

Validazione clinica degli indici strumentali nella sepsi

A.M. Cenci

Dipartimento di Patologia Clinica, Nuovo Ospedale "S. Agostino-Estense" - AUSL Modena, Baggiovara (MO)

Riassunto

La sepsi è costituita dalla reazione sistemica acuta dell'organismo ospite all'infezione. I gradi di gravità e gli stadi di malattia in cui questa sindrome si presenta sono caratterizzati da numerosi e diversi segni e sintomi clinici e di laboratorio che, sfortunatamente, non esprimono completa specificità. Nell'organismo, l'infezione è caratterizzata da eventi che coinvolgono cellule (monociti, macrofagi, neutrofilo), e fattori umorali (citochine, markers di reattività, anticorpi, fattori della coagulazione e di attivazione del complemento, ecc.); il grado dei cambiamenti di questi elementi, in termini di espressione di molecole di attivazione, rilascio di sostanze reattive e modulazione della risposta dell'organismo, dipende da una serie di variabili quali i diversi agenti patogeni, la suscettibilità genetica individuale, l'immunodeficienza, i fattori concomitanti, ecc. Nel passato recente poche sono state, in laboratorio, le reali novità riguardanti gli indicatori diagnostici di sepsi, nonostante i notevoli progressi avvenuti nella comprensione dei meccanismi molecolari e della biologia di cellule e citochine interessate nel processo della risposta immune dell'ospite, e non risultano al momento disponibili in questo campo markers che posseggano

la sensibilità e specificità necessaria a scopi diagnostici in tempi rapidi. La recentemente introduzione di test genetici per tracciare la regolazione dei geni che governano la risposta immune e di biologia molecolare per la ricerca veloce multipla degli agenti eziologici che sostengono l'infezione, sembra poter apportare, in un prossimo futuro, nuovi contributi di laboratorio vantaggiosi per la diagnostica clinica. Tuttavia, ancora oggi, trattamenti inadeguati, risultato di ritardi nella diagnosi, continuano a gravare sulla prognosi degli stati settici. Per le sue caratteristiche peculiari, l'esame emocromocitometrico e la formula leucocitaria sembrano poter fornire risultati utili nel raggiungimento di outcome clinici positivi in tempi utili nella sepsi. Nel presente studio si valuta il valore diagnostico di parametri vecchi e nuovi dell'emocromo in diversi pazienti settici e si discutono le caratteristiche necessarie per un contributo tempestivo del test alla diagnosi e al follow up terapeutico della patologia. In particolare si propongono percorsi analitici che, costruiti con diversi dati ematologici e informazioni complementari fornite in modo rapido da differenti tecnologie, propongono una valutazione complessiva di conteggi, misure, morfologia e funzionalità cellulare.

Summary

Clinical value of instrumental sepsis haematological parameters

Sepsis consists in the systemic acute inflammatory response to infection. Several clinical symptoms and signs are recognised in different degrees and stage of illness, but, unfortunately, they are not specific. Infection is characterized by cellular events, (involving monocytes, macrophages, and neutrophils), and presence of humoral factors (cytokines, reactive biomarkers, antibodies, coagulation and complement pathways factors, etc); the degree of their changes,

activity, expression, and release depends on many variables. Differences in pathogenic agents, genetic susceptibility, immunodeficiency, coexisting conditions should be considered. Despite the marked progress in understanding molecular mechanisms and biology of cells and cytokines involved in the host immune process, few innovations in diagnostic indicators can be found in the recent past, and biomarkers that provide high sensitivity and specificity for diagnostic aims in quick and useful time are not available at present time. Recently, the introduction of genetic methods to track regulation of the genes responsible for the bio-

markers expression, and molecular biology test to identify infection supporting agents are giving new tools in understanding the host immune response to infection. Nevertheless, an inadequate treatment as a result of delayed diagnosis continues to affect the septic status. For its characteristics the CBC and leukocyte differential counts seem to be useful in good timing and in reaching clinical goals in septic patients. In this study, are evaluated the present diagnostic value of old and new haemocytometric parameters in several different septic patients, and are discussed

the requirements for a timely correct contribute to diagnosis and therapeutic follow up in sepsis by CBC. In particular, are proposed analytical pathways based on several haematological data and complementary information from different technologies in a useful real-time monitoring, and resulting by counts, measures, morphology and function parameters.

