

Novità sulla rilevazione dell'immaturità mieloide

E. Piva^a L. Pasini^b

^aServizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Università, Padova

^bLaboratorio di Analisi, Casa di Cura "Giovanni XXIII", Monastier (TV)

Riassunto

I granulociti immaturi (IG), normalmente assenti dal sangue periferico, sono aumentati in corso di infezioni batteriche, malattie infiammatorie, cancro (in particolare con metastasi), necrosi tissutale, rigetto acuto di trapianto, in situazioni chirurgiche anche ortopediche, per uso di steroidi e in gravidanza (soprattutto durante il terzo trimestre). I convenzionali analizzatori ematologici possono effettuare conteggi cellulari degli elementi normalmente presenti nel sangue periferico. Il nostro studio ha lo scopo di valutare le informazioni fornite dalle nuove tecnologie, anche considerando le anomalie morfologiche dei granulociti immaturi, la correlazione tra le diverse metodologie, imprecisione ed accuratezza con il conteggio manuale secondo standard H20A e con il metodo citofluorimetrico. Nella valutazione preliminare della correlazione tra le differenti tecnologie il valore di r^2 varia da 0.11 a 0.44. Allo stato attuale quindi, il conteggio di IG non deve comparire nel referto ematologico e deve essere utilizzato come parametro strumento-specifico in regole decisionali per la revisione microscopica o da utilizzare nei commenti interpretativi nel monitoraggio clinico dei pazienti con infezioni già riconosciute clinicamente.

Summary

Innovations on automated enumeration of immature granulocytes

The immature granulocytes (IG), normally absent from peripheral blood, are increased in conditions such as bacterial infections, acute inflammatory diseases, cancer (particularly with marrow metastasis), tissue necrosis, acute transplant rejection, surgical and orthopedic trauma, myeloproliferative diseases, steroid use, and pregnancy (mainly during the third trimester). Usually, automated instruments can enumerate only the five-type white blood cells (WBC) found in the peripheral blood. With improved technology, users and manufactures have started looking at new applications, including enumeration of cell types normally not found in the blood, or present at very low level as immature granulocytes. Our study aims to assess the information provided by new technologies, also considering dysplastic features of the IG. Correlation between the different methodologies, imprecision, and accuracy in comparison with the manual morphology count and with a flow cytometric count were evaluated. The preliminary assessment does not show encouraging results. The correlation between different instruments shows a value of r^2 ranges from 0.11 to 0.44. Published studies agree that IG counts have a high specificity for infectious conditions (from 83% to 97%) but are accompanied by low sensitivity (between 35% and 40%). This low sensitivity does not allow to use the counting with the purpose of screening or early infection detection, while the clinical use in the evaluation of therapeutic response (e.g. to antibiotic therapy) seems more appropriate. At present, IG counting should not appear in the haematological report and must be used as a benchmark instrument-specific decision-making rules for reviewing or to be used in interpretative reporting for patients with clinically recognized infections.

Key words. Immature granulocytes, Automated haematology analyser, Flow cytometry.

La maggior quota dei leucociti circolanti è rappresentata dai neutrofili il cui ruolo è l'indiscussa importanza nella difesa contro le infezioni. Il midollo emopoietico con i precursori risponde a stimoli come infezioni, infiammazioni, danni ai tessuti, neoplasie, poichè una varietà di fattori di crescita e citochine inducono stimolazione con rapida liberazione del pool. In risposta agli stessi stimoli vi è un aumento degli elementi dal pool di marginazione con contemporaneo aumento delle attività di funzione. Il conteggio delle cellule immature della serie mieloide, comprese anche le "band" o "stab", ovvero neutrofili a banda o a bastoncino, viene quindi considerato clinicamente utile per la diagnosi di infezione¹. I granulociti immaturi non sono presenti nel sangue periferico dei soggetti normali, possono essere presenti in condizioni parafisiologiche come la gravidanza o in corso di terapia steroidea. In stati patologici si riconoscono in condizioni di reattività (infezioni batteriche, malattie infiammatorie, patologie oncologiche, stati post-chirurgici o traumi, rigetto acuto post-trapianto) e in condizioni proliferative come le malattie mieloproliferative o nelle sindromi mielodisplastiche. In queste ultime, come è noto, si associano spesso tipiche alterazioni morfologiche. Una variazione della morfologia tuttavia può anche verificarsi in risposta alle infezioni o altri stimoli. Le linee guida pubblicate nel 1992 e le linee guida pediatriche, più recenti, per la definizione di SIRS riportano i seguenti parametri ematologici: Globuli Bianchi >12 o <4 ($10^9/L$) o forme immature >10%, in alternativa alla determinazione dei WBC^{2,3}. Nell'ultima definizione, il conteggio degli elementi immaturi e non specificatamente le band, viene considerato tra le variabili infiammatorie da valutare solo nel caso di un normale conteggio leucocitario⁴. Nonostante il tentativo di standardizzazione operato dal CSLI nel documento H20A che con dettagliata descrizione ha definito le caratteristiche morfologiche per classificare le "band", l'ampia variabilità anche tra operatori esperti e la difficoltà della tecnologica di separare questa classe cellulare dai neutrofili o dai neutrofili con modificazioni morfologiche dovute all'attivazione della funzionalità, ha reso in pratica di scarso utilizzo il conteggio⁵. Il riconoscimento e la quantificazione degli altri elementi immaturi mieloidi (promielociti, mielociti, metamielociti) rappresenta la progressiva, logica tappa evolutiva degli attuali conteggi leucocitari. In questa ottica, la conta differenziale estesa (Extended Differential Count, EDC) non comprende le "band" o "stab" cellule (neutrofili a bastoncino). Gli analizzatori ematologici contano i granulociti immaturi in completa automazione utilizzando lo stesso canale per il conteggio differenziale e cercando il riconoscimento delle caratteristiche di immaturità: granulazioni, dimensioni più grandi del nucleo e cromatina meno addensata, aspetti tanto più evidenti quanto maggiore è il grado di immaturità della cellula mieloide. Quando presenti, i granulociti immaturi si collocano in particolari zone del citogramma e con nuovi software di analisi è possibile ottenere il valore numerico. A tutt'oggi però il metodo di riferimento è rappresentato ancora dai conteggi manuali effettuati da due operatori che devono valutare percentualmente gli elementi in un conteggio di

