

# INTERVALLI DI RIFERIMENTO DEL PARAMETRO “FRAZIONE DI PIASTRINE IMMATURE” (IPF) DEL SISTEMA EMATOLOGICO SYSMEX XE-2100

Grillo A, Biancotti PP, Martinelli F, Cazzola A, Sabbadin G  
 Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche “Baldi e Riberi”  
 Azienda Ospedaliera S.Giovanni Battista ( sede Molinette) Torino

## INTRODUZIONE

Un accurato conteggio di piastrine fornisce un'informazione limitata sulla probabilità di sanguinamento del paziente trombocitopenico. Poter avere rapidamente una valutazione dell'efficienza della piastrinopoiesi sarebbe utile per distinguere più facilmente una trombocitopenia dovuta a un difetto di produzione midollare (con alta probabilità di sanguinamento) da una trombocitopenia causata da incremento della distruzione periferica o da aumentato turn-over. E' stato osservato nel 1969 che, dopo emorragia acuta, le piastrine rilasciate di nuova produzione contenevano grossolane granulazioni colorabili con blu di metilene e riconoscibili al microscopio ottico. Queste piastrine, più grandi e più reattive delle piastrine mature, contenevano RNA costituendo quindi un analogo piastrinico dei reticolociti eritrocitari e furono perciò identificate con il termine di “piastrine reticolate”. Il numero di piastrine reticolate riflette il tipo di piastrinopoiesi: aumentano quando la produzione è stimolata e diminuiscono quando è ridotta. Fino ad ora il metodo di riconoscimento più usato per tale parametro è stato quello citofluorimetrico che utilizza coloranti fluorescenti che legano l'RNA insieme ad anticorpi rivolti verso antigeni piastrinici. Attualmente invece la valutazione delle piastrine reticolate può essere effettuata mediante il parametro IPF (Frazione di Piastrine Immature) ottenuto, in completa automazione, con il sistema ematologico SYSMEX XE 2100.

## SCOPO DEL LAVORO

Poiché la determinazione del parametro IPF risulta utile, come dimostrato da recenti studi, nella diagnosi differenziale delle piastrinopenie (con valori inferiori alla norma nella ridotta produzione midollare e superiori nell'aumentato consumo periferico), abbiamo attivato il seguente studio per definire gli intervalli di riferimento (IR) in soggetti normali e fare il loro confronto con i dati disponibili in letteratura ( 1, 2, 3).

## MATERIALI E METODI

L'analizzatore ematologico SYSMEX XE 2100 (Sysmex, Kobe, Japan), utilizzando il software IPF-Master, determina con metodo ottico laser in fluorescenza e previa colorazione dell'RNA residuo in esse contenuto, la frazione di piastrine immature (IPF). La metodica citofluorimetrica utilizza un colorante fluorescente brevettato contenente polymethine e oxazine (Ret search II) che attraversa la membrana cellulare colorando l'RNA residuo negli eritrociti (per la determinazione dei reticolociti ) e nelle piastrine reticolate. Le cellule colorate passano attraverso un raggio laser a semiconduttore che permette di misurarne il volume cellulare (forward scatter) e l'intensità di fluorescenza (contenuto di RNA). Vedi Fig. 1- Fig. 2

Su 258 campioni di donatori volontari e sani (138 maschi, 120 femmine), di età compresa tra 18 a 66 anni, con valori ematologici nei limiti di riferimento e senza flags strumentali, sono stati determinati gli IR con statistica non parametrica (range 2.5°-97.5° percentile, mediana). Eventuali differenze legate al sesso sono state esaminate con test di Kruskal-Wallis (significativo per p<0.05) per IPF %, IPF # (x10<sup>9</sup>/L), conteggio delle piastrine (x10<sup>9</sup>/L) e per gli altri parametri piastrinici. Con lo stesso metodo è stata valutata la differenza per classi di età, suddividendo i soggetti in 3 gruppi: fino a 35 anni (n=81), da 36 a 49 anni (n=96), da 50 a 65 anni (n=81). I grafici 1 e 2 sono relativi agli istogrammi di frequenza delle piastrine e delle classi di età in tutti i soggetti esaminati.

## RISULTATI

I valori di IPF% e IPF # hanno distribuzioni di frequenza non normali per asimmetria (Graf. 3). Gli intervalli di riferimento ottenuti per i vari parametri esaminati sono indicati nella Tab.1.

Sono risultate significative le differenze maschi / femmine (come già noto in letteratura) per il conteggio piastrine (mediana-maschi = 229, mediana-femmine= 246, con p<0.0001) e per il parametro IPF% (p= 0.0124) mediana-maschi =2.20, intervallo di riferimento 1.05-5.36; mediana-femmine = 1.90, intervallo di riferimento 0.80-5.39 ( Tab.1).

