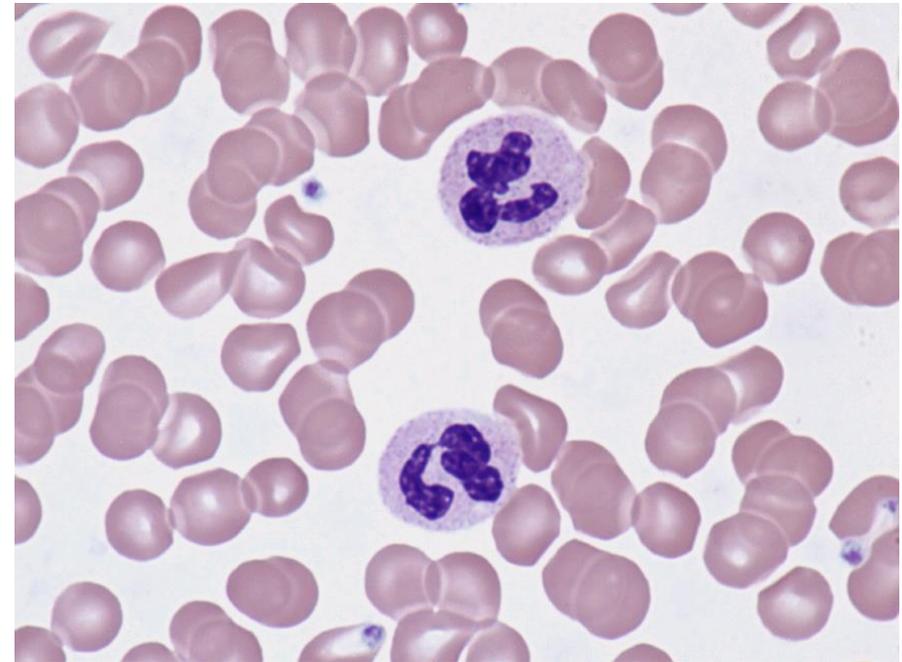


Tecniche di laboratorio di ematologia

Prof. Gian Matteo Rigolin
Ematologia

6. Esame del midollo



Esame del midollo

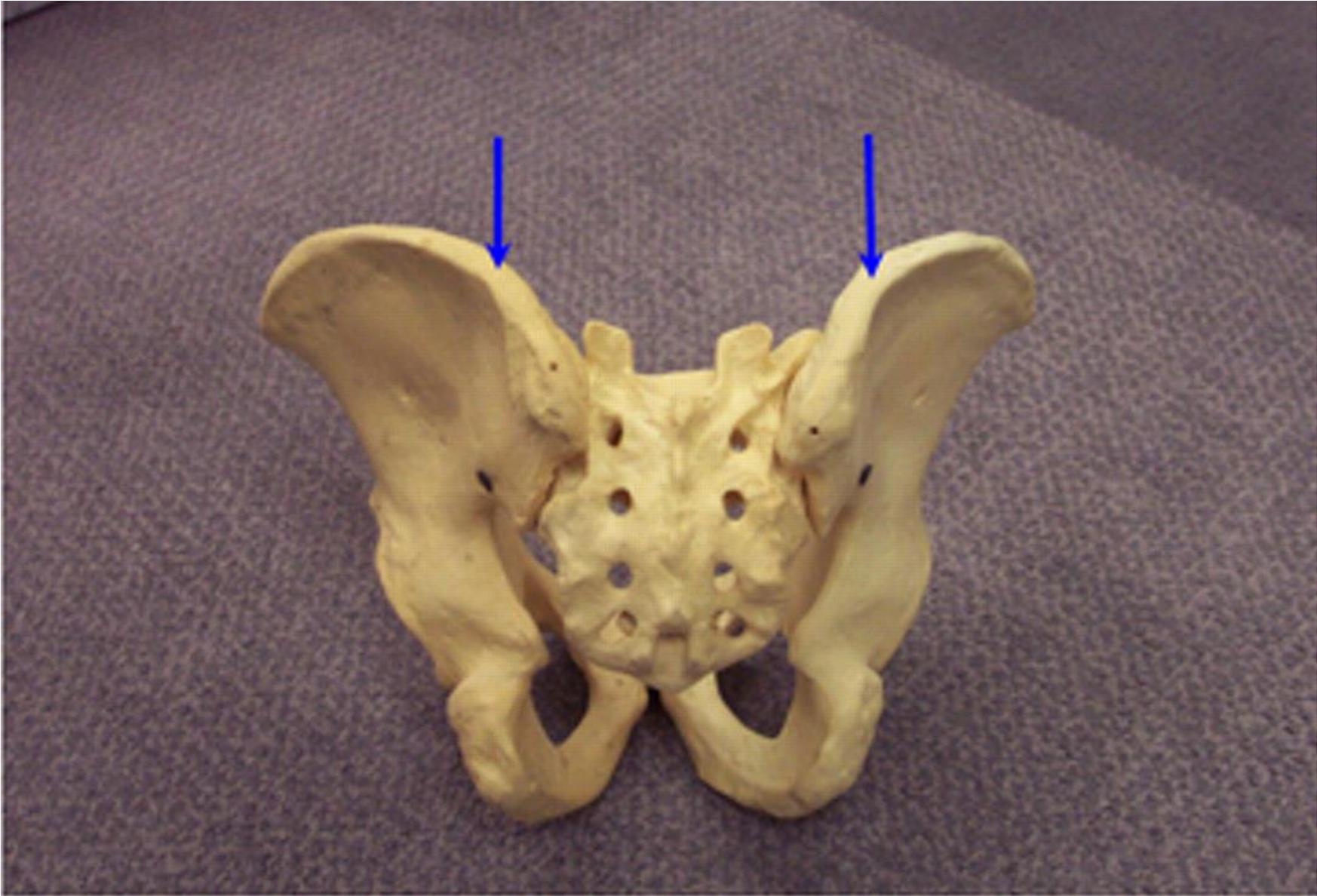
- La diagnosi ed il monitoraggio di molte malattie ematologiche richiede l'esame del midollo osseo che si basa su 2 modalità distinte ma correlate:
 - **Valutazione citologica** mediante agoaspirazione del sangue midollare e allestimento di uno striscio su vetrino permettendo una valutazione morfologica ottimale.
 - **Valutazione istologica** di un cilindro osseo che permette una ottimale valutazione della cellularità, fibrosi, infiltrazione midollare e processi infettivi.

