www.medicalsystems.it

ISSN 0394 3291

Caleidoscopio
Italiano

Responsabile scientifico
Sabrina Buoro

La Diagnostica Ematologica di Laboratorio:

Gestione delle Linfocitosi e Applicazioni Cliniche dei Conteggi in Automazione

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

241

... il futuro ha il cuore antico

MEDICAL SYSTEMS SpA

Tariffa R.O.C.: "Poste Italiane S.p.a. - Sped. in A.P. - D.L. 353/2003, (conv. in L. 27/02/2004 n. 46) art. 1 comma 1, DCB Genova" - n° 241 Giugno 2021 - Dir. resp.: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Nuova AATA - Genova

Caleidoscopio
Italiano

Responsabile scientifico
Sabrina Buoro

Autori
Luca Germagnoli, M. Scapaticci, A. Bartolini, L. Bonato, G. Da Rin, Annalisa Modenese, Alessandra Fanelli, Alessandra Mongia, Sara Ciullini Mannurita, Alessandra Marini

La Diagnostica Ematologica di Laboratorio:

Gestione delle Linfocitosi e Applicazioni Cliniche dei Conteggi in Automazione

241

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

... il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SpA

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

INFORMAZIONI GENERALI. Caleidoscopio pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'International Committee of Medical Journal Editors. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

TESTO. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte ovvero 100-130.000 caratteri (spazi inclusi). Si invita a dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi.

TABELLE E FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

UNITÀ DI MISURA. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. I files del testo in formato .doc oppure .rtf, delle fotografie, dei grafici e delle figure in formato .jpeg con una risoluzione di almeno 240 dpi devono essere spediti per posta elettronica al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista Caleidoscopio rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41).

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al seguente indirizzo e-mail: rahp80@yahoo.it

Editoriale[1]

Questo volume raccoglie i contributi dell'omonimo Convegno tenutosi ad Acqui Terme venerdì 21 Febbraio 2020.
Data storica perché lo stesso giorno nel nostro ospedale (provincia di Bergamo, di oltre 1,1 milioni di abitanti) è stato identificato il primo caso documentato di un paziente con una infezione virale causata da SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) l'agente responsabile dei primi casi di polmonite di origine sconosciuta a Wuhan, una delle manifestazioni della malattia poi denominata COVID-19.
Pertanto questo volume ha un valore non solo storico ma anche simbolico e rimarrà nella mente di tutti. Questo, fu l'ultimo convegno in presenza che si tenne perché, subito dopo la conclusione, al rientro, si era già diffusa la notizia del caso identificato. Immediatamente i convegnisti si trovarono catapultati in una nuova inaspettata realtà e sebbene già durante il convegno scambiavano opinioni, idee e notizie su quanto trapelava dalla Cina il giorno dopo dovettero fare fronte ad uno scenario che non era stato certamente previsto.
Il rapido aumento dei casi positivi aveva provocato da un lato un diffuso panico tra la popolazione e dall'altro la necessità di profonde riorganizzazioni strutturali e logistiche dell'Ospedale Papa Giovanni XXIII. In questo contesto, si inseriva la necessità di disegnare il ruolo del laboratorio. A partire da sabato 22 febbraio, metà del reparto di malattie infettive è stato dedicato ai pazienti COVID-19, spostando 24 pazienti non COVID-19 in altre unità mediche dello stesso ospedale o dimettendoli. Il 23 febbraio si è capito che questa riconversione non era sufficiente e ogni 48 ore, è stata allestita una nuova

1S. Tratto da: Buoro, F. di Marco, M. Rizzi, F. Fabretti, F.L. Lorini, S. Cesa, et al.Papa Giovanni XXIII Bergamo Hospital at the time of the COVID-19 outbreak: letter from the warfront. Int J Lab Hematol. (2020), 10.1111/ijlh.13207

unità da 48 posti letto, trasferendo fuori dall'ospedale i pazienti non COVID-19. In modo rapido e tremendamente organizzato, sono state smantellate diverse unità medico-chirurgiche per creare unità dedicate COVID-19. Oltre il 35% del personale medico è stato reclutato e formato appositamente per essere completamente dedicato alle unità COVID-19. Contemporaneamente, l'ospedale ha aumentato il numero di posti letto per unità di terapia intensiva (ICU) dall'unità inizialmente dedicata a 8 posti letto a 88 posti letto. Questo scenario richiedeva al laboratorio di ematologia un adattamento obbligato. Si è registrata una progressiva riduzione dei test richiesti per i pazienti ambulatoriali rispetto ai ricoverati a causa del COVID-19. Il laboratorio svolge un ruolo essenziale nella diagnosi, anche precoce, nella gestione, nel follow-up e nella prognosi di molte malattie e la diagnosi insieme alla gestione dei pazienti con COVID-19 non fanno eccezione a questo paradigma; infatti, i test di diagnostica molecolare consentono l'identificazione diretta del virus a RNA, mentre la rilevazione di anticorpi specifici per il COVID-19 è la pietra angolare della sorveglianza sierologica. Era urgente identificare i predittori clinici e di laboratorio che consentissero la valutazione del rischio, i percorsi clinici più appropriati e l'ottimizzazione dell'allocazione delle risorse. A quel tempo, erano disponibili poche e contraddittorie informazioni sui test di laboratorio come i parametri dell'emocromo completo (CBC). Dati sui parametri più innovativi dell'emocromo non erano disponibili. Questo fu solo uno dei nostri impegni descritti dettagliatamente in altra sede. Tutto questo fu fatto garantendo la sicurezza del personale e facendo riferimento ai documento dell'OMS.

Questa esperienza ha sottolineato, semmai fosse stato necessario, l'importanza di rafforzare la cooperazione e le reti nazionali e internazionali per la condivisione dei dati e delle tecnologie dei big data in una prospettiva multidisciplinare in una situazione dove il fattore tempo è il fattore chiave per salvare quante più vite possibili.

Inquadramento delle linfocitosi

Luca Germagnoli

La gestione clinica delle linfocitosi periferiche richiede obbligatoriamente il supporto di un'attenta valutazione morfologica dei preparati da sangue periferico e midollare, attività quest'ultima di difficile governo da parte dello specialista di Medicina di Laboratorio a causa della frequente sovrapposizione dei quadri morfologici e, quindi, delle situazioni di diagnosi differenziale. L'osservazione e l'interpretazione della morfologia al microscopio ottico rappresenta tuttora lo strumento diagnostico fondamentale nonostante gli enormi avanzamenti tecnologici delle metodiche in cito-fluorimetria ed in genetica molecolare avvenuti negli ultimi decenni. L'importanza diagnostica della morfologia cellulare è ribadita con forza nell'ultima edizione della classificazione WHO delle patologie ematologiche (1). L'osservazione microscopica, infine, per il suo costo ridotto e per la limitata necessità tecnologica, rappresenta ancora oggi l'ideale strumento di screening.

La classificazione WHO è il risultato di un processo di consenso multidisciplinare tra differenti professionisti della sanità al fine di conferire ordine ed omogeneità ad un'area clinica estremamente complessa ed eterogenea attraverso:

- Il coinvolgimento di tutti gli specialisti sanitari coinvolti, cioè gli specialisti clinici (oncologi ed ematologi), di medicina di laboratorio (esperti in morfologia, immunologi e genetisti) e di anatomia patologica

- L'inclusione delle informazioni cliniche rilevanti comparse in letteratura scientifica negli ultimi anni con implicazione di tipo diagnostico, prognostico e terapeutico,

- Il raggiungimento di un compromesso necessario all'utilizzo clinico ed alla pratica di ricerca

Lo schema di classificazione WHO nella sua 4° revisione pubblicata nel 2016 pone ancora molta rilevanza alla morfologia, ma indirizza in modo puntuale ad una collaborazione sempre più stretta ed ampia con le tecniche di genetica medica, evidenziando specifici marcatori genetici come criteri diagnostici, fattori disease-defining e predittivi e di prognosi.
WHO 2016 presenta molti esempi di stretta correlazione tra dati genetici ed indicazioni morfologiche/anatomopatologiche. Ad esempio:

- Mutazione BRAF V600E, presente virtualmente in tutti i pazienti affetti da Hairy Cell Leukemia, esempio di impatto di un marcatore genetico

nel processo diagnostico di processo linfoproliferativo con cellule a contorno citoplasmatico irregolare. La scoperta di questa mutazione ha portato, inoltre, alla messa a punto di farmaci specifici (BRAF inibitori) con impulso alla pratica di medicina personalizzata,

- Mutazione MYD88 L265P, presente nella parte dei casi di Macroglobulinemia di Waldestrom e di linfoma linfoplasmocitico.

- Traslocazioni di MYC [t(8;14), t(2:8), t(8:22)], caratteristiche in caso di Burkitt lymphoma "classico" nelle tre forme epidemiologiche, endemica, sporadica e associata a immunodeficienza/HIV,

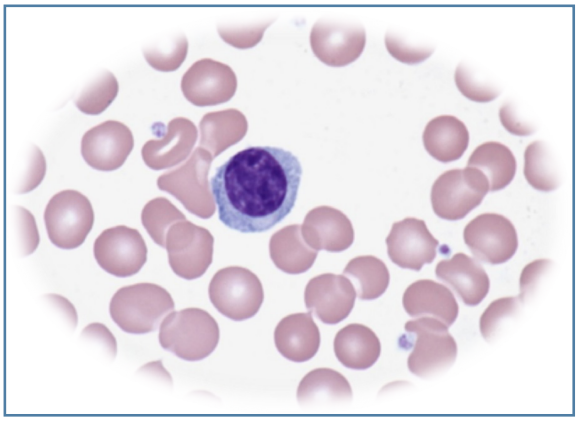


Figura 1. Elemento da linfoma linfoplasmocitico.

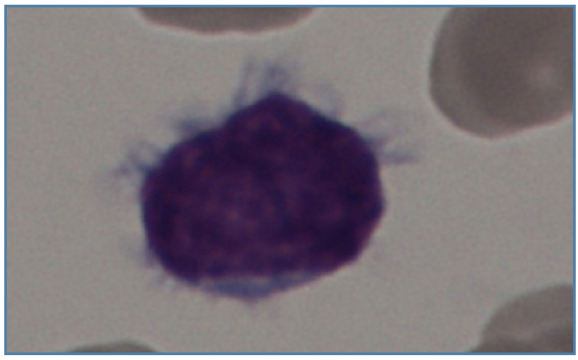


Figura 2. Elemento linfocitario da Hairy Cell Leukemia.

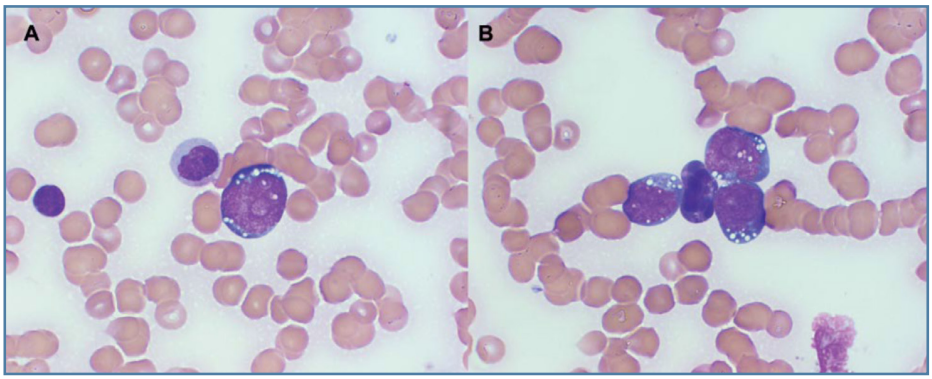
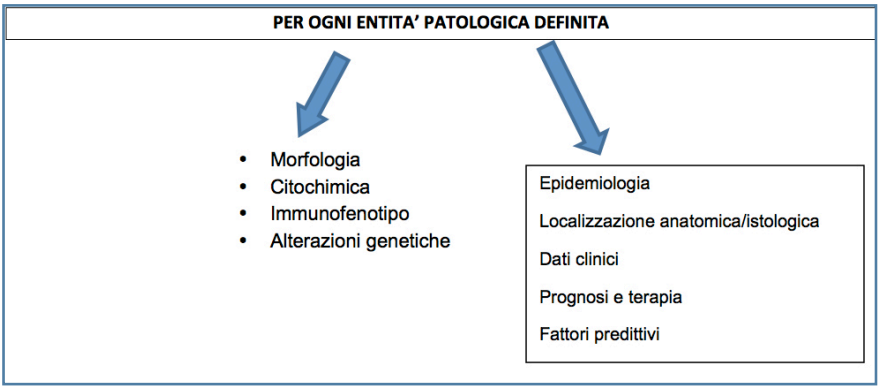


Figura 3. Elementi linfocitari da Burkitt lymphoma.

Seguendo l'impostazione concettuale delineata, lo schema WHO classifica le forme patologiche in entità il più possibile definite e distinte, non sovrapposte, con indicazione del lineage cellulare di origine. Per ogni entità patologica, quindi, viene in primo luogo definita l'origine cellulare (cellula "normale" di origine e la sua localizzazione fisiologica), le caratteristiche distintive di diagnosi di laboratorio ed i parametri epidemiologici clinici utili all'inquadramento.



La classificazione WHO fornisce, inoltre, una serie di indicazioni procedurali relative all'esecuzione del prelievo di sangue midollare e all'allestimento dei preparati ematologici, anche da sangue periferico, fornendo nel contempo alcune indicazioni di natura pre-analitica. In particolare è necessario mantenere tempi rapidi tra il prelievo e la preparazione degli strisci ematici. Questa indicazione procedurale è soprattutto vera nel caso dell'analisi morfologica delle apposizioni da sangue midollare, ma si applica allo stesso modo agli

strisci da sangue periferico. WHO indica in 2 ore il tempo oltre il quale la morfologia cellulare non è più adeguata per una corretta indicazione diagnostica.
L'importanza di una corretta conservazione dei materiali biologici e l'occorrenza di caratteristiche alterazioni morfologiche in caso essa non sia assicurata sono spesso ricordate in letteratura (2). Uno studio personale ha evidenziato la comparsa di varie alterazioni morfologiche nucleo/citoplasmiche a carico di tutti gli elementi figurati del sangue periferico.
Di seguito alcune immagini esemplificative.

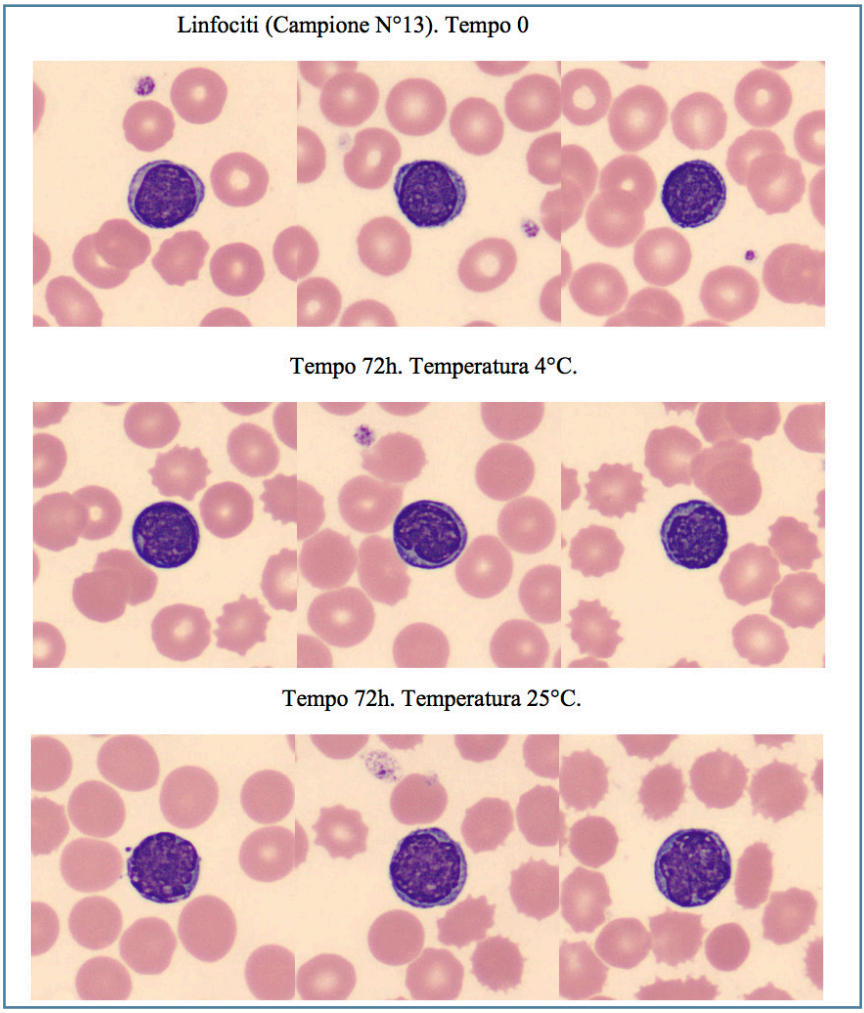
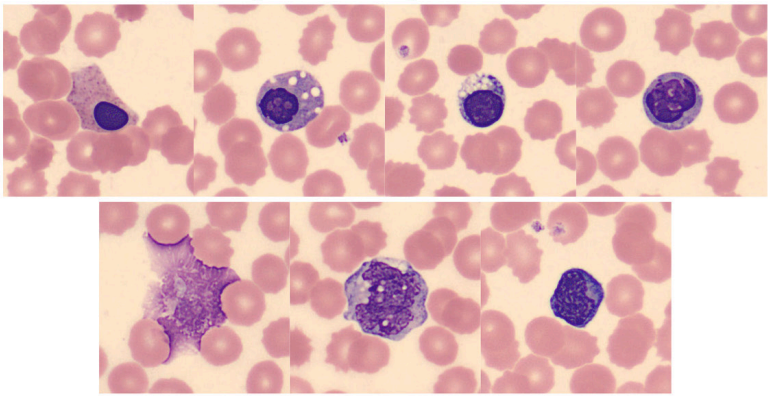


Figura 4. Alterazioni linfocitarie. Si nota la comparsa di note di attivazione nucleo-citoplasmatiche

Campione N°13

Elementi cellulari non classificabili

Tempo 72h. Temperatura 4°C.



Tempo 72h. Temperatura 25°C.

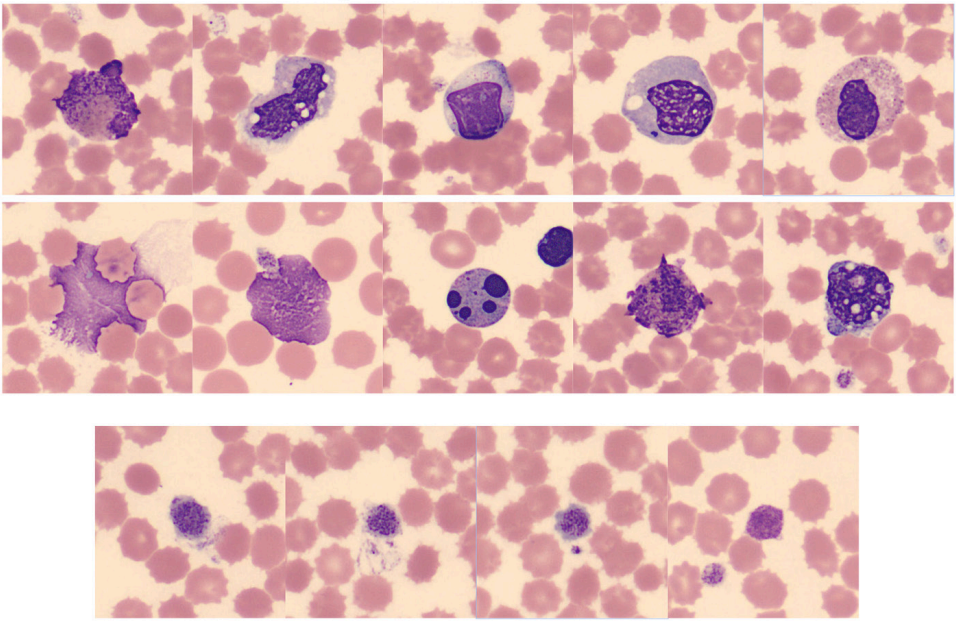


Figura 5. Alterazioni cellulari con comparsa di elementi cellulari non classificabili

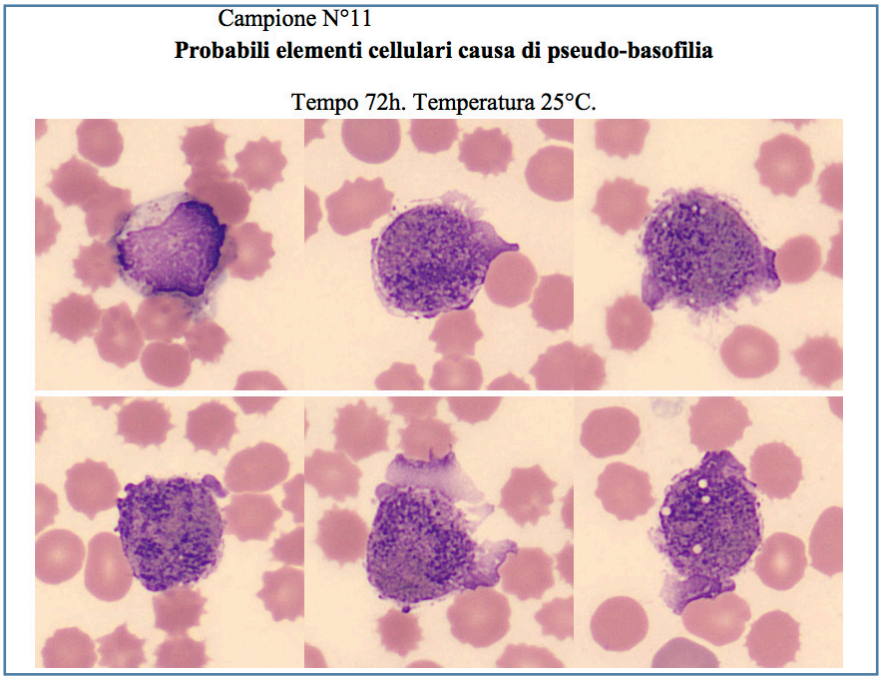


Figura 6. Alterazioni cellulari con comparsa di forme causa di pseudo-basofilia

Di seguito sono riportate alcune indicazioni procedurali relative alla preparazione e colorazione dei preparati da sangue periferico.
L'anticoagulante EDTA rappresenta la molecola di prima scelta in ematologia ed è prescritto da Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (3); altri tipi di molecole anticoagulanti sono indicate in alcune situazioni particolari e tra queste è di rilevanza clinica per la sua frequenza la pseudo-piastrinopenia da anticoagulante.

ALLESTIMENTO MANUALE DEI PREPARATI DA SANGUE PERIFERICO ("STRISCIO").

- Con una pipetta pasteur monouso porre una piccola goccia di sangue (pochi μl) sul vetrino portaoggetti,
- Posizionare il vetrino copri-oggetto sulla goccia in modo che il sangue si disponga uniformemente sul lato e con angolazione pari a 40-45°,
- Spostare rapidamente il vetrino copri-oggetto in direzione opposta,
- Lo spessore dello striscio influenza la bontà della colorazione e gli strisci devono essere colorati entro 2 ore dal prelievo

Gli strisci dimenticati tendono ad assumere colore azzurro di fondo e presentano spesso artefatti eritrocitari.

Secondo le indicazioni fornite dal documento CLSI H20-A2 (3) uno striscio di accettabile qualità deve offrire:

- sufficiente area di osservazione,
- lunghezza minima pari a 2.5 cm e terminare ad almeno 1 cm dal bordo del vetrino,
- la graduale transizione dalle zone spesse a quelle sottili
- dimensioni inferiori a quelle del vetrino per consentire in tutte le sue parti l'osservazione in olio per immersione

Scegliere l'area di osservazione in modo che vi sia minima distorsione di distribuzione cellulare e minimi artefatti morfologici; l'area migliore per eseguire la formula leucocitaria è spesso quella in cui gli eritrociti si toccano senza sovrapporsi, mostrando una conservazione ottimale delle loro caratteristiche.

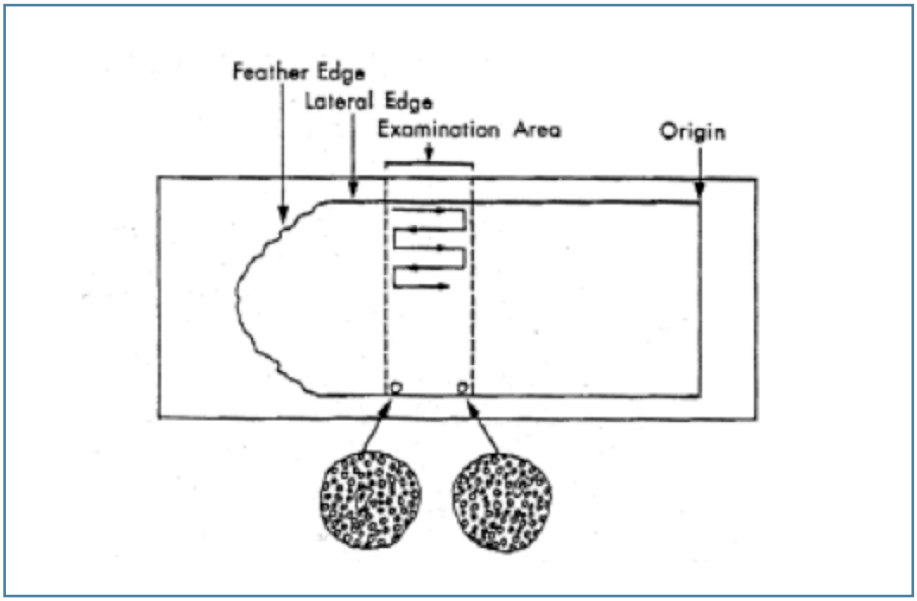


Figura 7. Area di osservazione microscopica in uno striscio secondo quanto indicato da CLSI.

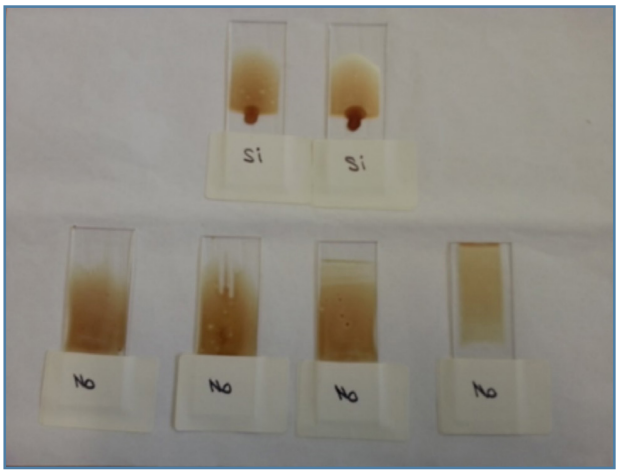


Figura 8. Alcuni esempi di strisci manuali.

COLORAZIONE DEI PREPARATI DA SANGUE PERIFERICO ("STRISCIO").
Può essere utilizzata una metodica del tutto analoga a quella descritta per le apposizioni midollare. Utilizzare soluzioni di Giemsa a pH 6,8 e colorare in May-Grunwald per 5 minuti ed in Giemsa per 10 minuti.
Indipendentemente dal metodo scelto, è molto importante ricordare che il pH delle soluzioni di colorazione è di fondamentale importanza per la corretta resa tintoriale dei differenti componenti cellulari.
La corretta conservazione dei materiali biologici e la corretta preparazione e colorazione degli strisci d sangue midollare sono, infine, necessari al fine di identificare e quantificare gli elementi blastici e blasti-equivalenti (promielociti e promonociti) e di evidenziare gli aspetti di dismielopoiesi (disgranulocitopoiesi, diseritropoiesi displasia piastrinica) eventualmente presenti. Questi aspetti morfologici sono importanti ai fini di screening di malattia ematologica e devono essere sempre identificati e quantificati. Le medesime attenzioni procedurali sono necessarie anche per la corretta identificazione delle alterazioni morfologiche degli elementi linfatici, caratteristiche dei processi linfoproliferativi.
Al fine di correttamente preparare l'esame microscopico è necessario acquisire tutte le informazioni rilevanti al corretto inquadramento del paziente. È di assoluta importanza per lo specialista di Medicina di Laboratorio interfacciarsi con i colleghi clinici, acquisendo sempre:

- Quesito diagnostico dettagliato,
- Informazioni cliniche (carenze vitaminiche, bilancio marziale, altro),

- Eventuali terapie in corso (fattori di crescita, immunosoppressori, cortisonici, altro),

- Informazioni obbiettive (epatomegalia, splenomegalie, linfo-adenomegalie, lesioni cutanee, altro),

- Esiti degli esami di laboratorio pertinenti, essenziale è l'interpretazione critica dell'esame emocromocitometrico completo di formula leucocitaria. A questo riguardo è fondamentale che gli operatori di ogni laboratorio conoscano a fondo le prestazioni analitiche e cliniche dei propri strumenti ematologici e degli allarmi numerici e morfologici forniti dagli stessi. Allo stesso modo è necessario che i criteri e le regole che determinano l'esecuzione degli strisci siano validati e personalizzati sulla base degli analizzatori utilizzati e dello specifico "case mix" prevalente nella sede clinica.

