

CONTRIBUTO DELL'AUTOMAZIONE ALLO STUDIO DELLA MORFOLOGIA DISPLASTICA ATTRAVERSO NUOVI PARAMETRI STRUMENTALI

Cenci A.M., Casolari B.

Laboratorio Patologia Clinica, Nuovo Ospedale S.Agostino Estense, AUSL Modena

SCOPO DEL LAVORO

Le prestazioni di XE2100 nel riconoscimento e la quantificazione dell'immatùrità mieloide sono state oggetto di valutazione in studi precedenti che ne hanno confermato accuratezza e precisione di conteggio e performance diagnostiche degli allarmi morfologici.^(1, 2, 3)

Scopo del nostro lavoro è stato di valutare la possibilità di acquisire informazioni aggiuntive utili a evidenziare alterazioni morfologiche legate a granularità, densità e segmentazione nucleare dei granulociti (Fig. 1) in situazioni di patologie displastiche, primitive e secondarie.

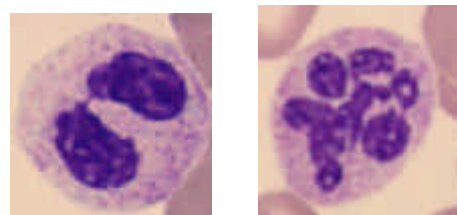


Fig.1: Anomalie Pseudo Pelger e ipersegmentazione nucleare

Allo scopo abbiamo valutato due parametri, NEUT-X e NEUT-Y, determinati dallo strumento nel citogramma di formula leucocitaria e visualizzati, per ogni campione esaminato, in apposite pagine dell'archivio storico dei risultati. Questi parametri, infatti, esprimono il posizionamento del cluster granulocitario nel citogramma DIFF (Fig. 2) e corrispondono a:

- NEUT-Y: valore modale dell'intensità di fluorescenza emessa dai Granulociti Neutrofili (proporzionale al contenuto di DNA ed RNA delle cellule)
- NEUT-X: valore modale dello scatter laterale di luce laser dei Granulociti Neutrofili (misura relativa alla complessità cellulare interna, indice di granularità, rapporto N/C, forma e densità del nucleo)

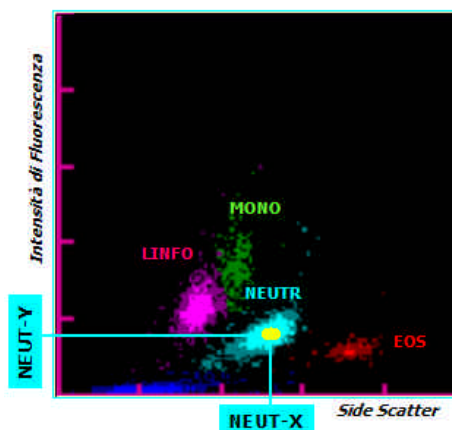


Fig.2: Schema di citogramma DIFF in campione normale

MATERIALI E METODI

Sono stati definiti innanzitutto gli intervalli di riferimento (I.R.) di NEUT-X e NEUT-Y (range 2,5° - 97,5° percentile) su un gruppo di 824 campioni normali, selezionati con i seguenti criteri: nessun allarme morfologico, quantitativo o di distribuzione, WBC da 4.00 a 10.00 x10⁹/L, RBC da 3.50 a 5.80 x10¹²/L, HGB da 12.5 a 17.5 g/dL, MCV da 82 a 98 fL, PLT da 150 a 400 x10⁹/L, Neutr.# da 2.00 a 8.00 x10⁹/L, Linfo.# da 1.00 a 3.50 x10⁹/L, Mono.# da 0.20 a 0.80 x10⁹/L, Eos.# < 0.50 x10⁹/L, Baso.# < 0.20 x10⁹/L.

Sono stati quindi valutati i valori di NEUT-X e NEUT-Y di una serie di campioni di pazienti con displasia mieloide, provenienti dalla routine di quattro stabilimenti ospedalieri della AUSL, suddivisi in 4 gruppi in base alle seguenti alterazioni morfologiche:

- 65 campioni con disgranulopoiesi di diverso grado (9 marcata, 37 discreta, 19 lieve)
- 3 campioni con anomalie nucleari pseudo-Pelger
- 4 campioni con ipersegmentazione nucleare

Per verificare se gli eventuali scostamenti dagli I.R. fossero effettivamente legati ad alterazioni qualitative della morfologia cellulare, sono stati valutati i valori di NEUT-X e NEUT-Y di 80 ulteriori campioni classificati come "gruppi di controllo":

