

La diagnostica ematologica nel laboratorio clinico tra evoluzione tecnologica, analisi morfologica e tecniche innovative

Alessandra Marini¹, Sabrina Buoro², Mauro Panteghini³

¹U.O. Laboratorio Analisi, Ospedale Versilia, Azienda Toscana Nord Ovest, Lido di Camaiore (LU)

²SMeL Generale di Base - Analisi Chimico Cliniche, Azienda Socio-Sanitaria Territoriale Papa Giovanni XXIII, Bergamo

³Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche 'Luigi Sacco', Università di Milano

La diagnostica ematologica è un settore affascinante e complesso della Medicina di Laboratorio, caratterizzato dalla coesistenza di una rapida e continua evoluzione tecnologica con la tradizionale analisi morfologica sullo striscio di sangue periferico o midollare in microscopia ottica. Numerose possibilità di approfondimento diagnostico, basate su metodi di citochimica, citogenetica, citofluorimetria, genomica e trascrittomica, sono poi in costante diffusione, contribuendo in maniera significativa alla classificazione, alla diagnosi e al monitoraggio delle patologie ematologiche. L'introduzione di nuove metodologie e principi analitici per l'analisi cellulare, insieme alla progressiva evoluzione di "hardware" e "software", ha permesso la realizzazione di emocitometri in grado di fornire dati quantitativi (conteggi cellulari e determinazione di indici cellulari) e qualitativi (citogrammi e allarmi morfologici) caratterizzati da sempre maggiori sensibilità e specificità nell'individuazione di anomalie cellulari. Queste caratteristiche hanno anche permesso lo sviluppo di algoritmi diagnostici, spesso in completo automatismo, adatti alle moderna organizzazione del laboratorio clinico. Questi indubbi progressi hanno, tuttavia, imposto la necessità di conoscenze sempre più specialistiche per poter meglio comprendere le possibili applicazioni cliniche e sviluppare percorsi successivi di appropriatezza.

Il Gruppo di Studio SIBioC sulla Diagnostica Ematologica (GDS-DE), di recente costituzione, ha condotto nel 2014 un'indagine conoscitiva sul territorio nazionale, mirata a indagare lo stato dell'arte della diagnostica ematologica nei servizi di Medicina di Laboratorio (1). I risultati hanno evidenziato un quadro eterogeneo caratterizzato da diversi gradi di complessità e completezza nella gestione del processo diagnostico di laboratorio in ambito ematologico: notevoli sono infatti le differenze tra laboratori di piccole dimensioni (caratterizzati generalmente da casistica di bassa complessità e livelli di automazione e standardizzazione

del processo relativamente contenuti) e laboratori di medie e grandi dimensioni, con casistica complessa e modelli organizzativi avanzati a elevato grado di tecnologia e automazione. E' stata quindi quasi una necessità la decisione di dedicare un numero di *Biochimica Clinica* all'approfondimento dei vari aspetti della diagnostica ematologica allo scopo di sensibilizzare i lettori in merito alla qualità necessaria e alle competenze richieste per consentire una gestione adeguata del processo diagnostico.

In questo numero monografico dedicato all'ematologia di laboratorio sono presenti contributi relativi ai 4 aspetti fondamentali di questa diagnostica: l'analisi quantitativa degli elementi cellulari, l'analisi morfologica, le tecnologie di approfondimento diagnostico e l'armonizzazione della refertazione. Buttarello descrive in maniera esaustiva le potenzialità degli emocitometri di ultima generazione (2). Questi analizzatori, in funzione dei metodi e della tecnologia adottati, oltre ai parametri classici dell'emocromo, forniscono una serie di parametri aggiuntivi (ad es., il conteggio degli eritroblasti o il conteggio leucocitario differenziale esteso con l'inclusione, oltre alle 5 classiche popolazioni leucocitarie, del conteggio dei granulociti immaturi), che necessitano di essere ben compresi e gestiti per un loro utilizzo clinico ottimale. Le differenze tecnologiche e metodologiche tra gli analizzatori si possono d'altro canto tradurre in una disomogeneità dei risultati forniti, che può ulteriormente complicare il loro utilizzo clinico. A questo proposito, il GDS-DE presenta i risultati di uno studio multicentrico di comparazione delle prestazioni analitiche dei principali analizzatori ematologici, nel quale sono stati confrontati i conteggi cellulari e gli indici eritrocitari prodotti da 8 diversi strumenti presenti sul mercato (3). Lo studio dimostra un buon grado di comparabilità fra analizzatori per i principali parametri valutati, verificando tuttavia l'esistenza di limiti importanti nel conteggio di monociti e, soprattutto, basofili, nonché nella determinazione degli

