

La differenziazione Leucocitaria con i sistemi Sysmex serie XT:

Messaggi di sospetto ed immagini al microscopio

Indipendentemente dalla tecnica utilizzata per l'analisi al microscopio di un vetrino ematologico, tre caratteristiche rimarranno sempre determinanti per differenziazione del leucocita che, nella loro interezza, sono uniche per ogni tipo delle cellule:

- ❑ dimensione delle cellule
- ❑ struttura, posizione e colorazione del nucleo
- ❑ quantità, colorazione e granulazioni del citoplasma

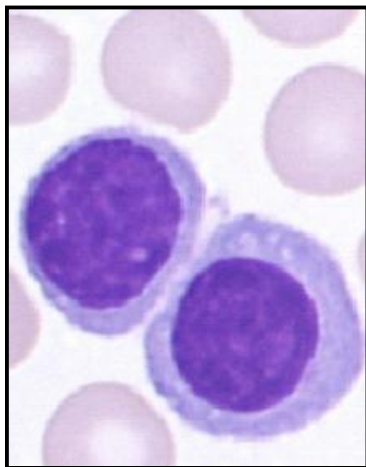


Fig. 1: Immunociti in fase di produzione di Anticorpi

Anche occhi inesperti sono in grado di differenziare velocemente i leucociti maturi, ma l'esperienza approfondita è necessaria per classificare chiaramente le forme cellulari immature o reattive. Determinate forme immature delle cellule sono relativamente facili da riconoscere: i Promielociti, per esempio, sono riconoscibili dal caratteristico citoplasma blu scuro con granuli rossastri e dalle loro dimensioni; le plasmacellule possono essere riconosciute a causa dei loro nuclei periferici. Tuttavia, anche dopo che molti anni di pratica, certe cellule possono essere classificate correttamente soltanto dal confronto diretto con altre cellule, per esempio i linfociti reattivi in una risposta immunitaria specifica. Questi immunociti sono chiaramente rilevabili soltanto se lo striscio periferico nel suo assieme suggerisce una risposta immunitaria reattiva.

Esistono evidenti paralleli tra queste osservazioni morfologiche al microscopio ed i risultati prodotti dai sistemi ematologici SYSMEX XT- XE. Grazie all'utilizzo della Citometria a Flusso in fluorescenza, questi analizzatori infatti effettuano, come nell'indagine microscopica, un'analisi dettagliata delle strutture cellulari e delle loro fasi di sviluppo, espressione diretta dell'attività metabolica delle cellule.

'Solo osservando l'interno delle cellule sarà possibile differenziarle esattamente.'

Questa affermazione è applicabile sia ai metodi manuali sia ai metodi automatici e rappresenta l'aspetto decisivo comune ai due metodi. Prerequisito fondamentale è di mantenere le cellule in uno stato prossimo a quello nativo, colorarle e differenziarle, ad esempio con un colorante sopravvitalente.

Questo metodo è il solo che permette di mantenere le peculiari e specifiche caratteristiche cellulari, consentendone una chiara identificazione tramite la valutazione contemporanea dei nuclei e del citoplasma. E' infatti pressoché impossibile associare nuclei isolati a specifiche cellule, sia nella differenziazione manuale che in quella automatizzata.

Un altro parallelo da enfatizzare tra i diversi metodi riguarda la differenziazione tra cellule mature ed immature o reattive, sulla base dell'RNA citoplasmatico e della struttura del DNA. Nel vetrino le cellule immature e reattive possono essere riconosciute dal loro citoplasma blu scuro, dalla struttura nucleare lassa o dalla presenza di nucleoli. La presenza di queste strutture, costituite da rRNA, tRNA, mRNA e proteine basiche, suggerisce la presenza di un'elevata attività metabolica cellulare. I sistemi serie XE ed XT utilizzano speciali coloranti fluorescenti in grado di colorare in modo specifico gli acidi nucleici presenti nel nucleo o nel citoplasma. A seguito dell'eccitazione con luce laser, come in citometria a flusso, queste cellule, con il loro citoplasma blu scuro e la loro struttura nucleare lassa, emetteranno un segnale di fluorescenza significativamente elevato. Maggiore sarà il segnale, maggiori saranno le dimensioni del nucleo e più scura apparirà la colorazione blu del citoplasma nel vetrino. Questo significa che cellule metabolicamente attive quali blasti (proliferazione) o plasmacellule (produzione di anticorpi), a causa della loro attività, mostreranno sempre una struttura nucleare lassa, con presenza di nucleoli ed incremento di RNA, unita ad un aumento di RNA citoplasmatico. Questo è chiaramente visibile nel vetrino e misurabile nel canale DIFF degli analizzatori Sysmex.