L'importanza della conoscenza delle terapie in atto è esemplificata dalla formazione di elementi granulocitari pseudo-Pelger in corso di terapia con Tacrolimus (figura 5, da ref.4).

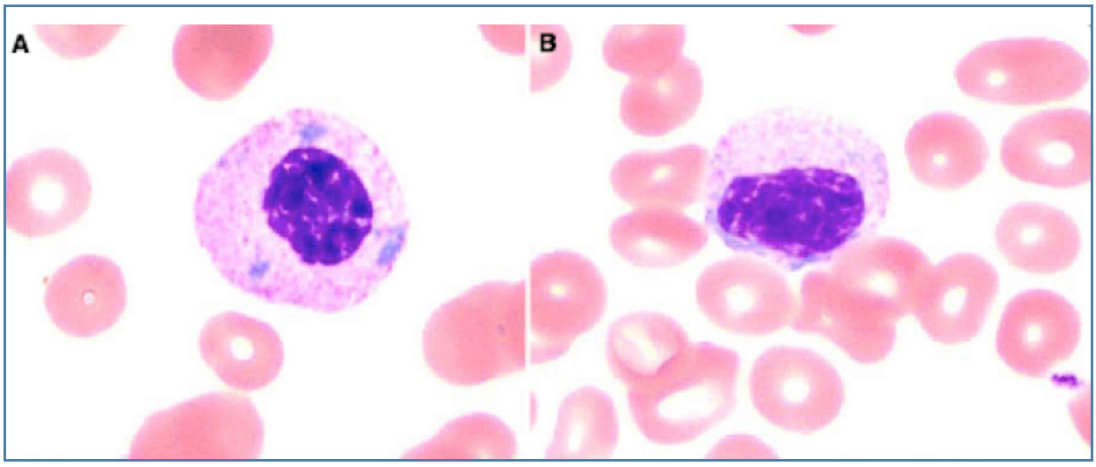


Figura 9. Elementi granulocitari pseudo-Pelger in un paziente in terapia con Tacrolimo (da ref.4).

La WHO 2016 definisce numerose entità patologiche in ambito linfatico. Nelle pagine seguenti sono riportati alcuni esempi con riferimento ai quadri morfologici che più frequentemente si possono incontrare all'osservazione degli strisci ematici.

Processi linfoproliferativi acuti.

- B-lymphoblastic leukemia/lymphoma (B-ALL/LBL): proliferazione di precursori linfatici B; si tratta di blasti di piccole/medie dimensioni, scarso citoplasma privo di granulazioni, cromatina moderatamente dispersa, nucleoli assenti o poco evidenti. Raro interessamento di siti nodali ed extra-nodali

- Linfoma (LBL): processo linfoproliferativo confinato a masse generalmente senza interessamento periferico e midollare

- T-ALL: come forma B, oppure interessamento primario del timo o nodale (T-LBL)

La condizione di Leucemia acuta viene definita in caso di blasti midollari > 25% della popolazione nucleata; è da notare che, a differenza del lineage mieloide, esiste minore accordo riguardo la definizione del cut-off della conta dei blasti diagnostico per patologia.

All'interno dei processi neoplastici acuti la WHO 2016 evidenzia le seguenti forme patologico/cliniche:

- B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS ("not otherwise specified") ad indicare le forme non caratterizzate da alterazioni genetiche specifiche e ricorrenti.
- B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities:

La distinzione di alcune entità genetiche è arbitraria, ma le alterazioni scelte sono associate a quadri distintivi per clinica, caratteristiche immunofenotipiche e rilievi diagnostici e prognostici entità biologicamente distinte e mutualmente esclusive:

- B-LL/L con t(9;22) (q34.1;q11.2); BCR-ABL1
- B-LL/L con t(v;11q23.3); KMT2A
- B-LL/L con t(12;21); ETV6-RUNX1
- B-LL/L con iperdiploidia
- B-LL/L con ipodiploidia
- B-LL/L con t(5;14); IGH/IL3
- B-LL/L con t(1;19);TCF3-PBX1
- B-LL/L BCR-ABL 1 like è entità provvisoria in WHO 2016 priva di traslocazione BCR-ABL1, ma pattern genetico simile
- B-LL/L con iAMP21 è entità provvisoria , amplificazione intra-cromosomale del cromosoma 21
- T-LL/L

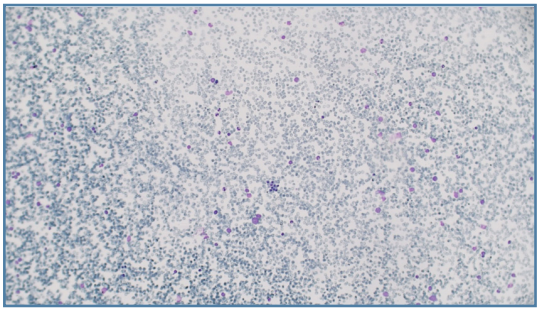


Figura 10. B-ALL, piccolo ingrandimento.

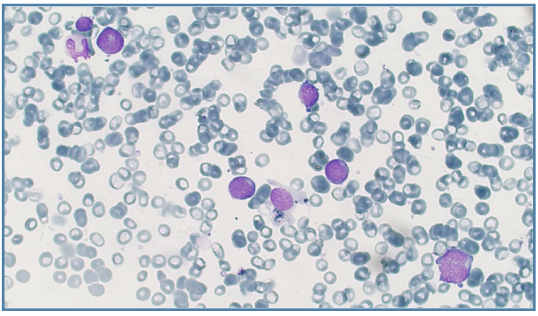


Figura 11. B-ALL

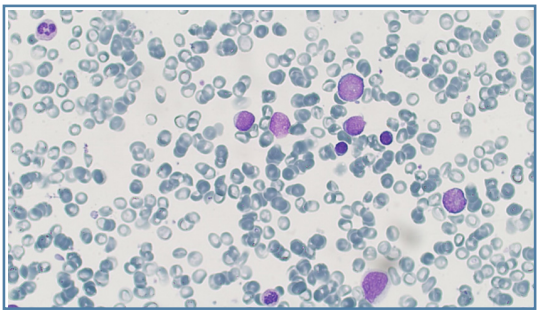


Figura 12. B-ALL.

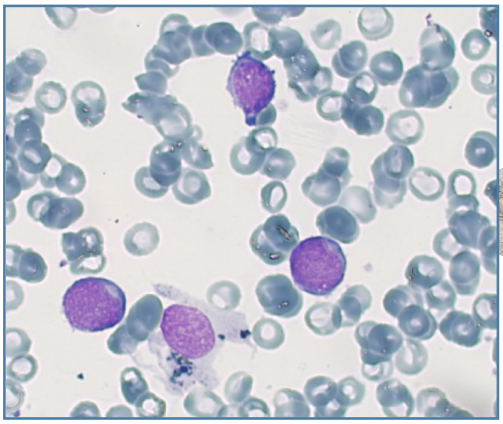
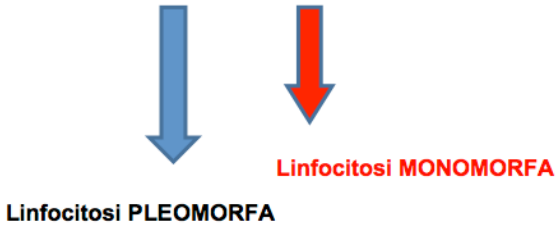


Figura 13. B-ALL.

APPROCCIO AL PAZIENTE CON LINFOCITOSI (5).

- Esame emocromocitometrico ed analisi degli allarmi numerici e dei flags morfologici e di popolazione,
- Striscio ematico e lettura in microscopia ottica ricordare sempre l'importanza della qualità dello striscio, della colorazione e della lettura standardizzata del preparato, questi aspetti sono definiti da specifiche linee-guida reperibili in letteratura internazionale,
- Distinzione morfologica tra linfociti rettivi ed elementi di tipo atipico, indicativi di un processo linfoproliferativo
- Se necessario esecuzione di biopsia osteo-midollare, analisi numerica e qualitativa dei preparati per apposizione

Il passo fondamentale è rappresentato dalla distinzione morfologica al microscopio ottico tra i linfociti REATTIVI ed ATIPICI



Il giudizio relativo alla eventuale omogeneità morfologica deve essere posto con la valutazione di tutti gli aspetti di morfologia cellulare (4). Analisi di:

- Dimensioni e forma della cellula
- Quantità ed aspetto del citoplasma (basofilia, omogeneità della colorazione, evidenza del complesso di Golgi, presenza di eventuali granulazioni)
- Dimensioni e forma del nucleo
- Caratteristiche della cromatina nelle sue affinità tintoriali e compattezza
- Presenza e numero di nucleoli

In termini generali ed esemplificativi si osservano elementi linfocitari con dimensioni medie/grandi (più spesso dimensioni maggiori a quelle dei linfociti normali), citoplasma più spesso aumentato. Frequenti sono le alterazioni morfologiche del contorno citoplasmatico e del nucleo; frequente è la comparsa di nucleoli.
Con l'esperienza il processo descritto diventa automatico ed analogo a quanto avviene naturalmente e automaticamente nel riconoscimento di un viso.
Esistono sicuramente eccezioni a questa generalizzazione morfologica, ma molte di queste sono in realtà solo apparenti, ad esempio, come accade in diagnosi differenziale tra linfoma di Burkitt (ed alcune leucemie acute) e linfocitosi reattiva.

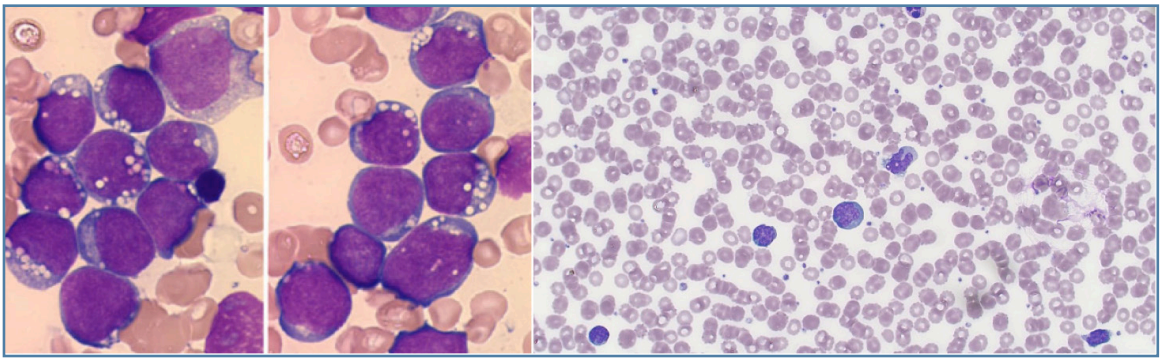


Figura 14. Burkitt lymphoma (SX) e linfociti reattivi (DX)

Linfocitosi pleomorfa – Linfociti reattivi

Importante eterogeneità cellulare- possibili variazioni morfologiche:

- Aumento dimensionale e variazioni di forma della cellula
- Aumento della basofilia del citoplasma
- Anisocromia della basofilia citoplasmatica
- Comparsa di vacuoli
- Centrosoma evidente
- Comparsa di granulazioni
- Azzollamento della cromatina
- Maggiori dimensioni ed eterogeneità del nucleo
- Comparsa di nucleoli, spesso

La morfologia cellulare varia anche in modo notevole in seguito a stimoli immunologici differenti.
Elementi linfatici reattivi possono comparire in seguito a svariate situazioni e tra le più frequenti sono le infezioni batteriche e, soprattutto, virali. Tra queste ultime l'infezione più frequente è sostenuta dal virus Epstein-Barr (EBV, nel 50-90%) seguita da HHV6 (Human Herpesvirus 6, nel 9%) e CMV (nel 5-7%). Descritti anche Herpes Simplex 1, HIV, Adenovirus, Toxoplasma (6).
In diagnosi differenziale con quadri morfologicamente simili, e quindi nella distinzione tra proliferazione linfocitaria pleomorfa e monomorfa, è nuovamente importante il puntuale rapporto con il medico clinico detentore del quadro clinico presentato dal paziente. In letteratura sono reperibili rassegne cliniche relative a questo argomento.

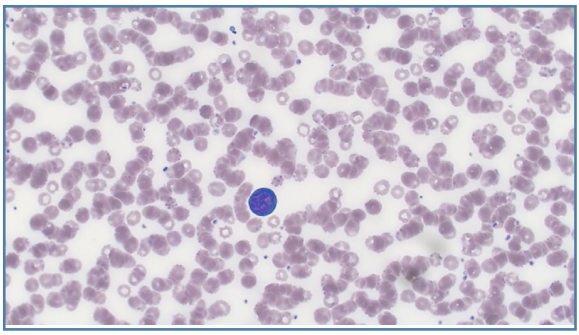


Figura 15. Elemento linfatico reattivo.

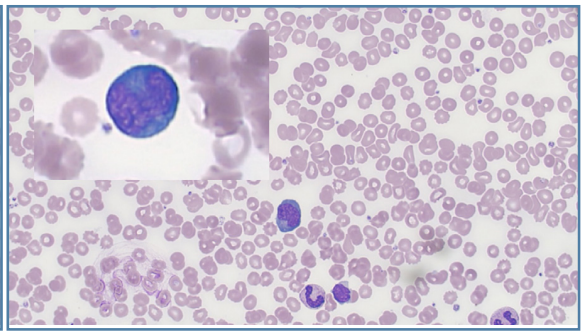


Figura 16. Elementi linfatici reattivi a differente ingrandimento.

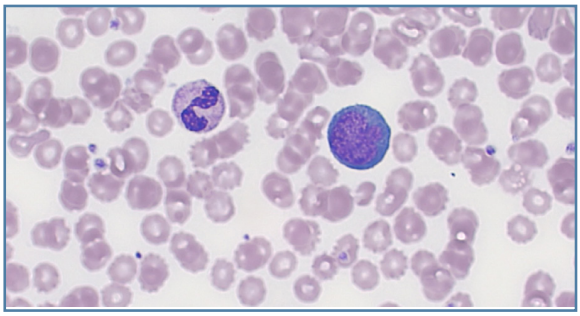


Figura 17. Immagine di quadro reattivo.

Linfocitosi monomorfa.

- Linfocitosi a piccole cellule, elevato rapporto nucleo citoplasmatico, scarso citoplasma generalmente privo di granulazioni, nuclei a contorno regolare, cromatina addensata, privo di nucleoli:

  - Leucemia linfatica cronica (CLL)/linfoma linfocitico a piccole cellule (SLL): di frequente riscontro, più spesso in età adulta e anziana, deve essere presente una linfocitosi monoclonale B con conta $\geq 5x10^9/L$, morfologia tipica. Sono spesso presenti elementi più atipici (maggiori dimensioni, contorni irregolari e nucleo con cromatina meno compatta), ma sempre in percentuale inferiore al 15% della popolazione linfatica.

    Possono essere osservati casi caratterizzati dalla presenza in maggiore percentuale di elementi con queste caratteristiche morfologiche, eventualmente con evidenza di nucleoli, definite CLL atipiche.

    L'osservazione di prolinfociti > 55% definisce la Leucemia Prolinfocitica B; il prolinfocita è descritto come una cellula a maggiori dimensioni, citoplasma più abbondante, nucleo regolare con evidente singolo nucleolo in assenza di evidenti alterazioni morfologiche.

  - Alcune forme di Linfoma Mantellare

  - MBL ("Monoclonal B Lymphocytosis")

MBL, si tratta di entità caratterizzata da linfocitosi monoclonale B con conta $< 5x10^9/L$ in assenza di linfoadenopatia, organomegalia, altre masse extra-midollari o altre manifestazioni di disordine linfoproliferativo □ WHO cancella l'opzione di diagnosi di CLL con linfociti monoclonali $< 5x10^9/$, anche in presenza di citopenia/e o sintomi correlati a malattia (3, Blood 127: 2375;

2016, Swerdlow et al):

- Diagnosi immunofenotipica in paziente generalmente asintomatico, 3 possibili assetti immunologici
    - CLL tipico, CD5, CD23, CD20dim; rappresenta il 75% dei casi; frequente nella popolazione generale con incidenza crescente con l'età
    - CLL atipico, CD5, CD20bright
    - Non-CLL, CD5neg (CD5dim nel 20% dei casi), CD20
- Virtualmente tutti i casi di CLL sono preceduti da MBL, ma non tutte le MBL evolvono in CLL

E' importante ricordare che non tutti i cloni MBL hanno il medesimo comportamento clinico e prognostico ed è obbligatorio differenziare i paziente in base all'entità della popolazione monoclonale:

- Low-count MBL se conta < $0{,}5x10^9$/L, ridotta propensione ad evolvere in franca neoplasia
- High-count MBL se conta ≥ 0,5x109/L, biologicamente non distinguibile da CLL Rai 0 e progressione a CLL con rate annuale pari a 1-2% dei casi

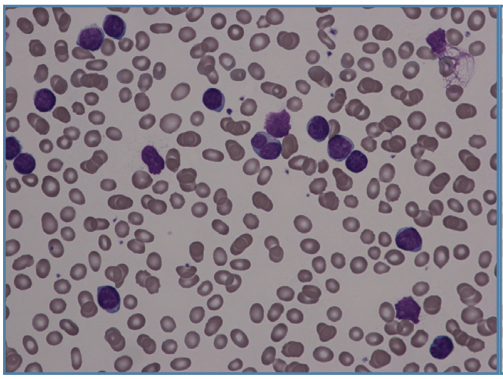


Figura 18. CLL. Presenza di linfocita binucleato e di 2 ombre di Gumprecht

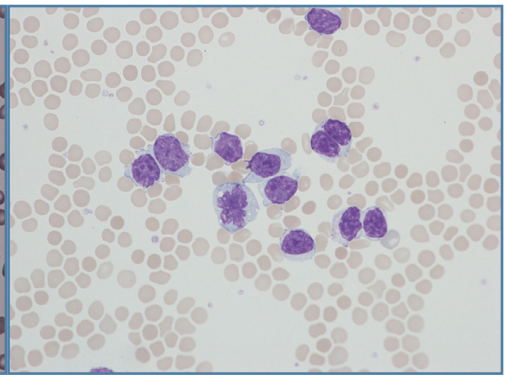


Figura 19. CLL. Presenza di elementi a morfologia atipica.

Leucemia prolinfocitica a cellule T (T-PLL).

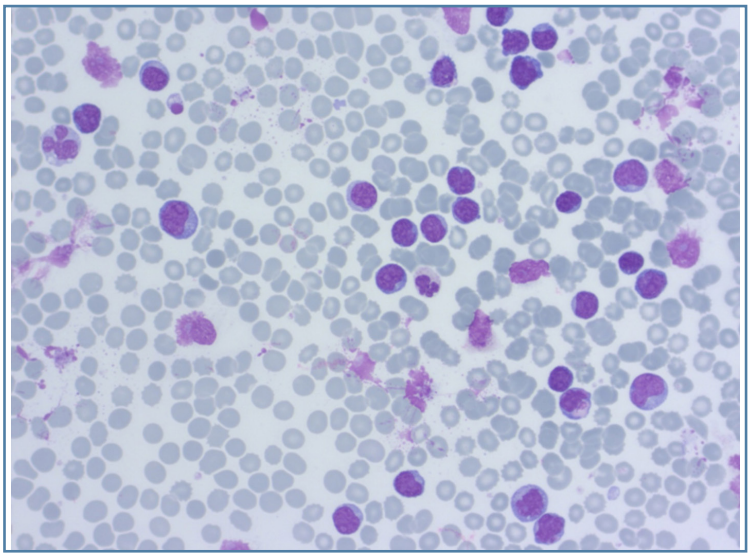


Figura 20. Leucemia prolinfocitica, cellule T, sangue periferico. Predominanza di prolinfociti, elementi linfatici di dimensioni medie, citoplasma debolmente basolfilo, generalmente privo di granuli, nucleo più spesso rotondo/ovale con cromatina addensata ed evidente/i nucleolo/i. Il nucleo può essere a contorno irregolare.

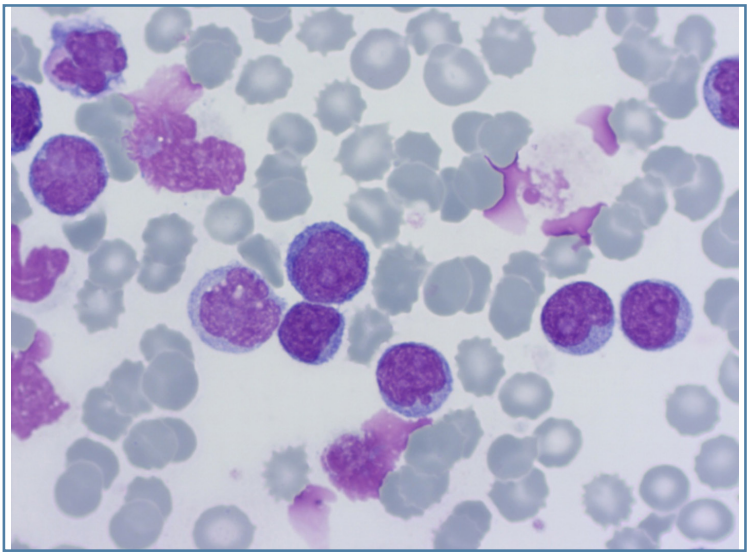


Figura 21. Leucemia prolinfocitica, cellule T, sangue periferico. Prolinfociti a maggiore ingrandimento.

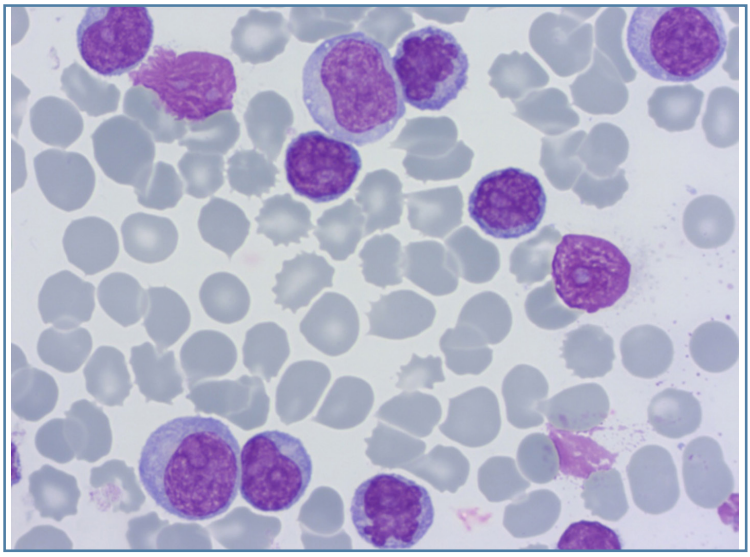


Figura 22. Leucemia prolinfocitica, cellule T. sangue periferico. Prolinfociti a maggiore ingrandimento.

Leucemia prolinfocitica, linfociti T.

È forma rara, circa il 2% di tutti i casi di leucemia linfocitica matura, è più frequente nella popolazione di media età (età media 65 anni), rara in età <30 anni.

È forma clinicamente aggressiva con epatosplenomegalia e linfoadenopatia periferica all'esordio, presenza di lesioni cutanee frequenti.
Alla diagnosi sempre anemia e piastrinopenia ed importante linfocitosi assoluta (> 100 x109/L)

Morfologia più variabile rispetto alla forma, più frequente, di origine B
Citoplasma basofilo, privo di granulazioni, nucleo più spesso rotondeggiante o ovale

Dal punto di vista morfologico si hanno frequenti forme varianti:
- variante a piccole cellule (linfociti di piccole dimensioni, nucleolo non evidente), nel 25% dei casi
- variante cerebriforme (contorno nucleare irregolare, anche cerebriforme), nel 5% dei casi

Fenotipo: CD2+, CD5+, CD3+, CD7+, CD52+.
Nel 60% dei casi CD4+, CD8-, nel 25% dei casi co-espressione CD4 e CD8, molto tipica di T-PLL, 15% CD4-, CD8+

Forma clinicamente aggressiva con sopravvivenza media pari a 1-2 anni.

Linfocitosi monomorfa.

- Linfocitosi con nuclei con contorno irregolare (clivato/indentato, ripiegato)

  - Infezione da Bordetella Pertussis, più frequente nei bambini, sintomatologia classica, linfocitosi anche severa, diagnosi supportata dal quadro sierologico.
    Linfociti monomorfici di aspetto maturo, citoplasma abbondante e basofilo, nucleo profondamente clivato in assenza di alterazioni morfologiche evidenti.
    Si tratta di linfocitosi monomorfa, ma di tipo reattivo.

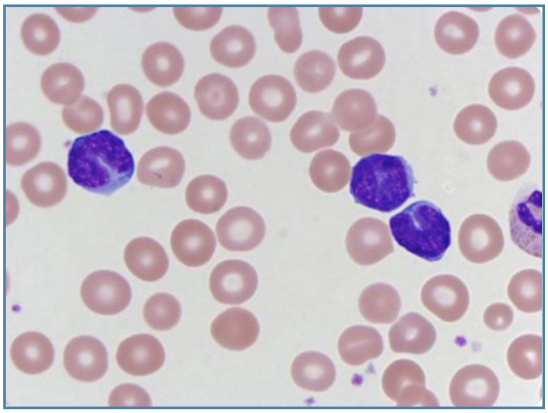


Figura 23. Infezione da Bordetella Pertussis.

- Linfoma follicolare, raramente caratterizzato da interessamento del compartimento periferico, diagnosi immunofenotipica e citogenetica

- Linfoma mantellare (MCL), con frequente interessamento periferico.

In letteratura sono descritte 2 forme distinte di MCL che riflettono 2 distinte vie patogenetiche (7) (8):

  - La forma "classica" con tipico interessamento linfonodale ed extra-nodale (linfoadenopatia, epato-splenomegalia, midollo emopoietico), immunofenotipo CD5pos e CD10neg, clinicamente aggressiva ed evolutiva. Frequente è l'interessamento del sangue periferico con linfocitosi anche marcata con caratteristiche morfologiche variabili (morfologia pleomorfa con quadri "classici" a blastoidi) e diagnosi differenziale con PLL e CCL

- La forma SMCL ("smouldering MCL"), entità clinicamente indolente, malattia prevalemtemente leucemica, senza o con minimo interessamento linfonodale ed extra-nodale (massimo diametro linfonodale < 3 cm e milza < 20 cm), leucocitosi presente, ma non marcata, morfologia pleomorfa, non blastoide.

- La forma asintomatica, solo leucemica non blastoide, si tratta di MBL a fenotipo non classico, talvolta ad interessamento splenico. In letteratura questa forma clinico-patologica è anche riportata all'interno di SMCL.

  MCL è associato a differenti alterazioni citogenetiche. La traslocazione t(11;14)(q13;q32) tra un gene IGH e CCND1 (codificante la ciclina D1) è presente nei pazienti in percentuale >95% e viene considerata come evento genetico primario. Questa alterazione è descritta anche MBL MCL (4). Altre alterazioni non casuali di tipo genetico interessano l'espressione di C-myc (fino al 36% dei pazienti secondo WHO 2016), TP53 (fino al 45% dei casi, WHO) ed altre a frequenza variabile.