Indicazioni all'esecuzione della agobiopsia midollare

1. diagnosi ed inquadramento di patologie ematologiche
 - leucosi acute e croniche
 - sindromi mieloproliferative
 - sindromi mielodisplastiche
 - anemie ad eziologia non ben definita
 - citopenie
 - gammapatie monoclonali
 - linfomi non Hodgkin ed Hodgkin (interessamento midollare)
 2. follow up di pazienti ematologici
 - vedi sopra
 3. patologie non ematologiche
 - stadiazione di processi neoplastici (metastasi)
 - difetti congeniti del metabolismo lipidico
 4. citopenie periferiche
 - di qualsiasi natura si sospetti l'origine
 5. altre
 - processi infettivi (esami colturali e ricerca antigeni)
-

Sede del prelievo

- Le sedi elettive per il prelievo di midollo osseo mediante agoaspirazione sono nell'adulto la spina iliaca postero-superiore e antero-superiore e lo sterno, nel bambino la protuberanza tibiale.
 - **Spina iliaca postero superiore.** È la sede preferita per la rarità delle complicanze, la facilità di reperi ed il ridotto impatto traumatico sul paziente.
 - Possibili complicanze sono oltre ad infezioni (rare) ed ematomi, le rarissime emorragie retroperitoneali qualora si perfori l'osso iliaco.
 - **Sterno.** La sede ottimale a livello sternale è localizzata a livello del manubrio o della prima o seconda parte del corpo dello sterno. La regione sternale viene utilizzata in casi di insuccesso nel prelievo in sede iliaca.
 - Complicanze legate alla aspirazione in sede sternale sono il tamponamento cardiaco, se viene sfondato il corpo sternale, emorragie od ematomi.
 - Altre sedi. Nel bambino sedi preferenziali sono la **puntura tibiale** se l'età è inferiore ai 2 anni: in caso contrario si ricorre alla cresta iliaca.



Biopsia midollare



H70595

889279

RCV: 10/04/01

BMD



Indagine che possono essere condotte su materiale ottenuto da biospia midollare

-
- esame citologico in microscopia ottica (Colorazione May Grünwald Giemsa)
 - esame citochimico
 - valutazione immunofenotipica (immunofluorescenza ed immunoenzimatica)
 - valutazione citogenetica
 - indagini molecolari
 - valutazione della crescita colturale
 - microscopia elettronica
 - separazione di frustoli per esame istologico
-

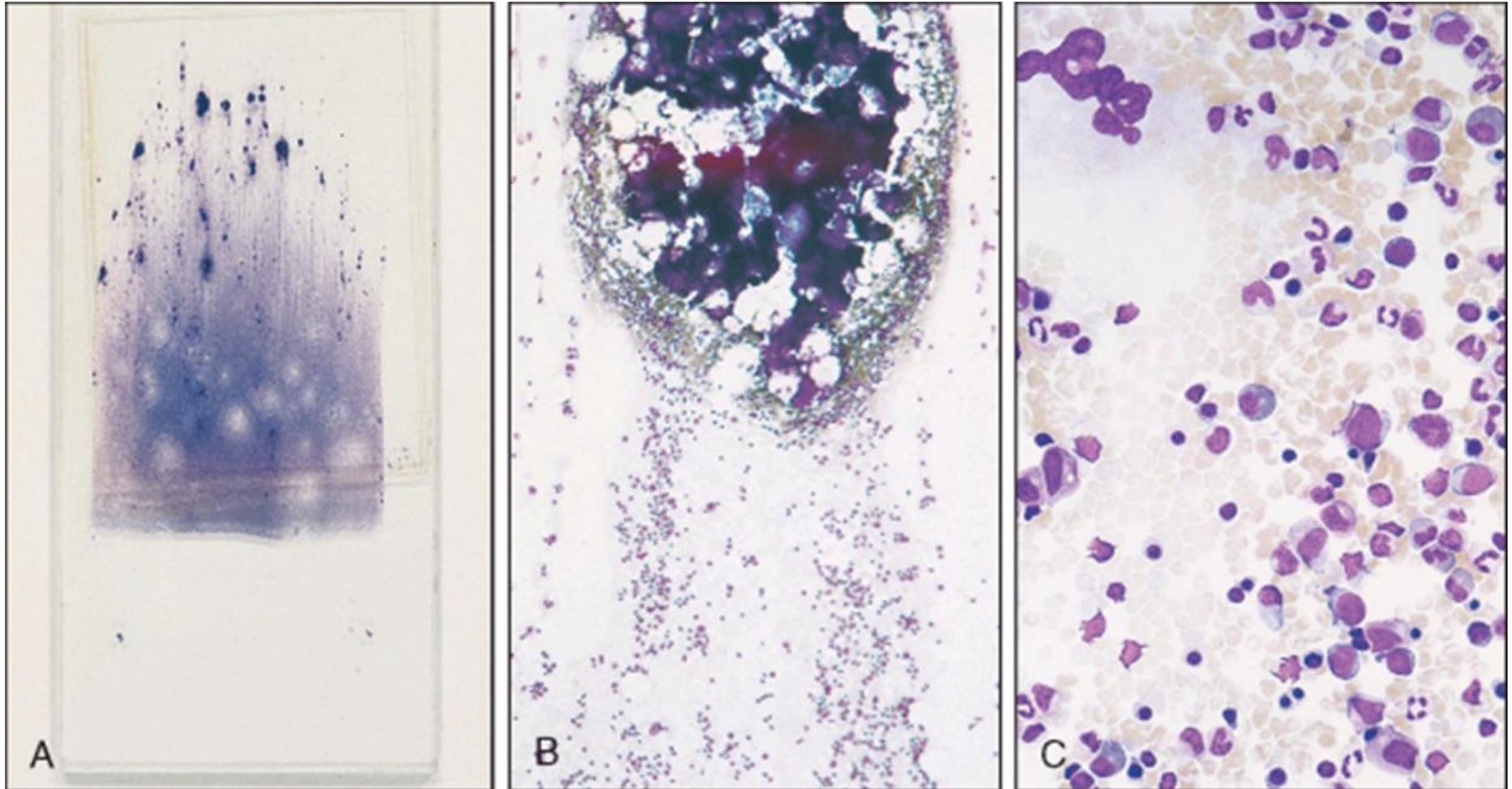
Esame aspirato midollare

- L'esame dell'aspirato midollare inizia con la valutazione della **consistenza della teca ossa** perforata che potrà essere
 - diminuita in caso di osteoporosi avanzata o di mieloma,
 - aumentata in situazioni di osteopetrosi e mielofibrosi.
- Si procede quindi con **l'esame fisico del materiale estratto** definendo
 - la ricchezza o meno del materiale estratto,
 - la presenza di frustoli,
 - la loro numerosità,
 - il colore (da rosso acceso a biancastro),
 - le dimensioni.

Esame aspirato midollare

- L'esame quindi procede con la dopo fissazione ed opportuna colorazione del preparato allestito.
- Le **colorazioni di routine** per l'analisi morfologica del midollo sono
 - May-Grünwald-Giemsa e
 - di Perls (blu di Prussia) per la valutazione dei depositi di ferro.
- Di secondo livello per valutare aspetti morfo-funzionali sono
 - le **colorazioni citochimiche** (PAS, Sudan Black B, esterasi specifiche e non, fosfatasi alcalina, fosfatasi acida, fosfatasi acida tartrato resistente, mieloperossidasi)
 - le tecniche **immunoenzimatiche** (APAAP) e quelle **di immunofluorescenza** vengono applicate nello studio dell'immunofenotipo.

