

Gli eritroblasti: performance strumentali e significato clinico

V. Miconi

Laboratorio di Patologia Clinica, AULSS 5 Ovest Vicentino, Arzignano (VI)

Riassunto

Il riconoscimento e il conteggio degli eritroblasti è ancora un problema aperto. Gli eritroblasti sono causa di interferenze nella determinazione dei parametri emocitometrici e la loro presenza nel sangue dei pazienti non pediatrici è un importante indicatore di patologia. Vi sono molte situazioni cliniche nelle quali il conteggio degli eritroblasti fornisce indicazioni diagnostiche e prognostiche. La tecnologia emocitometrica ha prodotto metodi e strumenti perfezionati per ottenere un conteggio accurato e preciso. I metodi strumentali sono basati su misure di fluorescenza, scatter, densità nucleare, conduttività, colorazione citochimica. Una sperimentazione avviata all'inizio del 2008 ha preso in esame campioni di pazienti con patologia conosciuta con presenza di eritroblasti entro un ampio intervallo di concentrazione. I risultati preliminari indicano che in situazioni limite sensibilità e specificità sono influenzate da scelte di posizionamento della sensibilità dell'allarme. I metodi basati sulla fluorescenza correlano meglio tra loro rispetto agli altri.

Summary

Erythroblasts: analytical performances and clinical relevance

Detection and count of erythroblasts (NRBC) is still an open question. NRBCs interference can affect CBC counts as well as leucocyte differential counts. The presence or the persistence of NRBCs in peripheral blood of adults is an important indicator of pathology. NRBC counting can provide relevant diagnostic and prognostic informations for clinicians and laboratory in many clinical conditions. The improvements in blood cell counters technology has produced more accurate and precise counts giving to professionals new diagnostic tools. At present time several analytical methods for NRBCs detection and counting are available, based on fluorescence, scatter, nuclear density, conductivity and cytochemistry staining. An evaluation, promoted in 2008 by Haematology Study Group (GdS-E) of the Italian Society of Laboratory Medicine (SIMeL), enrolled samples of patients with known pathology and a wide range of NRBC concentration. Preliminary results indicate that at very low and high NRBC concentrations sensitivity and specificity performances are influenced by flag sensitivity position. Fluorescence based methods show a better correlation among them than non-fluorescence based methods.

Future evolution of automated haematology devices should move toward a routine integrated NRBC count to provide positive outcomes for both clinician and patients and a further reduction in the need of smear review rate.

Key words. Blood cell analyzers, Nucleated Red Blood Cells (NRBC), Automated Counting, Clinical goals, Analytical performances.

La capacità degli strumenti di riconoscere e contare gli eritroblasti rappresenta la risposta dell'emocitometria automatizzata ad un problema fondato su motivazioni cliniche e tecnico-analitiche.

Le prime sono legate alle crescenti evidenze del valore clinico del conteggio degli eritroblasti. La loro presenza,

salvo che nei primi giorni di vita, è associata a patologie o situazioni cliniche di importante impegno medico ed è parte importante della semeiotica su cui si basa la diagnosi e la prognosi del paziente e la conseguente gestione clinica.

Le seconde sono correlate alle interferenze che gli eritroblasti possono causare nella determinazione dei para-

metri emocromocitometrici. All'inizio dell'era dell'emocitometria automatizzata gli eritroblasti erano considerati null'altro che un problema analitico causato dal posizionamento di questa popolazione, con caratteristiche strutturali del nucleo molto simili a quelle dei piccoli linfociti maturi, tra questi ultimi e il rumore di fondo. Un'ulteriore complicazione è apportata dalla disomogeneità dimensionale e morfologica degli eritroblasti legata al loro stadio maturativo e, se presente, alla patologia sottostante. I conteggi ottenuti in queste situazioni quasi sempre presentavano pseudoleucocitosi e pseudolinfocitosi al conteggio differenziale con invariabile necessità di verifica microscopica, nonostante i limiti intrinseci di precisione e accuratezza che quest'ultima presenta quando si contano popolazioni poco rappresentate. Il contesto storico in cui oggi si trova la Medicina di Laboratorio è caratterizzato da una continua sfida verso il contenimento delle procedure manuali, quali l'esame microscopico dello striscio periferico, senza per questo perdere in modo significativo sensibilità e capacità diagnostica.

La risposta della tecnologia non si è fatta attendere. Oggi la tecnologia applicata all'emocitometria in automazione permette il riconoscimento ed il conteggio degli eritroblasti utilizzando canali e reagenti dedicati, elaborazioni software, fornendo nella maggior parte delle situazioni un corretto conteggio dei leucociti e mettendo a disposizione un parametro ricco di informazioni cliniche.