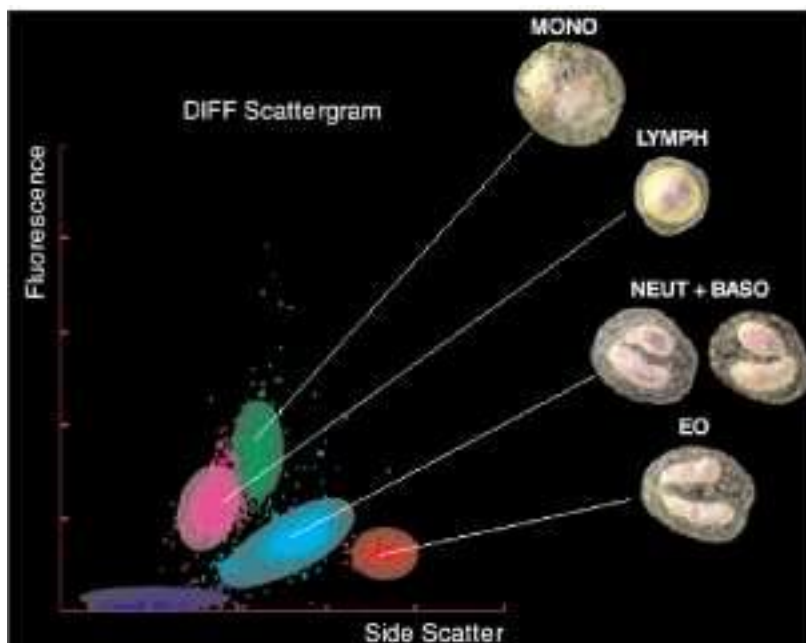


Fig. 2: Differenziazione nel canale DIFF

I sistemi XE ed XT utilizzano, per la differenziazione leucocitaria, il canale DIFF (Fig. 2). In questo canale le singole popolazioni sono separate sulla base del loro contenuto in acidi nucleici (corrispondente al segnale in fluorescenza) e delle caratteristiche della struttura interna (complessità delle granulazioni, corrispondente al side scatter laterale). In questo canale le dimensioni cellulari non influenzano la differenziazione, poiché non viene rilevato alcun tipo di segnale relativo alle dimensioni cellulari.

Specifica posizione delle cellule nello scattergram

Le cellule metabolicamente attive, con intensa colorazione blu del citoplasma ed elevato segnale di fluorescenza, si collocano, lungo l'asse Y dello scattergram DIFF, in una zona nettamente più alta rispetto alle popolazioni delle cellule mature (Fig. 3).

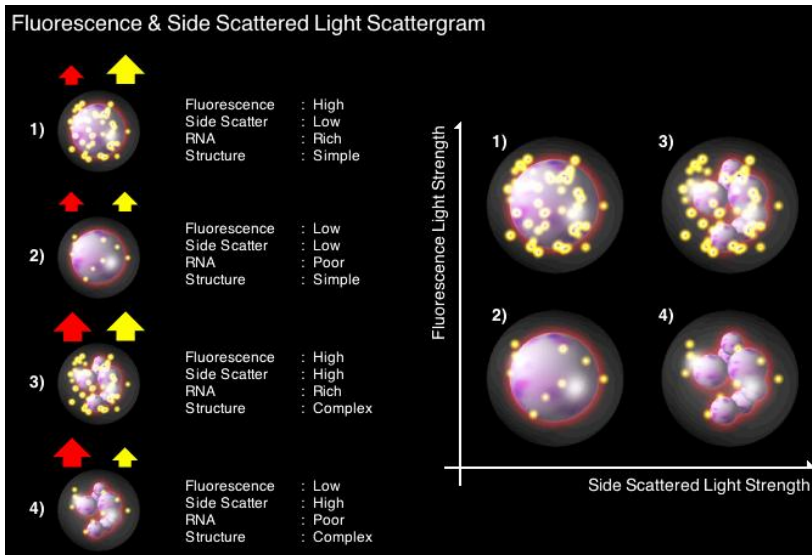


Fig. 3: Diagramma della differenziazione nel canale DIFF serie XT

Il secondo criterio per la differenziazione è la complessità cellulare interna, rappresentata dal side scatter laterale (asse X dello scattergram DIFF). Questo è strettamente correlato con l'intensità delle granulazioni e la densità dei granulociti. Diversamente dai mieloblasti, i promielociti contengono alcuni granuli, visibili come granulazioni rossastre in uno striscio colorato. Queste granulazioni comportano una maggiore densità ottica rispetto ai mieloblasti. Tanto maggiore è la densità, tanto maggiore sarà il segnale di side scatter laterale (vedere Fig. 3). Di conseguenza, in presenza di granulazioni, i granulociti, maturi od immaturi, avranno una maggiore intensità di side scatter laterale rispetto alle cellule mononucleate, per esempio i Linfociti.

