

OMHÄNDERTAGANDE OCH BEDÖMNING AV BLOD- OCH BENMÄRGSPROVER

Innehållsförteckning

- I. Provtagningsanvisning
- II. Anamnestisk remissinformation
- III. Provmottagarens hantering av provet
- IV. Analyser
- V. Information i remissen svarsdel samt diagnostiska kriterier för akuta leukemier
- VI. Rekommendation för utformning av diagnostext
- VII. Referenser
- VIII. Administrativt
- IX. Aktuella vårdprogram

I. Provtagningsanvisning

Utförliga internationella riktlinjer finns publicerade: S.-H Lee et al: ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2008, **30**, 349-364

Remissuppgifter

Relevant anamnes anges. Det är av särskild vikt att ange eventuell tidigare satt diagnos och givna behandlingar.

Indikationen för benmärgsprovtagningen ska framgå.

Aktuella värden för Hb, LPK och TPK är obligatoriska.

Information om resultat av andra relevanta analyser (S-EPO, JAK2, BCR/ABL, cytogenetik etc.).

Provmärkning

Socialstyrelsen har utgivit bestämmelser för hur märkning ska göras (SOSFS 1989:1, punkt 7.2).

Objektglas med mattslipad kant märkta med blyertspenna rekommenderas (ange personnummer + namn, eventuellt initialer). Skilj genom märkning på blod- och benmärgsutstryk.

Biobankslagen medger av patientsäkerhetskäl undantag för cytologiprover från principen att prover som sparas inte får märkas med patient-id.

Vid känd eller misstänkt blodsmitta skall detta anges med etikett på såväl preparatburk/rör som remiss.

Provmaterial

Material till benmärgsutstryk tas före eventuellt material för andra undersökningar som flödescytometri, cytogenetiska/molekylärgenetiska analyser och mikrobiologiska undersökningar (se nedan). Undantag är MRD-analys, då den första portionen av aspiratet bör användas till flödescytometrisk analys för att undvika blodtillblandning.

1. Blodutstryk (kapillärt eller venöst prov): minst tre stycken (lufttorkas).
2. Benmärgsutstryk eller imprintspreparat: minst sex stycken (lufttorkas), vid leukemimistanke minst åtta stycken.

3. Material för histologisk undersökning (helst grovnålsbiopsi eftersom koagel ofta är inadekvat för diagnostik) fixeras i neutral, buffrad formalinlösning 10 % (4 % formaldehyd). Grovnålsbiopsi bör ej understiga 2 cm i längd. Grovnålsbiopsi kan göras före eller efter benmärgsaspiraten för utstryksdiagnostik.

(Obs! Tillse att formalin inte läcker ut från kärlet med benmärgskula/grovnålsbiopsi - formalinånga förstör utstryksglaset.)

För adekvat diagnostik rekommenderas grovnålsbiopsi (crisabiopsi), särskilt

- vid misstanke på aplastisk anemi (bilaterala biopsier)
- vid misstanke på myelodysplastiskt syndrom
- vid misstanke på myeloproliferativ neoplas
- vid lymfomdiagnostik, myelomdiagnostik och metastaserande tumörsjukdom
- i fall där tidigare punktion har misslyckats (vid myelofibros, hårcellsleukemi, metastaser, remissions- resp. recidivbedömning etc.)

Vid extramedullärt engagemang kan provtagning från lymfkörtel eller infiltrat i annan vävnad bli aktuell. För detta ändamål insändes provet ofixerat i sterilt provtagningskärl med fysiologisk koksaltlösning. Provmaterial av detta slag förvaras och transporteras helst vid kylskåpstemperatur. Provmaterialet får inte frysas. Sändningen bör nå laboratoriet så snart som möjligt, helst samma dag och senast morgonen efter provtagningen.

4. Vid provtagning för immunologisk diagnostik med flödescytometri sprutas 2 – 3 ml benmärgsaspirat i heparinrör (grön kork) eller EDTA-rör (lila kork). Innan benmärgsaspiratet nedsprutas i rören tillsätts cirka 2 ml fysiologisk koksaltlösning eller odlingsmedium t ex RPMI . Vid prov för MRD analys bör den första portionen av aspiratet användas till flödescytometrisk analys för att undvika blodtillblandning. I de fall då man tvingas avstå från benmärgsaspiration insändes enbart blod.

Rören insändes snarast och måste nå laboratoriet senast morgonen efter provtagningen för att kunna analyseras inom 24 timmar. Kontakta gärna mottagande laboratorium enligt lokala rekommendationer innan prov insändes.

Om benmärgen inte kan aspireras ("dry tap") kan en benmärgsbiopsi på 2 cm läggas i odlingsmedium t ex RPMI i ett sterilt rör. Kvaliteten på sådana undersökningar blir dock sämre pga större mängd celldebris och döda celler.

Provröret måste förpackas på sådant sätt att nedfrysning inte sker under transporten.