Come spesso avviene nell'ambito scientifico, la ricerca della soluzione ad un problema porta alla scoperta di opportunità prima sconosciute. In modo analogo, abbiamo assistito negli anni alla metamorfosi degli eritroblasti, divenuti da problema, fonte di preziose informazioni.

Gli analizzatori ematologici di ultima generazione sono in grado di riconoscere e contare gli eritroblasti con buone prestazioni strumentali. A seconda del metodo utilizzato possono essere distinti in due gruppi di strumenti: quelli basati sulla fluorescenza (Abbott Sapphire, ABX Pentra 120 DX, Sysmex XE 2100) e quelli basati su misure di volume, scatter, conduttività, densità nucleare e colorazione citochimica (Beckman Coulter LH serie 7xx, Siemens Advia 2120).

Una diversa suddivisione può essere fatta in base alle modalità di esecuzione del conteggio degli eritroblasti tra strumenti che eseguono il conteggio su tutti i campioni per i quali è richiesto il conteggio differenziale dei leucociti, mantenendo la cadenza analitica abituale (Abbott Sapphire, Beckman Coulter LH serie 7xx, Siemens Advia 2120), e strumenti che eseguono il conteggio su richiesta specifica dell'operatore (ABX Pentra 120 DX, Sysmex XE 2100) attivato dalla comparsa di un allarme di sospetto¹.

La positività per eritroblasti è in genere segnalata dagli emocitometri da un allarme legato alla presenza di eventi nella zona di transizione tra i linfociti e il rumore di fondo. Le valutazioni riportate in letteratura non accreditano questo allarme di sensibilità e specificità tali da renderlo soddisfacente ed efficace. Di fatto, l'allarme assume il significato di un generico allarme di zona dove, oltre agli eritroblasti, possono posizionarsi eventi aspecifici o popolazioni cellulari atipiche. Una sperimentazione del GdS-E SIMeL ha valutato il valore prognostico e la corrispondenza con l'esame microscopico del flag di sospetto per tutti gli

strumenti². L'allarme ha, in generale, maggiore sensibilità rispetto alla specificità analitica.

Tuttavia, i costanti progressi della tecnologia e dei programmi di elaborazione dei dati derivati da conteggi e misure producono continui miglioramenti.

Il conteggio con metodi basati sulla fluorescenza sembra accreditato di migliori prestazioni rispetto agli altri metodi. Il conteggio in fluorescenza sembra inoltre ben correlato con il conteggio manuale³ e la sensibilità analitica varia in rapporto alla tecnologia considerata e oscilla tra 1 e 2 eritroblasti per 100 leucociti⁴.

Gli eritroblasti tuttavia, costituiscono un problema ancora aperto per le crescenti evidenze dell'importanza di un corretto conteggio in talune situazioni cliniche.

Con tale presupposto, nei primi mesi del 2008 si è svolta una sperimentazione utilizzando i 5 emocitometri di vertice oggi disponibili sul mercato. Sono stati analizzati più di 2000 campioni provenienti da pazienti con le più diverse patologie, non solo ematologiche, per poter avere una numerosità significativa per ciascuna delle branche di indagine individuate. Per ciascun campione è stata allestita una serie di strisci per la verifica microscopica da eseguire con gli stessi 4 osservatori dello studio precedente, contando 200 cellule, per un totale di 800.

La parte dello studio dedicata agli eritroblasti ha avuto come punto di partenza la selezione di un sottogruppo di pazienti con presenza di eritroblasti dimostrata al microscopio a diversi livelli, da molto alti a molto bassi. L'obiettivo è stato la valutazione della sensibilità clinica in un vasto ambito di concentrazioni, in particolare su quelle estreme, per trarre indicazioni o ipotesi sul comportamento delle performance strumentali in rapporto al tipo di campione o di patologia sottostante. Per fare questo è stata selezionata una casistica comprendente campioni con patologia conosciuta e presenza certa di eritroblasti, anche a livelli minimi.

Il criterio di positività microscopica del campione è stato fissato per il rilevamento di 1 eritroblasto da parte di almeno un osservatore. Per un conteggio totale di 800 cellule, questo criterio corrisponde ad una soglia di 0,125 eritroblasti per 100 leucociti.

Dai risultati preliminari si può trarre la conferma di una migliore performance del conteggio rispetto all'allarme. L'allarme, in linea generale, conferma di avere maggiore sensibilità che specificità analitica.