Non sono risultate significative le differenze degli altri parametri, compreso IPF%, per sesso (Tab.1) e di tutti i parametri per classi di età ( Tab.2).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

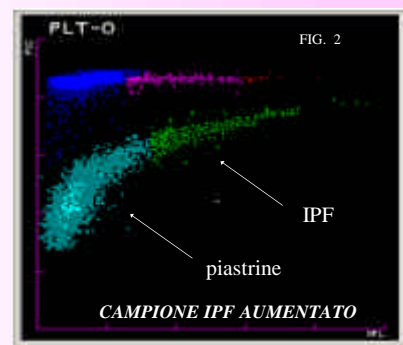
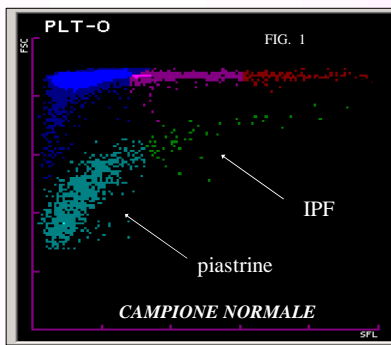
I risultati del nostro studio evidenziano che, nel definire gli intervalli di riferimento per il parametro IPF, il valore assoluto permette di utilizzare un indice di riferimento unico per sesso ed età in quanto non si rilevano differenze significative per queste categorie.

Gli intervalli di riferimento ottenuti sono confrontabili ai dati della letteratura: la conferma e la confrontabilità dei limiti di riferimento tra laboratori diversi ( Tab.3 ) dimostra i vantaggi di questo metodo rispetto ai metodi citofluorimetrici tradizionali, tra loro difficilmente confrontabili perché fortemente influenzati dalla metodica . Pertanto l'uso di XE-2100, attraverso una completa automazione, consente la standardizzazione del metodo, fornendo un parametro di facile e rapida acquisizione e di utilità clinica nella valutazione e nel monitoraggio del paziente trombocitopenico.

## Bibliografia

- 1) Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, et al.: A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). Thrombosis Research 2006;118:463-469
- 2) Kickler T S, Oguni S, Borowitz M J : A Clinical Evaluation of High Fluorescent Platelet Fraction Percentage in Trombocytopenia. Am J Clin Pathol 2006; 125:282-287.
- 3) Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin S J :Assessment of an immature platelet fraction(IPF) in peripheral thrombocytopenia.Brit J Haematology 2004; 125: 93-99

## SCATTERGRAM CANALE OTTICO PIASTRINE



Le piastrine mature appaiono come eventi colorati in blu, mentre i punti verdi rappresentano IPF con volume aumentato (FSC) e intensità di fluorescenza (SFL) più alta rispetto alle piastrine mature.

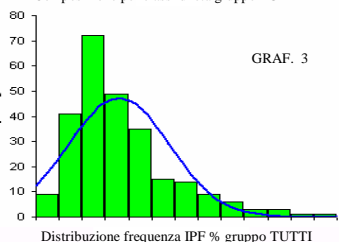
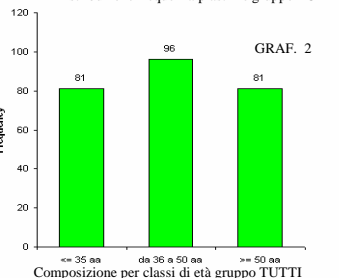
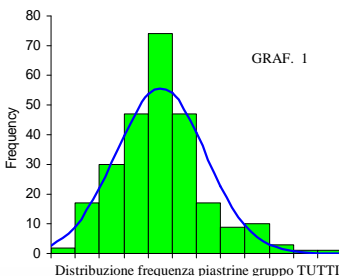


TABELLA 1 Intervalli di Riferimento per Sesso

Parametro	TUTTI (N=258)		MASCHI (N=138)		FEMMINE (N=120)		P Value
	Mediana	Range 2.5°-97.5°	Mediana	Range 2.5°-97.5°	Mediana	Range 2.5°-97.5°	
PLT x10 <sup>9</sup> /L	236	154-345	229	150-321	246	165-363	<0.0001
IPF%	2.00	0.85-5.26	2.20	1.05-5.36	1.90	0.80-5.39	0.0124
IPF x10 <sup>9</sup> /L	4.80	2.30-11.36	5.15	2.25-10.71	4.75	2.30-11.89	0.378
PDW fL	13.3	10.85-17.50	13.2	10.70-17.20	13.30	10.90-17.90	0.726
MPV fL	11.0	9.60-12.80	11.0	9.60-12.70	11.10	9.70-12.90	0.386
PLCR%	33.80	21.40-47.20	33.4	20.20-47.20	34.30	22.90-48.00	0.317

TABELLA 2 Significatività statistica delle differenze tra classi di età nei gruppi

Parametro	TUTTI	MASCHI	FEMMINE
	P value	P value	P value
PLT x10 <sup>9</sup> /L	0.4737	0.5803	0.8311
IPF %	0.375	0.258	0.525
IPF x10 <sup>9</sup> /L	0.610	0.438	0.382
PDW fL	0.3073	0.159	0.649
MPV fL	0.2134	0.180	0.497
P-LCR %	0.285	0.212	0.606

Confronto con i dati in letteratura	Nr soggetti	IPF %			
		MEDIA	SD	VALORE MINIMO	VALORE MASSIMO
1 Briggs C, BMJ 2004	50	3.40	N.D	1.10	6.10
2 Kickler T S, AJCP 2006	80	3.10	1.60	1.0	7.00
3 A be Y, Thromb. Research 2006	129	3.30	N.D	1.00	10.30
4 Torino, M olinette	258	2.30	1.09	0.60	7.00