Aspirato midollare



Esame dell'aspirato midollare

- L'esame microscopico inizia con la valutazione complessiva a piccolo ingrandimento (10x) al fine di definire:
 1. il **grado di cellularità** (normale, ridotta, aumentata): consiste nella determinazione quantitativa della componente cellulare secondo una valutazione soggettiva empirica in base alla quale il midollo è ipoplasico se la componente emopoietica di un frustolo è $< 25\%$ e viceversa iperplasico se $> 75-80\%$. La cellularità varia poi in rapporto all'età del paziente (nel bambino la componente emopoietica è più ricca rappresentando mediamente circa l'80% mentre nell'anziano il valore medio si aggira sul 30% a livello dello sterno).
 2. la presenza di **monomorfismo** cellulare che si realizza nel corso di leucosi acute, nelle sostituzioni midollari in corso di leucemie linfatica cronica o di processi linfomatosi coinvolgenti il midollo, nel mieloma multiplo.
 3. definizione quantitativa della **componente megacariocitaria**, in considerazione della facilità di individuare facilmente, per le loro maggiori dimensioni,
 4. la presenza di **aggregati di elementi linfoidi con aspetto monomorfo**, espressione di un coinvolgimento midollare in corso di processi linfoproliferativi.
 5. la **presenza di cellule non midollari** (es. metastasi), che generalmente si presentano come isolotti di elementi basofili in strutture simil-sinciziali talvolta con atteggiamento pseudo-acinare e secernente.

Esame dell'aspirato midollare

- **L'esame a piccolo ingrandimento** consente anche di individuare le zone ottimali per la valutazione morfologica che viene effettuata a maggiore ingrandimento: generalmente vengono prescelte regioni marginali dove il tessuto midollare è **ben disteso** e le cellule non sono addossate le une alle altre, in modo tale da poter riconoscere con precisione i dettagli morfologici.
- La zona prescelta deve inoltre essere rappresentativa del tessuto midollare cioè deve risultare minimamente contaminata da sangue midollare ed essere costituita per lo più da elementi nucleati midollari disposti in un unico strato e non troppo dispersi.

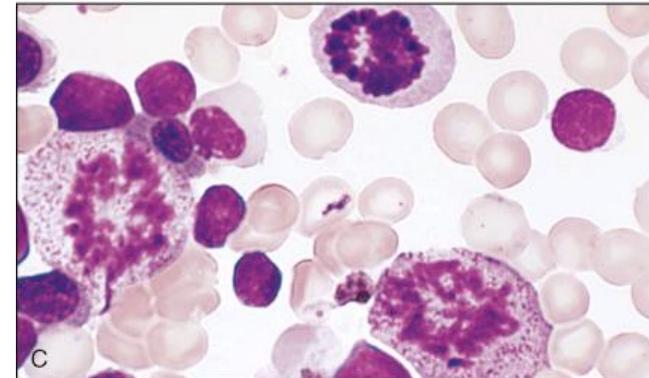
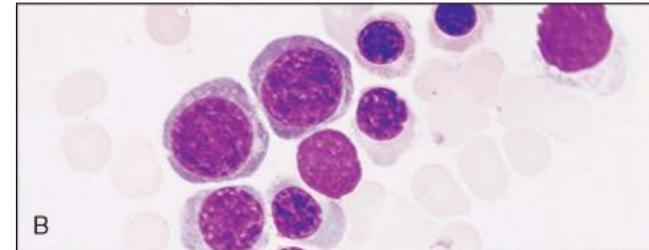
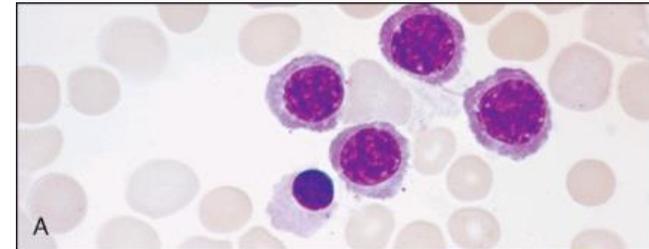
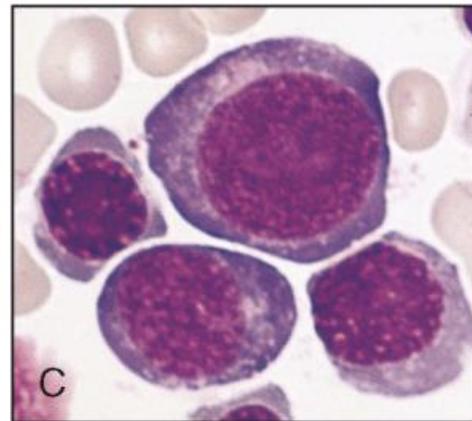
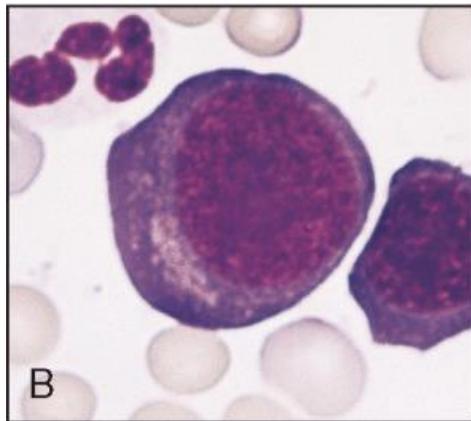
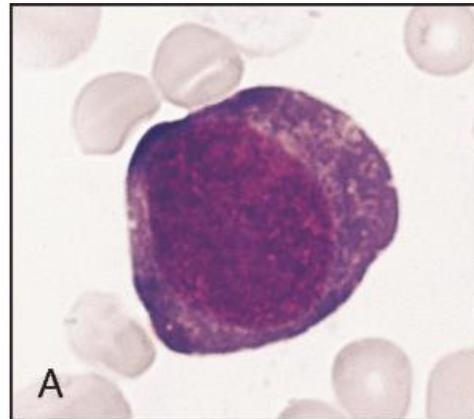
Esame dell'aspirato midollare