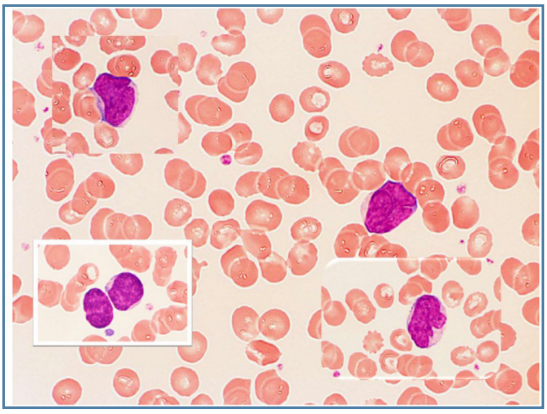


Figura 24. Elementi linfatici di MCL, morfologia classica. Sono evidenti gli aspetti di indentatura dei nuclei (clivati).

Linfocitosi monomorfi.

- Linfocitosi con citoplasma a contorno villoso.

  - Hairy Cell leukemia (HCL), età media 58 anni, più frequentemente pazienti di sesso maschile, splenomegalia, pancitopenia e monocitopenia,

    Morfologia caratteristica: elementi lineage B, dimensioni aumentate,

nucleo più frequentemente ovale a contorno regolare con cromatina omogenea chiara e priva di nucleoli, citoplasma abbondante, debolmente basofilo e contorno irregolare caratterizzato da proiezioni sottile distribuite lungo la maggior parte della circonferenza cellulare,

Spesso diagnosi differenziale morfologica con altre entità WHO definite (linfoma splenico della zona marginale, linfoma splenico B NOS),
Reattività citochimica tipica (fosfatasi acida tartrato resistente),

La elevata presenza (virtualmente in tutti i pazienti affetti) della mutazione BRAF V600F ne suggerisce un ruolo chiave nella patogenesi. Per queste sue caratteristiche, la mutazione rappresenta evento genetico disease-defining e bersaglio terapeutico specifico (1).

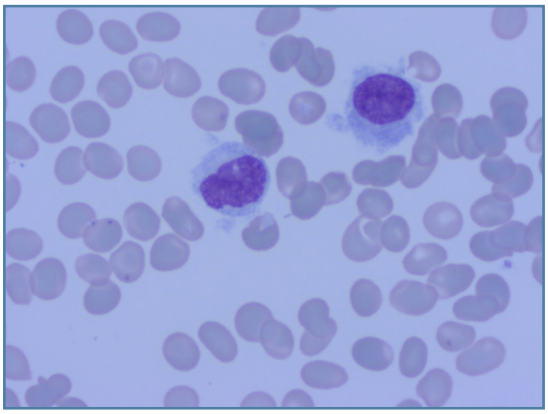


Figura 25. Elementi linfatici di HCL.

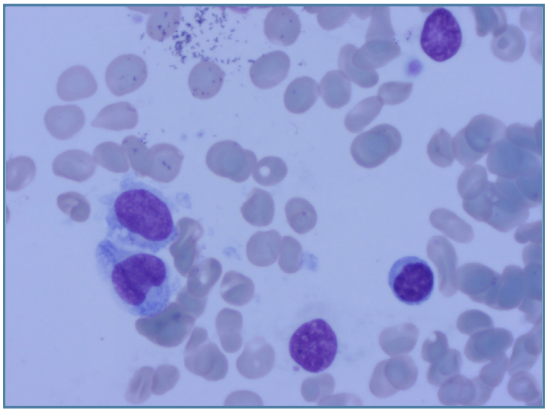


Figura 26. Elementi linfatici di HCL. A sinistra, un piccolo linfocita ad atteggiamento linfo-plasmocitico.

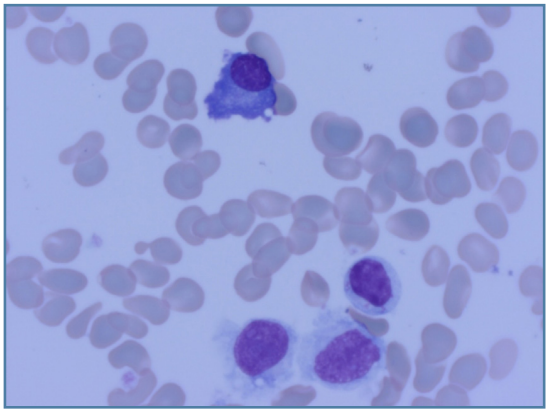


Figura 27. Elementi linfatici di HCL, sangue midollare. In alto è visibile una plasmacellula.

- HCL VARIANTE (HCL-v), morfologia simile a HCL classica.
  Più frequentemente presenza di leucocitosi ed assenza di monocitopenia rilevante.
  Quadri morfologici più eterogenei rispetto ad HCL, con elementi caratterizzati da evidente nucleolo, nuclei con aspetto blastico o convoluto; le estroflessioni citoplasmatiche possono essere assenti.
  Si pone spesso diagnosi differenziale morfologica con leucemia prolinfocitica.
  Assetto immunofenotipico caratterizzato dall'assenza di positività per CD25 e CD123.
  Nessun atteggiamento caratteristico alle metodiche di citochimica.
  Assenza di mutazione BRAF V600F,
  Resistenza alla terapia convenzionale di HCL classica.
  WHO 2016 considera HCL-v forma biologicamente non correlata a HCL e la classifica all'interno della classe "Splenic B-cell lymphoma/ leukemia, non classificabile

- Linfoma spenico B della zona marginale (SMZL), espansione clonale B con fenotipo CD5neg, CD10neg, CD23neg e CD43neg. Alcuni casi, caratterizzati da linfocitosi isolata, possono essere considerati MBL con fenotipo non CLL (CD5neg).

  SMZL è forma rara (< 2% dei processi linfoproliferativi), ma rappresenta la maggior parte delle forme morfologicamente riferibili a CLL NOS (CD5neg)

I pazienti affetti hanno generalmente età >50 anni, presentano generalmente splenomegalia importante, ma, raro o minimo interessamento linfonodale, leucocitosi elevata, anemia e piastrinopenia nel 50% dei casi.

In caso di interessamento leucemico si osserva la presenza di elementi spesso a contorno ovalare con corti villi polari, frequente è anche la presenza di elementi con note morfologiche plasmocitoidi.

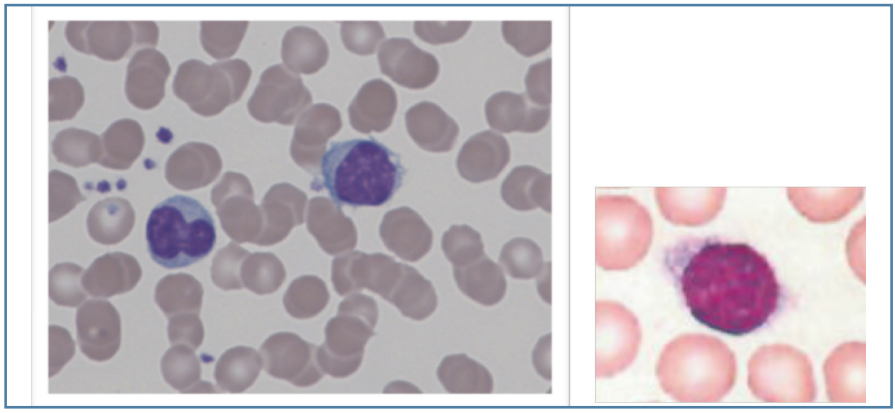


Figura 28. Elementi linfatici di SMZL.

Linfocitosi monomorfa.

- Linfocitosi con linfociti plasmocitoidi e plasmacellule.

  - Linfoma plasmocitoide (LPL), si tratta di neoplasia a linfociti B costituita da piccoli linfociti, linfociti plasmocitoidi e plasmacellule.
    Nella maggior parte dei pazienti si ha interessamento del midollo emopoietico ed alcuni di essi presentano localizzazione linfonodale ed extra-nodale; la presentazione leucemica non è costante,
    Spesso si pone diagnosi differenziale con le altre forme WHO costituite da linfociti piccoli e morfologicamente maturi.
    Frequente presenza di componente monoclonale, usualmente di tipo IgM, non costante e non necessaria per la diagnosi.
    La grande maggioranza dei pazienti (>90%) è caratterizzata dalla presenza della mutazione MYD88 L265P la cui presenza può facilitare la diagnosi. È importante ricordare che essa non è specifica per LPL e non è richiesta per la diagnosi.
  - Leucemia plasmacellulare (PCL), forma di mieloma plasmacellulare diagnosticato in presenza di plasmacellule circolanti con conta ≥ 20% dei leucociti totali, oppure con conta assoluta > 2.0 x10^9/L (9).

Il quadro è caratterizzato da diffusa infiltrazione del midollo emopoietico, da frequente localizzazione epatica, della milza e delle cavità sierose.
Dal punto di vista morfologico le plasmacellule circolanti sono molto simili agli elementi fisiologici e presenti nelle discrasie plasmacellulari, ma presentano minori dimensioni e citoplasma meno evidente.
È generalmente presente la traslocazione t(11;14)
Il quadro clinico ha generalmente prognosi sfavorevole, breve sopravvivenza ed incompleta risposta alla terapia.
In letteratura viene messo in discussione il cut-off diagnostico con proposta di conta plasmacellulare diagnostica pari ≥ 5% dei leucociti totali o > 0.5 x10^9 / L (10) (11)

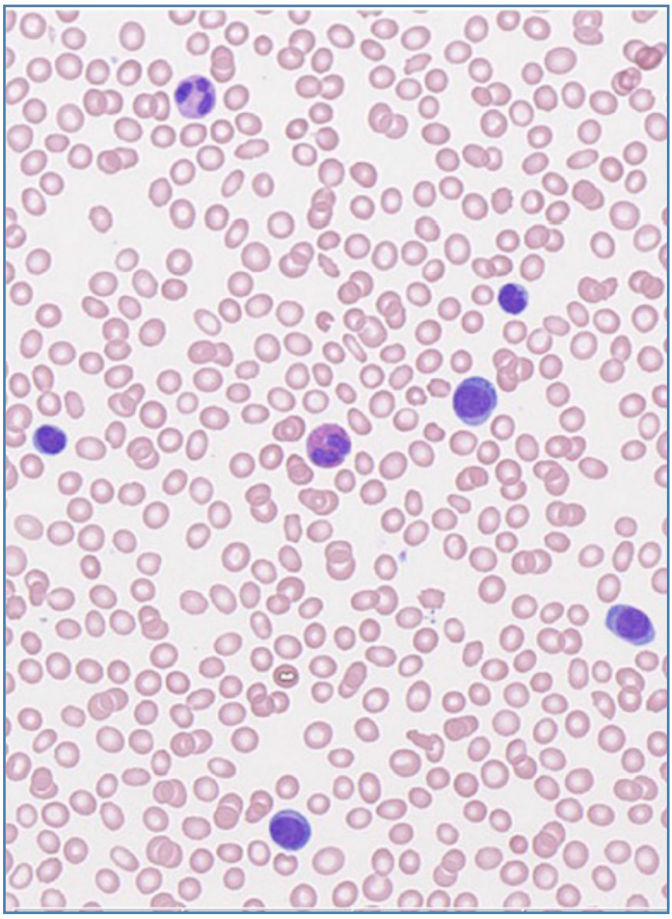


Figura 29. Leucemia plasmacellulare.

La presenza di franche plasmacellule nel circolo periferico:

- In numero ridotto nelle discrasie plasmacellulari
- Nella leucemia plasmacellulare

Bibliografia

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al.: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC press, Lyon 2017
2. Vives-Corrons et al. Effect of EDTA-anticoagulated whole blood storage on cell morphology examination. A need for standardization. Int. Jnl. Lab. Hem. 36, 222; 2014
3. Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI document H20-A2, Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standards-Second Edition
4. Joneja et al. Pseudo-Pelger-Huet anomaly in a patient on tacrolimus. Blood 126: 277; 2015
5. Chabot-Richards et al. Leukocytosis. Int. Jnl. Lab. Hem. 36: 279; 2014
6. Hurt et al. Diagnostic Evaluation of Mononucleosis-Like Illnesses. Am Jnl, Med. 120: 911.e1; 2007
7. Ye et al. Smoldering mantle cell lymphoma. Jnl. Exp. Clin. Cancer Res. 36: 185; 2017
8. Preetesh et al. Mantle cell lymphoma: 2019 update on the diagnosis, pathogenesis, prognostication and management. Am. Jnl. Hem. 94: 710; 2019
9. Kyle et al. Plasma cell leukemia. Report on 17 cases. Arch. Intern. Med. 133: 813; 1974
10. Fernandez de Larrea et al. Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response-criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. Leukemia 27:780; 2013
11. Gundesen et al. Plasma Cell Leukemia: Definition, Presentation and Treatment. Curr. Oncol. Rep. 21: 8; 2019

Conteggio in automazione dei linfociti. Parametri qualitativi e quantitativi

M. Scapaticci, A. Bartolini, L. Bonato, G. Da Rin

Basi tecnologiche dell'ematologia in automazione

L'avvento dei sistemi automatici di analisi e conta delle cellule del sangue periferico, avvenuta circa 70 anni fa grazie all'intuizione di Wallace Coulter, ha indubbiamente costituito un'importante passo nell'ambito della diagnostica ematologica di laboratorio. Coulter, infatti, nel 1953 sviluppò il primo rudimentale contaglobuli (detto anche contatore di Coulter) il quale, sfruttando il metodo impendenziometrico, consentiva di quantificare le componenti figurate del sangue. (1)

Da allora, numerosi strumenti semiautomatici e automatici sono stati sviluppati da diversi produttori e sono diventati di utilizzo routinario in tutti laboratori clinici. Sebbene infatti la valutazione morfologica dello striscio di sangue periferico mediante microscopia ottica resti ancor oggi uno dei gold standard in ematologia, essa richiede tempo, personale qualificato e con un elevato grado di esperienza; inoltre, l'interpretazione è operatore dipendente e l'applicazione del controllo di qualità rimane ancora difficoltosa. (2) Il conteggio cellulare, effettuato con microscopia ottica è inoltre soggetto a variabilità statistiche in base al numero di cellule contate e ai campi osservati. (3,4)

Negli ultimi decenni, la crescente domanda di test ematologici a fronte di tempi di refertazione sempre più ridotti e continue riduzioni del budget per i laboratori di patologia, ha spinto le ditte produttrici di sistemi di diagnostica a investire enormemente sullo sviluppo della strumentazione ematologica, permettendo un throughput sempre maggiore non solo in termine di quantità, ma anche di qualità. Si è così passati dai primi contaglobuli, in grado semplicemente di quantificare le componenti figurate del sangue, ad emocitometri di ultima generazione che, grazie all'introduzione di nuovi principi chimico-fisici per l'analisi cellulare e al progressivo sviluppo di software gestionali, sono in grado di determinare nuovi parametri quantitativi e qualitativi, utili per la caratterizzazione delle cellule del sangue periferico, cosicché cellule anomale, che in precedenza potevano soltanto essere indicate dalla presenza di un flag, come granulociti immaturi e globuli rossi nucleati (NRBC), possono ora essere enumerate in modo affidabile portando ad una riduzione nel numero di revisioni microscopiche. (5,6,7)

Le metodologie di conteggio impiegate da tutti gli analizzatori si basano sull'interazione delle cellule con segnali elettrici (impedenziometria, analisi

di radiofrequenza) o segnali ottici (laser scatter assorbanza, polarizzazione). Questi ultimi, utilizzati nell'analisi di leucociti, reticolociti e piastrine, sottopongono il campione a pretrattamenti citochimici, coloranti fluorescenti o lisi selettive, le cellule sono poi analizzate e raggruppate in cluster per costituire il cosiddetto citogramma, rappresentazione grafica strumentale delle diverse popolazioni cellulari analizzate. (8, 9, 10, 11, 12,13)
In base al tipo di emocitometro utilizzato sono disponibili parametri aggiuntivi quali il conteggio dei reticolociti (RET), degli eritroblasti (NRBC) e di numerosi altri parametri eritrocitari. In particolare, il conteggio differenziale leucocitario esteso (EDC), in funzione della tecnologia adottata, può includere oltre alle 5 popolazioni standard (neutrofili, linfociti, monociti, eosinofili e basofili) anche i granulociti immaturi (IG), le cellule ad alta fluorescenza (HFLC), le cellule mieloperossidasi negative (LUC), altre classi cellulari quali le grandi cellule immature (LIM), i linfociti atipici e infine i parametri leucocitari morfologico-posizionali (CPD) per neutrofili, linfociti e monociti.

Ma quali sono le caratteristiche ideali di un analizzatore ematologico?

Ad oggi, le caratteristiche ideali di un analizzatore ematologico sono indubbiamente la capacità di essere utilizzato per lo screening di patologia, distribuzionale o qualitativa, che possa poi essere verificata con i metodi tradizionali (es. microscopia), in modo da costituire un sistema efficace di "case finding" (individuazione del caso patologico nel contesto della popolazione sana) e dare informazioni aggiuntive e suggestive per la diagnosi. Un analizzatore ematologico ideale dovrebbe inoltre poter differenziare le condizioni reattive da quelle neoplastiche con la maggiore accuratezza possibile. Allo stesso tempo però, per far sì che la grande quantità di informazioni fornite dagli analizzatori ematologici siano sfruttate al meglio, è necessario che il professionista di laboratorio abbia un'ampia conoscenza dell'ematologia clinica e della medicina clinica in generale, per l'importanza delle alterazioni ematologiche secondarie, che abbia padronanza della morfologia delle cellule ematologiche normali e anormali, e infine che abbia dimestichezza con il funzionamento metodologico e tecnico degli analizzatori, per comprendere le loro prestazioni, l'origine dei flag, la loro sensibilità e specificità e per poter interpretare al meglio i relativi citogrammi. Gli analizzatori moderni presentano una sempre maggiore quantità di parametri forniti, ma quest'abbondanza richiede, di contro, conoscenze specialistiche sia per una corretta interpretazione sia per capire i limiti di misura di un determinato parametro. (10)

Conteggio automatizzato dei linfociti

La maggior parte dei linfociti è costituita da cellule piccole e prive di caratteristiche particolari, con poco citoplasma, pochi organelli e cromatina nucleare per lo più inattiva, come indicato dal suo stato condensato.
Quando i linfociti incontrano antigeni estranei, proliferano, si differenziano e si attivano, il che consente loro di svolgere un ruolo centrale nella risposta immunitaria. (14) Queste differenziazioni devono poter essere rilevate da uno strumento ematologico affinché le cellule possano essere individuate, contate e distinte dalle cellule neoplastiche e dai blasti nel modo più accurato possibile (Figura 1).

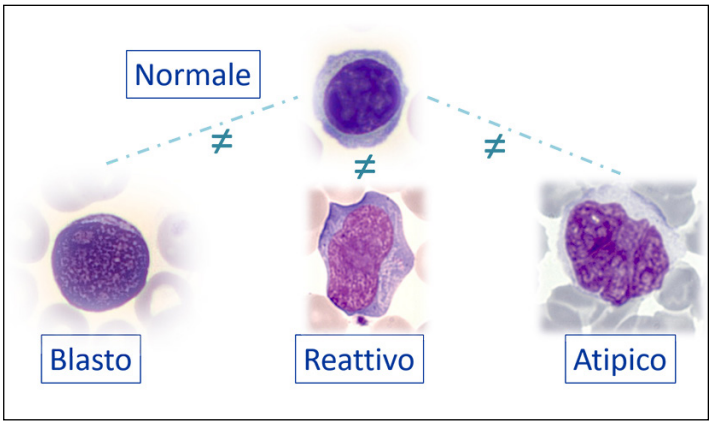


Figura 1. L'immagine mette a confronto l'aspetto di un linfocita normale rispetto ad un blasto, un linfocita reattivo e un linfocita atipico.

Strumentazione: basi tecnologiche

Le tecnologie ad oggi utilizzate dagli analizzatori ematologici a flusso sono riconducibili a due principi fondamentali: il principio a impedenza (o principio della conduttività) e il principio ottico (o a dispersione di luce).

Principio a impedenza

I contaglobuli basati sul principio dell'impedenza elettrica analizzano le cellule ematiche diluite in un liquido a elevata conduttività, che defluiscono per aspirazione in un capillare attraverso un piccolo orifizio ai lati del quale sono posti due elettrodi, tra i quali viene applicata una corrente continua. Dal momento che le cellule sono rivestite da una membrana dotata di un'e-

levata resistività, ogni particella si comporta come uno scadente conduttore ed il suo passaggio attraverso l'orifizio causa una momentanea variazione della resistenza elettrica, generando una variazione di voltaggio. La variazione di resistenza viene registrata come un impulso di brevissima durata, corrispondente al tempo che la particella impiega ad attraversare il foro e si ritiene sia direttamente proporzionale al volume della soluzione spostata, ossia al volume della cellula. (12) Il numero di impulsi, invece, opportunamente corretto in base sia alla diluizione effettuata che al fenomeno della coincidenza (nel caso due cellule attraversino contemporaneamente il foro), fornisce la conta cellulare. Più recentemente sono state applicate correnti a elevata frequenza (radiofrequenza) in grado di attraversare la membrana cellulare, in modo tale che la variazione d'impedenza dipendesse non soltanto dalla dimensione ma anche dalla struttura e dalla composizione interna della cellula analizzata. (15) La corrente alternata a radiofrequenza (RF) è in grado, infatti, di attraversare lo strato lipidico bipolare della membrana di una cellula, consentendo all'energia di penetrare nella cellula: il segnale RF che attraversa e oltrepassa la cellula è legato alla sua conduttività, ovvero alla resistenza opposta dal contenuto interno della cellula al passaggio della corrente. La proprietà cellulare analizzata in questo modo è il reciproco della conduttività, ed è definita opacità. Tra gli elementi strutturali interni della cellula, il nucleo è quello con la più bassa resistenza ed è quindi un ottimo conduttore di corrente. Cellule con un elevato rapporto nucleo/citoplasma (linfociti) hanno una opacità minore di cellule con un rapporto nucleo/citoplasma ridotto (granulociti). (Figura 2).

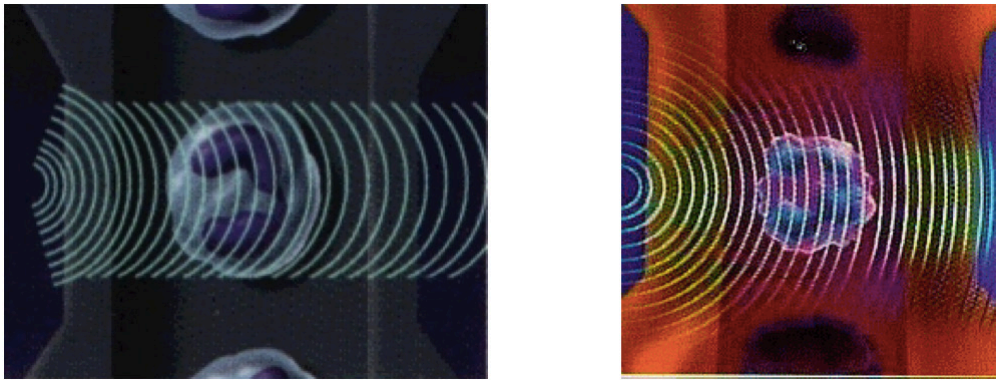


Figura 2. La misura della conduttività è ottenuta applicando sulle cellule una corrente ad alta frequenza

Principio ottico

L'analisi cellulare basata sul principio ottico della citometria a flusso (tecnologia citofluorimetrica) utilizza una sorgente di luce laser a semiconduttori che irradia le cellule con un raggio di luce monocromatica di lunghezza d'onda di circa 633 nm. Specifici coloranti fluorescenti agiscono in modo combinato sulle cellule, per evidenziarne i peculiari aspetti citomorfologici e individuare globuli bianchi e formula leucocitaria; eritroblasti; reticolociti; piastrine; elementi immaturi o patologici. Le cellule, dopo specifica colorazione, vengono trasportate con un flusso laminare nella cella di lettura dove vengono intercettate, una dopo l'altra, dal raggio di luce monocromatica. Il raggio laser, modificato dal passaggio delle cellule, viene captato da un rilevatore che genera impulsi elettrici di ampiezza proporzionale alla dimensione della particella. In questo modo, le cellule possono essere contate e misurate. L'interazione fra il raggio luminoso e ciascuna cellula determina la dispersione della luce in tutte le direzioni ed un sistema fotoelettrico esamina il fascio di luce laser che viene rifratta, diffratta o diffusa dalle cellule (Figura 3). La luce viene quindi raccolta da uno o più rivelatori (fotodiodi o fotomoltiplicatori) posizionati ad angoli ben definiti. La quantità di luce misurata a piccolo angolo, solitamente fra 0,5° e 10°, determina la cosiddetta rifrazione frontale, che costituisce il parametro "forward" scattered light (FSC) e che dipende prevalentemente dalle dimensioni (volume) della cellula, mentre la luce misurata ad angolo ampio (>10°) determina la rifrazione laterale o "side" scattered light (SSC), che viene rilevata da un tubo fotomoltiplicatore posto in posizione ortogonale alla sorgente luminosa. A tale angolazione la luce rifratta dalla cellula dipende dalla regolarità della forma del nucleo, dalla densità della cromatina nucleare e dalla granularità del citoplasma, dunque dal livello di complessità strutturale della cellula. (15) La quantità di luce rifratta lateralmente da un granulocita sarà quindi molto più elevata della quantità di luce rifratta da un linfocita a causa della maggiore quantità di granulazioni citoplasmatiche e della maggiore irregolarità di forma del nucleo. Se, inoltre, le cellule sono state preventivamente trattate con sostanze fluorescenti in grado di legarsi a specifici componenti cellulari, quali proteine o acidi nucleici, o colorate utilizzando reazioni citochimiche selettive è possibile, mediante misure di fluorescenza o di assorbanza, ottenere ulteriori informazioni utili a differenziare e classificare i diversi tipi cellulari. L'intensità della luce fluorescente laterale o side fluorescent light (SFL) costituisce infatti un parametro che riflette principalmente il tipo e la quantità di acidi nucleici e organelli cellulari.
L'intensità di fluorescenza emessa da ciascuna cellula, combinata alla quantità di luce rifratta lateralmente e/o frontalmente (FSC, SSC e SFL) consente un'eccellente classificazione delle diverse popolazioni cellulari del sangue

e, all'interno della stessa popolazione, un ulteriore e più specifica classificazione in base al grado di immaturità cellulare. Questi tre tipi di segnali sono utilizzati per la differenziazione e la conta dei globuli bianchi, globuli rossi nucleati, reticolociti e piastrine e per rilevare cellule anormali e cellule immature mediante l'utilizzo della tecnologia digitale e di appositi algoritmi. (16)

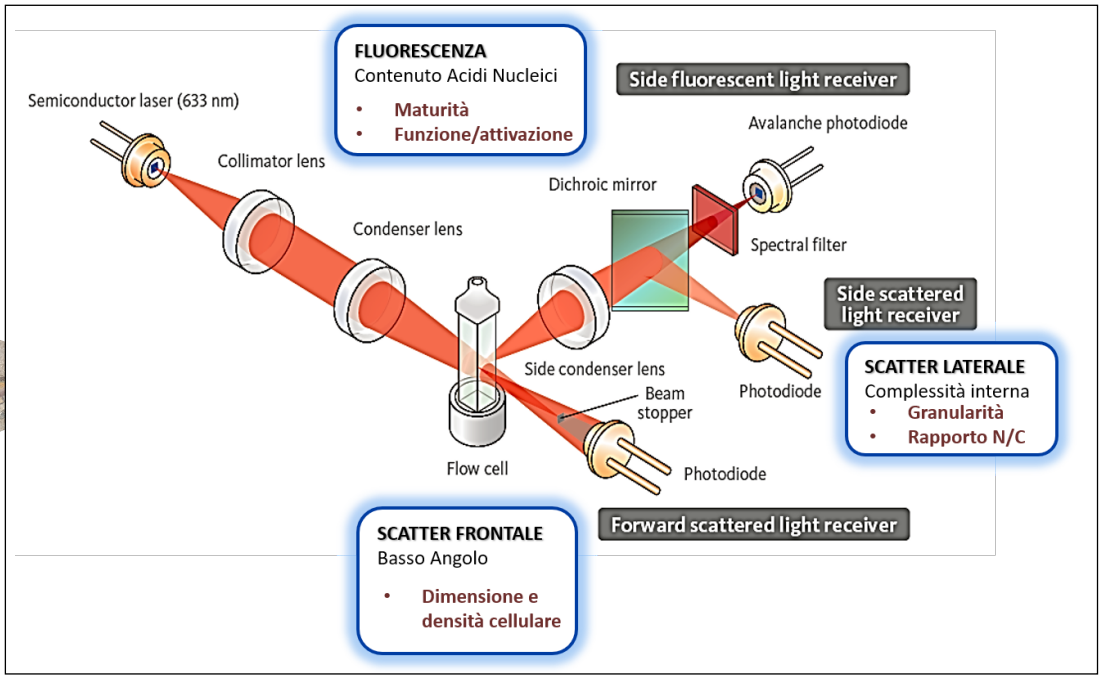


Figura 3. Principio ottico della citometria a flusso. (Da Novel and rapid enumeration method of peripheral blood stem cells using automated hematology analyzer. Tanosaki R, Kumazawa T, Yoshida A, Oguni S, Nakano A, Yamagata S, Takahashi N, Kurosawa S, Kim Sw, Yamashita T, Mori S, Heike Y, Fukuda T, Hamaguchi Y, Tsuda H. Int. Jnl. Lab. Hem. 2014, 36, 521–530).