Andra undersökningar

- Provtagning för cytogenetisk analys bör samlas enligt lokala rekommendationer, helst i sterila rör med odlingsmedium t ex RPMI med 10 % fetalt kalvserum för god viabilitet. Om benmärgen inte kan aspireras läggs en benmärgsbiopsi på 2 cm i odlingsmedium med 10 % fetalt kalvserum.
- Provtagning för molekylära undersökning såsom PCR eller RT-PCR bör också samlas enligt lokala rekommendationer, ofta i EDTA rör.
- Prov för mikrobiologiska undersökningar bör samlas i sterila rör eller inokuleras i speciellt odlingsmedium enligt det lokala mikrobiologiska laboratoriets rekommendationer.

Det är KVASt-gruppens uppfattning att det samlade provmaterialet - för en optimal bedömning – bör insändas till en och samma mottagare.

II. Anamnestisk remissinformation

Insändaren anger: Hb, LPK, TPK, information om aktuella symtom, förstörade lymfkörtlar, lever, mjälte, om tidigare hematologiska sjukdomar, behandling med cytostatika, strålning och annan medicinering.

Information om resultat av andra relevanta analyser (S-EPO, JAK2, BCR/ABL, cytogenetik etc).

III. Provmottagarens hantering av provet

Vid provets ankomst till laboratoriet bör följande dokumenteras:

- Grovnålsbiopsi: längd i mm.
- Benmärgsaspirat: ungefärlig mängd.
- Blod- och benmärgsutstryk samt imprints: antal glas.

Materialer är ömtåligt och skall snittas av erfaren personal.

IV. Analyser

4.1 På histologiska snitt göres hematoxylin-eosin samt vid behov järnfärgning, retikelfärgning, kollagenfärgning och Giemsa. På benmärgsutstryk och utstryk från perifert blod göres May-Grünwald-Giemsa, på benmärgsutstryk ev järnfärgning.

Flödescytometrisk immunfenotypning utgör numera en väsentlig del av diagnostiken (se nedan). I vissa situationer kan immunfenotypning utföras på snittmaterial med immunohistokemisk teknik.

Vid misstänkt AML kan följande enzymcytokemiska färgningar rekommenderas på utstryksglas alt. cytosplinas: Myeloperoxid (MPO), naftol-AS-D-kloracetateras (NASDCAE), naftol-AS-D-acetateras (NASDAE) med och utan hämning av natriumfluorid (NaF) eller i färdiga kit.

4.2 Flödescytometrisk diagnostik

Eftersom akuta leukemier ofta följs med MRD-undersökning krävs vid diagnos fullständig panel med minst 8-färgsanalys för att möjliggöra MRD uppföljning. Observera att flödescytometrisk immunfenotypning av diagnosprovet ligger till grund för senare MRD-analys. Immunfenotypningen måste därför utföras av ett laboratorium med erforderlig rutin och kompetens av flödescytometrisk MRD-analys. Tolkningen av flödescytometridata måste göras med kännedom om den morfologiska bilden.

Information om standardpaneler finns på www.nopho.org "NOPHO's working group for standardization of flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies".

V. Information i remissens svarsdel samt diagnostiska kriterier för akuta leukemier

5.1 Diagnoskriterier och klassifikation för akuta leukemier

Klassifikationen av akuta leukemier följer WHO-klassifikationen (se VII. Referenser).

5.2 Remissionskriterier

Under induktionsbehandlingen genomgår benmärgen först ett depressionsstadium och därefter en regenerationsfas, vilket kan innebära diagnostiska svårigheter i remissionsbedömningen. Observera svårigheterna att åstadkomma en remissionsbedömning om patienten får behandling med cytokiner (tillväxtfaktorer) (t ex Neupogen).

Samtliga nedanstående kriterier skall vara uppfyllda för komplett morfologisk remission:

- 1) Frånvaro av celler med Auerstav (vid AML).

- 2) < 5 % blaster av antalet kärnförande celler baserat på differentialräkning av minst 500 kärnförande celler.
- 3) Frånvaro av härdformig blastförekomst i snittpreparat oavsett procenttalet leukemiska celler i utstryk. Svårigheter att skilja fokal förekomst av tidiga erythropoetiska celler och regenererande granulopoes från leukemicellshärdar måste uppmärksammas och kan klarläggas med immunhistokemi.
- 4) Regenerering av samtliga poeser (dvs. inte tom märm).

”Measurable residual disease” (MRD) vid akuta leukemier:

Hos majoriteten av alla akuta leukemier kan man med hjälp av flödescytometrisk undersökning vid diagnos identifiera en leukemiasocierad immunfenotyp (LAIP) som sedan kan användas för MRD-uppföljning. Metodens känslighet är hög, en leukemisk cell per 10^3 – 10^4 friska benmärgsceller kan identifieras. Flödescytometrisk undersökning kan i flertalet fall skilja ut regenererande poeser från leukemiska blaster. Variationen i känslighet beror bl.a. på hur mycket leukemins immunfenotyp skiljer sig från normal hematopoes och hur många celler som analyseras.

