsou buňky rovnoměrně rozprostřeny (erythrocyty se nepřekrývají!). Nejčastěji se jedná o místo cca 1 cm od konce nátěru (někteří autoři doporučují místo v rozsahu 1 – 3 cm od konce nátěru).

Nátěr v mikroskopu hodnotíme meandrovitým či bajonetovým rovnoměrným pohybem objektivu nad podložním sklem přes vrstvu imerzního oleje nejlépe na šířku skla od jednoho okraje k druhému (viz obr.).



1.2.1 Kvantitativní hodnocení

- a) Při diferenciálním počtu leukocytů v periferní krvi běžně hodnotíme za sebou jdoucích 100 leukocytů (pohyb po skle viz výše), u patologických nálezů či při hodnocení kontroly kvality je v rámci zpřesnění diagnózy doporučováno hodnocení 200 i více leukocytů.
 - Ve fyziologickém nátěru jsou přítomny tyto elementy bílé řady: neutrofilní segmenty, neutrofilní tyče, eozinofilní segmenty, bazofilní segmenty, lymfocyty a monocyty.
 - Patologicky mohou být v nátěru periferní krve přítomna všechna vývojová stádia krevních elementů, patologické hematologické buňky, vzácně při hematogenním rozsevu i nehematopoetické maligní buňky a volně či v krevních elementech i krevní paraziti (např. malarická plazmodia, Leishmania).
- b) Při početním hodnocení přítomnosti erytroblastů je vyčíslíme na 100 leukocytů (počet erytroblastů/100 WBC)
 - Fyziologicky normoblasty nalézáme pouze u novorozenců do 3. dne od porodu.
 - Patologicky u hemolytických anémií, hematologických i nehematologických malignit, při infiltraci kostní dřeně apod.

Vzorce pro korekci počtu leukocytů využíváme v případě přítomnosti více než 5 % erytroblastů (NRBC), *pokud princip analyzátoru neumožňuje počet NRBC přímo změřit nebo pokud počet WBC není přístrojově přímo korigován na počet NRBC:*

1. vzorec z literatury (Dacie and Lewis Practical Haematology, 10th edition)

Korigovaný počet WBC ($\times 10^9/L$)

= Nekorigovaný počet WBC ($\times 10^9/L$) - (Nekorigovaný počet WBC \times NRBC (%)/100)

2. v ČR používaný vzorec (původ nedohledatelný)

Postup při hodnocení nátěru periferní krve

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

$$\text{Korigovaný počet WBC } (\times 10^9/\text{L}) = \frac{\text{Nekorigovaný počet WBC } (\times 10^9/\text{L}) \times 100}{\text{Relativní počet NRBC } (\%) + 100}$$

1.2.2 Hodnocení relativního počtu

- počet schistocytů (schizocytů) – hodnotíme počet přítomných mechanicky poškozených erytrocytů (včetně keratocytů, mikrosférocytů, fragmentů erytrocytů) na 1000 erytrocytů (zápis: počet schistocytů/1000 ery, viz doporučení ČHS)
- počet trombocytů – orientační vyšetření, které se využívá např. při podezření na pseudotrombocytopenii – opět se spočítá počet trombocytů na 1000 erytrocytů a dle vzorce (viz dále) se přepočítá počet trombocytů na litr erytrocytů:

$$\frac{\text{zjištěný počet trombocytů} \times \text{RBC}}{1000} \quad (\text{RBC} = \text{počet erytrocytů/L})$$

1.2.3 Hodnocení morfologických změn

provádíme po prohlédnutí celého nátěru a popisujeme

1) Leukocyty:

- celková charakteristika buňky – velikost buněk (malé, střední, velké); tvar buněk; N/C (= nukleo-cytoplazmatický poměr)
- charakteristika jádra – velikost; tvar; uložení (uprostřed, excentricky); ohraničení; struktura chromatinu (jemná, hrubá); jadérka (přítomnost, počet)
- charakteristika cytoplazmy – zbarvení vč. homogenity; granulace (přítomnost, počet, zbarvení, velikost, distribuce); přítomnost inkluzí a vakuolizace; ohraničení cytoplazmy (pravidelná kontura, výběžky, neohraničené).