I moderni analizzatori ematologici usano due o più misure contemporaneamente sulla stessa cellula al fine di poter separare e identificare le varie popolazioni leucocitarie (Tabella 1). Ne deriva la costruzione di un citogramma in cui sono visualizzati i cosiddetti "cluster cellulari" corrispondenti alle diverse popolazioni individuate. Bisogna tener presente però che i metodi applicati possono non essere gli stessi, sia tra strumenti diversi che fra diversi modelli di analizzatori con lo stesso marchio, ne deriva che i citogrammi siano strettamente strumento-specifici.

Analizzatore	Conteggio leucocitario differenziale
Abbott Cell-Dyn Sapphire	Scatter multiangolo Polarizzazione Fluorescenza
ABX-Horiba Nexus Pentra DX	Corrente continua Citochimica selettiva Lisi selettiva Fluorescenza
Beckman Coulter Unicel DXH 800	Corrente continua Radiofrequenza Scatter multiangolo
Mindray BC 6800	Scatter multiangolo Fluorescenza Lisi selettiva
Siemens Advia 2120	Scatter multiangolo Citochimica selettiva Lisi selettiva
Sysmex XE/XN	Scatter multiangolo Fluorescenza Lisi selettiva

Tabella 1. Principi analitici utilizzati dai sistemi disponibili commercialmente per il conteggio leucocitario differenziale (15)

Allarmi strumentali

Sebbene gli allarmi che gli analizzatori ematologici evidenziano in caso di globuli bianchi (WBC) anormali mostrino una buona sensibilità, essi presentano generalmente scarsa specificità, generando spesso inutili revisioni microscopiche di strisci di sangue (15). Un miglioramento nella specificità si è sicuramente ottenuto con gli ultimi analizzatori Sysmex, serie XE e XN (Sysmex, Kobe, Japan), che utilizzano la tecnologia citofluorimetrica e hanno un canale differenziale per i WBC (canale WDF o canale DIFF) in grado di riportare un flag combinato per blasti/linfociti anormali ("Blasts/Abn

lympho?"). Inoltre, sulla serie XN, introdotta nella routine di laboratorio nel 2011, è presente anche un canale dei precursori dei globuli bianchi (canale WPC) che sfrutta le differenze nel contenuto lipidico della membrana cellulare per separare le cellule normali da quelle anormali, permettendo di differenziare processi potenzialmente neoplastici da processi puramente reattivi. Questa differenziazione dei globuli bianchi permette di identificare la presenza di blasti, sulla base della lisi cellulare e differente segnale di fluorescenza. Campioni con il flag "Blasts/Abn lympho?" sul canale WDF ottenuti su strumento XN vengono automaticamente sottoposti all'analisi WPC mediante un test reflex. I complessi algoritmi combinano infine le informazioni ottenute dai canali WDF e WPC per produrre un flag specifico per entrambi i tipi di cellule ("Blasts/Abn lympho?") oppure, se non viene rilevata alcuna anomalia, rimuovere completamente il flag iniziale. (17) Nella prima fase il reagente di lisi perfora le membrane cellulari. L'estensione del danno della membrana dipende dalla composizione lipidica, che a sua volta dipende dal tipo livello di maturità e dallo stato di attivazione della cellula. Successivamente, il fluoroforo si lega principalmente al DNA del nucleo o all'RNA presente nel citoplasma. (Figura 4). (18)

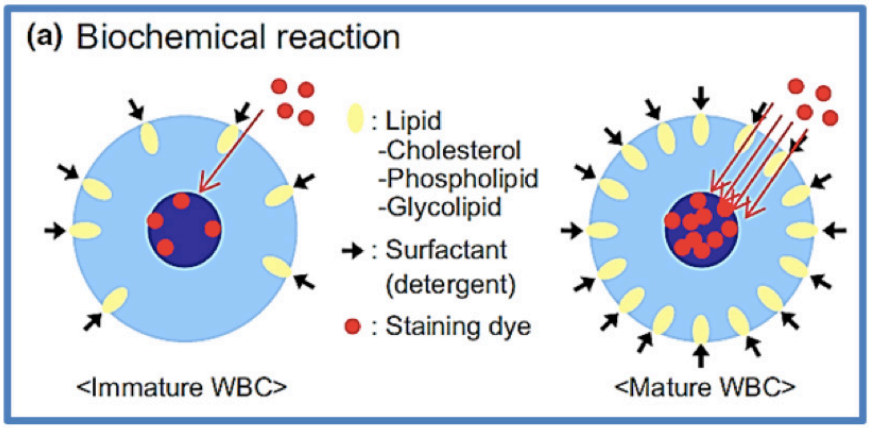


***Figura 4.** L'immagine rappresenta le reazioni biochimiche, incluse l'emolisi e la colorazione con fluorocromi, che discriminano i leucociti immaturi dalle cellule mature per via della differenza di contenuto lipidico della membrana cellulare che comporta differente resistenza alla soluzione surfattante. (18)*

Il canale WDF (canale DIFF) rileva principalmente l'attività citoplasmatica, in quanto il fluoroforo si lega prevalentemente al RNA presente nel citoplasma. Il canale WPC rileva invece le cellule anomale in base alla loro composizione di membrana, determinando differenze nelle dimensioni (la maggiore per-

meabilizzazione di alcuni tipi di cellule, quali i linfociti anormali, porta alla perdita citoplasmatica e ad una dimensione cellulare più piccola) e discriminando quelle a maggiore fluorescenza, conseguenza del miglior accesso del fluoroforo al contenuto di DNA cellulare (Figura 5).

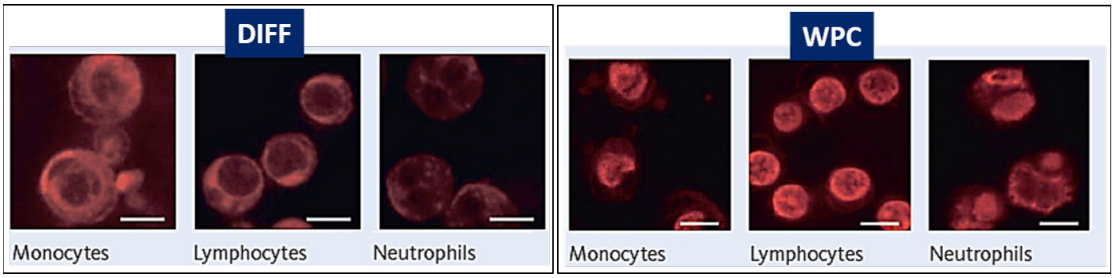


Figura 5. Micrografie a fluorescenza di tre popolazioni cellulari dopo trattamento con reagenti WDF e WPC. Il fluorocromo WDF lega principalmente l'RNA nel citoplasma mentre il fluorocromo WPC rileva principalmente il DNA nel nucleo. Adattata da Kawauchi S et al. (2014): Comparison of the Leukocyte differentiation Scattergrams Between the XN-Series and the XE-Series of Hematology Analyzers. Sysmex Journal International Vol.24 No.1

La composizione lipidica della membrana è influenzata dalla funzionalità o dallo stato di attivazione di una cellula. Un esempio è costituito dalla presenza dei cosiddetti "lipid rafts" regioni delle membrane plasmatiche cellulari ricche di colesterolo e glicosfingolipidi, che svolgono ruoli importanti nella regolazione del traffico delle proteine di membrana, dei neurotrasmettitori e dei recettori (Figura 6). (19) Rispetto alle cellule mature a riposo e alle cellule immature, elevati livelli di "lipid rafts" sono presenti nelle membrane di cellule più attive nella comunicazione extracellulare (es. cellule tumorali e cellule mature attivate). (20,21)
Combinando le informazioni di entrambi i canali WDF e WPC vengono ottimizzate dunque sia la sensibilità che la specificità del rilevamento di cellule reattive e maligne. (22,23)

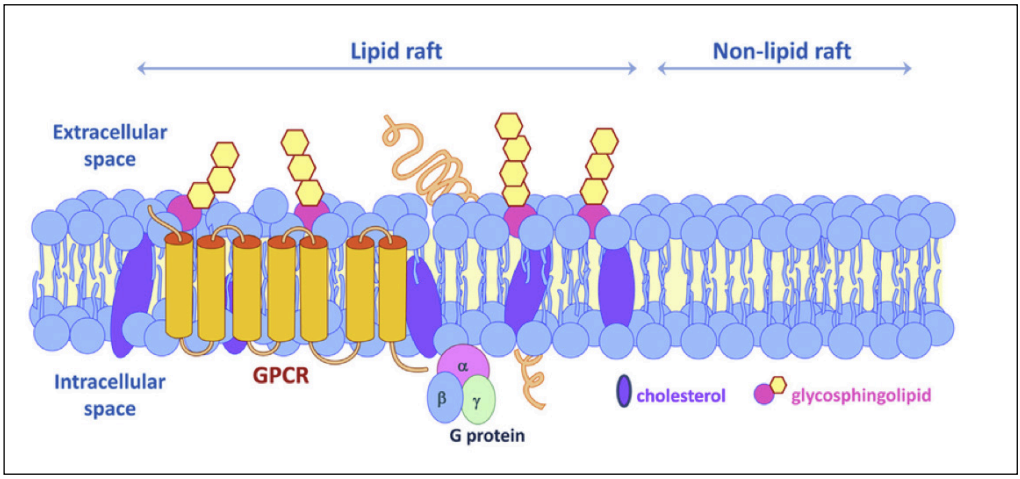


Figura 6. I "lipid raft" sono microdomini della membrana plasmatica altamente organizzati arricchiti in fosfolipidi, glicosfingolipidi e colesterolo e fungono da matrice per i recettori, come i recettori accoppiati a proteine G (GPCR) e altre molecole di segnale. (Da Villar VA, Cuevas S, Zheng X, Jose PA. Localization and signaling of GPCRs in lipid rafts. Methods Cell Biol. 2016;132:3-23.)

Effetto di un reagente lisante sulla membrana dei linfociti T e B.

I linfociti nel sangue periferico si dividono in tre tipi: linfociti T (o cellule T), che esprimono il recettore CD3; linfociti B (o cellule B), che esprimono le immunoglobuline di membrana; e cellule che non esprimono nessuno di questi marcatori di superficie cellulare (null cell). La percentuale di cellule T nel sangue periferico di individui sani costituisce circa il 75% dei linfociti totali, i linfociti B il 15-25%, le null cell circa il 10%. (24)
Mentre i linfociti T e B non attivati sono morfologicamente molto simili al microscopio elettronico (Figura 7), diventano morfologicamente distinguibili in seguito all'attivazione da parte di un antigene anche mediante citometria a flusso, che si basa sull'espressione differenziale di proteine sulla superficie cellulare. (25) La figura 7 mostra l'effetto di un reagente lisante sulla membrana dei linfociti T e B al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), la figura 8 mostra invece l'effetto osservato al microscopio elettronico a scansione (SEM).

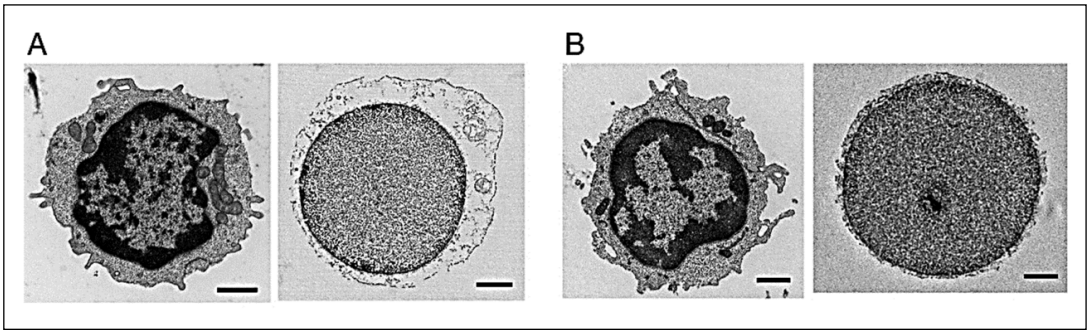


Figura 7. Effetto di un reagente lisante sulla membrana dei linfociti T (A) e B (B). A sinistra appare il controllo mentre a destra la cellula dopo trattamento con il lisante. Al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) si vede che, in seguito al trattamento con il reagente specifico, i linfociti T mantengono le loro membrane cellulari e gli organelli citoplasmatici mentre questi sono quasi completamente scomparsi nei linfociti B (Da: Kono M, Takagi Y, Kawauchi S, Wada A, Morikawa T, Funakoshi K. Non-activated T and B Lymphocytes Become Morphologically Distinguishable After Detergent Treatment. Cytometry Part A. 83A: 396_402, 2013).

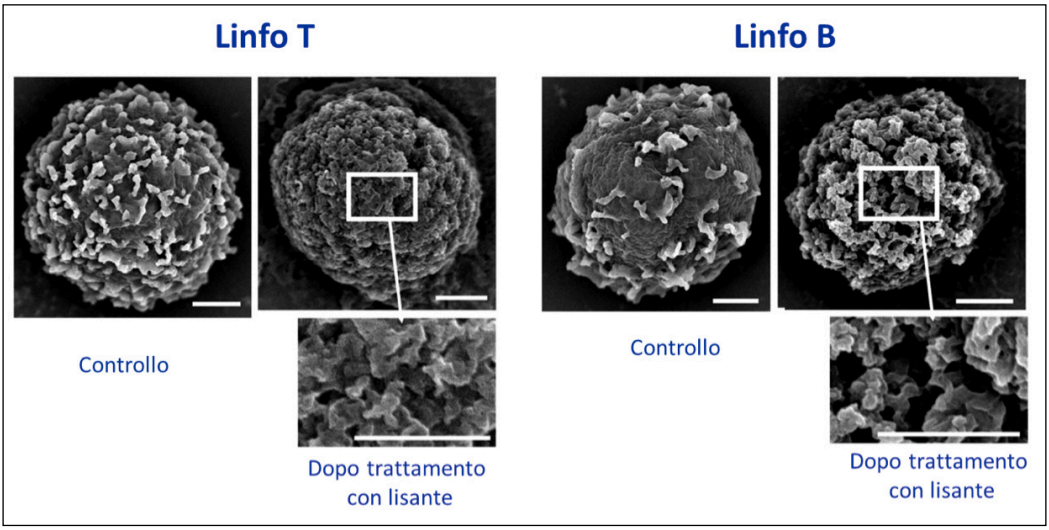


Figura 8. Le osservazioni al microscopio elettronico a scansione (SEM) hanno rivelato la presenza di pori più grandi sulle membrane citoplasmatiche dei linfociti B rispetto a quella sulle superfici cellulari dei linfociti T tali da permettere la distinzione tra i due tipi di linfociti. (Da: Kono M, Takagi Y, Kawauchi S, Wada A, Morikawa T, Funakoshi K. Non-activated T and B Lymphocytes Become Morphologically Distinguishable After Detergent Treatment. Cytometry Part A. 83A: 396_402, 2013).

Utilizzando anticorpi specifici contro gli antigeni di superficie cellulare è possibile verificare la perdita della membrana cellulare dei linfociti B e non dei T, dovuta al differente contenuto lipidico della membrana di queste cellule. (25) Kono et al. hanno infatti dimostrato che il diverso rapporto tra colesterolo e lipidi totali nella membrana cellulare dei linfociti T e B (i linfociti T tendono a contenere più colesterolo nelle loro membrane cellulari rispetto ai linfociti B) è alla base delle differenze tra i due tipi di cellule e, dunque, alla base delle differenze di resistenza al detergente utilizzato e, di conseguenza, alle differenze di colorazione che vengono sfruttate dallo strumento Sysmex XE per la loro differenziazione (Figura 9).

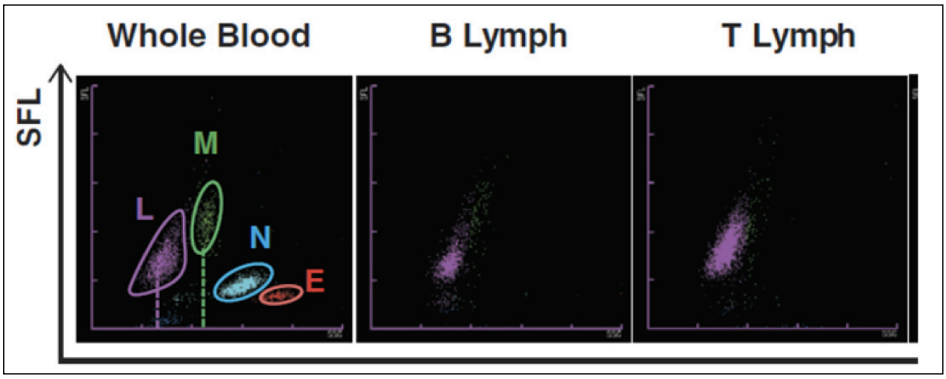


Figura 9. Distribuzione di linfociti T e B isolate sul citogramma dell'analizzatore ematologico Sysmex XE. A sinistra è visibile il citogramma della differenziazione leucocitaria, al centro la distribuzione dei linfociti T e a destra i linfociti B.

Evoluzione tecnologica della strumentazione: conteggio differenziale esteso.

Sebbene l'evoluzione tecnologica della strumentazione ematologica abbia indubbiamente contribuito a cambiare la "qualità" delle informazioni "aggiuntive", cioè a riconoscere e misurare cellule che normalmente non sono presenti nel sangue periferico e a dare un significato anche quantitativo ai flag strumentali, resta il problema della mancanza di una corrispondenza univoca con la controparte morfologica. Alcuni analizzatori sono infatti già da tempo in grado di contare diverse popolazioni nucleate quali, ad esempio, le cellule a elevata fluorescenza (HFC) (Sysmex XE/XN e Mindray BC-6800), le "large unstained cells" (LUC) (Siemens Advia 2120), le "large immature cells" (LIC) e gli "atypical lymphocytes" (ALY) (analizzatori ABX Horiba), ma spesso con poca specificità. Le LUC, ad esempio, possono essere alternativamente costituite da blasti, linfociti atipici o attivati oppure, semplicemente, da neutrofili perossidasi-negativi (Figura 10). (15, 26)

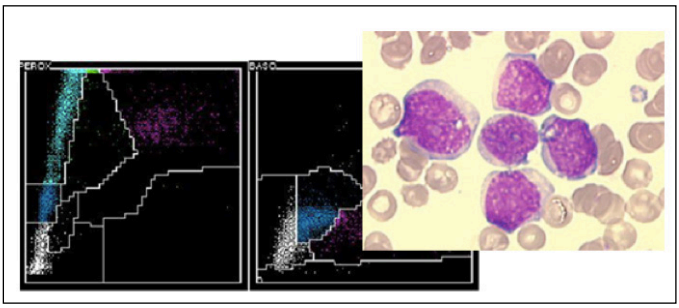


Figura 10 a. Campione con blasti

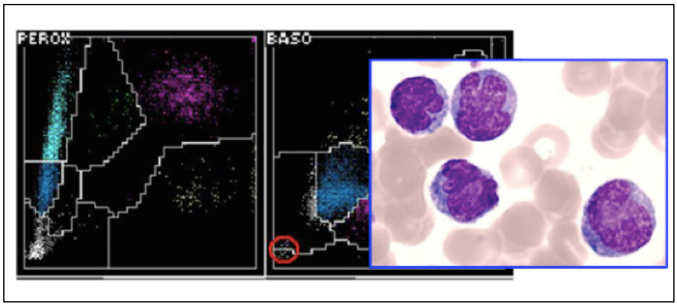


Figura 10 b. Campione con linfociti attivati

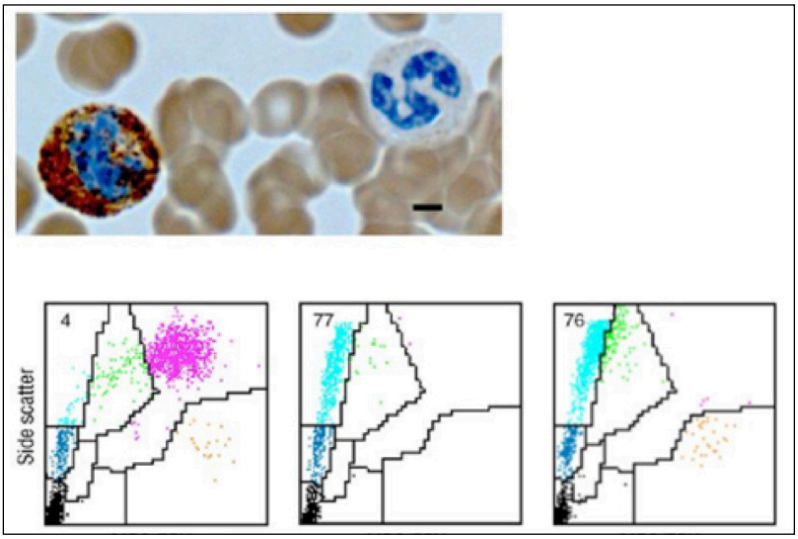


Fig. 10 c: 4 citogramma di un campione normale
76-77 citogrammi di campioni con deficit di perossidasi

Figura 10 Citogrammi dell'ADVIA 2120

Sysmex XN: nuova tecnologia per la conta leucocitaria differenziale

L'analizzatore ematologico Sysmex XN (Sysmex, Kobe, Japan) è dotato di una nuova tecnologia per la conta leucocitaria differenziale, costituita dai tre canali specifici: differenziale WBC (WDF), cellule progenitrici dei globuli bianchi (WPC) e canale per globuli bianchi nucleati (WNR). Il canale WDF è inoltre provvisto di una nuova serie di parametri aggiuntivi rispetto ai parametri differenziali leucocitari tradizionali, che forniscono ulteriori dati qualitativi per l'interpretazione del sangue periferico, quali lo scattergram anormale e dati sulla popolazione cellulare (CPD). (27) Nello specifico, le informazioni del canale dei globuli bianchi patologici vengono integrate con i segnali dei canali FSC, SSC, e SFL, risultando fondamentali nell'analisi di campioni contenenti blasti e cellule immature. Se l'allarme "Blasts/Abn lympho?" viene generato dal canale WDF insieme a o in assenza del flag "atypical lympho?", l'analisi WPC estesa è in grado di specificare ulteriormente la sospetta anomalia. L'allarme "Blasts?" generalmente identifica neoplasia acute, quali leucemia mieloide acuta o leucemia linfoblastica, l'allarme "abn lympho?" indica la presenza di linfociti atipici sospetti neoplastici, ad esempio linfomi, mentre il flag"atypical lympho?" si genera per linfociti atipici che si sospetta siano reattivi. La sensibile analisi ottica della dispersione della luce e dell'intensità di fluorescenza consente una differenziazione piuttosto

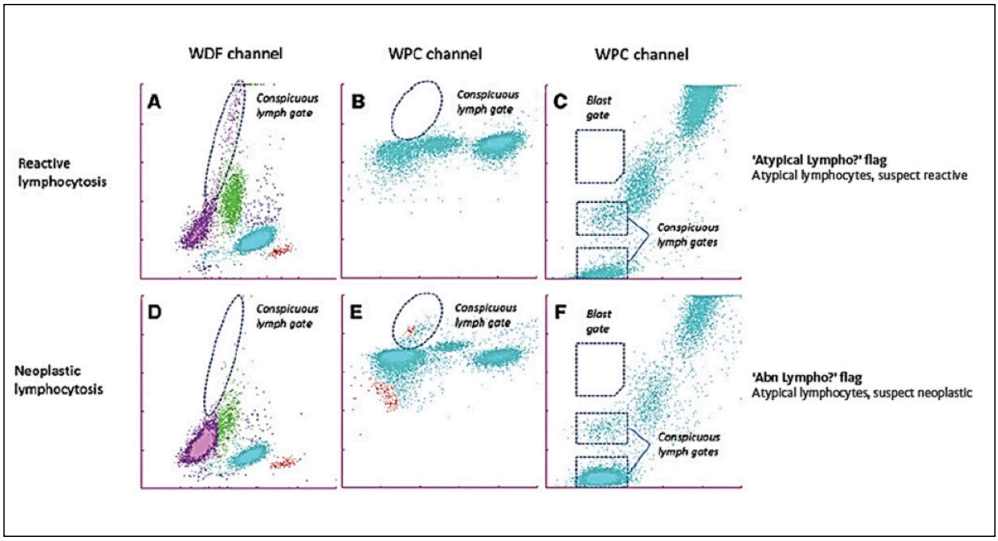


***Figura 11.** La figura mostra gli allarmi generati e i relativi grafici dei canali WDF e WPC in presenza di una linfocitosi reattiva (A-C), una linfocitosi neoplastica (B-CLL) (D-F) (Da Schuff-Werner P, Kohlschein P, Maroz A, Linssen J, Dreißiger K, Burstein C. Performance of the XN-2000 WPC channel flagging to differentiate reactive and neoplastic Leukocytosis. Clin Chem Lab Med 2016; 54(9): 1503–1510).*

affidabile delle cellule neoplastiche immature, come blasti o cellule di linfoma, da leucociti normali e la differenziazione di linfociti neoplastici atipici ("anormali") rispetto ai linfociti reattivi, come indicato dalle recenti raccomandazioni di consenso (Figura 11). (28)

Il canale WNR determina la conta differenziale di basofili e globuli rossi nucleati, mediante l'emolisi dei globuli rossi e l'utilizzo di una soluzione che, penetrando all'interno delle membrane cellulari dei globuli bianchi, causa cambiamenti nella morfologia esterna e nella struttura interna di ciascuna cellula. Questo canale è in grado di differenziare e contare i basofili rilevando le differenze morfologiche evidenziate dai cambiamenti dei valori di FSC. Gli acidi nucleici e gli organelli cellulari di globuli bianchi e globuli rossi nucleati si legano infine a una soluzione contenente un fluorocromo e mostrano una forte fluorescenza che viene rilevata dal canale WNR e sfruttata per la differenziazione e la conta delle cellule nucleate.

Parametri posizionali ("Cell Population Data")

Gli analizzatori più evoluti sono in grado di fornire dei citogrammi bi- o tridimensionali dove sono rappresentati i "cluster" corrispondenti alle popolazioni analizzate. Ciascun "cluster" cellulare, occupa una definita posizione, individuabile dalle rispettive coordinate: x,y; oppure, nel caso di mappe tridimensionali, x,y,z. Le coordinate delle diverse popolazioni leucocitarie, in condizioni fisiologiche, possiedono dei valori caratteristici, quali indice di centralità (valore medio) e dispersione (deviazione standard, DS) (Figura 12).

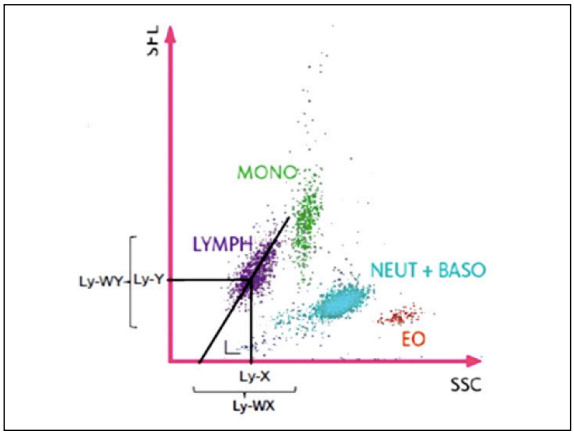


Figura 12. L'imagine mostra la posizione, la forma, la lunghezza, l'ampiezza e l'angolo di ciascun cluster cellulare in condizioni normali su strumento Sysmex.