Corrispondenza a: Sabrina Buoro, SMeL generale di base - Analisi chimico-cliniche, ASST Papa Giovanni XXIII, Piazza OMS 1, 24127 Bergamo. Tel. 035267450, Fax 0352674939, E-mail sbuoro@asst-pg23.it

Ricevuto: 07.07.2016

Revisionato: 16.07.2016

Accettato: 17.07.2016

Pubblicato on-line: 01.08.2016

DOI: 10.19186/BC_2016.028

indici eritrocitari più strettamente strumento-dipendenti. Ma eterogeneità delle prestazioni analitiche e necessità di investire ulteriori energie nei percorsi di standardizzazione e armonizzazione sono evidenziabili anche per il conteggio dei reticolociti e dei relativi parametri reticolocitari, come evidenziato dallo studio comparativo fra alcuni emocitometri e dai risultati dei programmi di VEQ presentati da Piva et al. (4). E appunto in un'ottica di standardizzazione, Birindelli et al. (5) propongono un modello per la stima dell'incertezza analitica e per il controllo dell'allineamento interstrumentale degli emocitometri con l'impiego di un materiale di controllo di terza parte, utile per sviluppare nuovi percorsi di qualità in accordo con standard internazionali, come l'ISO 15189:2012 (6).

Numerosi studi presenti in letteratura hanno valutato le prestazioni analitiche della misura dei parametri tradizionali dell'emocromo, mentre relativamente pochi hanno preso in considerazione le prestazioni dei parametri ematologici di più recente introduzione. Il lavoro di Mecca et al. (7) porta un significativo contributo valutando le prestazioni relative al conteggio automatizzato di granulociti immaturi, eritroblasti, frazione immatura delle piastrine e alla determinazione del contenuto medio di emoglobina reticolocitaria e dei parametri morfo-funzionali leucocitari ottenuto con un analizzatore automatico di ultima generazione. Pur soffrendo di scarsa comparabilità, questi parametri sono caratterizzati da un basso costo (sono automaticamente prodotti in concomitanza all'esecuzione dell'emocromo e della conta differenziale) e ampia fruibilità (presenti in strumentazioni operanti 24 ore al giorno). E' quindi opportuno promuovere studi per verificarne l'applicabilità clinica al fine di sfruttare al meglio le potenzialità che la tecnologia offre. In questo contesto, appare interessante la proposta di utilizzo clinico del conteggio dei neutrofilii e dei granulociti immaturi per valutare il rischio di mortalità in pazienti con patologie cardiopolmonari (8). E in tema di utilizzo clinico, ma anche di armonizzazione, Dima et al. (9) presentano per l'esame emocromocitometrico corredato di conteggio reticolocitario gli intervalli di riferimento nel sangue cordonale.

Sebbene siano stati fatti enormi passi in avanti nello sviluppo tecnologico, l'esame morfologico dello striscio di sangue periferico costituisce tuttora un punto cardine della diagnostica ematologica, necessario per confermare i dati strumentali e per individuare popolazioni cellulari patologiche o altre alterazioni, come ad esempio la presenza di agglutinati piastrinici, che possono non essere riconosciute o quantificate dagli analizzatori ematologici. A fronte del ruolo fondamentale dell'analisi morfologica dello striscio di sangue periferico, si percepisce a volte una competenza dello specialista di Medicina di Laboratorio non sufficientemente adeguata, condizione di causa o effetto dello sviluppo di percorsi operativi sbilanciati rispetto all'applicazione di criteri di "reflex", che prevedano la revisione microscopica (1). Gli indici di revisione microscopica documentati nel territorio nazionale mostrano infatti un'ampia oscillazione (fra 1% e 20%), difficilmente spiegabile solo in base alla

tecnologia adottata e alla differente casistica. L'importanza della valutazione morfologica è messa in luce nel contributo di Avino et al. (10), dove vengono evidenziate le chiare correlazioni tra le caratteristiche morfologiche dei megacariociti e le alterazioni citogenetiche di frequente riscontro nelle sindromi mielodisplastiche. Tuttavia, anche lo studio della morfologia presenta delle criticità, come descritto in un caso particolarmente interessante di leucemia acuta con morfologia indifferenziata (11).