Key words: sepsis, clinical goals, laboratory diagnostic aspects, blood cell counts, leukocyte differential count, blood cell analyzers.

La sepsi, risposta sistemica e complessa dell'ospite all'infezione, è caratterizzata da numerosi sintomi e segni, clinici e di laboratorio, purtroppo quasi tutti aspecifici¹. Essa determina il rilascio in circolo di numerosi mediatori chimici; la sintomatologia clinica è data dall'interazione tra prodotti tossici dell'agente eziologico e risposta dell'ospite ed è gravata di alto tasso di mortalità.

Le motivazioni alla richiesta di una diagnostica di laboratorio più specifica, accurata, sensibile e tempestiva sono ancora pressanti, al fine di diminuire la mortalità collegata alla sepsi. Esiste, infatti, una chiara necessità di fornire indicatori di infezione/sepsi che possano aumentare la performance di sensibilità e specificità sia nella diagnosi che nel monitoraggio terapeutico. Inoltre, dovrebbero venire soddisfatte le caratteristiche di efficienza clinica necessarie per test che trovano impiego in situazioni a rapida evoluzione e di applicazione in regimi di emergenza, tutto questo tenendo nel giusto conto la multifattorialità delle cause, le possibili concause aggravanti, l'individualità della risposta, la necessità molto spesso presente di cure intensive, le diverse fasi della patologia e la possibilità di evoluzione dell'una nell'altra, i diversi patogeni coinvolti, con i potenziali stimoli/risposte differenti a seconda della reazione scatenata¹⁻³.

I test da utilizzare dovranno, quindi, valutare diversi fronti, quali la risposta immune dell'ospite (studio dello stato infiammatorio, citochine e sostanze pro e antinfiammatorie, test genetici), evidenziare gli agenti eziologici, le loro cariche e gli strumenti di tossicità (test microbiologici avanzati), identificare le concause (diagnosi d'organo, test generali e specifici). Nella loro ricerca e impostazione si dovrà tenere conto dei progressi avvenuti nel tempo nella conoscenza degli eventi causali che si succedono e sostengono la malattia e, da un punto di vista tecnico, dei progressi della diagnostica strumentale. Il loro impiego avverrà nell'inquadramento di patologia, nella sua stadiazione e nel monitoraggio terapeutico, con occhio al problema cruciale del tempo di risposta.

A nostro giudizio, per la capacità di rispondere a molte delle richieste sopra formulate e per le caratteristiche di innovazione tecnologica di cui si è arricchito, il contributo diagnostico dell'emocromo si presenta, oggi, di utile e rinnovato impiego nella sepsi. Test di base e tra i più diffusi nella diagnostica del laboratorio clinico, esso fornisce, in tempi rapidi e a costi contenuti, notizie di tipo generale sullo stato del paziente e parametri specifici riferiti alle popolazioni circolanti. Tali informazioni, inserite nel quadro clinico del paziente, quando appropriatamente inter-

pretate, risultano sempre più spesso di supporto nella risposta ai quesiti proposti^{4,5}.