In condizioni patologiche i "cluster" cellulari possono subire degli spostamenti e/o delle variazioni conformazionali in base ai cambiamenti dimensionali, strutturali o funzionali che caratterizzano la condizione patologica e ciò si riflette sui valori di questi indici posizionali (Figura 13). (10,15)

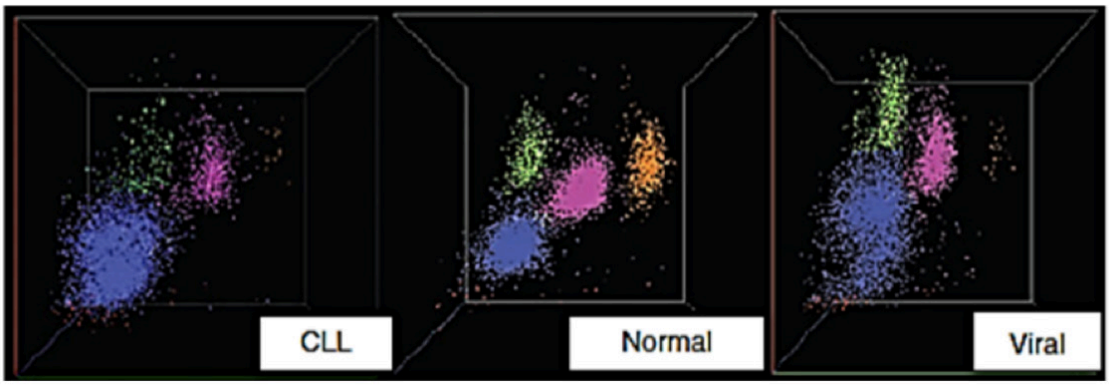


Figura 13. Tre grafici di cluster rappresentanti le differenti popolazioni di globuli bianchi ottenuti mediante analisi tridimensionale utilizzando i tre parametri: volume, conduttività e scatter e nelle quali appaiono evidenti le differenze di volume dei linfociti in un campione normale (al centro), in un campione con leucemia linfatica cronica (a sinistra) e in uno con malattia virale (destra). (Da Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Hoffmann JJML. Quality counts: New parameters in blood cell counting Int. Jnl. Lab Hem.2009;31:277-297.)

Questi parametri sono molto utili per rilevare i cambiamenti linfocitari che rendono necessaria la revisione microscopica. (29)
Nonostante ciò, resta la problematica che i parametri posizionali sono strettamente metodo-specifici, ragione per cui, se si usano all'interno di regole decisionali, bisogna determinare gli intervalli di riferimento per il metodo in uso, valutando anche la stabilità dei parametri nel tempo, poiché il contatto prolungato con l'anticoagulante potrebbe modificare le caratteristiche dimensionali e strutturali delle cellule interessate. (30) Inoltre, vi sono sensibilità e specificità differenti per tipo di allarme e per tipo strumento, con valori predittivi positivi (VPP) tendenzialmente bassi e valori predittivi negativi (VPN) costantemente elevati, caratteristica questa che permette di soddisfare il primo obiettivo clinico dell'automazione, quale lo screening dei campioni patologici, ma che conferma il rilevante ruolo della valutazione microscopica per poter differenziare tra processi reattivi e neoplastici. (28, 31) Oltre a

migliorare la standardizzazione della classificazione morfologica, per evitare errori diagnostici, i moderni e sofisticati metodi di indagine diagnostica in ematologia dovrebbero essere interpretati alla luce della morfologia cellulare e del contesto clinico. A tale scopo la "review article" di Barbara Bain, sottolinea l'importanza diagnostica dello striscio di sangue. (31)

Morfologia cellulare e contesto clinico

La diagnostica ematologica nel laboratorio clinico ad oggi richiede dunque sicuramente un approccio metodologico al paziente, piuttosto che all'esame emocromocitometrico in sé, utilizzando ed integrando i dati a disposizione, quali quesito clinico, morfologia strumentale e morfologia ottica. La validazione dell'esame emocromocitometrico deve essere dunque "sample and patient oriented" con lo scopo di fornire un referto che possa garantire informazioni utili sul piano clinico e allo stesso tempo facilmente interpretabili. (32)

La sfida resta dunque quella di migliorare le proprie conoscenze e padroneggiare le tecnologie in quanto, sebbene gli analizzatori generino flag sospetti in presenza di cellule anormali, la quantità di falsi positivi resta ancora alta, portando spesso ad inutili revisioni di strisci di sangue. D'altra parte, le alterazioni dell'esame emocromocitometrico segnalate dagli analizzatori ematologici con flag di sospetto morfologico devono essere approfondite con la revisione microscopica dello striscio di sangue periferico, lasciando alla valutazione della morfologia cellulare un ruolo chiave nella diagnosi di tutte le patologie ematologiche e nell'indirizzare un eventuale successivo approfondimento diagnostico.

Bibliografia

1) Simon E. Coulter's life and his impact on the world. Int J Lab Hematol 2013;35:230-236.

2) Briggs C, Culp N, Davis B, et al. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. Int J Lab Hematol 2014;36:613-27.

3) C. L. Rumke. The statistically expected variability in differential leukocyte counting. In: Koepke JA, ed. Differential Leukocyte Counting. Aspen, Colo: College of American Pathologists; 1977:39–45.

4) Fuentes-Arderiu X, Dot-Bach D. Measurement uncertainty in manual differential leukocyte counting- Clin Chem Lab Med 2009;47:112–15.

5) Briggs C, Harrison P, Grant , et al. New quantities parameters on a recently introduced automated blood cell counter—the XE-2100. Clin Lab Haem 2000;22:345–50.

6) Fernandez B, Hamachi Y. Automated enumeration of immature granulocytes. Am J Clan Pathol 2007;128:454–63.

7) Jean A, Boutet C, Lenormand B, et al. The new haematology analyzer DxH 800: an evaluation of the analytical performances and leucocyte flags, comparison with the LH 755. Int J Lab Hematol 2011;33:138–45.

8) Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. Am J Clin Pathol 2008;130:104-16.

9) Buttarello M. Quality specification in hematology: the automated blood cell count. Clin Chim Acta 2004;346:45-54.

10) Briggs C, Harrison P, Machin SJ.. Hoffmann JJML. Quality counts: New parameters in blood cell counting Int. Jnl. Lab Hem.2009;31:277-97.

11) Lecompte TP, Bernimoulin MP. Novel Parameters in Blood Cell Counters. Clin Lab Med 2015;35:209–24.

12) Kubitschek HE. Electronic measurement of particle size Research (London) 1960;13:128-35.

13) Mansberg HP, Saunders AM, Groner W. The Hemalog D white cell differential system. J Histochem Cytochem 1974;22:711-24.

14) Kono M, Takagi Y, Kawauchi S, Wada A, Morikawa T, Funakoshi K. Non-activated T and B Lymphocytes Become Morphologically Distinguishable After Detergent Treatment. Cytometry Part A. 83A: 396_402, 2013.

15) Buttarello M. Analizzatori ematologici a flusso: basi tecnologiche, modalità di valutazione, qualità analitica e nuove informazioni. BC 2016, vol. 40, n. 3.

16) Sensitive assessment of WBC functionality and greater workflow efficiency. Sysmex white paper White Blood Cell Functionality. 2017;1-7.

17) Jones AS, Tailor H, Liesner R, Machin SJ, Briggs CJ. The value of the

white precursor cell channel (WPC) on the Sysmex XN-1000 analyser in a specialist paediatric hospital. J Clin Pathol 2015; 68:161–65.

18) Tanosaki R, Kumazawa T, Yoshida A, et al. Novel and rapid enumeration method of peripheral blood stem cells using automated hematology analyzer. Int. Jnl. Lab. Hem. 2014;36:521–30.

19) Gottfried EL, Lipids of human leukocytes: relation to cell type. Journal of lipid research. 1967;Vol 8.

20) Tuosto L et al. Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. Eur J Immunol. 2001;31(2):345 – 9.

21) Li YC et al. Elevated Levels of Cholesterol-Rich Lipid Rafts in Cancer Cells Are Correlated with Apoptosis Sensitivity Induced by Cholesterol-Depleting Agents. Am J Pathol. 2006;168(4):1107–18.

22) Zini G et al. A European consensus report on blood cell identification: terminology utilized and morphological diagnosis concordance among 28 experts from 17 countries within the European LeukemiaNet network WP10, on behalf of the ELN Morphology Faculty. Br J Haematol. 2010;151(4):359 – 64.

23) Briggs C, Longair I, Kumar P, Singh D, Machin SJ. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. J Clin Pathol. 2012 Nov;65(11):1024-30.

24) Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 2002; 4th edition. New York: Garland Science.

25) Kono M, Takagi Y, Kawauchi S, Wada A, Morikawa T, Funakoshi K. Non-activated T and B Lymphocytes Become Morphologically Distinguishable After Detergent Treatment. Cytometry Part A. 83A: 396_402, 2013.

26) Thirup P. LUC, What Is That? Large unstained cells. Clin Chem 1999;45:1100.

27) Seghezzi M., Manenti B., Previtali G., et al. A specific abnormal scattergram of peripheral blood leukocytes that may suggest hairy cell leukemia. Clin Chem Lab Med 2018;56(5): e108–e111.

28) Schuff-Werner P, Kohlschein P, Maroz Aet al. Performance of the XN-2000 WPC channel flagging to differentiate reactive and neoplastic Leukocytosis. Clin Chem Lab Med 2016;54(9):1503–10.

29) Furundarena JR, Uranga A, Sainz MR, Gonzàles C, Uresandi N, Argoitia N, Araiz M. Usefulness of the lymphocytes positionale parameters in the Sysmex XN haematology analyser in lymphoproliferative disorders and mononucleosis syndrome. Int J lab Hem. 2017;1-8.

30) Pérez I, Redìn ME. Stability of leukocyte research parameters over time on the Sysmec XN: How to quantify the changes in cell morphology. Int J Lab Hem. 2018;1-8.

31) Bruegel M, Nagel D, Funk M, et al. Comparison of five automated hematology analyzers in a university hospital setting: Abbott Cell-Dyn Sapphire, Beckman Coulter DxH 800, Siemens Advia 2120i, Sysmex XE-5000, and Sysmex XN-2000. CCLM 2015;53,1057-71.

32) P. Cappelletti L'Ematologia di Laboratorio. RIMeL 2005; (1): 247-58.

Linfocitosi: casi clinici

Annalisa Modenese

Premessa

L'evoluzione tecnologica nell'ematologia di laboratorio ha consentito, negli ultimi anni, un rapido e consistente miglioramento sia dei processi organizzativi che dei percorsi diagnostici mirati alla individuazione delle patologie ematologiche.
I moderni analizzatori utilizzano infatti tecnologie sempre più sofisticate ed affidabili per eseguire il conteggio e la classificazione morfologica delle popolazioni cellulari (1).
Mediante l'utilizzo combinato di diverse tecnologie, strumento specifiche, le cellule vengono classificate in base a:

- Dimensioni
- Forma
- Rapporto nucleo/citoplasma
- Caratteristiche nucleo e citoplasma

Tali informazioni vengono riportate su un piano cartesiano mediante citogrammi in cui le popolazioni cellulari di leucociti (WBC), eritrociti (RBC), piastrine (PLT), reticolociti (RET) ed eritroblasti (NRBC) si distribuiscono graficamente.

I citogrammi generati dai diversi analizzatori possono essere bidimensionali o tridimensionali a seconda della tecnologia utilizzata.
Gli strumenti ematologici inoltre, forniscono una serie di allarmi morfologici ("flag" di sospetto) per la presenza sospetta di atipie quali cellule immature, cellule di tipo reattivo o blasti, e di allarmi di tipo numerico quantitativo qualora risultasse alterato il normale conteggio cellulare, in base alle soglie numeriche impostate sugli analizzatori. Altri allarmi possono essere invece rappresentativi di un malfunzionamento dell'analizzatore.
La presenza di questi allarmi morfologici deve indirizzare l' operatore verso la revisione microscopica del campione, al fine di verificare la presenza di cellule anomale, di classificarle in base alla loro morfologia, ed eventualmente quantificarle, con lo scopo di produrre un referto completo di commenti per indirizzare la diagnosi (2).

Le tecnologie moderne permettono di affiancare agli analizzatori di laboratorio dei software esperti di validazione che utilizzano i dati qualitativi e quantitativi forniti dagli strumenti, per inviare i campioni anomali alla

revisione microscopica, ad ulteriori approfondimenti mediante test riflessi, o verso la validazione automatica del campione se i dati risultano nella norma o in linea con la storia clinica del paziente.

I casi che verranno presentati in questo breve capitolo sono stati ottenuti con la tecnologia Mindray SF Cube sullo strumento BC 6200 affiancato dal Software esperto LabXpert.
Lo strumento, per la conta differenziale dei leucociti, eritroblasti e la generazione dei citogrammi, utilizza il principio della citometria a flusso abbinata alla fluorescenza. Una luce laser opportunamente orientata interagisce con le cellule generando segnali nelle 3 direzioni.
In particolare il segnale di Side Laser Scatter (SS) riflette la complessità delle cellule, il Forward Laser Scatter (FW) le dimensioni e la Fluorescenza (FL) il contenuto in acidi nucleici delle cellule.
Nel sistema Mindray BC 6200 sono tre i canali di lettura che generano altrettanti citogrammi tridimensionali: DIFF, WNB e RET.

1. Nel canale DIFF (Figura 1) vengono conteggiate le sottopopolazioni leucocitarie (Linfociti, Monociti, Neutrofili, Eosinofili). Nel citogramma DIFF l'asse X (SS) riflette la complessità cellulare, l'asse Y (FL) l'intensità di fluorescenza, quindi il contenuto in acidi nucleici delle cellule, e l'asse Z (FS) la dimensione.

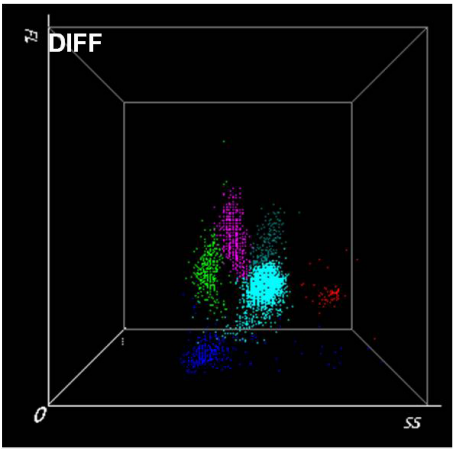


Figura 1. Citogramma DIFF scattergram da Mindray BC 6200 di un campione normale. L'asse X (SS) riflette la complessità cellulare, l'asse Y (FL) l'intensità di fluorescenza, l'asse Z (FS) la dimensione callulare. Il cluster verde è rappresentato dai linfociti, quello fucscia dai monociti, quello azzurro dai granulociti neutrofili, quello rosso dagli esosinofili

Quando presenti, all' estremità superiore dell'asse della fluorescenza si posizionano linfociti atipici, attivati, plasmacellule e blasti. Tali cellule atipiche vengono conteggiate mediante il parametro di ricerca HFC (High Fluorescence Cells).
Il citogramma evidenzia anche, come cluster separato, i granulociti immaturi che vengono indicati e conteggiati come IMG in valore assoluto ed in percentuale. Il conteggio dei granulociti immaturi è parte integrante della formula leucocitaria.

2. Il canale WNB (Figura 2) conteggia i leucociti totali, i basofili e gli eritroblasti.

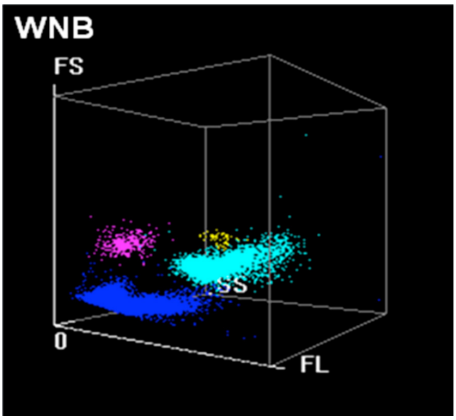


Figura 2. Citogramma WNB di un campione normale. Sono rappresentati in azzurro i leucociti , in fuscia gli eritroblasti , in giallo i leucociti basofili e in blu le ombre cellulari

3. Nel canale RET vengono conteggiati gli RBC con metodo ottico e tutte le forme di reticolociti, a bassa (LFR), media (MFR) ed alta fluorescenza (HFR).
Il canale quantifica in modo accurato le piastrine con metodo ottico/ fluorescente grazie all' uso di un colorante fluorescente specifico per l'RNA nucleolare, anche in caso di trombocitopenia, grazie all'estensione di 8 volte del tempo di conta.
Questa modalità di lettura delle piastrine viene utilizzata come test riflesso in base a regole configurate sul software esperto (LabXpert), in presenza del allarmi di sospetto "aggregati piastrinici?" che si generano sul citogramma DIFF o in presenza di anomalie o interferenze morfologiche o numeriche sul conteggio impedenziometrico delle piastrine.

Allarmi Morfologici relativi a linfociti
Nella tecnologia Mindray, un'anomalia di distribuzione dei linfociti a livello del citogramma DIFF, comporta la generazione di allarmi morfologici diversi che devono sensibilizzare l'operatore verso ulteriori approfondimenti.
In particolare, in relazione al sospetto clinico, unitamente al conteggio linfocitario, gli allarmi devono indurre ad una approfondita revisione microscopica del campione per la ricerca di anomalie a livello del nucleo, del citoplasma e della dimensione cellulare, che dovranno poi essere riportate sul referto (2).
Gli allarmi strumentali che possono generarsi sul citogramma DIFF relativamente alla morfologia linfocitaria, sono "blasti", "linfociti atipici" e "linfociti anomali/blasti".

Allarme "Linfociti atipici"
L'allarme "Linfociti atipici" compare quando nel citogramma DIFF, al di sopra del cluster dei linfociti, si posiziona una popolazione di cellule a più alta fluorescenza quindi a maggior contenuto di acidi nucleici (Figura 3). Le cellule appartenenti a questo cluster aggiuntivo vengono quantificate tra i parametri di ricerca (RUO, Research Use Only) mediante il parametro HFC (High Fluorescence Cells) sia in valore assoluto che in percentuale.
Un esempio tipico è quello rilevato nei campioni contenenti plasmacellule.

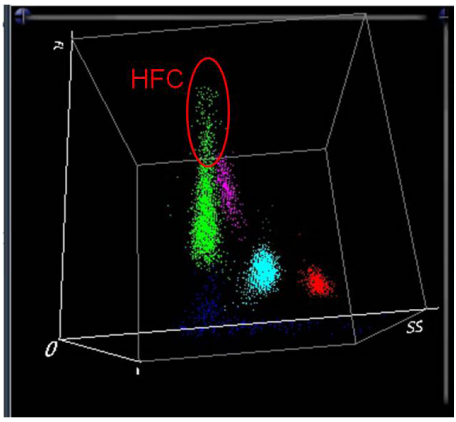


Figura 3. Diff scattergram di un campione in cui si è generato l'allarme "Linfociti atipici" per la presenza al di sopra della nuvola di distribuzione dei linfociti (in verde), di una popolazione di cellule a più alta fluorescenza quindi a maggior contenuto di acidi nucleici (HFC)

Allarme "Linfociti anomali/blasti"
L'allarme morfologico "Linfociti anomali/blasti" si genera quando nel campione sono presenti cellule a più alta complessità cellulare e dimensione . In questo caso il caso il cluster di distribuzione delle cellule atipiche risulta addossato a quello dei normali linfociti (Figura 4).

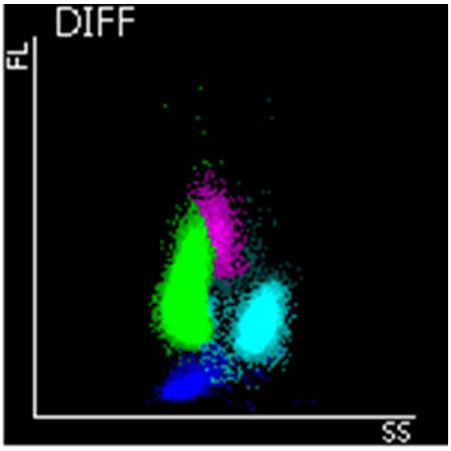


Figura 4. Diff scattergram di un campione in cui si è generato l'allarme morfologico "Linfociti anomali/blasti" . Nel campione sono presenti, vicino ai linfociti (in verde) cellule atipiche a più alta complessità cellulare e dimensione .Il cluster di distribuzione delle cellule atipiche risulta addossato a quello dei normali linfociti (segnalato sempre in verde) e risulta non distinguibile da esso.

Questo allarme può comparire nel caso di virosi, linfomi, e in presenza di blasti.

Per concludere questa premessa, prima di entrare nel merito dei casi clinici, si sottolinea come la tecnologia presentata, permetta attraverso l'osservazione dei citogrammi, la distinzione delle linfocitosi di natura reattiva da quelle neoplastiche.
Nelle linfocitosi reattive o secondarie il cluster di distribuzione dei linfociti assume la forma di una goccia allungata lungo l'asse della fluorescenza per la presenza di cellule con intensa attività di sintesi.
Al contrario, nelle linfocitosi primarie, il cluster linfocitario risulta più compatto ed omogeneo senza alcuna estensione verso la parte alta dell'asse della fluorescenza.

Caso clinico 1

Una ragazza di 14 anni si presenta in Pronto Soccorso alle ore 23.00 per epigastralgia e nausea. L'esame obiettivo evidenzia linfoadenomegalie laterocervicali e faringodinia.

Il medico prescrive esami ematochimici di base. Le transaminasi epatiche risultano aumentate (AST 120 U/L, ALT 277 U/L) e l'emocromo evidenzia linfocitosi.

Nell'immediato sospetto di un infezione virale vengono prescritti per il giorno successivo la ripetizione dell'emocromo e un approfondimento sierologico: reazione di Paul Bunnel (Monotest), Anticorpi IgM anti Citomegalovirus, Anticorpi anti Epstein Virus EBNA IgG e VCA IgM.

L'analisi emocromocitometrica, eseguita la sera stessa dell'accesso in Pronto Soccorso, evidenzia una conta di WBC di 9.43 x 10^3 / uL con linfocitosi (6.51 x 10^3 /uL ; 68.9 %).

Nel canale di lettura DIFF è comparso l'allarme numerico "linfocitosi" (per superamento dei limiti di normalità impostati sullo strumento Mindray 6200) unitamente ad altri due allarmi morfologici relativi ai linfociti "linfocita atipico" e "linfo/ blasti anomali".

Le regole di validazione impostate sul software LabXpert indirizzano il campione alla revisione microscopica per la presenza di un conteggio elevato dei linfociti e per la presenza di cellule linfocitarie anomale.

Il software LabXpert suggerisce, mediante messaggi preimpostati, di verificare il conteggio delle cellule ad alta fluorescenza (HFC# ed HFC%), tra i paramentri di ricerca.

L'analisi del citogramma DIFF mostra la presenza di un cluster di cellule, che partendo dai linfociti si protende verso l'estremità dell'asse FL, nella regione delle cellule ad alta fluorescenza (HFC). Il cluster linfocitario assume la forma di una goccia allungata (Figura 5A). I monociti invece, sono poco rappresentati.

La rotazione del citogramma trimensionale DIFF (Figure 5B e 5C) permette di visualizzare, a lato del cluster delle cellule mononucleate linfocitarie, la presenza di un cluster aggiuntivo di cellule con dimensioni ridotte.

Il conteggio delle cellule ad alta fluorescenza (HFC), riportato nei parametri di ricerca, è HFC # = 0.20 x 10^3 /uL ; HFC% = 2.1%.

I dati leucocitari quantitativi, le anomalie evidenziate nel citogramma DIFF e la presenza di allarmi morfologici inducono l'operatore ad eseguire la revisione microscopica dello striscio di sangue.

L'osservazione microscopica evidenzia:

1. la presenza di linfociti attivati (riconducibili alle cellule che si estendono nella parte alta del citogramma, lungo l'asse FL indicate HFC (Figura 5A)
2. la presenza di linfociti apoptotici che verosimilmente costituiscono

il cluster di linfociti aggiuntivo, di dimensione ridotta rispetto al cluster linfocitario normale (Figura 5B e 5C).

Il quadro risulta compatibile con una linfocitosi di tipo reattivo.
Gli approfondimenti sierologici, pervenuti successivamente, escludono un

A

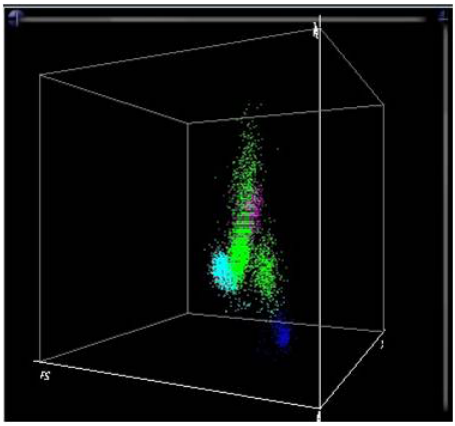
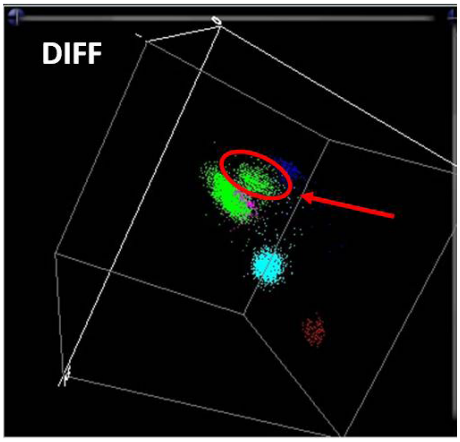


Figura 5A. DIFF Scattergram di un campione in cui il cluster linfocitario si protende verso l' estremità dell'asse FL, nella regione delle cellule ad alta fluorescenza (HFC) e assume la forma di una goccia allungata . Le cellule HFC ad alto contenuto di acidi nucleici sono, nel caso clinico riportato, linfociti di tipo reattivo.
E' visibile la presenza di un secondo cluster di cellule a dimensione ridotta (in verde)

B



C

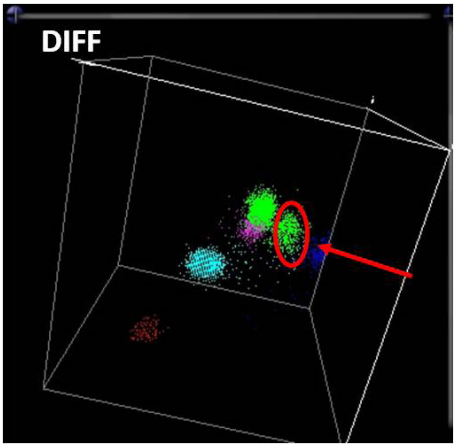


Figure 5B e 5C. La rotazione del citogramma trimensionale DIFF permette di visualizzare, a lato del cluster delle cellule mononucleate linfocitarie, la presenza di un cluster aggiuntivo di cellule con dimensioni ridotte

infezione da Citomegalovirus e confermano il sospetto di Mononucleosi infettiva da Epstein-Barr virus (Tabella 1).

TEST	Risultato	Valori di Riferimento
Anticorpi IgM anti CMV	negativo	negativo
EBV VCA IgM	>160 UI/mL	< 40 UI/mL
EBV EBNA IgG	<3 UA/mL	< 20 UA/mL
Reazione di Paul Bunnet (monotest)	positiva	negativa

Caso clinico 2

Una paziente donna di 79 anni giunge in Pronto Soccorso per addominalgia. L'esame obiettivo mostra addome globoso e teso, splenomegalia, linfoadenomegalia delle stazioni linfodonali superficiali.
L'RX addome, richiesto in urgenza dal chirurgo, evidenzia una subocclusione intestinale.
I parametri biochimici sono i seguenti: Creatinina: 1.30 mg/dL; Azotemia: 103 mg/dL; PCR: 5.5 mg/dL. La paziente viene ricoverata.

E l'emocromo?
L'esame emocromocitometrico mostra anemia (emoglobina pari a 9.0 g/dL), piastrine nella norma (260 x 10^3/uL) e una marcata leucocitosi (WBC 147.00 x 10^3 / uL). Il software segnala mediante un allarme visivo il valore critico rilevato per quest'ultimo parametro.
La formula leucocitaria conta 126.000 x 10^3/uL linfociti (85.4 % dei WBC).
Sono presenti eritroblasti (NRBC) .
Sono comparsi l'allarme numerico "linfocitosi" e l'allarme morfologico "linfo/blasti anomali".
L'analisi dei citogrammi DIFF e del citogramma WNB (Figura 6A e 6B) mostrano come il cluster dei linfociti sia maggiormente rappresentato rispetto a quello degli altri leucociti. Tale cluster risulta compatto ed omogeneo, rappresentato quindi da cellule monomorfe.