Se da un lato è necessario investire in percorsi formativi e qualificanti per lo specialista di Medicina di Laboratorio per migliorarne le capacità di valutazione morfologica, dall'altro è indispensabile continuare a promuovere l'integrazione di tali competenze con altre tecniche e/o metodiche, in particolare quelle immunologiche e molecolari. L'importanza dell'impiego della citofluorimetria multiparametrica è ben evidenziata da Ortolani et al. (12). Questa tecnica continua a fornire dati utili in vari scenari clinici e la sua diffusione, ancora maggiore rispetto alle tecniche genetiche molecolari, associata a costi e tempi vantaggiosi, le assegna ancora un ruolo fondamentale tra le indagini ematologiche di II livello. Un esempio di utilità clinica della citofluorimetria è fornito da Rousseau et al. (13), che ne evidenziano l'impiego nella valutazione della risposta alla terapia nella macroglobulinemia di Waldenström. D'altro canto, nessuno oggi può negare la centralità che spesso assumono le metodiche di biologia molecolare nell'approccio diagnostico e nella valutazione prognostica e dell'efficacia della terapia nelle malattie ematologiche. A dimostrazione di questo, è sufficiente osservare come la caratterizzazione molecolare abbia portato alla radicale revisione della classificazione WHO delle neoplasie mieloidi e linfoidi. Accanto a sistemi complessi di valutazione dell'espressione genica o applicazioni di approcci di "next generation sequencing", sono ora disponibili nuove tecnologie per la diagnosi molecolare rapida delle patologie onco-ematologiche, come la metodica denominata "loop-mediated isothermal amplification" (LAMP) descritta in questo numero dal gruppo di Spinelli (14). L'applicazione di questa metodica consente di indagare alterazioni genetiche, come le mutazioni *PML-RAR*, *BCR-ABL1* o *JAK2*, che caratterizzano rispettivamente la leucemia promielocitica acuta, la leucemia mieloide cronica e le neoplasie mieloproliferative *BCR-ABL1* negative, con il vantaggio di completare un percorso diagnostico in modo veloce, diminuendo i tempi di esecuzione rispetto alla "polymerase chain reaction" o ad altre tecniche molecolari come l'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH). In un'epoca in cui l'analisi del genotipo sembra prevalere sul fenotipo, Gessoni et al. (15) documentano nei casi clinici presentati l'importanza di associare l'analisi molecolare (nello specifico per la ricerca della mutazione G1691A) con il test della resistenza alla proteina C attivata nei portatori di fattore V Leiden.

Il processo di armonizzazione nella comunicazione dei risultati è alla base della corretta comprensione e dell'utilizzo ottimale degli stessi da parte del clinico (16).

I requisiti generali propri del referto e del processo di refertazione sono dettagliati nello standard ISO 15189 (6), i requisiti specifici per la refertazione ematologica sono descritti in letteratura prevalentemente per i dati numerici, mentre sono carenti le indicazioni in merito alla refertazione che necessita di commenti. L'esame emocromocitometrico è un'analisi multiparametrica quantitativa e, talvolta, qualitativa; nel referto i dati numerici possono essere accompagnati da commenti finalizzati a segnalare alterazioni morfologiche qualitative o semiquantitative. Nel referto deve essere quindi garantita, oltre all'impiego corretto delle unità di misura internazionali (17) e all'adozione di intervalli di riferimento strumento-dipendenti quando necessario (18), una corretta e comprensibile comunicazione delle alterazioni morfologiche suggestive di patologia ematologica e non. L'armonizzazione dei commenti del referto ematologico è un passaggio fondamentale al fine di garantire la tutela del paziente, promuovendo i corretti percorsi di approfondimento diagnostico, se e quando necessari. L'indagine conoscitiva condotta nel 2014 precedentemente citata ha evidenziato per la realtà italiana una situazione molto confusa e disomogenea relativamente ai commenti nella refertazione dell'esame emocromocitometrico (1). Il GDS-DE ha quindi prodotto una raccomandazione frutto di un impegnativo lavoro di armonizzazione per l'adozione di un numero limitato di commenti standardizzati, ritenuti idonei alla gestione delle più comuni necessità cliniche, comprendente anche i criteri minimi per la segnalazione delle alterazioni (19). Sono altresì proposte delle "regole redazionali" che, nella necessità di produrre un commento non precodificato, permettano comunque di mantenere uniformità e correttezza del livello informativo.