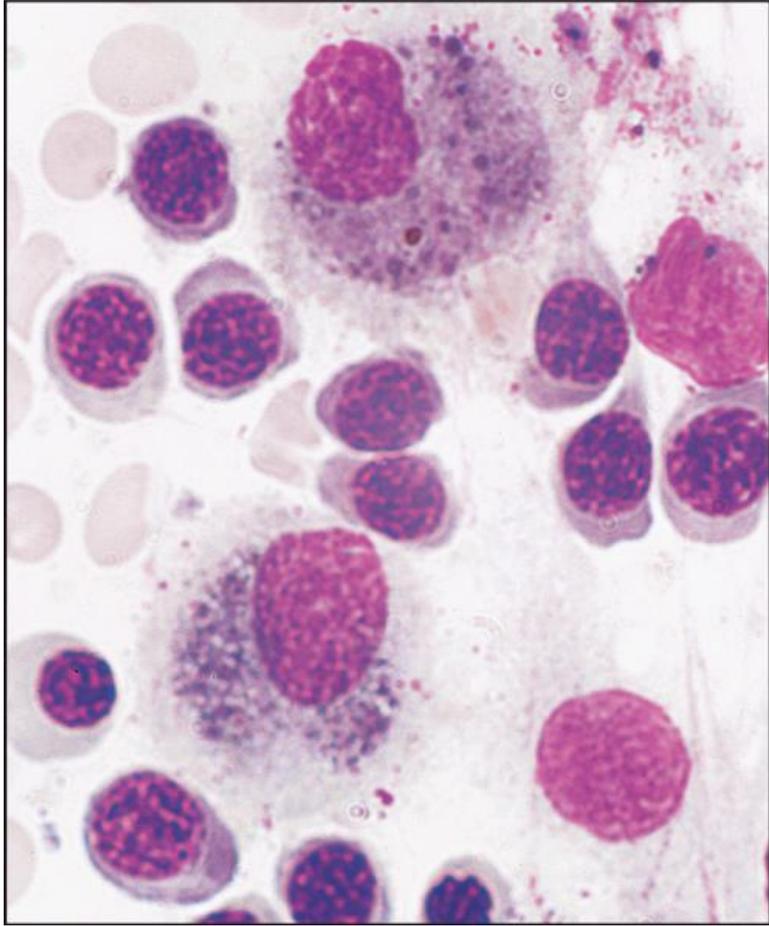
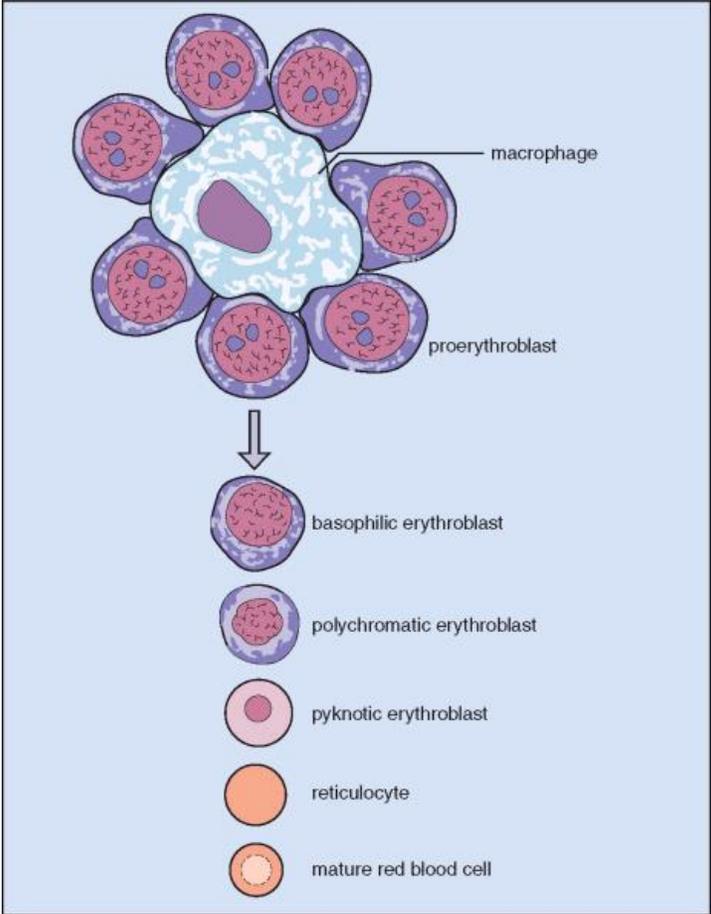
- L'analisi procede quindi con il **conteggio differenziale** e con le **valutazioni morfologiche qualitative**: tale valutazione viene condotta ad un ingrandimento di 40x e 100x (ad **immersione**).
 - In termini rigorosi il conteggio differenziale più corretto da un punto di vista numerico è sicuramente quello ottenuto da sezioni di biopsia ossea nelle quali non vi è la contaminazione da parte del sangue midollare e nelle quali si possono osservare, se presenti, elementi midollari non ottenuti nell'aspirato per una loro maggiore adesione al tessuto midollare.
- D'altra parte la valutazione in sezioni di biopsia spesso rende difficilmente identificabili gli elementi midollari con impossibilità quindi di effettuare, a causa dei processi di fissazione, decalcificazione ed inclusione, una corretta attribuzione.
- Si preferisce quindi, per questa ultima considerazione, effettuare il conteggio su materiale ottenuto mediante aspirazione con le avvertenze sopra menzionate.

Esame dell'aspirato midollare

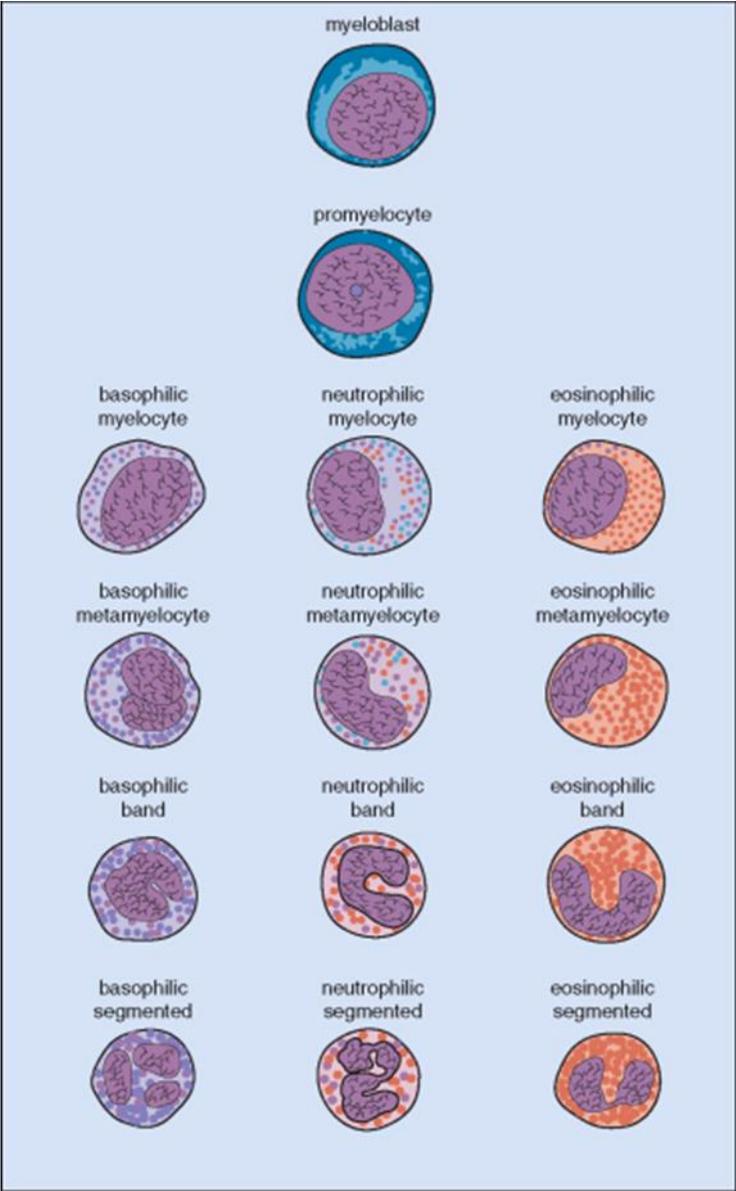
- Primo passo nell'analisi di un aspirato midollare è la valutazione dei **rapporti tra i diversi elementi cellulari**.
 - La conta differenziale determina **il rapporto mielo-eritroide** vale a dire il rapporto tra la componente mieloide e quella eritroide valutato su 200-500 cellule.
 - In condizioni di normalità esso si aggira tra 2:1 e 4:1. In alternativa si può valutare il rapporto tra gli elementi mieloidi senza i leucociti maturi e quelli eritroidi (rapporto leuco-eritrogenico v.n. 0,6-2,7) ed il rapporto mielo-linfoide (1-17) e linfo-eritroide (0,2-4,1).
 - Valutazione dei **rapporti tra gli elementi maturanti di ciascuna serie emopoietica come pure degli elementi non emopoietici e determinazione del mielogramma**.
 - La determinazione del mielogramma secondo alcuni autori non sarebbe in realtà così precisa come si potrebbe pensare: il tessuto midollare in esame inevitabilmente subisce fenomeni di diluizione e di contaminazione ad opera del sangue midollare e le modificazioni legate alla tecnica di striscio e di colorazione del preparato.
 - Si ritiene quindi, da parte di questi autori, che il conteggio differenziale debba tenere conto anche di **una valutazione complessiva d'insieme**.