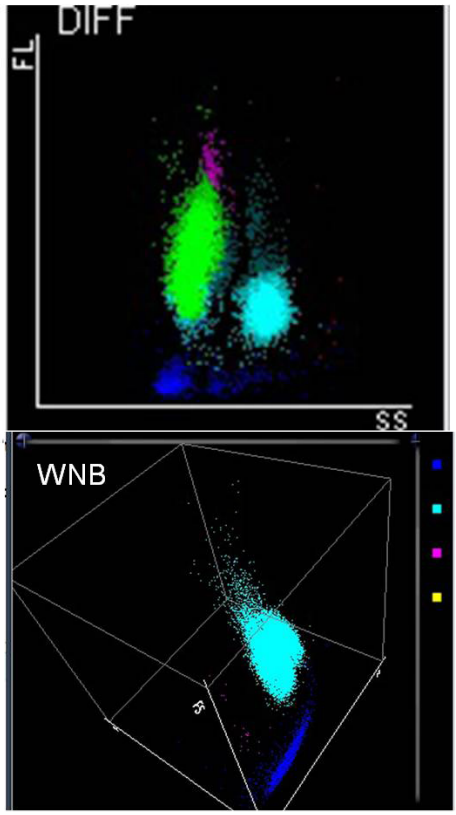


Figura 6A e 6B citogrammi DIFF e del citogramma WNB del caso clinico 2. Il cluster dei linfociti è maggiormente rappresentato rispetto a quello degli altri leucociti.

Il campione viene indirizzato alla revisione microscopica. L'analisi dello striscio evidenza la presenza di:

1. elementi linfocitari con nucleo ipercromatico con pattern a mosaico e scarso citoplasma (Figura 7)
2. ombre nucleari (di Gumprecht)

L'esame citofluorimetrico dell'aspirato midollare, richiesto dall'ematologo,

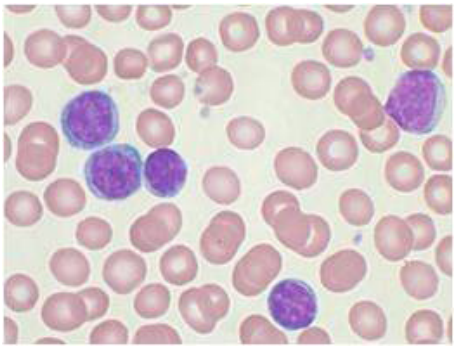


Figura 7. Elementi linfocitari con nucleo ipercromatico con pattern a mosaico e scarso citoplasma

evidenzia sul totale dei leucociti la presenza dell'86% di linfociti. Tale frazione linfocitaria è costituita per il 91.5% da linfociti B di tipo CD5+, CD19+,CD23+
Il quadro risulta compatibile con il sospetto di una Leucemia Linfatica Cronica.
Date le condizioni generali della paziente (paziente con demenza senile), l'età avanzata, si decide di non trattarla con terapia chemioterapica ma con steroidi.

Caso clinico 3

Un paziente maschio di 70 anni giunge in PS per astenia e riferiti dolori addominali da alcuni giorni.
L'esame obiettivo mostra splenomegalia.
I primi esami ematochimici sono indicativi di un'insufficienza renale (Creatinina 3.0 mg/dL). L'emocromo mostra anemia macrocitica (HGB = 7.1 g/dL ; MCV = 107.2 fl) e piastrinopenia (PLT = 43 x $10^{3/}$ uL).
I leucociti sono nella norma (WBC= 4.34 10^3/uL) ma i parametri della formula sono accompagnati dal simbolo "R" ad indicare che la formula va ricontrollata.

Sul citogramma DIFF compare l'allarme "linfociti atipici?"

I suggerimenti del software esperto indirizzano a verificare il conteggio delle cellule ad alta fluorescenza. La conta delle cellule HFC# è pari a 0.55 x10^3/uL e 12.6 %

L'analisi del citogramma DIFF (Figura 8) indica la presenza di un cluster di cellule, posizionato al di sopra dei monociti, che si estende nella parte alta del citogramma, lungo l'asse FL (zona delle cellule ad alta fluorescenza).
Tale cluster di cellule aggiuntivo (cellule HFC) risulta spostato lungo l'asse SS ed FS, indicando cellule più grandi e più complesse rispetto ai linfociti.

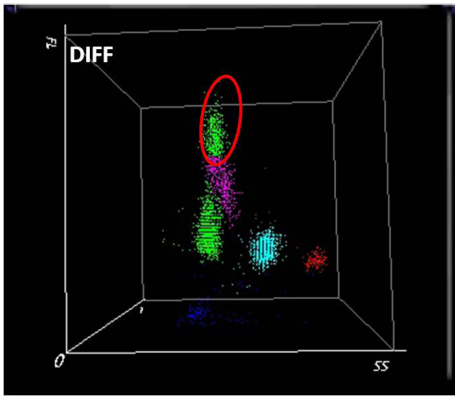


Figura 8. Citogramma DIFF del caso clinico 3. E' evidente la presenza di un cluster di cellule, sopra dei monociti, che si posiziona nella zona delle cellule ad alta fluorescenza.
Tale cluster di cellule aggiuntivo (cellule HFC) essendo spostato lungo l'asse SS ed FS, è costituto da cellule più grandi e più complesse rispetto ai linfociti.

Il campione viene analizzato al microscopio.
L'analisi morfologica dello striscio evidenzia macrocitosi, anisocitosi, ipocromia delle emazie, e presenza di emazie rouleax.
E' evidente la presenza di linfociti atipici e di cellule di grandi dimensioni, con citoplasma basofilo, nucleo eccentrico e cromatina variamente condensata classificate come plasmacellule in quantità 12-14% (Figura 9) (incluse nel conteggio dei linfociti, affiancato dal simbolo R). La piastrinopenia è confermata.
L' elettroforesi delle siero proteine, richiesta nel corso del ricovero ospedaliero, rileva un aumento delle proteine totali (10.3 g/dL), ipoalbuminemia e la presenza di una componente monoclonale di notevole entità (5.9 g/dL) in zona gamma globuline tipizzata come IgA-Lambda, che orientano il clinico verso il sospetto di una Mieloma.

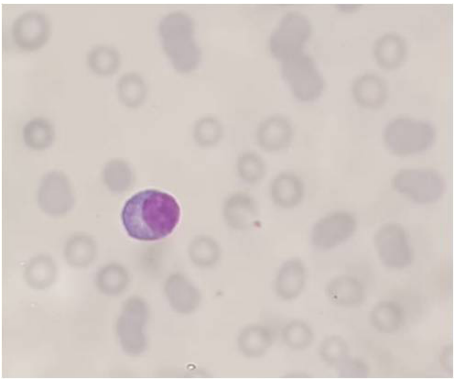


Figura 9. E' inquadrata una cellule di grandi dimensioni, citoplasma basofilo nucleo eccentrico e cromatina variamente condensata, classificata come plasmacellula.

Caso clinico 4

Una giovane ragazza di 13 anni arriva in Pronto Soccorso con febbre da alcuni giorni e presenza di petecchie diffuse in tutto il corpo.
Gli esami ematochimici evidenziano leucocitosi (WBC = 28.68 x 10^3 / uL); trombocitopenia (PLT=11 x 10^3 / uL); anemia (HGB = 8.30 g/dL), LDH, transaminasi e Proteina C reattiva aumentate (Tabella 2).

TEST	Risultato	Valori di Riferimento
LDH	16.000 U/L	< 214 U/l
AST	175 U/L	< 32 U/L
ALT	43 U/L	< 33 U/L
Proteina C reattiva	1.49 mg/dL	< 0.5 mg/dL

Viene immediatamente valutato l'emocromo ed eseguito lo striscio del sangue periferico.
Nell'analisi della formula leucocitaria lo strumento conta 1.91 x 10^3 / uL granulociti neutrofili, ma non quantifica i linfociti e i monociti.
Nel citogramma DIFF (Figura 10) accanto all'area di distribuzione dei neutrofili associata al colore azzurro, è presente un unico cluster grigio; l'analizzatore non è riuscito a classificare correttamente le popolazioni dei leucociti, in base alle caratteristiche di dimensioni, complessità e fluorescenza, segnalando l'allarme "anomalia dispersione WBC".

Compare inoltre l'allarme morfologico relativo ai linfociti "linf/blasti anomali".

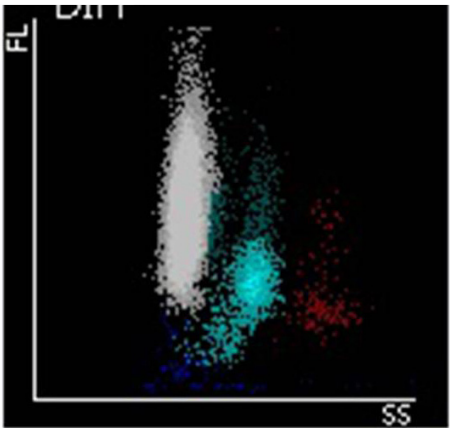


Figura 10. Nel citogramma DIFF accanto all'area di distribuzione dei neutrofili associata al colore azzurro, è presente un unico cluster indicato in grigio perchè l'analizzatore non è riuscito a classificare i leucociti.
E' visibile la presenza di un secondo cluster di cellule a dimensione ridotta (in verde)

La rotazione del citogramma DIFF (Figura 11) evidenzia, accanto l'esteso cluster grigio, la presenza di un secondo raggruppamenti di cellule (sempre

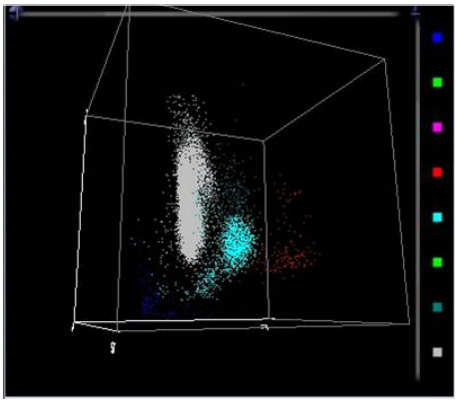


Figura 11. La rotazione del citogramma DIFF del caso clinico 4, evidenzia, accanto l'esteso cluster grigio, la presenza di un secondo raggruppamento di cellule (sempre in grigio) con dimensioni maggiori rispetto a quelle dei linfociti

indicate in grigio) con dimensioni maggiori rispetto a quelle dei linfociti e con una fluorescenza maggiore rispetto a quella dei monociti.
La revisione microscopica del campione (Figura 12) evidenza la presenza di blasti (80-85%) con poco citoplasma, nucleoli non visibili o piccoli e poco apprezzabili. Cromatina dispersa a blocchi nelle cellule più piccole, omogenea in ogni caso e presenza di vacuoli variabile. Leucociti neutrofili iposegmentati.

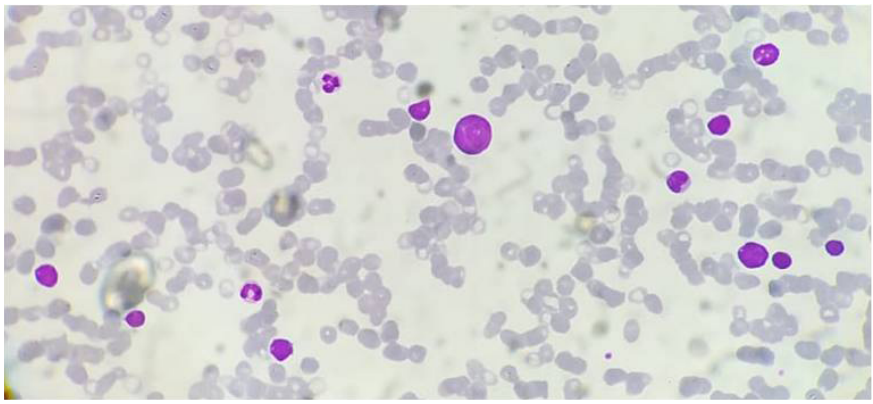


Figura 12. Striscio di sangue del caso clinico 4. Si osserva la presenza di blasti con poco citoplasma, nucleoli non visibili o piccoli e poco apprezzabili.

Viene richiesta l'esecuzione di esami emocoagulativi per escludere una concomitante patologia coagulativa (DIC).
Fibrinogeno e D-Dimero risultano lievemente aumentati e quindi non indicativi di una patologia da consumo.

Il quadro risulta compatibile con la sospetta presenza di una Leucemia Linfoblastica Acuta L1.

Caso clinico 5

Un paziente maschio di 47 anni viene inviato dal medico curante in un ambulatorio ospedaliero per persistente febbre, astenia, adenomegalia e intermittente dolore addominale.
Esegue:

1. Emocromo
2. Pannello biochimico epatico e pancreatico completo

Il quadro epatico e pancreatico risultano nella norma.

L' emocromo è caratterizzato leucopenia, neutropenia, monocitosi e marcata trombocitopenia (55.000 x 10^3 / uL PLT).
L'analizzatore segnala la presenza di alterazioni morfologiche a carico dei linfociti mediante l'allarme "Linfo/blasti anomali".
Il software esperto consiglia di verificare il conteggio e la morfologia dei monociti.

Sul citogramma DIFF (Figura 13) è evidente la presenza di un cluster di cellule classificate come monociti (associate al colore fucsia) ma che, diversamente da questo, si posiziona al di sopra dei linfociti, essendo costituito da cellule più grandi e con maggiore complessità.

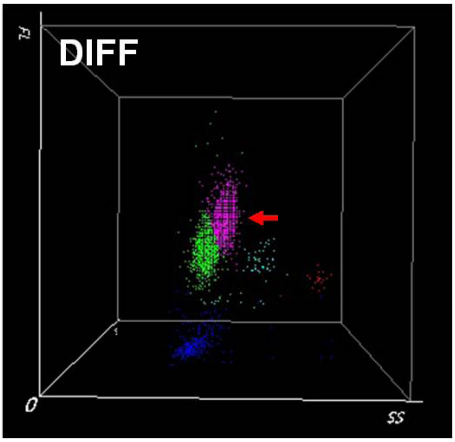


Figura 13. Citogramma DIFF del caso clinico 5. E' visibile la presenza di un cluster di cellule classificate come monociti e rappresentate in colore fucsia ma costituto da cellule più grandi e con maggiore complessità dei monociti.

L'analisi al microscopio (Figura 14) evidenzia:
Anisocitosi ed ipocromia delle emazie
Leucopenia e spiccata neutropenia.
Presenza di linfociti in prevalenza atipici con cromatina finemente zollata, senza evidenti nucleoli e con numerose estroflessioni citoplasmatiche (Hairy Cells).

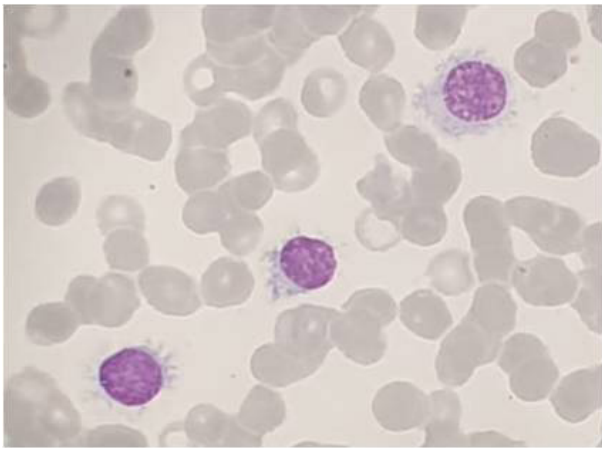


Figura 14. Striscio periferico in cui si osserva la presenza di linfociti con cromatina finemente zollata, senza evidenti nucleoli e con numerose estroflessioni citoplasmatiche

Conclusioni

La casistica illustrata dimostra la necessità di operare un' attenta valutazione dell'esame emocromocitometrico considerando i dati numerici (conteggi cellulari) , i dati qualitativi (presenza di allarmi morfologici) e analizzando le popolazioni cellulari dei citogrammi.
La tecnologia Mindray SF Cube, con la pecularità della tridimensionalità dei citogrammi, e la possibilità di ruotarli secondo tutte le dimensioni dello spazio, consente una più chiara visione delle popolazioni leucocitarie compresa la presenza di piccoli cluster non visibili attraverso l'analisi analisi bidimensionale.

Dagli esempi di linfocitosi riportati in questo breve capitolo appare evidente come la tecnologia SF Cube permetta una chiara distinzione fra le linfocitosi di natura reattiva e le linfocitosi neoplastiche.

Gli allarmi morfologici che si generano sui citogrammi, le regole di validazione e i suggerimenti esperti del software LabXpert, indirizzano il laboratorista verso la revisione microscopica dello striscio periferico per un' attenta verifica delle atipie cellulari segnalate e per la formulazione di un referto ematologico descrittivo che unitamente agli altri dati clinici, possa essere di aiuto al clinico nel percorso di diagnosi (2).

Bibliografia

1) McPherson R.A., Pincus M.R.: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 21 Edition Saunder Elsevier

2) La Gioia A., Balboni F., Buoro S., Fanelli A., Gioia M., Marini A., Pipitone S., Da Rin G., Di Fabio A., Fiorini F., Francione S., Papa A., a nome del gruppo di studio SIBioC Medicina di Laboratorio Diagnostica Ematologica; I commenti interpretativi nel referto ematologico di laboratorio. Biochimica Clinica , 2016, vol 40, n.3, 255-269.

La Qualità del risultato nella diagnostica ematologica di Laboratorio: la VEQ della Morfologia Cellulare

Alessandra Fanelli, Alessandra Mongia, Sara Ciullini Mannurita

L'esame morfologico cellulare dello striscio di sangue periferico rappresenta, ancora oggi, un'indagine diagnostica di fondamentale importanza in quanto: può permettere una diagnosi definitiva, è uno strumento importante per la diagnosi differenziale e per l'indicazione a eseguire ulteriori test, ha un ruolo cruciale nell'identificazione e nella caratterizzazione delle neoplasie ematologiche. Nonostante gli enormi avanzamenti tecnologici delle metodiche citofluorimetriche e di genetica molecolare avvenute negli ultimi anni, tale importanza diagnostica è ribadita anche nell'ultima edizione della classificazione WHO delle patologie ematologiche. La morfologia è, infatti, lo specchio della funzionalità cellulare, evidenziandone maturità, immaturità, asincronia maturativa, reazione agli stimoli, attivazione, morte; e l'analisi morfologica si configura come il processo ricognitivo interpretativo che consente di prendere decisioni di differenziazione e di catalogazione delle cellule e, quindi, decisioni cliniche.

La morfologia cellulare: dal microscopio ottico all'analizzatore di immagini

L'impressionante miglioramento delle tecniche di imaging digitale degli ultimi anni ha aperto la strada all'uso dell'analizzatore di immagini in sostituzione o complementare al classico microscopio ottico. Tramite questo strumento, le immagini microscopiche delle cellule ematologiche sono fotografate utilizzando camere digitali a elevata risoluzione in grado di produrre immagini dettagliate di porzioni citologiche, che possono poi essere visionate utilizzando monitor a elevato ingrandimento.
Kratz e collaboratori in una recente review (1) hanno messo ben in evidenza vantaggi e svantaggi di questo strumento. L'analizzatore di immagini presenta vantaggi analitici, tra cui la standardizzazione della zona di analisi, il conteggio rapido e meno faticoso, la pre-classificazione dei globuli bianchi con possibilità di confronto con immagini di riferimento, la maggiore oggettività morfologica e la maggiore sensibilità nel riconoscimento delle cellule rare. In secondo luogo, ci sono innegabili vantaggi legati alla

connettività: operatori diversi che si trovano a distanza possono visualizzare le stesse immagini, le immagini non sono soggette a deterioramento e sono facilmente archiviabili, si ha la totale tracciabilità del dato ematologico morfologico. Importante anche l'impatto sull'attività didattico-formativa: tramite l'uso di immagini digitali si può armonizzare la professionalità degli specialisti, facilitarne l'addestramento e la formazione continua (E-learning), viene stimolata la ricerca scientifica mediante la creazione di database di immagini per studi mono o multicentrici. Ultimo impatto, non meno importante, è quello inerente l'accuratezza e la tempestività diagnostica con confronti su casistica complessa e consulti a distanza. Nella stessa review sono stati messi in evidenza anche i punti deboli di tale strumentazione, in primis i possibili errori nella preclassificazione delle cellule, soprattutto di quelle patologiche quali blasti, granulociti immaturi, cellule displastiche, schistociti, eventuale presenza di parassiti intracellulari ecc.
Da qui risulta indispensabile che gli operatori che si approcciano alla morfologia digitalizzata siano formati adeguatamente al riconoscimento di tali cellule e soprattutto mantengano tale formazione nel tempo, come miglioramento continuo della professionalità acquisita.

La VEQ della morfologia cellulare

Il punto 7.1 della ISO 15189 ribadisce che il personale responsabile delle valutazioni dei risultati delle analisi deve possedere adeguate conoscenze teoriche e pratiche e appropriata esperienza sul campo e che la competenza, la preparazione e la qualificazione devono essere documentate, così come anche le attività di addestramento e di aggiornamento. In aggiunta, il punto 7.6 della norma sottolinea che il laboratorio deve partecipare a valutazioni interlaboratorio o a valutazioni esterne di qualità o a programmi di valutazione adeguati alla complessità delle procedure analitiche e diagnostiche utilizzate dal laboratorio.
L'esecuzione di esercizi di programmi di Valutazione Esterna di Qualità di morfologia cellulare rappresenta senz'altro una risposta a queste esigenze.

Il Centro Di Riferimento Sicurezza e Qualità della Regione Toscana offre gli esercizi del programma "VEQ Morfologia ematologica". Il programma prevede l'invio annuo di 4 strisci di sangue venoso periferico colorati con May Grumwald Giemsa da leggere al microscopio ottico o all'analizzatore di immagini, e 4 esercizi con immagini digitali. Per ogni esercizio vengono inviati i dati dell'esame emocromocitometrico e brevi note cliniche. Facendo riferimento a una tabella predefinita di anomalie morfologiche delle diverse popolazioni cellulari, i professionisti devono segnalare le anomalie predominati.

Per quanto riguarda la valutazione delle risposte, in modo sperimentale dall'anno 2020, la valutazione dei dati di ritorno è basata sul posizionamento del dato inviato rispetto alla frequenza di risposta. Vengono presentate le prime 10 posizioni sul totale delle risposte inviate. Le risposte del laboratorio (massimo 6) sono anche riportate come posizione rispetto alla classifica generale (Tabella 1). Una guida dettagliata dell'Elaborato e della statistica applicata è presente sul sito web alla voce 'Razionale programmi VEQ'.
Per ogni esercizio, il Centro di Riferimento Regionale invia ai partecipanti il "Commento degli esperti" effettuato da professionisti con autorevole e riconosciuta competenza in diagnostica ematologica:
1-Descrizione del vetrino (le maggiori anomalie che il partecipante avrebbe dovuto vedere);
2-Percorso diagnostico (come da storia clinica/follow-up del paziente, esempio: approfondimenti diagnosi/II livello);
3-Commento dei risultati dei partecipanti;

ANOMALIE CELLULARI A

Leucociti			Nr.
	56	Senza anomalie	66
	03	Neutrofili con nucleo ipersegmentato	51
	05	Neutrofili ipo/agranulati	49
	73	Neutrofili ipergranulati	28
	11	Linfociti attivati	24
	91	Elementi immaturi della serie mieloide	24
	54	Linfociti atipici	21
	74	Neutrofili con anomalia di Pelger	16
	09	Ombre di Gumprecht	14
	52	Grandi linfociti granulati (LGL)	6
	75	Neutrofili con corpi di Dohle	5
	90	Blasti	5
	14	Plasmacellule	2
	72	Prolinfociti	1
	55	Tricoleucociti	1

Eritrociti			Nr.
	22	Anisocitosi e/o Poichilocitosi	66
	70	Senza anomalie	34
	58	Ovalociti/Ellissociti	22
	36	Emazie con inclusioni	20
	23	Anisocromia/Ipocromia	7
	34	Schistociti	2
	27	Emazie a bersaglio (Target Cells)	1
	77	NRBC	1
	59	Echinociti	0
	60	Emazie a falce	0
	57	Rouleaux Eritrocitari	0
	24	Dacriociti	0

Piastrine			Nr.
	71	Senza anomalie	84
	21	Anisocitosi piastrinica	83
	78	Plastrine Macrocitiche	50
	80	Piastrine ipo/agranulate	4
	79	Satellismo Piastrinico	2
	17	Aggregati piastrinici	1
	19	Micromegacarioci	1

Qualità del materiale	Numero
Nessuna risposta:	6
Insoddisfacente:	4
Accettabile:	32
Adeguato:	30

B

Risposte ricevute: **197**

Prime dieci anomalie riportate

Cod.	Elemento	Anomalia	Posizione	Nr.
71	Piastrine	Senza anomalie	1	84
21	Piastrine	Anisocitosi piastrinica	2	83
22	Eritrociti	Anisocitosi e/o Poichilocitosi	3	66
56	Leucociti	Senza anomalie	3	66
03	Leucociti	Neutrofili con nucleo ipersegm	5	51
78	Piastrine	Plastrine Macrocitiche	6	50
05	Leucociti	Neutrofili ipo/agranulati	7	49
70	Eritrociti	Senza anomalie	8	34
73	Leucociti	Neutrofili ipergranulati	9	28
91	Leucociti	Elementi immaturi della serie	10	24

Tuoi risultati

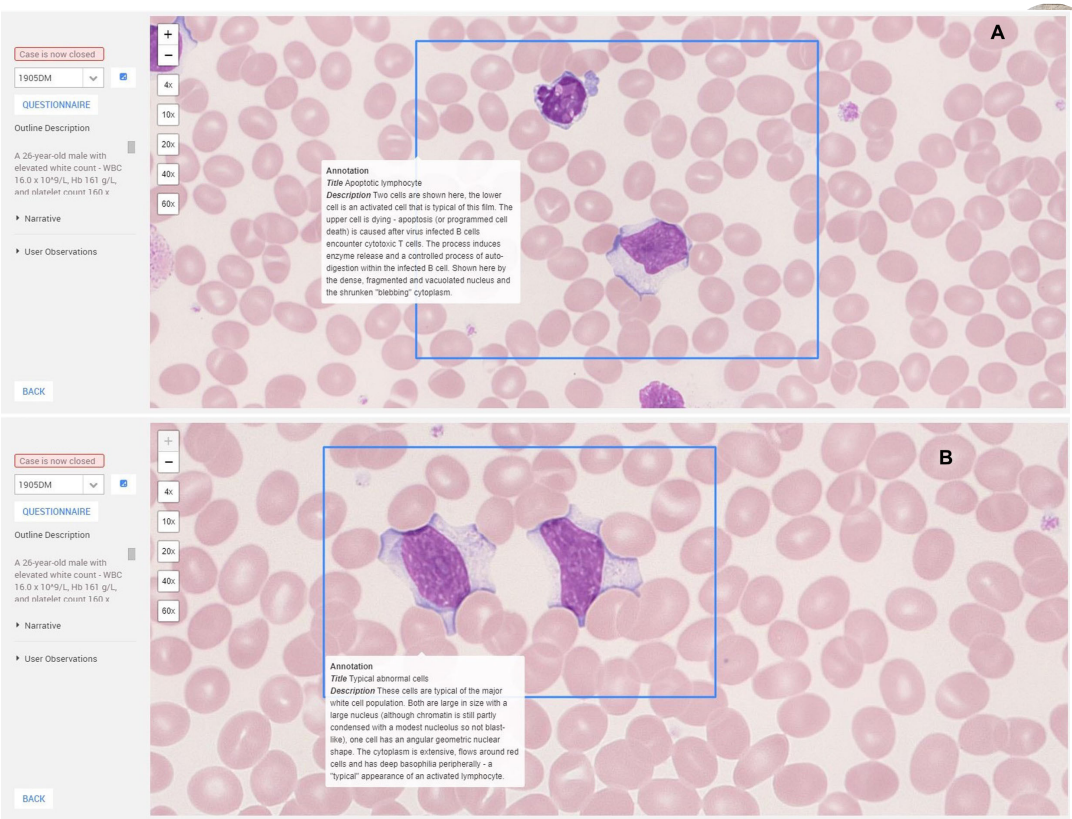
Cod.	Elemento	Anomalia	Posizione	Nr.
71	Piastrine	Senza anomalie	1	84
56	Leucociti	Senza anomalie	3	66
70	Eritrociti	Senza anomalie	8	34

Tabella 1. Esempio di elaborato della morfologia cellulare per singolo campione relativo al programma VEQ Morfologia ematologica del Centro Di Riferimento Sicurezza e Qualità della Regione Toscana. A) Frequenza di anomalie individuate da tutti i partecipanti per sottopopolazione cellulare. B) Classificazione dei risultati in base alla frequenza delle risposte. Sono riportate le prime 10 anomalie più numerose segnalate dai partecipanti, le anomalie individuate dal singolo partecipante e la relazione tra queste ultime e il ranking generale.