L'evoluzione tecnologica della diagnostica ematologica di laboratorio, unitamente alla prospettiva di un'ulteriore integrazione nel processo dei sistemi citofluorimetrici e delle metodiche molecolari, senza dimenticare l'importanza della valutazione morfologica, richiedono un costante impegno educativo e di aggiornamento dello specialista di Medicina di Laboratorio. La qualità analitica del dato, la corretta interpretazione dei sempre più complessi parametri strumentali forniti dagli emocitometri di ultima generazione, la capacità di rilevare e interpretare correttamente le alterazioni morfologiche, nonché l'impiego di tecnologie innovative quali citofluorimetria e analisi molecolari e la capacità di trasmettere le informazioni in modo chiaro e adeguato attraverso il referto, sono gli elementi fondamentali che consentiranno la produzione di risposte ai quesiti clinici atte a influenzare favorevolmente l'"outcome" del paziente.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Buoro S, Apassiti Esposito S, Balboni F, et al. Stato dell'arte della diagnostica ematologica nei servizi di Medicina di Laboratorio in Italia. *Biochim Clin* 2015;39:25-40.
2. Buttarello M. Analizzatori ematologici a flusso: basi tecnologiche, modalità di valutazione, qualità analitica e nuove informazioni. *Biochim Clin* 2016;40:180-94.
3. Buoro S, Pipitone S, Fanelli A, et al. Valutazione multicentrica dei conteggi cellulari ottenuti con 8 analizzatori ematologici automatici. *Biochim Clin* 2016;40:195-203.
4. Piva E, Secchiero S, Spolaore F, et al. Armonizzazione della diagnostica ematologica: lo stato della valutazione dei reticolociti. *Biochim Clin* 2016;40:208-16.
5. Birindelli S, Carnevale A, Aloisio E, et al. Valutazione dell'imprecisione dell'esame emocromocitometrico eseguito con analizzatore Sysmex XN-9000. *Biochim Clin* 2016;40:282-4.
6. International Organization for Standardization (ISO). Medical laboratories - Particular requirements for quality and competence. ISO 15189:2012.
7. Mecca T, Seghezzi M, Gherardi P, et al. Valutazione analitica della misura di nuovi parametri emocitometrici su analizzatore Sysmex XN-9000. *Biochim Clin* 2016;40:217-24.
8. Papa A, Bauleo C, Fornaro MG, et al. Valore predittivo della determinazione di neutrofili e granulociti immaturi nel sangue periferico per il rischio di mortalità in soggetti con patologie cardiopolmonari. *Biochim Clin* 2016;40:225-8.
9. Dima F, Montagnana M, Raffaelli R, et al. Intervalli di riferimento dell'esame emocromocitometrico nel sangue di cordone ombelicale. *Biochim Clin* 2016;40:204-7.
10. Avino D, Di Palma A, Caliendo I, et al. Alterazioni morfologiche dei megacariociti nelle sindromi mielodisplastiche associate a delezione del braccio lungo del cromosoma 5 [del(5q)], 7 [del(7q)] e 20 [del(20q)] e monosomia del cromosoma 7. *Biochim Clin* 2016;40:229-33.
11. Marini A. Quando l'apparenza inganna: un caso di leucemia acuta con imponente vacuolizzazione dei blasti. *Biochim Clin* 2016;40:e18-21.
12. Ortolani C, Canonico B, Papa S. Citometria a flusso ed ematologia oncologica: un matrimonio sempre valido. *Biochim Clin* 2016;40:244-54.
13. Rousseau M, Carulli G, Ciancia EM, et al. Impiego della citofluorimetria multiparametrica nella valutazione della risposta alla terapia in pazienti con macroglobulinemia di Waldenström. *Biochim Clin* 2016;40:285-6.
14. Salmoiraghi S, Minnucci G, Amicarelli G, et al. Development of new tools for molecular diagnosis of hematologic malignancies. *Biochim Clin* 2016;40:234-43.
15. Gessoni G, Valverde S, Gessoni F, et al. Discordance between phenotype and genotype study in factor V Leiden carriers: a real life experience. *Biochim Clin* 2016;40:e22-6.
16. Plebani M, Panteghini M. Armonizzazione in laboratorio: verso una visione globale. *Biochim Clin* 2015;39:12-4.
17. Papa A, Buoro S, Marini A, et al. Armonizzazione del referto ematologico con l'impegno di unità di misura conformi al Sistema Internazionale. *Biochim Clin* 2015;39:627-30.
18. Buoro S, Apassiti Esposito S, Mecca T, et al. Determinazione degli intervalli di riferimento dell'esame emocromocitometrico eseguito con analizzatore Sysmex XN 9000. *Biochim Clin* 2015;39:256-63.
19. La Gioia A, Balboni F, Buoro S, et al. I commenti interpretativi nel referto ematologico di laboratorio. *Biochim Clin* 2016;40:255-69.