För vissa leukemier (AML t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*, AML inv(16)(p13q22) / t(16;16)(p13;q22); *CBFB-MYH11* och *NPM1*-muterade leukemier) används i första hand molekylärgenetiska MRD analyser (transkriptanalys med RT-qPCR eller genomisk qPCR).

5.3 Recidivkriterier

Vid recidiv gäller samma kriterier som vid diagnos.

5.4 Information i remissens svarsdel

1. Svaret bör vara utformat enligt mall, förslagsvis enligt nedan, och ska vara kongruent med aktuella WHO-rekommendationer:

Blodutstryk:

Eventuella fynd av intresse noteras.

Benmärgssnitt:

Utbyte av benmärgsprovet. Grovnålsbiopsins längd anges i mm.

För aspirerat snittat material anges utbytet subjektivt som inget/otillräckligt, sparsamt, måttligt, rikligt material.

Cellhalt anges i procent.

Förekomst av härdvisa förändringar (tumörinfiltrat, granulom etc) anges.

Megakaryocyt morfologi (andel i förhållande till cellhalt, distribution, cytologiskt utseende) beskrivs.

Fördelning av granulopoes och erytropoes kommenteras v.b.

Resultat av eventuellt gjord järnfärgning redovisas som positiv eller negativ.

Resultat av eventuellt gjord retikelfärgning respektive kollagenfärgning redovisas.

Benmärgsutstryk:

Bedömning av granulopoes (och monopoes).

Bedömning av erytropoes inklusive bedömning av förekomst av depåjärn och olika typer av sideroblaster.

Bedömning av lymfocyter, plasmaceller och megakaryocyter.

Förekomst respektive frånvaro av märgfrämmande celler.

2. Differentialräkning görs enligt rekommendationer för respektive sjukdomsentitet.

3. Resultat av immunfenotypning redovisas enligt särskilda rutiner (Béné et al nedan).

4. Vid utformning av svar bör man göra en sammanfattning av fynden och ange diagnos. Man bör alltid svara på kliniska frågeställningar. Ge gärna också förslag på ev. kompletterande undersökningar av värde för att diagnosen ska kunna säkerställas.

Diagnoser anges enligt aktuella klassifikationer för respektive sjukdomsgrupper enligt aktuell WHO-klassifikation.

VI. Rekommendation för utformning av diagnostext

Diagnos enligt aktuell WHO klassifikation och lokal skall anges.

VII. Referenser

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391-405

Blood and Bone Marrow Pathology, 2nd Edition, 2011, Churchill Livingstone

Authors: Anna Porwit Jeffrey McCullough Wendy Erber

eBook ISBN: 9780702045356 , eBook ISBN: 9780702058035

Hardcover ISBN: 9780702031472

Hematopathology. 2nd Edition, 2016, Elsevier

Authors: Elaine Jaffe Daniel A. Arber Elias Campo Nancy Lee Harris Leticia Quintanilla-Fend

eBook ISBN: 9780323388726 , eBook ISBN: 9780323388719

Hardcover ISBN: 9780323296137

Knowles Neoplastic Hematopathology 3rd Edition , 2013, LWW

by Attilio Orazi, Kathryn Foucar, Daniel M. Knowles, Lawrence M. Weiss

ISBN-10: 9781609136826, ISBN-13: 978-1609136826

Kvasnicka HM, Beham-Schmid C, Bob R, Dirnhofer S, Hussein K, Kreipe H, Kremer M, Schmitt-Graeff A, Schwarz S, Thiele J, Werner M, Stein H. Problems and pitfalls in grading of bone marrow fibrosis, collagen deposition and osteosclerosis - a consensus-based study. *Histopathology*. 2016 May;68(6):905-15

S-H Lee et al. (2008). ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 30, 349-364

Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, Metzeler KH, Schwind S, Wu YZ, Kohlschmidt J, Pettenati MJ, Heerema NA, Block AW, Patil SR, Baer MR, Kolitz JE, Moore JO, Carroll AJ, Stone RM, Larson RA, Bloomfield CD. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012 Dec 20;30(36):4515-23

Multiparameter flow cytometry in the diagnosis of hematologic malignancies. Porwit A and Béné M. C. (eds), Cambridge University Press, Cambridge, 2018, ISBN 978-1-107-50383-0

Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné MC, Buccisano F, Cloos J, Grimwade D, Haferlach T, Hills RK, Hourigan CS, Jorgensen JL, Kern W, Lacombe F, Maurillo L, Preudhomme C, van der Reijden BA, Thiede C, Venditti A, Vyas P, Wood BL, Walter

RB, Döhner K, Roboz GJ, Ossenkoppele GJ. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018 Mar 22;131(12):1275-1291

WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues,
WHO Classification of Tumours, Revised 4th Edition, Volume 2
Edited by Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J
IARCC, 2017, ISBN-13 (Print Book) 9789283244943

VIII. Administrativt

SNOMED-koder för registrering av akuta leukemier: se KVASt-gruppens SNOMED-lathund

IX. Aktuella vårdprogram

Vuxna patienter: www.sfhem.se/filarkiv

Barn: www.nopho.org (tillgänglig endast för medlemmar)