Serie eritroide

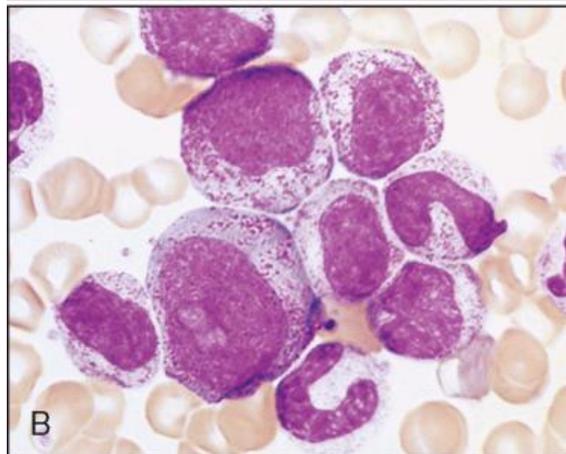
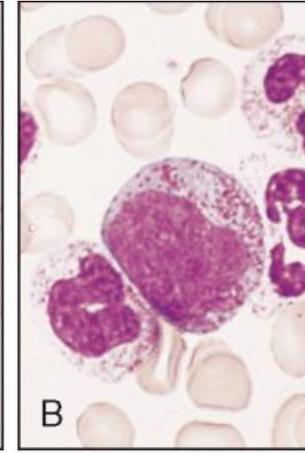
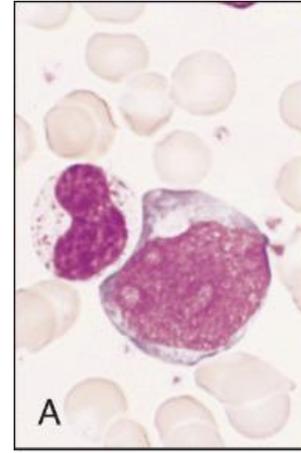
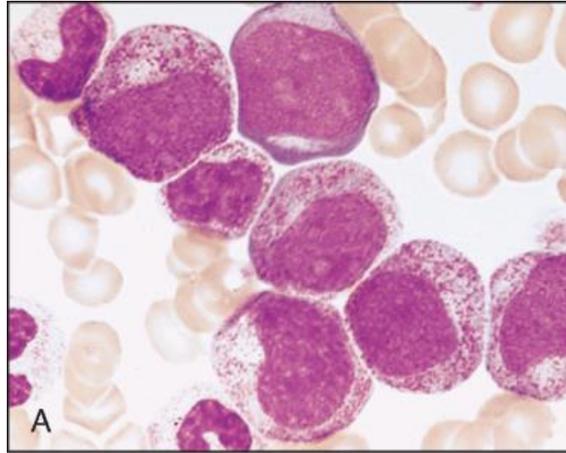