4-Eventuale voce bibliografica (non obbligatoria).
Per il 2022 sono previste alcune azioni di miglioramento: 1) il reperimento di casi clinici di particolare interesse; 2) il miglioramento della qualità e la standardizzazione degli strisci ematici da inviare; 3) l'acquisizione delle immagini digitali a vari ingrandimenti per una visione d'insieme del vetrino con la possibilità di ingrandire a piacimento; 4) la messa a disposizione delle immagini su server in modalità fruibile con allestimento di maschera web adatta.

UK NEQAS rappresenta un altro importante provider di programmi VEQ per la morfologia cellulare. Nel programma "Blood films for morphology" è previsto l'invio di due vetrini per l'analisi morfologica delle cellule di sangue periferico. Ai partecipanti si richiede di riportare le caratteristiche morfologiche osservate utilizzando un elenco di codici di riferimento prefissato e fornito con la documentazione che accompagna ogni invio di campioni. E' previsto l'invio di due vetrini per analisi morfologica otto volte in un anno (16 Blood Films in un anno), fissati in metanolo e colorati con May-Grunwald-Giemsa.

UK NEQAS offre, inoltre, il programma "Digital morphology", programma educazionale individuale, totalmente gestito via web, diretto a sviluppare e mantenere la capacità di leggere e interpretare la morfologia di strisci di sangue periferico e midollo. E' aperto a tutti i Paesi del mondo, è diretto a tutti i componenti dello staff del laboratorio integrato di ematologia (tecnici, biologi, medici) ed è riconosciuto come generatore di crediti CPD (Continuing Professional Development) da parte dell'Institute of Biomedical Science britannico. Rispetto ai tradizionali programmi di lettura di vetrini, i reperti morfologici rilevanti per la definizione delle anomalie cellulari, per l'interpretazione e la diagnosi - gli stessi per tutti i partecipanti - vengono singolarmente evidenziati, estensivamente commentati e sono memorizzabili a scopo di archivio.
Il programma educa gli operatori di tutti i livelli a valorizzare gli elementi morfologici diagnostici più importanti di ogni caso clinico e permette nel tempo la costruzione di una biblioteca commentata e consultabile di casistica ematologica (Figura 1).



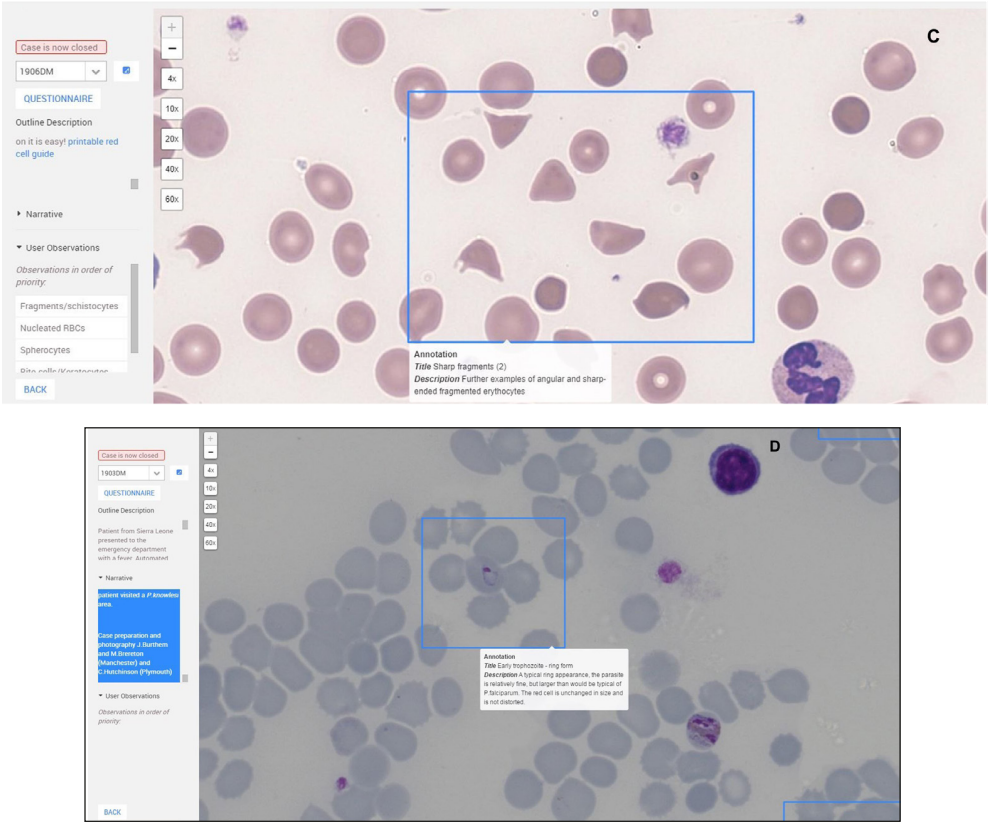


Figura 1. Esempi di report della morfologia cellulare relativi al programma UK NEQAS "Digital morphology". Ogni caso è accompagnato dalla descrizione dei paramenti clinici ed ematologici. Selezionando le singole cellule vengono rappresentate le caratteristiche morfologiche a scopo didattico. Il programma prevede la selezione delle anomalie identificate in scala di priorità e la riposta ad un questionario relativo all'ipotesi diagnostica.

Burthem et al (2) hanno effettuato uno studio pilota per l'uso dei "vetrini virtuali" digitali nella valutazione della qualità ematologica. Condotto insieme allo schema di valutazione della qualità esterna nazionale del Regno Unito per l'ematologia generale, lo studio ha coinvolto 166 partecipanti separati, utilizzando il formato di un tipico esercizio di valutazione.
I partecipanti hanno valutato soggettivamente la loro esperienza di visualizzazione di immagini digitali utilizzando una scala da 1 a 5, riportando una soddisfazione generale per gli aspetti pratici dell'accesso alle immagini (Figura 2). Il feedback dei partecipanti ha inoltre fortemente sostenuto l'uso

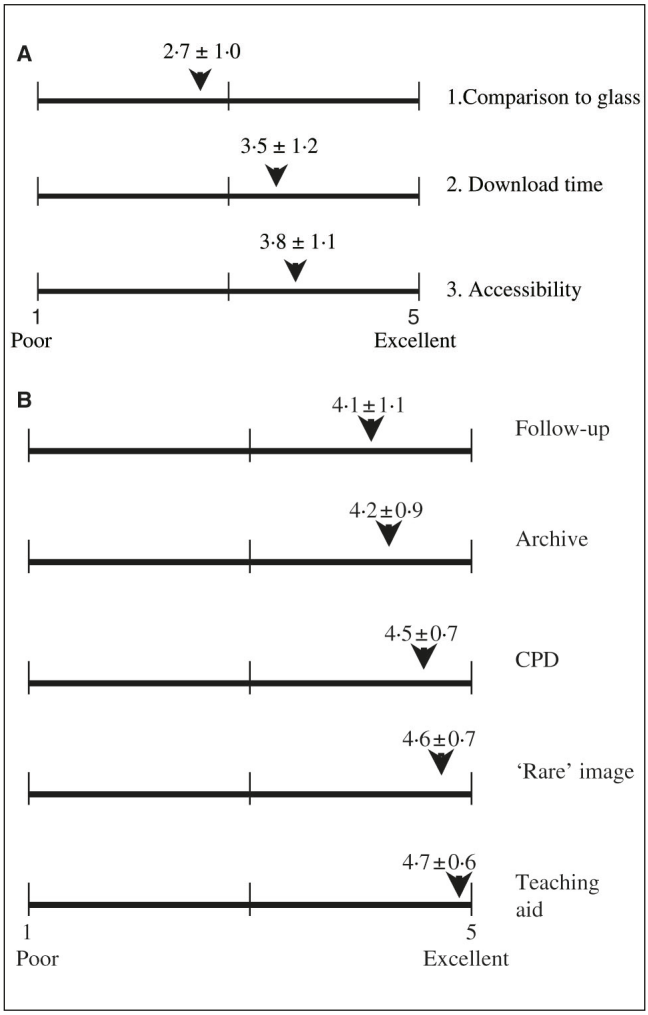


Figura 2. Valutazione comparata di immagini digitali rispetto alla visualizzazione microscopica dei vetrini. Ai partecipanti è stato chiesto di rispondere a domande specifiche utilizzando una scala arbitraria da 1 (meno favorevole) a 5 (più favorevole). Le risposte sono riportate come punteggio medio e deviazione standard. CPD, sviluppo professionale continuo. Figura da Burthem J et al 2005.

di immagini digitali nei ruoli di insegnamento e valutazione.
Lo studio pilota è stato poi condotto allo stesso modo su vetrino standard, ovvero ai partecipanti è stato chiesto di elencare le cinque caratteristiche

morfologiche che consideravano più importanti. I risultati ottenuti dalla valutazione del vetrino digitale sono stati quindi confrontati con i risultati della corrispondente indagine su vetrino. I risultati della valutazione digitale hanno mostrato un'elevata concordanza con quelli riportati nella corrispondente indagine su vetrino, anche se sono state osservate alcune differenze significative per il vetrino della leucemia prolinfocitica e per il vetrino della malaria (Plasmodium ovale) (Figura 3). È probabile che queste

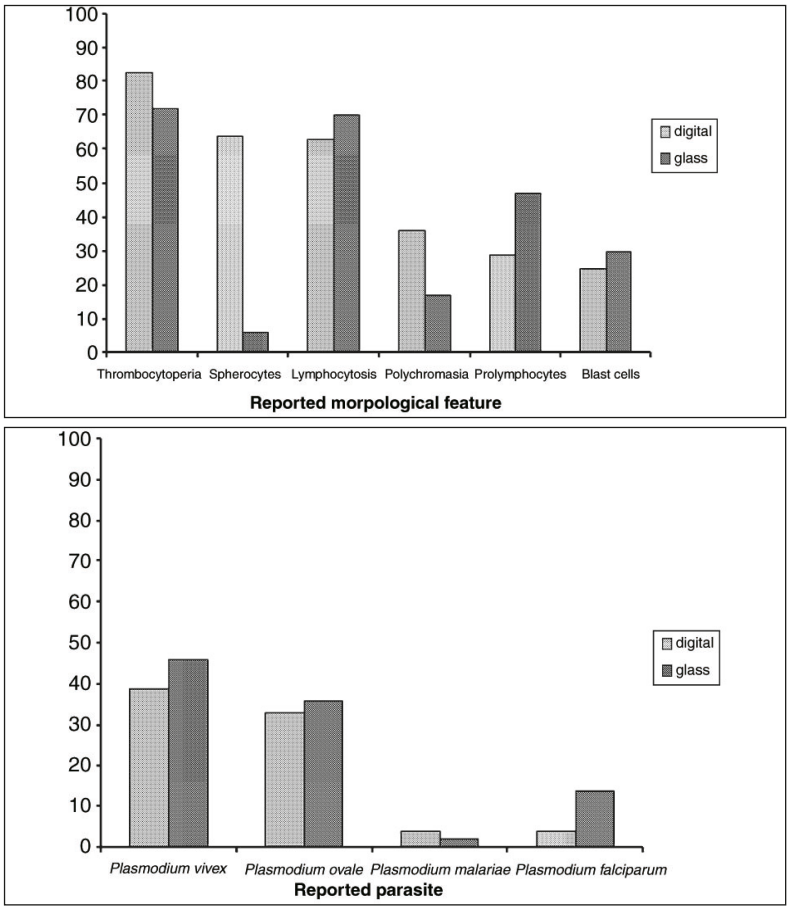


Figura 3. Gli istogrammi mostrano la frequenza di risposte relative alle caratteristiche più comunemente riportate dal sondaggio digitale confrontate con le risposte date nella corrispondente indagine su vetrino. Sono state osservate differenze significative in relazione al vetrino di leucemia prolinfocitica (A) in cui sia la sferocitosi che la policromasia sono state identificate più frequentemente nel vetrino digitale, e al vetrino di malaria (B) in cui P. falciparum è stato identificato più frequentemente sul vetrino. Figura da Burthem J et al 2005.

differenze riflettano la selezione di particolari campi microscopici nella costruzione delle diapositive digitali e, quindi, rappresentino un "bias di selezione del campo" da parte del fotografo. Ciò è un potenziale svantaggio dell'immagine digitale pertanto l'uso di immagini digitali più grandi che comprendano aree di diapositiva più estese ridurrebbe questa distorsione.

In generale, i programmi di VEQ di ematologia digitale offrono dei vantaggi innegabili tra cui:

1) Reperimento di casi clinici rari, soprattutto per i laboratori più periferici;

2) Una più facile distribuzione di immagini uguali per tutti i centri che partecipano al programma;

3) Possibilità di salvare le immagini e di creare una biblioteca di casi di interesse, da cui deriva anche l'elevato valore educativo del programma;

4) Possibilità di fornire un documento oggettivo che dimostri il continuo aggiornamento professionale del professionista di laboratorio, come richiesto dalle norme internazionali.

Bibliografia essenziale

1) A. Kratz, S.H. Lee, G. Zini, J.A. Riedl, M. Hur, S. Machin; International Council for Standardization in Haematology. Digital morphology analyzers in hematology: ICSH review and recommendations. Int J Lab Hematol 2019 Aug;41(4):437-447;

2) J. Burthem, M. Brereton, J. Ardern, L. Hickman, L. Seal, A. Serrant, C.V. Hutchinson, E. Wells, P. McTaggart, B. De la Salle, J. Parker-Williams, K. Hyde. The use of digital 'virtual slides' in the quality assessment of haematological morphology: results of a pilot exercise involving UK NEQAS(H) participants. Br J Haematol 2005 Jul;130(2):293-296.

Ruolo della Citometria a Flusso nella diagnostica differenziale delle linfocitosi

Alessandra Marini

L'approccio diagnostico a una linfocitosi, definita, negli adulti, come numero di linfociti circolanti > 4 x 10^9/L, si avvale di diverse metodiche, le quali comprendono osservazione morfologica, test sierologici, citofluorimetria (CFM), con ulteriore approfondimento secondo la complessità del quadro clinico. L'osservazione morfologica permette di identificare linfociti "attivati" oppure linfociti "atipici", già suggestivi di condizioni diverse. Le tecniche citofluorimetriche consentono di acquisire informazioni più estese e precise, dal momento che con l'impiego di pannelli anticorpali ben impostati è possibile individuare la popolazione linfocitica coinvolta nel processo espansivo (linfociti T, oppure B, oppure NK) e caratterizzare eventuali immunofenotipi aberranti e/o patognomonici di una patologia ematologica maligna. In mani esperte, la combinazione morfologia + CFM diventa un potente mezzo diagnostico che offre informazioni precise in un brevissimo lasso di tempo. In certe condizioni, tuttavia, gli aspetti morfologici possono essere poco indicativi, per cui la CFM diventa l'esame dirimente per impostare il lavoro diagnostico successivo con maggior precisione, mediante tecniche istologiche, immunoistochimiche, e mediante test di biologia molecolare.

Con il passare del tempo, le tecniche citofluorimetriche sono diventate sempre più efficienti. Attualmente sono in commercio sistemi citofluorimetrici (citofluorimetro + software dedicato) in grado di impiegare molti anticorpi monoclonali in un singolo tubo; i citofluorimetri per la diagnostica umana di routine analizzano 12 parametri (2 parametri fisici + 10 canali di fluorescenza). Sfruttando la simultanea presenza, nello stesso canale di fluorescenza, di anticorpi monoclonali sostanzialmente esclusivi di una sottopopolazione linfocitica, è possibile approntare con facilità pannelli con 12 anticorpi monoclonali. Pertanto, con un singolo tubo diventa possibile individuare ed enumerare: linfociti T, con relativi subset e immunofenotipo attivato, linfociti NK, linfociti B, con relativo assetto delle catene leggere di superficie, linfociti B positivi per CD5, eventuali plasmacellule che possono essere contate come linfociti nei sistemi di ematologia automatizzata. Con alcuni accorgimenti e appropriata scelta degli anticorpi monoclonali, è possibile spingersi a impiegare fino a 15 anticorpi monoclonali, pur avendo a disposizione solo 10 canali di fluorescenza.

Gli anticorpi monoclonali impiegati nella linfocitosi di prima diagnosi sono quelli della tipizzazione linfocitaria: CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/CD56, CD45, con l'aggiunta del CD5, e delle catene leggere k e λ. Quando sussiste il sospetto di particolari condizioni patologiche, diventa necessario approntare pannelli addizionali (per esempio, CD2, CD7, TCR$\alpha\beta$ e TCR$\gamma\delta$, CD23, CD25, etc).

Sono, infine, disponibili tubi contenenti anticorpi monoclonali in formulazione essiccata o liofila, pronti all'uso e conservabili a temperatura ambiente, facilmente impiegabili nella routine (1).

Alcuni sistemi, che impiegano una miscela già pronta di anticorpi monoclonali e microbiglie per analisi in singola piattaforma, forniscono un report completo, che riporta percentuali e valori assoluti delle popolazioni linfocitarie analizzate, la ratio CD4:CD8 che normalmente è ≥ 1, la linfosomma per il controllo di qualità interna.

Tra le linfocitosi di tipo reattivo, in genere caratterizzate da un numero assoluto di linfociti non particolarmente alto, esempi classici sono forniti dalle virosi, come l'infezione da EBV o CMV. Nelle fasi precoci dell'infezione la sierologia può essere ancora negativa, e la morfologia può non mettere ancora in evidenza linfociti "attivati", ma l'immunofenotipo (con aumento dei linfociti T CD8+ ed inversione del rapporto CD4/CD8) può già orientare l'operatore verso una diagnosi di malattia non neoplastica. Ovviamente la diagnosi è guidata soprattutto dal quadro clinico e dal contesto (come la fascia di età, nel senso che certe virosi sono tipiche dei giovani). Infatti per esempio l'inversione del rapporto CD4/CD8 legata ad un aumento dei linfociti T CD8+, può essere osservata anche in alcune connettiviti, come la sindrome di Sjögren (2). Diverse linfocitosi reattive sono sostenute invece da un incremento di linfociti T CD4+.

Popolazioni policlonali di linfociti T doppio-marcati CD4+/CD8+ (Fig. 1) si possono riscontrare in situazioni caratterizzate da profonde sollecitazioni del sistema immunitario, quali il rigetto di trapianto renale, l'artrite reumatoide giovanile, la miastenia grave.

Il fenotipo di linfociti T doppio-negativi CD3+CD4-CD8- è una caratteristica attesa nei T linfociti maturi con TCR a catene $\gamma\delta$, ma può essere riscontrata anche nei T linfociti maturi con TCR a catene $\alpha\beta$. Sono presenti in bassa percentuale nei soggetti normali, ma possono aumentare in alcuni casi di lupus eritematoso sistemico, di GVHD, di rigetto di organo, di immunodeficienza combinata, di sindrome ipereosinofila, di sindrome da shock tossico da Stafilococco (3).

La presenza di popolazioni espanse di linfociti T con TCR a catene $\alpha\beta$ e fenotipo doppio- negativo CD3+CD4-CD8- (DNTs) è una caratteristica della Sindrome Linfoproliferativa Autoimmune (ALPS) (4).

Nelle linfocitosi a cellule B, le forme reattive, generalmente transitorie, si caratterizzano per la normale espressione delle molecole di superficie carat-

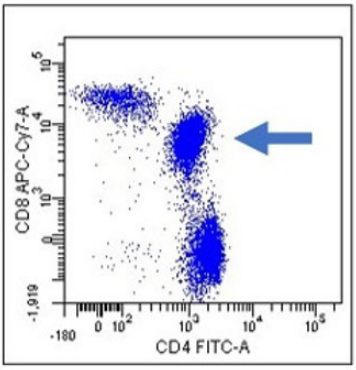


Figura 1. Un caso di espansione di linfociti T doppio-positivi CD4+CD8+ (freccia).

teristiche della linea di appartenenza (CD19, CD20, CD22) e soprattutto per l'espressione policlonale delle catene leggere di superficie.

La "linfocitosi persistente policlonale a cellule B (PPBL)", caratterizzata sul piano morfologico dalla presenza di linfociti binucleati, su quello istologico da un accumulo intravascolare dei linfociti B nel midollo osseo, e su quello clinico da una possibile splenomegalia, si differenzia anch'essa da una neoplasia a cellule B proprio per la ripartizione normale delle catene leggere delle immunoglobuline di superficie, come si vede nella Fig. 2.

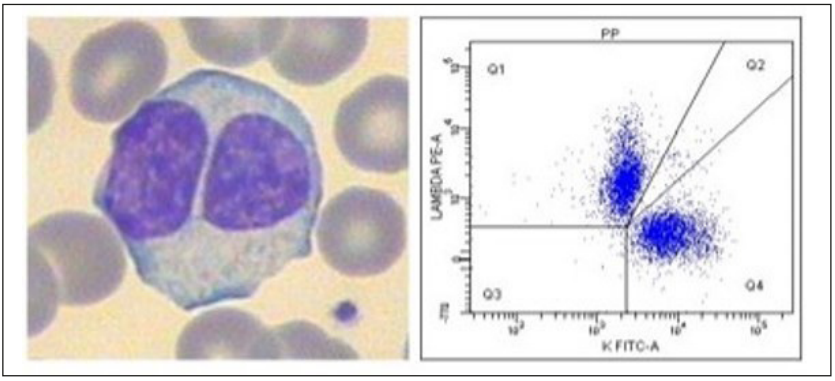


Figura 2. Un caso di PPBL.

I linfociti B oltre a essere policlonali, mostrano l'immunofenotipo dei linfociti B memory (CD27+) (5). La linfocitosi nella PPBL è modesta, ma persistente. In genere, si associa un incremento policlonale delle IgM.

Nelle linfocitosi neoplastiche la morfologia spesso è indicativa; i linfociti atipici possono presentare presenza di nucleoli, anomalie della forma del

nucleo, un pattern immaturo della cromatina nucleare, proiezioni villose del citoplasma, una forma plasmocitoide. Un incremento, anche marcato, dei linfociti circolanti caratterizza molte forme di linfoma. In alcune di queste patologie la presenza di linfociti patologici nel sangue periferico è patognomonica, come nel caso della leucemia linfatica cronica (LLC).

La revisione del 2016 della classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità delle neoplasie linfoidi (6) tra le forme a cellule B mature comprende la Linfocitosi monoclonale a cellule B (MBL) , ovvero la presenza di cellule B monoclonali nel sangue periferico fino a $5x10^9$/L in assenza di altri segni di linfoma. Questa patologia si trova anche in soggetti sani (fino al 12%) e precede virtualmente tutti i casi di leucemia linfatica cronica/linfoma a piccoli linfociti (LLC/SLL).

La frequenza aumenta con l'età, si osserva raramente sotto i 40 anni.

La diagnosi di un linfoma è multidisciplinare, dal momento che occorre fare riferimento alla combinazione di informazioni morfologiche, immunoistochimiche, molecolari, genetiche e, infine, immunofenotipiche.

La citofluorimetria multiparametrica è indubbiamente utile nella valutazione delle patologie linfoproliferative, ma il suo ruolo è cambiato, soprattutto per il sempre maggior peso dei test molecolari nel processo diagnostico.

La CFM conserva la sua efficacia (7):

- nell'identificazione della linea cellulare coinvolta,
- nella valutazione della clonalità, in particolare per quanto riguarda la restrizione delle catene leggere delle immunoglobuline (Fig.3)

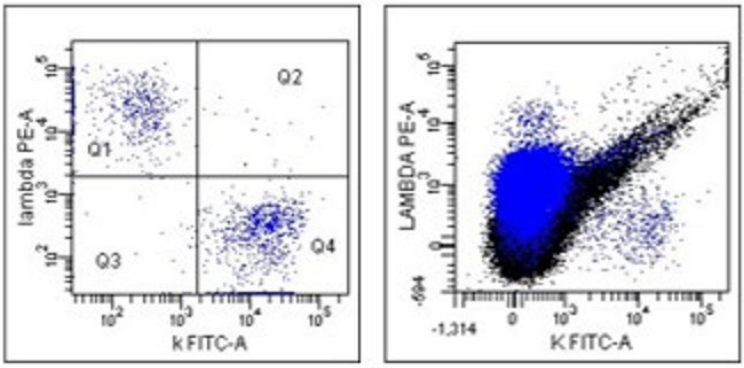


Figura 3. A sinistra espressione policlonale delle catene leggere di superificie. A destra, presenza di una popolazione B con restrizione clonale per le catene leggere di superficie λ, con espressione debole, e residua popolazione normale policlonale.

- nella valutazione di espressioni antigeniche aberranti, come la presenza nelle neoplasie a cellule B di marcatori come il CD5, il CD10, il CD23, il

CD103 normalmente non espressi dai linfociti B maturi

- nella valutazione dell'intensità di espressione dim (debole) oppure bright (forte) dei marcatori delle cellule B (CD19, CD20, CD22, etc.).

Infatti, in base non solo alla positività o meno dei vari marcatori testati, ma anche al loro pattern di espressione (debole, oppure brillante) si può indicare la diagnosi più probabile o restringere ad un gruppo di linfomi la diagnosi differenziale, ovviamente con il supporto delle informazioni addizionali (8).

Può essere difficile identificare piccole popolazioni clonali mescolate con cellule B reattive policlonali. Talora dal dot plot emergono chiaramente due diverse popolazioni linfocitarie, per es. per diverso Forward Scatter, quindi per diversa taglia delle cellule, o per diversa intensità di espressione di un marcatore, per es. del CD20, marcatore della serie linfocitaria B, come nella figura sottostante (Fig. 4), nella quale si osserva chiaramente la restrizione clonale per le catene leggere k relativa alla popolazione con espressione bright del CD20.

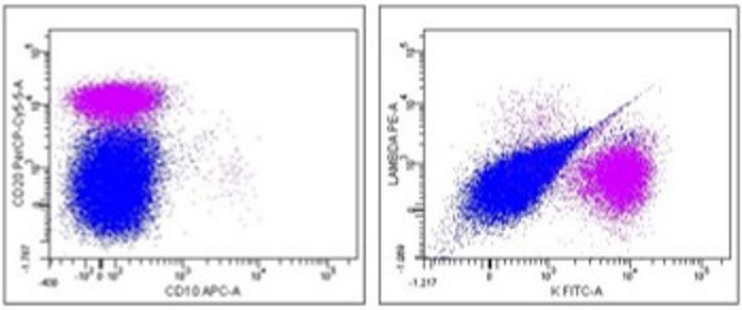


Figura 4. I due dot plots si riferiscono entrambi a linfociti B. A sinistra: presenza di una prevalente popolazione con debolissima espressione di CD20 (blu), con concomitante presenza di una popolazione con espressione intensa di CD20 (viola). A destra: la popolazione colorata in blu risulta negativa per le catene leggere di superficie; quella colorata in viola mostra restrizione per le catene leggere di superficie K. Il caso illustrato mostra una verosimile LLC (popolazione blu) concomitante con altro linfoma in fase leucemica.

Anche nel caso dei linfomi a cellule T con linfocitosi, molto meno frequenti delle forme a linfociti B, occorre valutare il pattern di espressione di marcatori T (per esempio, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8). Sono indicativi di anomalia la grande prevalenza di linfociti CD4+ oppure CD8+ (con rap-

porto CD4:CD8 >10 oppure CD8:CD4 >10), l'assenza di un antigene T atteso, la coespressione di CD4 e CD8 o la mancata espressione di entrambi questi due marcatori. Un esempio è fornito dalla Sindrome di Sezary, la quale è caratterizzata dal significativo incremento di linfociti CD4+, i quali tuttavia appaiono negativi per CD7 (9).

Nelle neoplasie linfoidi T la dimostrazione di clonalità è particolarmente difficile, dato che anche la restrizione per una regione del TCR ($\alpha\beta/\gamma\delta$) può non essere sufficiente come prova di clonalità.