I dati pubblicati in precedenza dal GdS-E SIMeL² mantengono la loro validità ed evidenziano come, in situazioni al limite delle possibilità tecnologiche, differenze di posizionamento della sensibilità del flag, operata dai costruttori, ne influenzino in modo sensibile le caratteristiche di sensibilità e specificità.

Prendendo in considerazione i risultati dei conteggi, sembra emergere una correlazione maggiore in termini di sensibilità e specificità, anche se ancora non completamente soddisfacente, tra metodi basati sulla fluorescenza rispetto agli altri.

L'attenzione verso la performance strumentale fa intuire come il conteggio degli eritroblasti in automazione abbia una sempre più dimostrata utilità clinica.

La prima naturale applicazione è stata in campo neonatologico ed è consistita semplicemente nel fornire un con-

teggio leucocitario e differenziale accurato in condizioni in cui la presenza di eritroblasti rientra nella fisiologia.

Da questo punto di partenza, ben presto numerosi studi hanno fatto emergere nuove applicazioni diagnostiche e nuovi obiettivi clinici. La possibilità di un riconoscimento rapido e di un conteggio accurato si sono dimostrati utili in situazioni di prematurità⁵, ipossia, asfissia fetale⁶, ritardato sviluppo alla nascita⁷. Il conteggio degli eritroblasti è stato accreditato di valore predittivo del rischio di emorragie intracerebrali nei neonati pretermine⁸. Una percentuale elevata di eritroblasti, originati in condizioni di stress eritroide dalle sedi di eritropoiesi extramidollare epatica e splenica oltre che dal midollo osseo, è un segno caratteristico della malattia emolitica del neonato⁹. È stata segnalata la presenza di eritroblasti fetali nel sangue materno nella maggior parte delle gravidanze¹⁰. Tale presenza sarebbe tuttavia ad un livello molto basso e dimostrabile solo mediante tecniche di biologia molecolare, quindi ben al di sotto della sensibilità di qualsiasi emocitometro di ultima generazione. La segnalazione non è stata però confermata nella gestanti prima di un parto pretermine¹¹.

Nell'adulto la presenza di eritroblasti nel sangue periferico può essere riscontrata in molte patologie. Nelle sindromi talassemiche e nelle emoglobinopatie che causano falceizzazione degli eritrociti, gli eritroblasti sono un indicatore della presenza di stress midollare da eritropoiesi inefficace. Il loro conteggio può essere utilizzato per guidare la terapia trasfusionale con l'obiettivo di mantenere l'emoglobina al di sopra di 10 g/dL. A questo livello di emoglobina l'eritropoiesi viene inibita, la percentuale di eritroblasti diminuisce in proporzione all'aumento dell'emoglobina e lo stress midollare è fortemente attenuato¹².

Eritroblasti sono presenti nelle leucemie, nelle metastatizzazioni midollari da tumori solidi, nelle sindromi mieloproliferative, in particolare nella mielofibrosi, dove si realizza allo striscio periferico il quadro di leucoeritroblastosi¹³, e in seguito ad emorragie massive o ipossia acuta.

La presenza di eritroblasti nel sangue periferico dei pazienti in terapia intensiva è stata associata ad un aumentato rischio di mortalità durante il ricovero (50,7% contro 9,8%) e rappresenta un fattore di rischio indipendente da altri segni o sintomi e da parametri di laboratorio¹⁴, così come in cardiocirurgia e chirurgia toracica rappresenta un indice di rischio di mortalità nel periodo postoperatorio¹⁵.

Gli eritroblasti hanno valore prognostico nei pazienti ustionati¹⁶, tanto da far proporre di considerare il loro conteggio nello *score* di gravità delle ustioni¹⁷, nei pazienti sottoposti ad interventi cardiocirurgici¹⁸.

Nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo la persistenza di eritroblasti nel sangue periferico rappresenta un fattore prognostico tanto più sfavorevole, quanto maggiore è la loro concentrazione¹⁹.

Prospettive future

È prevedibile che l'impegno del laboratorio per migliorare le prestazioni analitiche relative al riconoscimento e al conteggio degli eritroblasti continuerà. È auspicabile che tutti gli emocitometri possano fornire un esame emocromocitometrico comprensivo del conteggio degli eritroblasti ed a costi contenuti. L'obiettivo sarà quello di ridurre il ricorso al controllo microscopico ed aumentare le

informazioni morfo-funzionali fornite dagli emocitometri, integrarle e correlarle secondo una logica diagnostica basata sulla significatività ed utilità clinica. Un contributo importante per il raggiungimento di questi obiettivi e ormai prossimo all'introduzione in diagnostica, sarà offerto dalle sempre più potenti piattaforme informatiche hardware e software capaci di fornire un quadro completo della filiera eritroide²⁰.