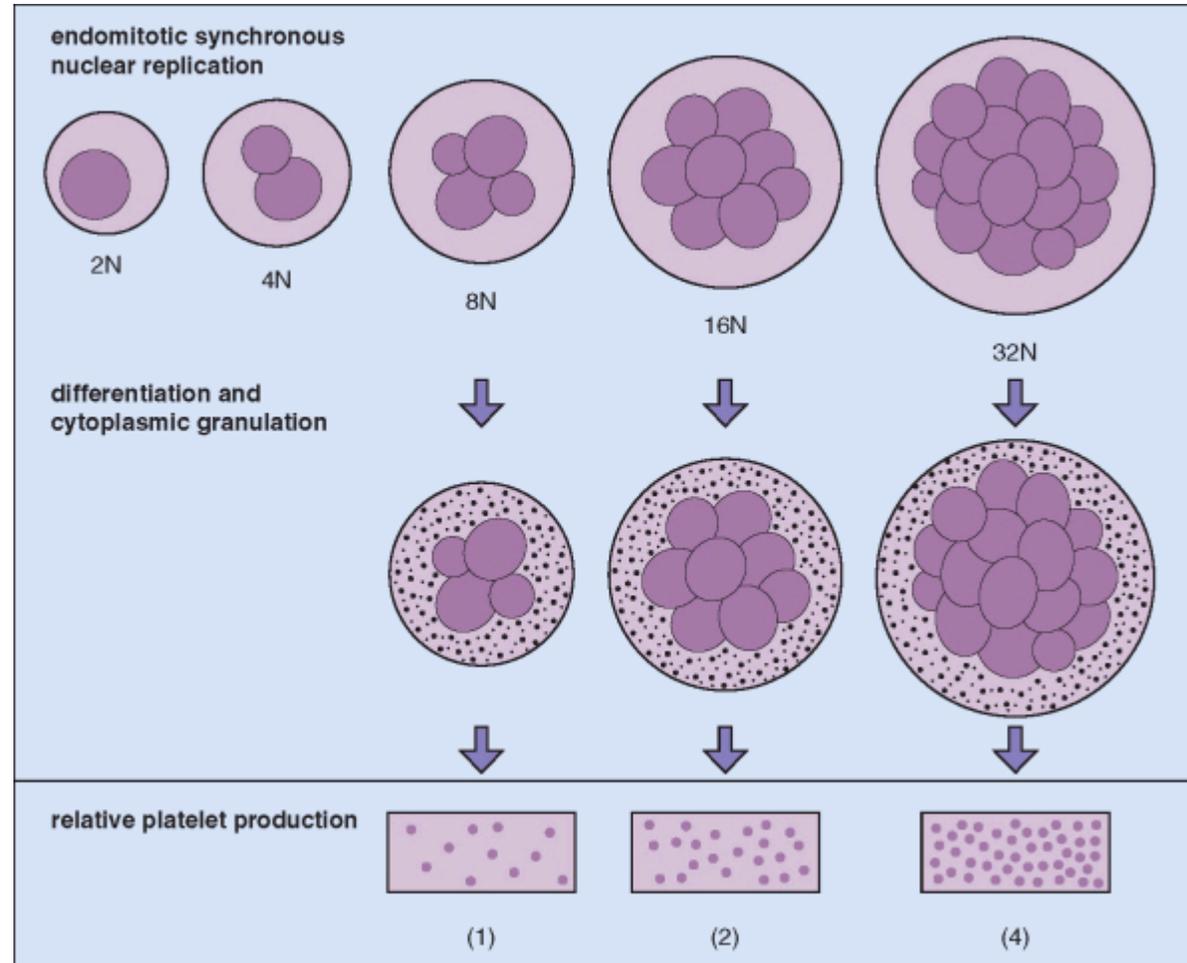
Serie mieloide



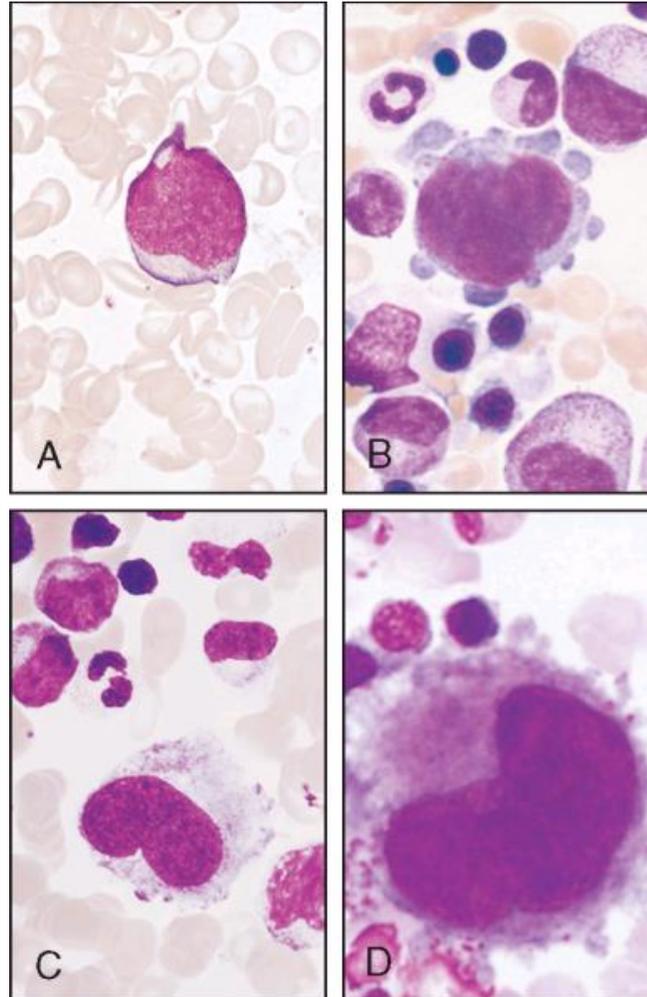
Serie mieloide



megacariocitopoiesi



megacariocitopoesi



Mielogramma

	%
Cellule reticolari	-
Mieloblasti	2 (0,3-5)
Promielociti	5 (1-8)
Mielociti	
neutrofili	12 (5-19)
eosinofili	1,5 (0,5-3)
basofili	0,3 (0-0,5)
Metamielociti	22 (13-22)
Granulociti	
neutrofili	20 (7-30)
eosinofili	2 (0,5-4)
basofili	0,2 (0-0,7)
Linfociti	10 (3-17)
Monociti	-
Megacariociti	-
Plasmacellule	0,4 (0-2)
Proeritroblasti	4 (1-8)
Eritroblasti	18 (7-32)
basofili	
policromatofili	
ortocromatici	

Changes in Differential Counts of Bone Marrow with Age

		Birth	1 Mo-1 Yr	1-4 Yr	4-12 Yr	Adult
Neutrophilic series	Mean (%)	60	33	50	52	57
	95% limits	42-78	17-47	32-68	35-69	39-79
Eosinophilic series	Mean (%)	3	3	6	3	3
	95% limits	1-5	1-5	2-10	1-5	1-5
Lymphocytes	Mean (%)	14	47	22	18	17
	95% limits	3-25	34-63	8-36	12-28	10-24
Erythrocytic	Mean (%)	14	8	19	21	0
	95% limits	2-28	2-16	11-27	11-31	10-30
Myeloid to erythroid ratio	Mean	4.3	4.0	2.6	2.5	2.6
<p>The means and 95% confidence limits in this table were calculated by combining data published in Osgood, Seaman. The cellular composition of bone marrow as obtained by sternal puncture. <i>Physiol Rev</i> 1939;24:105-114; with the data in Table 1.5.</p>						

Esame dell'aspirato midollare

- Successivamente si procede all'analisi degli aspetti **morfologici qualitativi** che è parte importante spesso decisiva nel processo diagnostico:
 - **anomalie morfologiche** (es. megaloblastosi)
 - **anomalie nel processo maturativo** a livello
 - nucleare (binuclearità, carioressi, picnosi, anomalia di Pelger-Huet, etc.)
 - citoplasmatico (disgranulopoiesi, vacuoli, etc.)
 - asincronie maturative nucleo-citoplasmatiche (es. sindromi mielodisplastiche)
 - **presenza di inclusioni cellulari patologiche** (depositi di ferro, cellule di Pot, etc.)
- La valutazione dei reperti midollari deve inoltre tenere presente la notevole variabilità che esiste nell'ambito dei midolli normali.

Esame dell'aspirato midollare

- La valutazione morfologica dopo colorazione May Grünwald Giemsa può essere successivamente completata con **accertamenti citochimici quali la reazione di Perls** (al blu di Prussia) al fine di determinare gli accumuli di ferro nell'interstizio e nei macrofagi midollari.
- Tale valutazione espressa secondo una scala semiquantitativa viene valutata a piccolo ingrandimento analizzando le zone del vetrino nelle quali il materiale è meno distribuito.
- La valutazione procede quindi a maggiore ingrandimento per valutare la presenza di sideroblasti ed in particolare, nei quadri di displasia midollare, la presenza di sideroblasti ad anello.