L'esame emocromocitometrico, e in particolare la determinazione dei globuli bianchi, ma non solo, fornisce, in caso di sepsi, indicazioni sia per la diagnosi (in genere una leucocitosi neutrofila, reattiva e di entità varia), sia per la prognosi (leucopenia, anche marcata, nei casi con esito sfavorevole o comparsa di elementi immaturi per stress midollare da persistente stimolazione o da problematiche terapeutiche). Ma non è questo l'unico contributo: infatti, alla statica fotografia della rilevazione del numero e della forma/stadio cellulare si è affiancata la registrazione della funzionalità quale utile indice della attivazione dei neutrofili, rilevata con il CD64, valutazione immunofenotipica integrabile in sistemi ematologici. Il parametro è presente nella sepsi e non nelle forme neoplastiche, fatto questo che risolve uno dei problemi di affidabilità del conteggio automatizzato diretto degli elementi immaturi in circolo integrato nello screening leucocitario di alcune strumentazioni del mercato. Infatti, l'accuratezza delle determinazioni dirette di questi sistemi, (elaborate attraverso il calcolo dei parametri posizionali, i conteggi di elementi immaturi, poi refertabili o, più genericamente, le flag dedicate), diminuisce quando le cellule mieloidi esprimono displasia, asincronie o dismaturità legate a situazioni neoplastiche. Il CD64 risulta essere una misura funzionale priva delle caratteristiche di soggettività di cui erano gravate in precedenza altre valutazioni riferite ai granulociti neutrofili, quali il conteggio delle band cell o la determinazione della formula di Arnet, cui in passato è stato attribuito un ingiustificato significato clinico. Infine il CD64 si correla con l'andamento di più sofisticati biomarkers, fornendo notizie sulla risposta dei neutrofili all'azione delle citochine stimolanti attraverso l'espressione di questo marcatore specifico^{6,7}.

Per le altre famiglie leucocitarie (linfociti, monociti, eosinofili e basofili), il contributo attuale dell'ematologia automatizzata è costituito fondamentalmente dall'accuratezza analitica (conteggi e allarmi). Lo studio funzionale dei monociti può avvalersi dell'analisi citofluorimetrica, dove possono essere messi in evidenza markers di attivazione e/o differenziazione espressi dalle cellule circolanti dei pazienti settici.

Gli altri parametri dell'emocromo (vedi emoglobina e globuli rossi) possono essere utilizzati per il monitoraggio dello stato generale e della reazione del paziente allo stato di malattia.

Circa il 40-60% delle sepsi è gravato da piastrinopenia, che riconosce una eziologia multifattoriale (pseudopiastrin-

nopenia, sviluppo di autoanticorpi, ematofagocitosi, trombocitopenia eparino-indotta o legata ad altre terapie, da diluizione soprattutto nei traumi, da cause preesistenti, quali cancro, ipersplenismo, PTI, ecc.)⁸.

Essa si manifesta in relazione a tutti gli altri aspetti della risposta dell'ospite alla sepsi, inclusa l'attivazione della via coagulazione/infiammazione, e lo sviluppo delle disfunzioni d'organo.

In questi pazienti l'accuratezza della conta e la stima della funzionalità piastrinica costituiscono informazioni basilari nella valutazione della bilancia emostatica. Un contributo notevole all'accuratezza del conteggio si ha con la possibilità di integrare più metodologie di lettura nella determinazione piastrinica (impedenzometria, metodo ottico ed immunologico). Bisogna infatti considerare le difficoltà di un corretto riconoscimento in ambiti di basse concentrazioni in pazienti nei quali possono ritrovarsi in circolo macroaggregati di particelle estranee alle piastrine e/o frammenti cellulari di natura diversa. A questo scopo risulta utile anche l'osservazione diretta della distribuzione dei cluster cellulari nei canali interessati. In questi casi, comunque, la possibilità della verifica immunologica (CD61 e CD41) costituisce un reale valore aggiunto nella refertazione di dati affidabili. In letteratura si riscontrano ancora suggerimenti sull'utilizzo del volume piastrinico come indice morfo-funzionale, pur conoscendo le difficoltà tuttora persistenti nella sua determinazione^{4,9}. Nuovi indici quali l'IPF (Immature Platelet Fraction) si riferiscono alla presenza in circolo di piastrine neoformate ricche di RNA e vanno, come significato e valutazioni preliminari sui conteggi bassi, nella stessa direzione del volume medio piastrinico. Il dato necessita di ulteriori verifiche prima di poter esprimere pareri comprovati la possibilità reale di utilizzo nei pazienti settici, con il significato di una valutazione in tempi brevissimi della ripresa nella produzione midollare anche senza praticare manovre invasive quali la biopsia osteomidollare, che risulterebbero particolarmente problematiche in queste situazioni.