200 leucociti, anche se, i riconoscimenti maturativi sono possibili analizzando in fluorescenza la differente espressività di antigeni di membrana come il CD11b ed il CD16 della linea mieloide. Il nostro studio si propone di valutare il possibile contributo delle informazioni fornite dalle nuove tecnologie, le problematiche di riconoscimento degli elementi displastici della stessa serie, l'imprecisione, l'accuratezza con la comparazione con il metodo microscopico e con il metodo citofluorimetrico e la concordanza tra le differenti metodologie. A questo proposito non esistono dati in letteratura. La preliminare valutazione non dimostra risultati incoraggianti. Il valore di r^2 oscilla da 0.11 a 0.44 ($n=$ da 107 a 157).

Questi risultati sono da considerare del tutto preliminari, è necessario aumentare la casistica valutando anche la condizione di reattività in modo diverso dalla mieloproliferazione neoplastica. Se i dati preliminari venissero tuttavia confermati, la scarsa concordanza tra le diverse metodologie pone in un futuro remoto la possibilità di applicare il conteggio differenziale esteso almeno per i granulociti immaturi. Studi effettuati dimostrano che il conteggio dei granulociti immaturi nelle situazioni infettive presenta una buona specificità (da 83% a 97%) ma bassa sensibilità (da 35% a 40%)^{6,7}. Quest'ultimo dato non permette di utilizzare il conteggio con finalità di screening o di diagnosi precoce, mentre l'utilizzo clinico nel monitoraggio specie nella valutazione della risposta terapeutica (es. a terapia antibiotica) sembra più indicato. Allo stato attuale quindi, il loro conteggio non deve comparire nel referto ematologico e deve essere utilizzato come parametro strumento-specifico in regole decisionali per la revisione microscopica o da utilizzare nei commenti interpretativi nel monitoraggio clinico dei pazienti con infezioni già riconosciute clinicamente.

Bibliografia

1. Al-Gwaiz LA, Babay H. Diagnostic value of absolute neutrophil count, band count and morphologic changes of neutrophils in predicting bacterial infections. *Med Princ Pract* 2007; 16: 344-7.
2. Levy M, Fink WP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. for the International Sepsis Definitions Conference. 2001SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003; 29:530-8. Published jointly with *Critical Care Medicine*.
3. Brilli RJ, Goldstein B. Pediatric sepsis definitions: past, present, and future. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6(Suppl):S6-8.
4. Cohen J, Brun-Buisson C, Torres A, Jorgensen J. Diagnosis of infection in sepsis: An evidence-based review. *Crit Care Med* 2004; 32(Suppl):466-94.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard-Second Edition. CLSI document H20-A2.
6. Ali Ansari-Lari M, Kikler TS, Borowitz MJ. Immature granulocyte measurement using the sysmex XE-2100 *Am J Clin Pathol* 2003; 120:795-9.
7. Field D, Tabue E, Heumann S. Performance evaluation of the immature granulocyte parameter in the sysmex XE-2100 automated haematology analyser. *Lab Hematol* 2006;12:11-4.