Esame dell'aspirato midollare

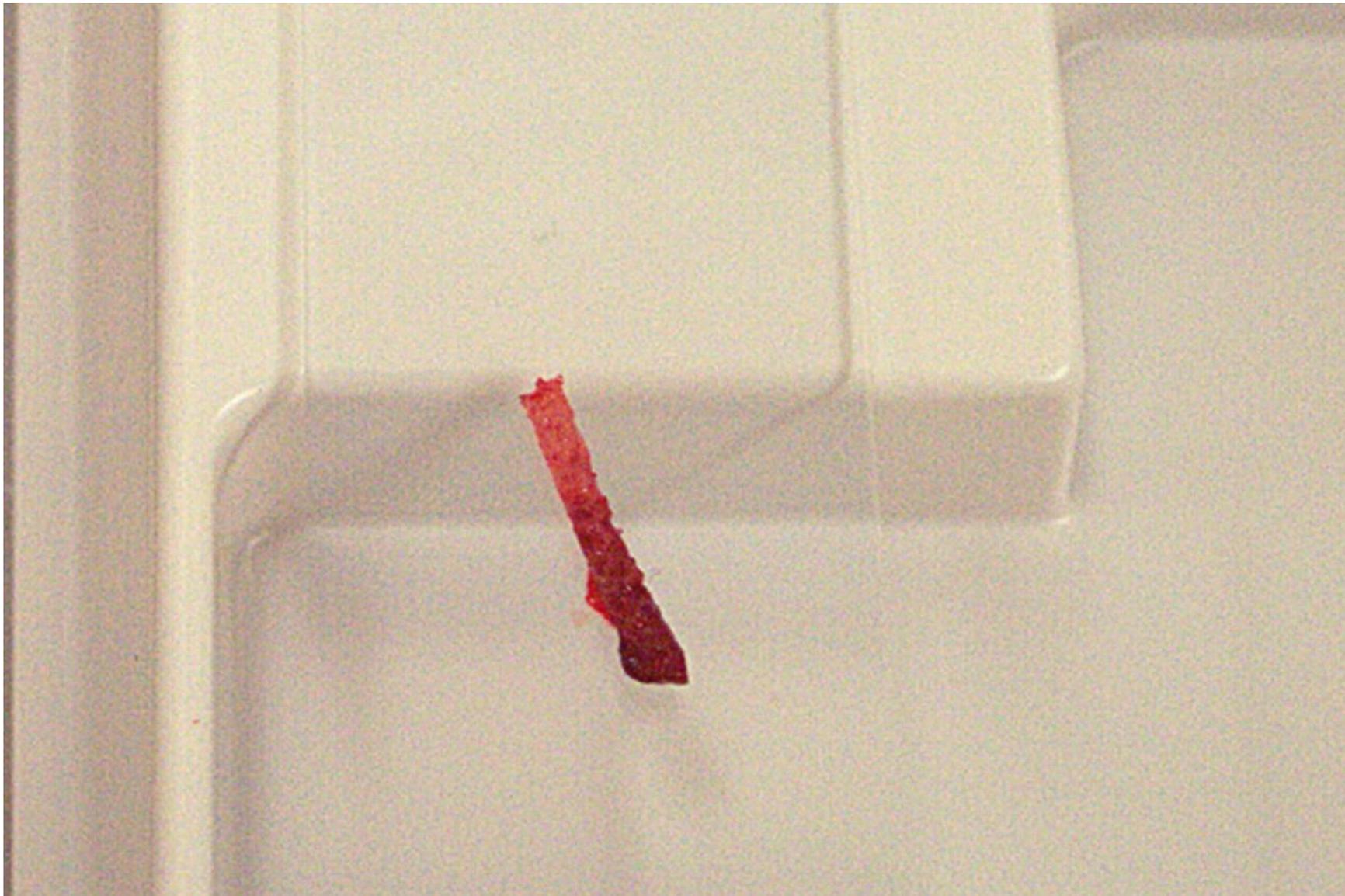
1. **Valutazioni citochimiche** quali il PAS, la mieloperossidasi, il Sudan B Black, le esterasi specifiche e aspecifiche, la fosfatasi acida, la fosfatasi alcalina leucocitaria vengono principalmente effettuate nella definizione dei processi leucemici.
2. **l'analisi immunologica** secondo tecniche immunoenzimatica o immunofluorescenza in citometria a flusso nella valutazione dei processi leucemici,
3. **l'analisi citogenetica e molecolare** delle cellule midollari patologiche (leucosi acute, leucemia mieloide cronica, disordini linfoproliferativi etc.).

BIOPSIA OSSEA

- La biopsia ossea è un esame relativamente più cruento della biopsia midollare rispetto alla quale presenta indicazioni e dà valutazioni diverse talvolta complementari.
- Le indicazioni alla esecuzione della biopsia ossea in ambito ematologico sono:
 - la stadiazione di processi linfomatosi
 - le sindromi mieloproliferative
 - le sindromi mielodisplastiche
 - le aplasie o ipoplasie midollari
 - l'hairy cell leukemia
 - le fibrosi midollari
 - tutte le situazioni di punctio sicca e di pancitopenia
 - il sospetto di metastasi midollari da neoplasia epiteliale
 - la valutazione di processi granulomatosi

Biopsia ossea





Biopsia ossea

- Il materiale estratto è costituito da una **carotina di tessuto midollare** il cui esame, dopo opportuna fissazione ed inclusione, viene effettuato, diversamente dall'aspirato midollare, dall'anatomo patologo.
- L'ematologo da parte sua effettua una apposizione del frustolo su vetrino ed osserva al microscopio ottico il materiale adesivo.
- .

Biopsia ossea

- La valutazione del midollo tramite biopsia dà **informazioni differenti rispetto a quelle fornite dall'aspirato midollare**: in particolare è possibile dare una valutazione della struttura del tessuto midollare con definizione
 1. **della quota cellulare** emopoietica
 2. della **sede** dove vengono osservati gli elementi delle filiere emopoietiche nell'ambito del tessuto midollare
 3. dei **rapporti quantitativi** tra le diverse componenti midollari soprattutto con il microambiente midollare e con le componenti cosiddette accessorie, alle quali oggi vengono attribuite proprietà funzionali di primaria importanza nella fisiologia del midollo e di altri sistemi cellulari.
 4. riconoscimento di eventuali **localizzazioni metastatiche**, di proliferazioni neoplastiche epiteliali extramidollari
 5. valutazione della **componente osteo-trabecolare**.

Preparazione delle sezioni

- **Fissazione.**
- La fissazione del preparato può essere effettuata con diverse soluzioni: le più utilizzate sono la formalina al 10% tamponata a pH 7.0 ed il B5.
- Il B5 è costituito da una miscela di 9 parti di una soluzione di acetato di Na (1.25 gr) e Cloruro di Hg (6 gr) in 90 ml di acqua distillata (la soluzione è stabile per circa 72 h) ed una parte di aldeide formica al 40% (da preparare subito prima dell'esecuzione della biopsia).
- Il B5 offre il vantaggio di ridurre i tempi di fissazione (2 h contro le 12-18 della formalina) permettendo una maggiore conservazione dei dettagli morfologici e l'esecuzione di alcune indagini di tipo immunoistochimico intracitoplasmatiche.
-

Preparazione delle sezioni

- **Decalcificazione.**
- Successivamente il preparato dopo essere stato posto in alcool 70% per circa 30 min., viene sottoposto a processo di decalcificazione per 2 h in una soluzione di EDTA (37. 22 g in 1 L di acqua distillata portato ad ebollizione) a cui vanno aggiunti 70 ml di HCl concentrato (a 40 °C). La soluzione dopo una notte di riposo va filtrata prima dell'uso.
- Il processo di decalcificazione comporta inevitabilmente dei fenomeni di distorsione della struttura midollare ed una alterazione dei dettagli morfologici cellulari (perdita delle granulazioni degli elementi mieloidi ed incremento della colorazione di fondo nelle reazioni immunoistochimiche). L'utilizzo di resine plastiche (metacrilato) permette dopo aver fissato il preparato di passare direttamente alla inclusione senza decalcificazione.