- "Neutrofilie", costituito da 40 campioni con Neutrofilia assoluta
- "Immatùri", costituito da 40 campioni con rari Granulociti immatùri alla revisione microscopica, senza alterazioni morfologiche di granularità e nucleo

RISULTATI

Tutte le valutazioni relative al gruppo di 72 pazienti con displasia e ai due gruppi di controllo "Neutrofilie" e "Gran. Imm." sono state effettuate confrontando i valori di NEUT-X e NEUT-Y rispetto agli I.R. degli 824 campioni normali (Tabella 1). I risultati sono indicati in Tabella 2, dove sono indicati il numero e la percentuale di campioni con valori eccedenti gli I.R. (OUTLIERS) solo per NEUT-X, solo per NEUT-Y, o per entrambi i parametri (X & Y).

Tab 1 : intervalli di riferimento (I.R.) dei parametri NEUT-X, NEUT-Y		
	NEUT-X	NEUT-Y
Mediana	1346	383
2.5° percentile	1298	343
97.5° percentile	1398	446

Tabella 2: Numero e percentuale di campioni con valori di NEUT-X e/o NEUT-Y eccedenti gli I.R. (Outliers) nei gruppi valutati nello studio						
GRUPPO	NR. Campioni	OUTLIERS				TOTALE OUTLIERS
		Solo NEUT-X	Solo NEUT-Y	Entrambi (X & Y)		
Disgran Marcata	9	0 (0%)	4 (45%)	5 (55%)	9	100%
Disgran Discreta	37	11 (30%)	6 (16%)	14 (38%)	31	84%
Disgran Lieve	19	2 (11%)	3 (16%)	6 (32%)	11	58%
Pseudo Pelger	3	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	3	100%
Ipersegmentati	4	0 (0%)	1 (25%)	3 (75%)	4	100%
Neutrofilie	40	2 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	2	5%
Immatùri	40	2 (5%)	1 (2,5%)	0 (0%)	3	7.5%

In presenza di disgranulopoiesi, quindi, circa l'80% dei campioni presenta alterazioni dei parametri NEUT-X e/o NEUT-Y rispetto agli I.R. (spesso anche molto evidenti), con una prevalenza del 100% in presenza di disgranulopoiesi "marcata", dell'84% di disgranulopoiesi "discreta" e del 58% di disgranulopoiesi "lieve". Campioni con anomalie pseudo-Pelger mostrano valori di NEUT-X e NEUT-Y sempre fortemente diminuiti rispetto agli I.R. (100% dei casi), all'opposto di campioni con ipersegmentazione nucleare che mostrano valori di NEUT-Y (100% dei casi) e NEUT-X (75% dei casi) aumentati. Il grafico in Figura 3 illustra il posizionamento di NEUT-X e NEUT-Y per ognuno dei campioni dei gruppi sopra elencati rispetto agli I.R. (corrispondenti al riquadro all'interno del grafico).

Tali alterazioni non si verificano nei campioni con Neutrofilia, o con modesto numero di Granulociti Immaturi senza alterazioni morfologiche di nucleo o granularità. Nei due gruppi, infatti, solo 5 campioni su 80 (6,25 %) mostravano un lievissimo aumento dei valori di NEUT-X o NEUT-Y (mai entrambi) rispetto agli I.R. Il grafico in Figura 4 illustra il posizionamento di NEUT-X e NEUT-Y per ognuno degli 80 campioni dei due gruppi rispetto agli I.R.

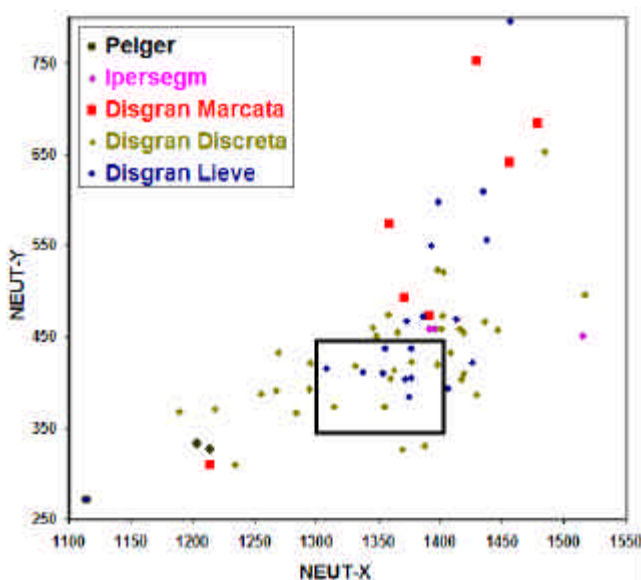


Fig. 3: Distribuzione valori NEUT-X e NEUT-Y in situazioni di displasia rispetto agli I.R. (corrispondenti al riquadro all'interno del grafico)