Messaggi di sospetto per i Leucociti

Ad ogni tipologia cellulare può essere abbinato un corrispondente messaggio di sospetto (Fig. 3). La comparazione tra i messaggi e le corrispondenti caratteristiche morfologiche cellulari permette di comprendere la collocazione delle diverse cellule nello scattergram.

I seguenti 6 messaggi di sospetto leucocitari saranno di seguito illustrate nel dettaglio:

- 'Imm. Gran?' = Granulociti immaturi
- 'Left Shift?' = Presenza di band cells
- 'Blasts?' = Linfoblasti o Mieloblasti
- 'Abn lymph/blasts?' = Linfociti anormali, in particolare cellule maligne
- 'Atyp. lymph?' = Linfociti attivati
- 'NRBC?' = Eritroblasti

'Imm. Gran?'

Questo messaggio è fornito qualora nel sangue periferico siano presenti cellule patologiche quali Promielociti, Mielociti o Metamielociti[1,2,3].. Eventuali band cells saranno evidenziate in una specifica area di segnalazione.

La posizione delle tre tipologie cellulari evidenziabili dalla flag "IG" è illustrata nello schema in Fig. 4 a pag. 6. Le cellule più immature, con nucleo grande ed elevato contenuto di RNA, mostrano il segnale di fluorescenza più elevato (promielociti). Nel corso del processo di maturazione la percentuale di RNA diminuisce, la colorazione del citoplasma perde di intensità ed il segnale in fluorescenza diminuisce (mielociti). Le cellule più mature di questo gruppo si collocano in un'area di transizione con le band cells e sono evidenziate nella zona inferiore dell'area "IG" (metamielociti).

I Promielociti sono rilevati in quest'area solo se hanno già sviluppato delle granulazioni. Di norma, la percentuale di mielociti e metamielociti è sempre molto elevata e di conseguenza la presenza del messaggio "IG" sarà dovuta principalmente a queste cellule.

In aggiunta all'eventuale flag, il numero dei granulociti immaturi sarà riportato come "parametro di ricerca" (IG# and IG%).

'Left Shift?'

Questo messaggio si riferisce alla presenza di band cells nel sangue periferico. Nella serie XT la presenza di residui di RNA cellulare gioca un ruolo decisivo nella separazione di queste cellule dai granulociti segmentati. Il sistema non è comunque in grado di fornire un risultato numerico comparabile con l'osservazione al microscopio, in quanto vengono classificate come "Left Shift" esclusivamente quelle cellule che mostrano chiari segnali di immaturità.

Esiste una grande diversità di opinioni riguardo al significato clinico delle band cells e, data l'assenza di una standardizzazione in merito, non esiste un altro messaggio gestito in modi così diversi dai vari laboratori. E' pertanto possibile che si possano riscontrare risultati diversi tra la differenziazione manuale, primariamente orientata sulla morfologia nucleare, e l'analisi automatizzata, in grado di rilevare il grado di immaturità complessiva delle cellule. E' possibile ottimizzare la sensibilità della flag in relazione ai diversi criteri di valutazione agendo sulla corrispondente Q-FLAG.

'Blasts?'

Questa segnalazione di sospetto è generata dalla presenza di blasti nella corrispondente area di rilevazione (linfoblasti o mieloblasti) e richiede la valutazione morfologica. I blasti sono caratterizzati primariamente da un significativo aumento della percentuale di RNA citoplasmatico – se confrontati con i linfociti – o da perdita di granulazioni.

L'aspetto dei blasti può essere altamente variabile, dipendendo dalla tipologia cellulare e dal grado di maturazione. Normalmente i blasti sono significativamente più piccoli rispetto alle corrispondenti cellule più mature, ed una cellula staminale a vetrino somiglia molto ad un linfocita, eccezion fatta per la colorazione più scura. Di conseguenza, il segnale in fluorescenza dei blasti sarà inferiore a quello delle plasmacellule, mentre il segnale di side scatter laterale sarà inferiore a quello delle cellule granulate; questo permette una chiara identificazione di tutti i tipi di granulociti, a cominciare dai promielociti.

'Abn Lymph/Blasts?'

Questo messaggio evidenzia la presenza di linfociti alterati, che si differenziano dalle cellule normali grazie alla maggiore complessità della struttura cellulare interna (aumento del segnale di side scatter laterale).

Ad esempio le cellule 'natural killer' (NK) si posizionano in quest'area, in caso di sensibile incremento. Lo stesso avviene per le cellule di linfomi, poiché non mostrano incremento della percentuale di RNA citoplasmatico. Anche la Mononucleosi può provocare un incremento di cellule in quest'area. In questi casi normalmente la flag 'Abn Lymph/Blasts?' non è la sola presente a causa del quadro morfologico complessivo molto eterogeneo.