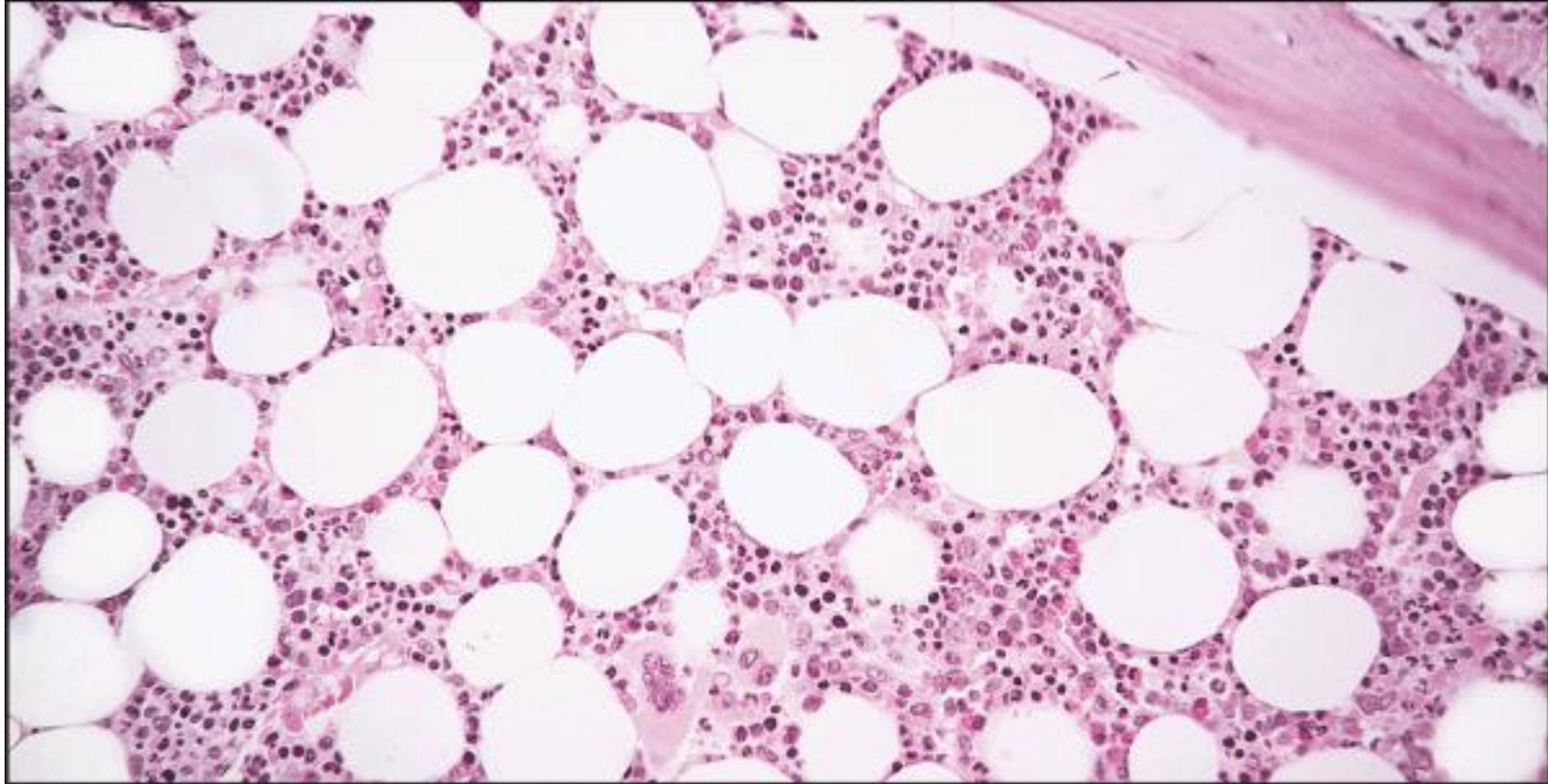
Preparazione delle sezioni

- **Inclusione.**
- Dopo aver sottoposto il preparato decalcificato alla scala ascendente e discendente degli alcoli per disidratarlo e diafanizzarlo, lo si include in paraffina e, dopo un periodo di tempo sufficiente per la solidificazione, con il microtomo lo si seziona per ottenere delle fettine dello spessore di 4-5 micron.
- Nel caso in cui l'inclusione venga effettuata con resine di metacrilato è possibile ottenere, con microtomi motorizzati con lama di vetro, sezioni più sottili (1-2 micron) le quali, prima di essere colorate, vanno trattate per rimuovere la resina con acetone, metanolo e soluzioni di metanolo-ammonio e acqua.
- L'utilizzo di queste resine permette per la rigidità che esse conferiscono al preparato di sezionarlo direttamente senza ricorrere alla decalcificazione, conservando allo stesso tempo i dettagli morfologici cellulari.

Preparazione delle sezioni

- **Colorazione.**
- Il preparato viene quindi colorato di routine con **ematossilina ed eosina**, con metodiche di impregnazione argentica per evidenziare la struttura reticolare (sec. Gomori) e con il PAS.
- In seconda istanza o per indagini mirate è possibile ricorrere a **colorazioni istochimiche** più raffinate (Perls, naftol-AS-D-cloro acetato esterasi, Rosso Congo).
- Per le colorazioni con tecniche **immunoistochimiche** non vengono utilizzati preparati inclusi in metacrilato in quanto la struttura della resina impedisce, per motivi sterici, il passaggio delle macromolecole utilizzate in queste reazioni immunologiche.
 - I preparati ottenuti con metodiche di inclusioni classiche non permettono tuttavia la conservazione di tutti i marcatori immunologici evidenziabili su materiale non fissato.
 - Per alcuni markers è necessario operare **colorazioni su pezzi di tessuto non fissati freschi** o sezionati dopo congelamento.

BIOPSIA OSSEA NORMALE



Esame della biopsia ossea

- Valutazione dei **rapporti quantitativi** tra le diverse filiere emopoietiche che risultano alterati in modo significativo nelle sindromi mieloproliferative nelle quali si può osservare oltre che ad una ipercellularità, soprattutto nelle fasi iniziali, la prevalenza a seconda della forma di una filiera sulle altre.
- Valutazione del grado di **fibrosi midollare** ripetutamente correlato con la prognosi nella mielofibrosi idiopatica, nella leucemia mieloide cronica e nelle sindromi mielodisplastiche.
- Definizione **di alterazioni di tipo qualitativo: questo tipo di indicazioni sono difficilmente valutabili** in una sezione di biopsia ossea anche se di ottima qualità come quelle incluse in resine di metacrilato, mentre vengono ben valutate in un aspirato midollare.