Takto popisujeme např.:

- u granulocytů:
 - hypersegmentaci neutrofilů (při posunu doprava),
 - Pelgerovu-Huětovu anomálii či její pseudofornu,
 - megaloidní (obrovské) tyče či metamyelocyty,
 - přítomnost polykaryocytů,
 - různé poruchy granulací (hypo-, hypergranularita, toxická granulace),
 - přítomnost Döhleho inkluzí, Auerových tyčí,
 - intracelulárních přítomnost parazitů
- u lymfocytů:
 - počet a aktivitu LGL (mohou fyziologicky tvořit 10 – 15 % z celkového počtu lymfocytů v periferní krvi),
 - reaktivní lymfocyty,
 - atypické/patologické formy lymfocytů (např. „vlasaté“ čili „vilózní“ lymfocyty, prolymfocyty, lymfomové buňky apod.),
- také si všimáme přítomnosti holých jader a jaderných stínů.

2) Trombocyty:

Postup při hodnocení nátěru periferní krve

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

- a) orientačně odhadujeme počet,
- b) popisujeme velikost (normální, mikro- či makroformy), či anizocytóza trombocytů,
- c) popisujeme granulaci – hypo/agranulární trombocyty, centralizace granul,
- d) rozložení v nátěru – shlukování – trombocytární agregáty, satelitismus trombocytů (trombocyty adherují nejčastěji na neutrofilní segmenty).

3) Erytrocyty:

- a) velikost erytrocytů – normocyty, mikrocyty, makrocyty a jejich izo- či anizocytóza,
- b) zbarvení erytrocytů – normochromní, hypo- či hyperchromní, polychromázie;
- c) změny tvaru – přehledně uniformita či naopak poikilocytóza (směs různých tvarů erytrocytů), dále sférocyty, terčovité erytrocyty (target cells), dakryocyty (erytrocyty tvaru kapky), anulocyty, schistocyty (fragmenty erytrocytů), ovalocyty, eliptocyty, akantocyty (erytrocyty s ostrými, nepravidelnými výběžky plazmy), echinocyty (erytrocyty s pravidelnými, kratšími a zaoblenými výběžky), drepanocyty (srpkovité erytrocyty), stomatocyty (projasnění ve středu erytrocytu tvaru úst), keratocyty (horned cells = „rohaté“ buňky) a další,
- d) přítomnost inkluzí – bazofilní tečkování, Howellova-Jollyho tělíška, Cabotovy prstence, Pappenheimerova tělíška,
- e) přítomnost parazitů – např. malarická plazmodia,
- f) penízkovatění (rouleaux – nelze hodnotit v hustém nátěru), aglutinace.

Pro přesnější hodnocení a např. porovnávání nálezů u jednotlivých pacientů, lze využít následující tabulku:

Morfologie erytrocytů – určení stupně poruchy

<i>Morfologie</i>	<i>Semikvantitativní hodnocení</i>
Polychromázie	
	1+ = 1 až 5 / zorné pole
Dakryocyty	2+ = 6 až 10 / zorné pole
Akantocyty	3+ = > 10 / zorné pole
Sférocyty	
Ovalocyty/eliptocyty	
Erytrocyty bizarních tvarů	1+ = 3 až 10 / zorné pole
Terčovité erytrocyty	2+ = 11 až 20 / zorné pole
Stomatocyty	3+ = > 20 / zorné pole
Penízkovatění – rouleaux *	1+ = agregáty 3 – 4 erytrocytů 2+ = agregáty 5 – 10 erytrocytů 3+ = četné agregáty s oj. volnými erytrocyty
Schistocyty (schizocyty)	> 1 na 1000 erytrocytů
<i>Drepanocyty (kvantitativně)</i>	

Postup při hodnocení nátěru periferní krve

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

<i>Morfologie</i>	<i>Semikvantitativní hodnocení</i>
Drepanocyty (nekvantifikované)	Semikvantitativní hodnocení se neuvádí (hodnotí se jako pozitivní nebo negativní nález).
Bazofilní tečkování	
Pappenheimerova tělíska	
Howell - Jollyho tělíska	

* nutné odlišit od aglutinace!!