Bibliografia

- Buttarelli M, Plebani M. Automated blood cell counts. State of the art. *Am J Clin Pathol* 2008; 130:104-16.
- Bulian P, Cenci AM, Piccinini C, Miconi V, Piva E, Buttarelli M, et al. Sensibilità clinica degli allarmi leucocitari degli analizzatori ematologici: studio di 334 casi secondo protocollo NCCLS H20-A. *Riv Med Lab - JLM* 2004; 5(Suppl):175.
- Briggs C, Harrison P, Grant D, Staves J, Machin SJ. New quantitative parameters on a recently introduced blood cell counter - the XE2100. *Clin Lab Hem* 2000; 22:345-50.
- Hrisinko MA, Curcio K, Gupta R, Giles J, Peterson L. A comparative evaluation of the Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100 analyzer with regard to identification of NRBC's [abstract]. *Int J Lab Hematol* 2007; 29(Suppl 1):52-3.
- Philip A, Tito A. Increased nucleated red blood cell counts in small for gestational age infants with very low birth weight. *Am J Dis Child* 1989; 143:164.
- Korst LM, Phelan JP, Ahn MO, Martin GI. Nucleated red blood cells: an update on the marker for fetal asphyxia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175:843-6.
- Soothill P, Nicolaidis K, Campbell S. Prenatal asphyxia, hyperlacticaemia, hypoglycaemia, and erythroblastosis in growth retarded fetuses. *Br Med J* 1987; 294:1051-3.
- Green DW, Hendon B, Mimouni FR. Nucleated erythrocytes and intraventricular hemorrhage in preterm neonates. *Pediatrics* 1995; 96:475-8.
- Schaefer M, Rowan RM. The clinical relevance of nucleated red blood cell counts. *Sysmex J Int* 2000; 10:59-63.
- Takabayashi H. Fetal cells in the maternal circulation. 4th National Congress and Workshop in Prenatal Diagnosis and Therapy in India. http://www.kanazawa_med.ac.jp 1999 (data di consultazione: 18.09.2008).
- Hoesli I, Danek M, Lin D, Li Y, Hahn S, Holzgreve W. Circulating erythroblasts in maternal blood are not elevated before onset of preterm labor. *Obstet Gynecol* 2002; 100:992-6.
- Sher G, Vütisallo B, Schisano T, Pantalony D, Van Hove L. Automated NRBC count, a new parameter to monitor, in real time, individualized transfusion needs in transfusion-dependent thalassemia major. *Lab Hematol* 1997; 3:129-37.
- Delsol G, Guiu-Godfrin B, Guiu M, Pris J, Corberand J, Fabre J. Leukoerythroblastosis and cancer frequency, prognosis, and physiopathologic significance. *Cancer* 1979; 44:1009-13.
- Stachon A, Segbers E, Holland-Letz T, Kempf R, Hering S, Krieg M. Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study. *Crit Care* 2007; 11:R62, online at: <http://ccforum.com/content/11/3/R62> (data di consultazione: 18.09.2008).
- Böning A, Stachon A, Weisser H, Krismann M, Skipka G, Laczkovics A, et al. Postoperative cholesterol and erythroblasts as a parameter of perioperative mortality after cardiothoracic surgery. *Z Herz-Thorax-Gefäßchir* 2001; 15:242-8.
- Lehnhardt M, Katzy Y, Langer S, Druecke D, Homann HH, Steinstraesser L, et al. Prognostic significance of erythroblasts in burns. *Plast Reconstr Surg* 2005; 115:120-7.

17. Stachon A, Lehnhardt M, Katzy Y, Holland-Letz T, Steinau HU, Krieg M. Making the case for adapting the abbreviated burn severity index to include erythroblast count. *J Wound Care* 2005; 14:97-100.
18. Stachon A, Böning A, Krismann M, Weisser H, Laczkovics A, Skipka G, et al. Prognostic significance of erythroblasts in blood after cardiothoracic surgery. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39:239-43.
19. Otsubo H, Kaito K, Asai O, Usui N, Kobayashi M, Hoshi Y. Persistent nucleated red blood cells in peripheral blood is a poor prognostic factor in patients undergoing stem cell transplantation. *Clin Lab Haematol* 2005; 27:242-6.
20. Kim YR, van't Oever R, Landayan M, Bearden J. Automated red blood cell differential analysis on a multi-angle light scatter/fluorescence haematology analyzer. *Cytometry B Clin Cytom* 2003; 56:43-54.