Per quanto riguarda le linfocitosi a cellule NK, possono essere reattive a stati infettivi, possono essere correlate alla terapia con dasatinib (10), oppure sono neoplastiche. Le molecole presenti sulla superficie dei linfociti NK normali (CD2, CD7, CD16, CD56, molecole KIR o CD158) presentano spesso diversa espressione nelle forme reattive rispetto alle forme proliferative di tipo neoplastico. Infatti, in queste ultime i linfociti NK sono positivi essenzialmente per CD56 e mostrano espressione uniforme di uno degli antigeni CD158 (solo CD158a oppure solo CD158b) (Fig. 5).

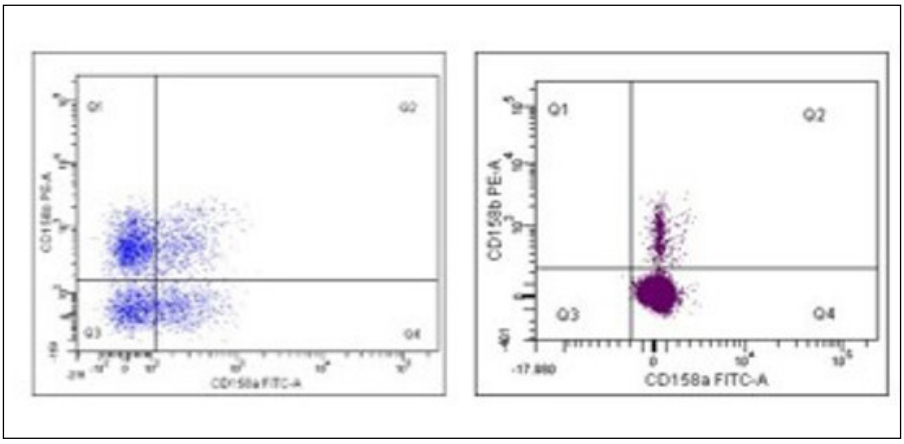


Fig. 5. A sinistra, dispersione normale di CD158a e CD158b sui linfociti NK. A destra: il 98% dei linfociti NK mostra restrizione per la isoforma CD158a, in un caso di leucemia cronica a cellule NK.

Interessante la prevalenza del CD56 trovata nelle forme linfomatose e quella di CD16 e CD57 nelle proliferazioni a cellule NK indolenti e reattive, in quanto se analizziamo questi 3 marcatori nei linfociti NK si osserva l'associazione rispettivamente del CD56 alla produzione di citochine, e soprattutto ad un maggiore potenziale proliferativo, del CD16 alla citotossicità e del CD57 alle "senescent cells" con ridotta capacità proliferativa (11).

Bibliografia

1) Van der Velden VHJ, Flores-Montero J, Perez-Andres M, Martin-Ayuso M, Crespo O, Blanco E, Kalina T, Philippé J, Bonroy C, de Bie M, Te Marvelde J, Teodosio C, Corral Mateos A, Kanderová V, Van der Burg M, Van Hoof D, van Dongen JJM, Orfao A. Optimization and testing of dried antibody tube: The EuroFlow LST and PIDOT tubes as examples. J Immunol Methods 2019;475: 112287.
2) Tavarozzi R, Carulli G, Manzato E, Sammuri P, Ciabatti E, Petrini M. Large granular lymphocytes (LGL) in primary Sjögren syndrome (pSS): immunophenotype and review on the pathological role of T cells in pSS. Blood Res 2020; 55: 120-123.
3) Carulli G, Lagomarsini G, Azzarà A, Testi R, Riccioni R, Petrini M. Expansion of TcRalphabeta+CD3+CD4-CD8- (CD4/CD8 double-negative) T lymphocytes in a case of staphylococcal toxic shock syndrome. Acta Haematol 2004; 111: 163-167.
4) Matson DR, Yang DT. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome: An Overview. Arch Pathol Lab Med 2020; 144: 245-251.
5) Tavarozzi R, Manzato E, Sammuri P, Ciabatti E, Ciancia E, Carulli G. Eight-year follow up of a case of persistent polyclonal B cell lymphocytosis: Immunophenotypic findings pre- and postsplenectomy. Cytometry B Clin Cytom 2020 Dec 3. doi: 10.1002/cyto.b.21976.
6) Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood 2016; 127: 2375-2390.
7) Seegmiller AC, Hsi ED, Craig FE. The current role of clinical flow cytometry in the evaluation of mature B-cell neoplasms. Cytometry B Clin Cytom 2019; 96: 20-29.
8) Carulli G, Marini A. Diagnosis and classification of B-cell non-Hodgkin lymphomas. The role of multiparameter flow cytometry. Clin Ter 2012; 163: 47-57.
9) Pulitzer MP, Horna P, Almeida J. Sézary syndrome and mycosis fungoides: An overview, including the role of immunophenotyping. Cytometry B Clin Cytom 2021; 100: 132-138.
10) Schiffer CA, Cortes JE, Hochhaus A, Saglio G, le Coutre P, Porkka K, Mustjoki S, Mohamed H, Shah NP. Lymphocytosis after treatment with dasatinib in chronic myeloid leukemia: Effects on response and toxicity. Cancer 2016; 122: 1398-1407.
11) De Mel S, Li JB, Abid MB, Tang T, Tay HM, Ting WC, Poon LM, Chung TH, Mow B, Tso A, Ong KH, Chng WJ, Liu TC. The utility of flow cytometry in differentiating NK/T cell lymphoma from indolent and reactive NK cell proliferations. Cytometry B Clin Cytom 2018; 94: 159-168.

Indice

Editoriale
Sabrina Buoro ..... " 3

Inquadramento delle linfocitosi
Luca Germagnoli ..... " 5

Conteggio in automazione dei linfociti. Parametri qualitativi
e quantitativi
M. Scapaticci, A. Bartolini, L. Bonato, G. Da Rin ..... " 29

Linfocitosi: casi clinici
Annalisa Modenese ..... " 49

La Qualità del risultato nella diagnostica ematologica di
Laboratorio: la VEQ della Morfologia Cellulare
Alessandra Fanelli, Alessandra Mongia, Sara Ciullini Mannurita ..... " 67

Ruolo della Citometria a Flusso nella diagnostica differenziale
delle linfocitosi
Alessandra Marini ..... " 77

Indice ..... " 85

Caleidoscopio Italiano

... il futuro ha il cuore antico

MEDICAL SYSTEMS S.p.A.

1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesità.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*****Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1).*** **Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaiò85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La β-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico e fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. **Carani C.:** ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. **Sanna M., Carcassi R., Rassu S.:** ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:** ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**
28. **Zilli A., Pagni E., Piazza M.:** ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. **Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.:** ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**
30. **Cingolani M.:** ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre '87.**

31. **Kubasik N.P.:** ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio '88.**
32. **Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.:** ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio '88.**
33. **Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.:** ***Neuroendocrinologia dello stress.*** **Marzo '88.**
34. **Guastella G., Cefalù E., Carmina M.:** ***La fecondazione*** **in vitro. Maggio '88.**
35. **Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.:** ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno '88.**
36. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (2).*** **Luglio '88.**
37. **Piantino P., Pecchio F.:** ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre '88.**
38. **Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.:** ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio '89.**
39. **Sommariva D., Branchi A.:** ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**
40. **Butturini U., Butturini A.:** ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
41. **Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.:** ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
42. **Palleschi G.:** ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
43. **Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.:** ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
44. **Fanetti G.:** ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
45. **Contu L., Arras M.:** ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
46. **Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.:** ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
47. **Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.:** ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**

48. **Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.:** ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**
49. **Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.:** ***L'immunologia del diabete mellito.*** **Marzo '90.**
50. **Cappi F.:** ***La trasfusione di sangue: terapia a rischio.*** **Aprile '90.**
51. **Tortoli E., Simonetti M.T.:** ***I micobatteri.*** **Maggio '90.**
52. **Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.:** ***Anticorpi antinucleo.*** **Giugno '90.**
53. **Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.:** ***Le macchine in terapia intensiva.*** **Luglio '90.**
54. **Goracci E., Goracci G.:** ***Gli allergo-acari.*** **Agosto '90.**
55. **Rizzetto M.:** ***L'epatite non A non B (tipo C).*** **Settembre '90.**
56. **Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.:** ***Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali.*** **Ottobre '90.**
57. **La Vecchia C.** ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (I).*** **Gennaio '91.**
58. **La Vecchia C.** ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (II).*** **Febbraio '91.**
59. **Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.:** ***Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti.*** **Marzo '91.**
60. **Bedarida G., Lizioli A.:** ***La neopterina nella pratica clinica.*** **Aprile '91.**
61. **Romano L.:** ***Valutazione dei kit immunochimici.*** **Maggio '91.**
62. **Dondero F. e Lenzi A.:** ***L'infertilità immunologica.*** **Giugno '91.**
63. **Bologna M. Biordi L. Martinotti S.:** ***Gli Oncogèni.*** **Luglio '91.**
64. **Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.:** ***Infezione-malattia da HIV in Africa.*** **Agosto '91.**
65. **Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.:** ***L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni.*** **Settembre '91.**
66. **Gentilomi G.A.:** ***Sonde genetiche in microbiologia.*** **Ottobre '91.**
67. **Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.:** ***Le sonde di DNA e la virulenza batterica.*** **Gennaio '92.**
68. **Zilli A., Biondi T.:** ***Il piede diabetico.*** **Febbraio '92.**

69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta.* Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali.* Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari.* Luglio '92.
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita.* Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.:*Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa.* Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin.* Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radionuclidi del Morbo di Graves-Basedow.* Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza.* Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio 94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I lnfociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptoccocchi beta emolitici di gruppo B (SGB).* Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodellamento osseo*. Aprile '94.
89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*. Settembre '94.
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: *Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*. Ottobre '94.
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: *Helicobacter pylori*. Novembre '94.
92. Parazzini F.: *L'epidemiologia della patologia ostetrica*. Febbraio '95.
93. Proietti A., Lanzafame P.: *Il virus di Epstein-Barr*. Marzo '95.
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: *Immunoflogosi nell'asma bronchiale*. Maggio '95.
95. Manduchi I.: *Steroidi*. Giugno '95.
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: *Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale*. Luglio '95.
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: *Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani*. Ottobre '95.
98. La Vecchia C., D'Avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: *Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*. Dicembre '95.
99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: *Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*. Gennaio '96.
100. Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: *Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*. Marzo '96.
101. Cogato I. Montanari E.: *La Sclerosi Multipla*. Aprile '96.
102. Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.:

Malattie a trasmissione sessuale. **Maggio '96.**

103. Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: ***Il linfoma di Hodgkin*****. Giugno '96.**

104. Marcante R., Dalla Via L.: ***Il virus respiratorio sinciziale*****. Luglio '96.**

105. Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: ***Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tissutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative.*** **Ottobre '96.**

106. Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: ***Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale*****. Novembre '96.**

107. Morganti R.: ***Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali*****. Dicembre '96.**

108. Andreoni S.: ***Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti*****. Gennaio '97.**

109. Salemi A., Zoni R.: ***Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi*****. Febbraio '97.**

110. Meisner M.: ***Procalcitonina*****. Marzo '97.**

111. Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: ***Malattie a trasmissione sessuale (2)*****. Aprile '97.**

112. Palleschi G. Moscone D., Compagnone D.: ***Biosensori elettrochimici in Biomedicina.*** **Maggio '97.**

113. Valtriani C., Hurle C.: ***Citofluorimetria a flusso*****. Giugno '97.**

114. Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barcucci P.: ***Alcol e problemi correlati*****. Settembre '97.**

115. Piccinelli M.: ***Depressione Maggiore Unipolare*****. Ottobre '97.**

116. Pepe M., Di Gregorio A.: ***Le Tiroiditi*****. Novembre '97.**

117. Cairo G.: ***La Ferritina*****. Dicembre '97.**

118. Bartoli E.: ***Le glomerulonefriti acute*****. Gennaio '98.**

119. Bufi C., Tracanna M.: ***Computerizzazione della gara di Laboratorio*****. Febbraio '98.**

120. National Academy of Clinical Biochemistry: ***Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide.*** **Marzo '98.**

121. Fava G., Rafanelli C., Savron G.: ***L'ansia*****. Aprile '98.**

122. Cinco M.: ***La Borreliosi di Lyme*****. Maggio '98.**

123. Giudice G.C.: ***Agopuntura Cinese*****. Giugno '98.**

124. Baccini C.: ***Allucinogeni e nuove droghe (1)*****. Luglio '98.**

125. Rossi R.E., Monasterolo G.: ***Basofili*****. Settembre '98.**

126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.: ***Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo 1*****. Novembre '98.**

127. Baccini C.: ***Allucinogeni e nuove droghe (1I)*****. Dicembre '98.**

128. Muzi P., Bologna M.: ***Tecniche di immunoistochimica*****. Gennaio '99.**

129. Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: ***Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivirali*****. Febbraio '99.**

130. Castello G., Silvestri I.:***Il linfocita quale dosimetro biologico*****. Marzo '99.**

131. AielloV., Caselli M., Chiamenti C.M.: ***Tumorigenesi gastrica Helicobacter pylori - correlata.*** **Aprile '99.**

132. Messina B., Tirri G., Fraioli A., Grassi M., De Bernardi Di Valserra M.: ***Medicina Termale e Malattie Reumatiche.*** **Maggio '99.**

133. Rossi R.E., Monasterolo G.: ***Eosinofili.*** **Giugno '99.**

134. Fusco A., Somma M.C.: ***NSE (Enolasi Neurono-Specifica)*****. Luglio '99.**

135. Chieffi O., Bonfirraro G., Fimiani R.: ***La menopausa*****. Settembre '99.**

136. Giglio G., Aprea E., Romano A.: ***Il Sistema Qualità nel Laboratorio di Analisi.*** **Ottobre**

'99.

137. Crotti D., Luzzi I., Piersimoni C.: ***Infezioni intestinali da Campylobacter e microrganismi correlati.*** **Novembre '99.**

138. Giovanella L.: ***Tumori Neuroendocrini: Diagnosi e fisiopatologia clinica*****. Dicembre '99.**

139. Paladino M., Cerizza Tosoni T.: ***Umanizzazione dei Servizi Sanitari: il Case Management*****. Gennaio 2000.**

140. La Vecchia C.: ***Come evitare la malattia*****. Febbraio 2000.**

141. Rossi R.E., Monasterolo G.: ***Cellule dendritiche*****. Marzo 2000.**

142.Dammacco F.: ***Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (I).*** **Aprile 2000.**

143. Dammacco F.: ***Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (II).*** **Maggio 2000.**

144. Croce E., Olmi S.: ***Videolaparoscopia.*** **Giugno 2000.**

145. Martelli M., Ferraguti M.: ***AllergoGest.*** **Settembre 2000.**

146. Giannini G., De Luigi M.C., Bo A., Valbonesi M.: ***TTP e sindromi correlate: nuovi orizzonti diagnostici e terapeutici.*** **Gennaio 2001.**

147. Rassu S., Manca M.G., Pintus S., Cigni A.: ***L'umanizzazione dei servizi sanitari*****. Febbraio 2001.**

148. Giovanella L.: ***I tumori della tiroide*****. Marzo 2001.**

149. Dessì-Fulgheri P., Rappelli A.: ***L'ipertensione arteriosa*****. Aprile 2001.**

150. The National Academy of Clinical Biochemistry: ***Linee guida di laboratorio per lo screening, la diagnosi e il monitoraggio del danno epatico*****. Settembre 2001.**

151. Dominici R.: ***Riflessioni su Scienza ed Etica*****. Ottobre 2001.**

152. Lenziardi M., Fiorini I.: ***Linee guida per le malattie della tiroide*****. Novembre 2001.**

153. Fazii P.: ***Dermatofiti e dermatofitosi*****. Gennaio 2002.**

154. Suriani R., Zanella D., Orso Giacone G., Ceretta M., Caruso M.: ***Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) Eziopatogenesi e Diagnostica Sierologica*****. Febbraio 2002.**

155. Trombetta C.: ***Il Varicocele.*** **Marzo 2002.**

156. Bologna M., Colorizio V., Meccia A., Paponetti B.: ***Ambiente e polmone*****. Aprile 2002.**

157. Correale M., Paradiso A., Quaranta M.: I ***Markers tumorali.*** **Maggio 2002.**

158. Loviselli A., Mariotti S.: ***La Sindrome da bassa T3*****. Giugno 2002.**

159. Suriani R., Mazzucco D., Venturini I., Mazzarello G., Zanella D., Orso Giacone G.: ***Helicobacter Pylori: stato dell'arte.*** **Ottobre 2002.**

160. Canini S.: ***Gli screening prenatali: marcatori biochimici, screening nel 1° e 2° trimestre di gravidanza e test integrato.*** **Novembre 2002.**

161. Atzeni M.M., Masala A.: ***La β-talassemia omozigote*****. Dicembre 2002.**

162. Di Serio F.: ***Sindromi coronariche acute*****. Gennaio 2003.**

163. Muzi P., Bologna M.: ***Il rischio di contaminazione biologica nel laboratorio biosanitario*****. Febbraio 2003.**

164. Magni P., Ruscica M., Verna R., Corsi M.M.: ***Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche*****. Marzo 2003.**

165. Magrì G.: ***Aspetti biochimici e legali nell'abuso alcolico*****. Aprile 2003.**

166. Rapporto dello Hastings Center: ***Gli scopi della medicina: nuove priorità.*** **Maggio 2003.**

167. Beelke M., Canovaro P., Ferrillo F.: ***Il sonno e le sue alterazioni*****. Giugno 2003.**

168. Macchia V., Mariano A.: ***Marcatori tumorali nel cancro della vescica*****. Luglio 2003.**

169. Miragliotta G., Barra Parisi G., De Sanctis A., Vinci E.: ***La Turbercolosi Polmonare:***

Diagnostica di Laboratorio. Agosto 2003.

170. Aebischer T.: *Il Comitato Internazionale della Croce Rossa ed il Diritto Internazionale Umanitario*. Settembre 2003.
171. Martino R., Frallicciardi A., Tortoriello R.: *Il manuale della sicurezza*. Ottobre 2003.
172. Canigiani S. e Volpini M.: *Infarto acuto del miocardio: biochimica del danno cellulare e marcatori di lesione.* Novembre 2003.
173. La Brocca A. Orso Giacone G. Zanella D. Ceretta M.: *Laboratorio e clinica delle principali affezioni tiroidee.* Dicembre 2003.
174. Savron G.: *Le Fobie*. Gennaio 2004.
175. Paganetto G.: *Evoluzione storica del rischio di patologie umane per contaminazione chimica ambientale*. Febbraio 2004.
176. Giovanella L.: *Iperparatiroidismo e tumori paratiroidei*. Marzo 2004.
177. Severino G., Del Zompo M.: *Farmacogenomica: realtà e prospettive per una "Medicina Personalizzata".* Aprile 2004.
178 Arigliano P.L.: *Strategie di prevenzione dell'allergia al lattice nelle strutture sanitarie.* Maggio 2004.
179. Bruni A.: *Malattia di Alzheimer e Demenza Frontotemporale.* Giugno 2004.
180. Perdelli F., Mazzarello G., Bassi A.M., Perfumo M., Dallera M.: *Eziopatogenesi e diagnostica allergologica.* Luglio 2004.
181. Franzoni E., Gualandi P. Pellegrini G.: *I disturbi del comportamento alimentare.* Agosto 2004.
182. Grandi G., Peyron F.: *La toxoplasmosi congenita*. Settembre 2004.
183. Rocca D.L., Repetto B., Marchese A., Debbia E.A: *Patogeni emergenti e resistenze batteriche*. Ottobre 2004.
184. Tosello F., Marsano H.: *Scientific English Handout*. Novembre 2004.
185. La Brocca A., Orso Giacone G., Zanella D.: *Ipertensione arteriosa secondaria: clinica e laboratorio*. Dicembre 2004.
186. Paganetto G.: *Malattie Neoplastiche: dalla Paleopatologia alle Fonti Storiche*. Gennaio 2005.
187. Savron G.: *La sindrome dai mille tic: il disturbo di Gilles de la Tourette*. Febbraio 2005.
188. Magrì G., Baghino E., Floridia M., Ghiara F.: *Leishmania.* Marzo 2005.
189. Lucca U., Forloni G., Tiraboschi P., Quadri P., Tettamanti M., PasinaL.: *Invecchiamento, deterioramento cognitivo e malattia di Alzheimer*. Aprile 2005.
190. Volpe G., Delibato E., Orefice L., Palleschi G.: *Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili*. Maggio 2005.
191. Mazzarello M.G., Albalustri G., Audisio M., Perfumo M., L. Cremonte G.: *Aerobiologia ed allergopatie*. Giugno 2005.
192. Scalabrino G., Veber D., Mutti E.:*Nuovi orizzonti biologici per la vitamina B12*. Luglio 2005.
193. Zepponi E.: *Guida pratica per gli utenti del laboratorio analisi*. Settembre 2005.
194. Faricelli R., Esposito S., Martinotti S.: *La sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi.* Ottobre 2005.
195. Baccini C., Bezzi F., Conti M., Tazzari V.: *Doping e antidoping nello sport*. Novembre 2005.
196. Lozzi M.: *La Mediazione pacifica dei conflitti. Una risorsa socio-relazionale in ambito medico-sanitario*. Dicembre 2005.

197. **Bracco G.:** ***Progettare un Laboratorio di Analisi*****. Gennaio 2006.**
198. **Angelucci A.:** ***Apoptosi e sistema immunitario: regolazione e patologie associate*****. Febbraio 2006.**
199. **Commissione Tecnica sul Rischio Clinico:** ***Risk management in Sanità. Il problema degli errori*****. Marzo 2006**
200. **Casati G., Marchese E., Roberti V., Vichi M.C.:** ***La gestione dei processi clinico assistenziali per il miglioramento delle prassi*****. Aprile 2006.**
201. **Zanella D., Ceretta M., Orso Giacone G.:** ***Peptidi natriuretici: nuove frontiere in cardiologia?*** **Maggio 2006.**
202. **Cicala M., Dal Lago U., Vinci P., Maggiorotti M.:** ***L'accusa di malpractice in ambito medico*****. Giugno 2006.**
203. **Martino R.:** ***Manuale Qualità UNI EN ISO 9001*****. Luglio 2006.**
204. **Mazzarello M.G., Arata M., Perfumo M., Marchese A., Debbia E.A.:** ***Tubercolosi e micobatteri*****. Settembre 2006.**
205. **Matrullo R.:** ***Anoressia: la negazione della sessualità come difesa narcisistica*****. Ottobre 2006.**
206. **Crotti D.:** ***Le parassitosi intestinali ed uro-genitali*****. Novembre 2006.**
207. **Orso Giacone G., Zanella D., Ceretta M.:** ***Il referto interpretativo in infettivologia*****. Dicembre 2006.**
208. **Baghino E., Magrì G., Nicoletti L., Novaro G., Vignale C., Mazzei C.:** ***Stato dell'arte delle aneuploidie fetali, dall'indagine clinica prenatale alla diagnosi anatomopatologica*****. Gennaio 2007.**
209. **Mazzarello M.G., Brunetti R., Perfumo M., Torriglia A.M., Montresor G.:** ***Principali Tecniche Analitiche in uso nei Laboratori di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche*****. Febbraio 2007.**
210. **Orso Giacone G., Zanella D., Ceretta M.:** ***Celiachia dalla A alla Z*****. Marzo 2007.**
211. **Cingolani M., Sparviero E.:** ***Decidere ora per allora: il testamento biologico (dichiarazioni anticipate di trattamento). Aprile 2007.***
212. **Barletta G., Pastacaldi V., Peracino A.P.:** ***La misura dei processi nella medicina di laboratorio*****. Maggio 2007.**
213. **Rassu S., Masia L., Delussu P., Chessa P., Demartis M.G., Moroso G.:** ***Manuale per il supporto vitale di base e la defibrillazione precoce (BLS-D)*****. Giugno 2007.**
214. **Anchisi R., M. Gambotto Dessy:** ***Il Burnout del personale sanitario*****. Marzo 2008.**
215. **Gulletta E., Orrico F., Foti D.P.:** ***Clinical Governance nel Laboratorio Biomedico*****. Aprile 2008.**
216. **Rochira V., Scaltriti S., Zirilli L., Carani C.:** ***Il ruolo degli estrogeni nel maschio*****. Maggio 2008.**
217. **Gulletta E., Foti D.P., Corsi M.M., Galliera E.:** ***Citochine e Chemochine*****. Giugno 2008.**
218. **Zambotto F.M.:** ***La biotecnologia transgenica utilizzata nella produzione degli alimenti di origine vegetale.*** **Settembre 2008**
220. **Morra A., Odetto L., Bozza C., Bozzetto P., Agostinis S., Bariona M.:** ***Compendio di Medicina delle Grandi Emergenze*****. Novembre 2008**

221. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: ***I Microarray*****. Dicembre 2008**
222. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: *Applicazioni dei microarray (1)*. **Marzo 2009**
223. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: ***Applicazioni dei microarray (2).*** **Giugno 2009**
224. Di Carlo A., Mariano A., Macchia V.: ***Struttura e Funzioni delle Matrix Metallo-Proteinasi (MMPs).*** **Settembre 2009**
225. Torricelli F. Giuliani C.: ***Farmacogenetica: aspetti diagnostici, applicazioni cliniche e prospettive future.*** **Febbraio 2010.**
226. Montagnana M., Lippi G., Salvagno G.L, Guidi G.C.: ***Vecchi e nuovi marcatori di Sindrome Coronarica Acuta. "Ischemia Modified Albumin": Storia di un marcatore "cardiaco".*** **Marzo 2010.**
227. Coghe F., Coni P., Orrù G., Gavino G.: ***Determinazione molecolare del KRas.*** **Giugno 2013.**
228. Tozzoli R., D'Aurizio F.: ***L'Immunochemiluminescenza nella Diagnostica di Laboratorio.*** **Gennaio 2014.**
229 Giavarina D.: ***Evidence Based Medicine: impiego dei test di laboratorio.*** **Luglio 2014.**
230 Fiore E., Latrofa F., Provenzale M. A., Vitti P.: ***Tiroidite Cronica Autoimmune.*** **Settembre 2014.**
231. Crapanzano C.: ***Vitamina D.*** **Ottobre 2014.**
232. Pulcinelli F. M., Maltese T., Temperilli F.: ***Piastrine, farmaci antiaggreganti e metodiche di laboratorio.*** **Aprile 2015.**
233. Testino G., Florio A., Balbinot P.: ***Le patologie alcol correlate.*** **Settembre 2015.**
234. Dall'Olio G., Fortunato A.: ***Il laboratorio nella diagnosi di gravidanza.*** **Ottobre 2015**
235. Zanella D., Mazzucco D., Grosso S., Serra A.M.: ***Aspetti clinici di appropriatezza diagnostica nella diagnosi differenziale dei disordini intestinali "IBS like"*****: Marzo 2016.**
236. La Gioia A., Rocco V., Balboni F., Fiorini F. e Pezzati P.: ***La diagnostica morfologica delle anemie*****. Ottobre 2016.**
237. Micheli P., Carrabba A., Carrino E., Micheli M., Piccolo G., Salatiello G.: ***Aspetti molecolari del carcinoma polmonare.*** *Dicembre 2016.*
238. Pansecco Pistarino V., Rebora G.: ***Le Terme di Acqui nel panorama del termalismo italiano.*** *Giugno 2017.*
239. Buoro S.: ***Diagnostica ematologica di laboratorio Morfologia, Tecnologia e Workflow.*** *Dicembre 2018.*
240. Bottaro L.C.: ***Per un nuovo management socio-sanitario: la Medicina di Condivisione.*** *Settembre 2019.*
241. Buoro S.: ***La Diagnostica Ematologica di Laboratorio: Gestione delle Linfocitosi e Applicazioni Cliniche dei Conteggi in Automazione.*** *Dicembre 2021*

Caleidoscopio
Rivista di Medicina
anno 39, numero 241

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Tel. mobile 338 2202502
E-mail: sergiorassu@yahoo.it

Responsabile Ufficio Acquisti
Francesca Salvi

Servizio Abbonamenti
Laura Cecchi

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi

Segretaria della Direzione
Medical Systems SpA
Daniela Benzi

EDITORE

... il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS S.p.A.
Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. 010 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);
Internet URL: http://www.medicalsystems.it
https://www.linkedin.com/company/medical-systems-spa

Stampa
Tipolitografia Gioi Srls
Via Gelasio Adamoli, 285 - Genova
Tel. 010 513120 - Fax 010 503320

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989
Iscrizione al Registro degli Operatori di Comunicazione (ROC) n° 1188

Finito di stampare: Dicembre 2021
Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.