1.2.4 Zdroje chyb v hodnocení

- a) Špatně provedený nátěr
 - velmi silný, hustý,
 - velmi řídký, tenký,
 - bez „konců“,
 - s aglutinací erytrocytů při nedostatečném nahřátí vzorku a podložního skla při přítomnosti chladových aglutininů,
 - nátěr z vysráženého vzorku.
- b) Nekvalitní barvení
 - staré barvy,
 - špatné pH,
 - špatná/nedostatečná fixace,
 - barvení nedostatečně zaschlého nátěru,
 - „rychlé barvení“.
- c) Nevhodné místo k diferenciaci
 - nátěr nebyl přehlédnut na malém zvětšení.
- d) Nedostatečné zvětšení při hodnocení morfologie.
- e) Nekvalitní imerzní olej s nedostatečným otřením skla po hodnocení a následné hodnocení po delším čase.

Zápis výsledku

Výsledek hodnocení nátěru periferní krve vždy zahrnuje číselné hodnoty jednotlivých typů leukocytů a popis morfologie leukocytů, erytrocytů, trombocytů, případně dalších nalezených buněk.

Legislativa a normy

Pro orientaci jsou uvedeny příklady některých základních norem, které mají vztah ke kontrolní činnosti.

1. ČSN EN ISO 15189:2013 Zdravotnické laboratoře – Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost. UNMZ Praha 2013.
2. ČSN EN ISO 17511:2004 Zdravotnické prostředky pro diagnostiku in vitro – Měření veličin v biologických vzorcích – Metrologická sledovatelnost hodnot přiřazených kalibrátorům a kontrolním materiálům. UNMZ Praha 2004.

Postup při hodnocení nátěru periferní krve

Webové adresy související s hodnocením nátěrů

- <http://www.sekk.cz> – záložka: Infoservis (Text přednášky: Morfologie erytrocytů, morfologické kvízy).
- <http://telemedicina.med.muni.cz/telehematologie/index.php>
- <http://www.leukemia-cell.org/cz/internetovy-hematologicky-atlas/>
- www.hematologyatlas.com
- <http://pathy.med.nagoya-u.ac.jp/atlas/doc/>
- <http://image.bloodline.net/category.html>
- www.usd.edu/~btimms/web521/Hematopoiesis/hematopoiesis.htm
- <http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/Anatomy%20&%20Physiology/2020/2020%20Exam%20Reviews/Exam%201/CH17%20Hematopoiesis.htm>
- http://serpins.med.unc.edu/~fcc/Biology134_Folder/hem_cd/Hemesets/set1/Set1a.htm
- <http://www.med.unc.edu/medicine/web/Smearreview/sld001.htm>
- <http://library.med.utah.edu/WebPath/HEMEHTML/HEMEIDX.html>
- <http://www.siumed.edu/~dking2/intro/bldsmear.htm>

Použité zkratky

LGL large granular lymphocytes

NRBC normoblasty

RBC red blood cells (erythrocyty)

WBC white blood cells (leukocyty)

Literatura

- ✓ *Brown, B. A. Hematology: Principles and procedures. London, Lea & Febiger 1993; 35-85, 97-105.*
- ✓ *Bain, B. J., Blood cells. Practical guide. Wiley-Blackwell, London, 3th ed., 2002.*
- ✓ *Bain, B. J., Blood cells. Practical guide. Wiley-Blackwell, London, 5th ed., 2015.*
- ✓ *Bain B. J. In: Dacie and Lewis: Practical Haematology, Churchill Livingstone, 11th ed. 2012; 57-68.*
- ✓ *Lewis, S. M., Bain, B. J., Bates, I. In: Dacie and Lewis Practical Haematology, 10th ed, 2006.*
- ✓ *Zini G., D'Onofrio G., et al: ICSH recommendation for identification, diagnostic value and quantitation of schistocytes, Int J Hem Lab 2012; 34: 107-116.*
- ✓ *Swerdlow SH., Campo E., Harris N.L., Elain L.H., Pileri S.A., Stein H., Siebert R., Thiele J., Arber D. A., Hasserjian R. P., Le Beau M.M., Orazi. A., Siebert R.: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues; IARC, revised 4th ed., Lyon, 2017*