Recenti lavori riportano una correlazione tra le caratteristiche della piastrinopenia e l'agente eziologico della sepsi, con differenze anche importanti tra le varie origini¹⁰.

Da tempo si conosce che la comparsa e l'aumento di circolo di precursori eritroidi costituisce un segno prognostico negativo. La possibilità attuale delle nuove tecnologie ematologiche di fornire conteggi in automazione per questi elementi, costituisce un notevole contributo all'attività di laboratorio nella risposta veloce ed accurata in situazioni di emergenza. In particolare, la possibilità di avere a disposizione contemporaneamente e su singola determinazione i parametri di immaturità mieloide ed eritroide può essere utilizzata nella valutazione prognostica complessiva dell'andamento clinico del paziente settico.

Un'occasione di osservazione diretta dei dati sopra riportati si è verificata con il follow up osservato in un setting di sperimentazione costituito da 8 pazienti, seguiti nel tempo (nel giorno e tra giorni) per un periodo di 2 setti-

mane. I pazienti settici ricoverati presso differenti terapie intensive risultavano affetti da sepsi di diversa origine (eziopatogenesi mediche e chirurgiche) e di diverso stadio e grado e sono stati monitorati con diversi parametri biochimici e microbiologici. I dati ottenuti, preliminari e in via di elaborazione complessiva, ricalcano quanto già presente in letteratura. In particolare, per i parametri dell'emocromo, sono state confrontate le performance di diversi strumenti ematologici nei pazienti settici, tra sistemi e contro metodo microscopico di riferimento; per completezza i campioni sono stati valutati anche con analisi citofluorimetrica. Dall'esame dei dati si evince il bisogno di conoscere in modo più approfondito l'andamento e i vantaggi legati all'utilizzo clinico di alcuni dei nuovi parametri strumentali in ambiti specifici quale quello studiato e la possibilità di conferme con metodologia analitica differente, anche per step successivi ma sulla stessa determinazione, dell'accuratezza di alcuni dati (vedi il chiaro esempio delle piastrine). Risulta, quindi, sempre più evidente la necessità di muoversi verso sincretismi tecnologici, siano essi integrazioni fisiche nello stesso strumento o tecnologie diverse legate da software gestionali, per fornire dati affidabili in tempi utili.

Bibliografia

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29:1303-10.
2. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101:1644-55.
3. McMillan JA, Feigin RD, DeAngelis CD, Jones MD Jr (Eds.). *Oski's Pediatrics: Principles & Practice*, 4th edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
4. Mackenzie I, Lever A. Management of *sepsis*. *BMJ* 2007; 335:929-32.
5. Carrigan SD, Scott G, Tabrizian M. Toward resolving the challenges of sepsis diagnosis. *Clin Chem* 2004; 50:1301-14.
6. Davis BH, Bigelow NC. Comparison of neutrophil CD64 expression, manual myeloid immaturity counts, and automated hematology analyzer flags as indicators of infection or sepsis. *Lab Hematol* 2005; 11:137-47.
7. Davis BH, Olsen S, Ahmad E, Bigelow NC. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency room patients. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130:654-61.
8. Levi M. Platelets at a crossroad of pathogenic pathways in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004; 2:2094-5.
9. Numbenjapon T, Mahapo N, Pornvipavee R, Sriswasdi C, Mongkonsritragoon W, Leelasiri A, et al. A prospective evaluation of normal mean platelet volume in discriminating hyperdestructive thrombocytopenia from hypo productive thrombocytopenia. *Int J Lab Hematol* 2008; 30:408-14.
10. Guida JD, Kunig AM, Leef KH, McKenzie SE, Paul DA. Platelet count and sepsis in very low birth weight neonates: is there an organism-specific response? *Pediatrics* 2003; 111:1411-5.