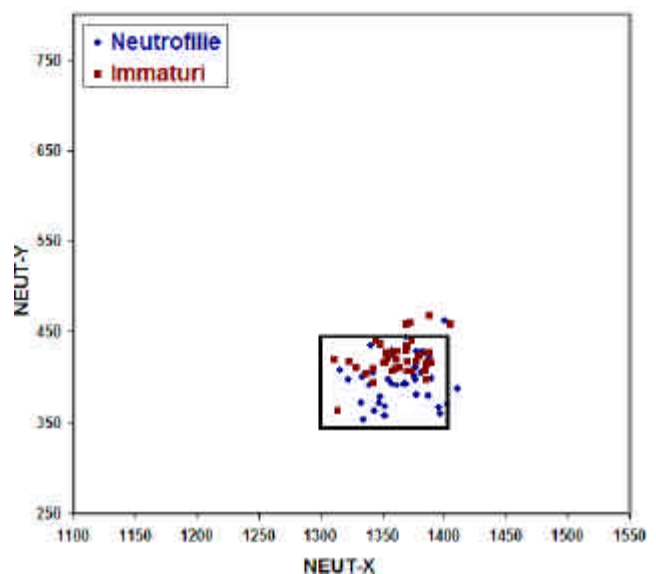


Fig. 4: Distribuzione valori NEUT-X e NEUT-Y nei gruppi "Neutrofilie" e "Immaturi" senza alterazioni displastiche rispetto agli I.R. (corrispondenti al riquadro all'interno del grafico)

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In presenza di displasia mieloide i parametri NEUT-X e NEUT-Y si alterano in modo significativo in oltre l'80% dei casi, mentre in situazioni di neutrofilia reattiva o in presenza di granulociti immaturi senza alterazioni morfologiche solo il 6,25 % dei campioni mostra un aumento (peraltro molto lieve) rispetto agli I.R.

I risultati ottenuti indicano quindi che questi parametri sono strettamente correlati alla morfologia cellulare, e le loro variazioni evidenziano con elevata sensibilità e specificità la presenza di alterazioni morfologiche dei granulociti neutrofilici in situazioni di mielodisplasie, primitive o secondarie.

In particolare il NEUT-X risulta direttamente correlato alla granularità e inversamente correlato al rapporto N/C e alla complessità della forma nucleare, e sembra pertanto diminuire al diminuire della granularità e/o con la presenza di nuclei meno convoluti o picnotici. Valori aumentati di NEUT-X sembrano invece associati a ipergranularità e ipersegmentazione nucleare, con aumento contestuale del NEUT-Y. Il NEUT-Y correla direttamente con il contenuto di DNA ed RNA delle cellule e, pur essendo il pattern dominante utilizzato da XE-2100 per il conteggio e la classificazione dei Granulociti Immaturi, le sue variazioni rispetto agli I.R. non sono legate solo alla presenza o al numero di Granulociti Immaturi. Oltre all'aumento di NEUT-Y riscontrato in tutti i casi di ipersegmentazione nucleare, infatti, esso era sempre diminuito in tutti i casi di anomalie nucleari tipo Pelger.

Nella nostra esperienza, quindi, i parametri NEUT-X e NEUT-Y consentono una valutazione più approfondita del referto strumentale, integrando al conteggio dei neutrofilici, dei granulociti immaturi e alle flag di revisione, utili informazioni correlate ad aspetti qualitativi di morfologia cellulare per un più efficace orientamento nella revisione e nell'approfondimento diagnostico.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Buttarello M., Piva E., Temporin V., D'Altoè P., Falda A., Plebani M – Il Conteggio dei Granulociti Immaturi sull'analizzatore ematologico Sysmex XE-2100; Poster Congresso Nazionale SIMeL 2004, Modena
2. Briggs C, Davis B.H., Kunka S., Machin J – Evaluation of Immature Granulocyte Count by the XE-IG Master: upgrade software for the XE-2100 Automated Hematology Analyzer. Laboratory Hematology, 9; 117-124
3. Cenci A.M., Maconi M., Casolari B. – Evaluation of the diagnostic performance of the Sysmex XT-2000i Automated Hematology Analyzer in the detection of Immature Granulocytes. Sysmex Journal International, Vol. 15 No. 1, 2005