Cellule molto simili ai blasti, quali centroblasti o immunoblasti, possono essere rilevate in quest'area. D'altro canto, dal momento in cui queste cellule inizieranno a mostrare a vetrino un citoplasma blu scuro ed un nucleo di maggiori dimensioni, saranno invece rilevate nell'area blasti, a causa del significativo aumento del segnale in fluorescenza.

'Atyp. Lymph?'

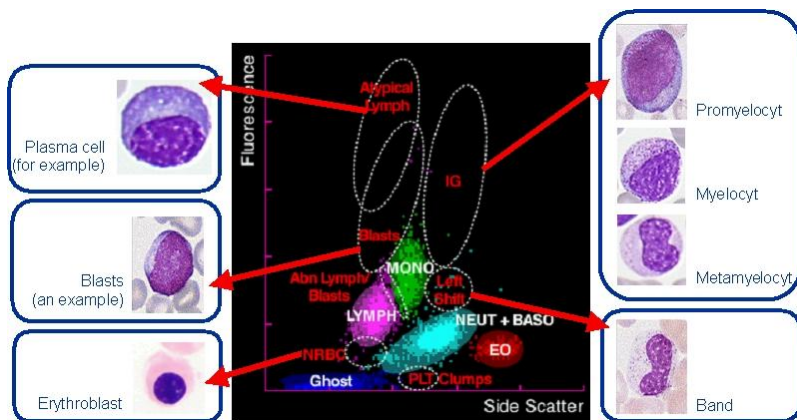
In quest'area vengono evidenziati i linfociti B reattivi in fase di massiva sintesi di immuno-globuline, caratterizzati a vetrino da grande citoplasma blu scuro, spesso vacuolato. Tutte le fasi di sviluppo delle cellule B verso forme reattive sono rappresentate, comprese le plasmacellule, che rappresentano lo stadio finale di sviluppo dei linfociti B. Al momento non è ancora appurato se questo concetto possa essere esteso a tutte le cellule linfoplasmocitoidi (immuniciti). La loro percentuale di RNA citoplasmatico è infatti inferiore a quelle delle plasmacellule e può essere molto variabile, sebbene partecipino attivamente alla risposta immunitaria. La diversa intensità della colorazione al microscopio dovuta alle forme linfocitarie presenti nelle differenti fasi della risposta immunitaria si ripercuoterà in una corrispondente collocazione sullo scattergram.

Il numero di linfociti reattivi presenti può essere visualizzato nella pagina di ricerca WBC ('OTHER#' e 'OTHER%').

'NRBC?'

Ogni conteggio automatico leucocitario o differenziale richiede sempre, come condizione preliminare, l'emolisi degli eritrociti. I frammenti risultanti dalla lisi non conterranno ne frammenti nucleari ne alter strutture rilevabili. In contrapposizione gli eritroblasti mostreranno un segnale in fluorescenza chiaramente rilevabile, a causa della colorazione del DNA nucleare, come per i leucociti. D'altro canto un eritroblasto ortocromatico non presenta apprezzabili quantitative di RNA citoplasmatico ne nucleoli, generando pertanto un segnale di fluorescenza inferiore a quello di un linfocita.

Normalmente la flag NRBC evidenzia tutti gli stadi maturativi, dall'eritroblasto ortocromatico al basofilo



passando per il policromatofilo.

Queste cellule non sono più in grado di dividersi ed il loro contenuto in acidi nucleici è inferiore a quello dei linfociti e si collocheranno pertanto in un'area inferiore rispetto a questi ultimi (Fig.

4). In presenza della flag, sulla serie XT, -è opportuno effettuare una verifica al microscopio ed

eventualmente correggere il

conteggio WBC. Con XE-2100 gli NRBC sono rilevati e contati in uno

Fig. 4: Aree di rilevazione flag nello scattergram DIFF e corrispondenti cellule rilevabili

specifico canale analitico con reagenti specifici. Questo permette la correzione automatica dei risultati dei leucociti e dei linfociti.

References:

- 1) Fujimoto et al.: Flow Cytometric Method for Enumeration and Classification of Reactive Immature Granulocyte Populations, *Cytometry* 42:371-378 (2000)
- 2) Weiland et al. : Evaluation of the Automated Immature Granulocyte Count (IG) on SYSMEX xe-2100 Automated Haematology Analyser vs. Visual Microscopy (NCCLS H20-A), *SYSMEX Journal International*, Vol.12 No.2 (2002)
- 3) Briggs et al.: Evaluation of Immature Granulocyte Counts by the XE-IG MASTER: Upgraded Software for the xe-2100 Automated Haematology Analyzer, *Laboratory Hematology* 9:117-124 (2003)