Aggiornamento ematologico

L'identificazione di eritroblasti con gli analizzatori automatici

MQZH 2020-01

Introduzione

Gli analizzatori ematologici automatici, nelle loro varie dimensioni, appartengono da anni all'attrezzatura di base di ambulatori e laboratori ospedalieri e di servizio. I vantaggi di questi strumenti sono talmente svariati che i metodi tradizionali hanno perduto quasi completamente il loro valore. Una grossa sfida dell'analisi automatica in ematologia rimane il riconoscimento di interferenze e fattori di disturbo. In questo aggiornamento utilizzeremo il campione 2020-1 H3b per confrontare le possibilità di diversi analizzatori nel riconoscimento di precursori eritrocitari nucleati, gli eritroblasti (NRBC=nucleated red blood cells).

Metodo di misura degli analizzatori a tre popolazioni

Gli analizzatori a tre popolazioni utilizzano un sistema a due camere e diversi reagenti per contare e classificare le cellule con il metodo dell'impedenza. In questo metodo, le cellule vengono condotte singolarmente attraverso un'apertura alla quale è applicata una corrente continua.

Il passaggio di ogni cellula causa un impulso elettrico, quindi ogni impulso corrisponde ad un "evento" che viene contato e le intensità degli impulsi sono proporzionali ai volumi cellulari. La distinzione delle singole popolazioni avviene per mezzo di discriminatori che possono essere predeterminati nello strumento o, come nei Sysmex, parzialmente regolabili.

Gli strumenti generano flags, allarmi e messaggi di errore usando algoritmi, a loro volta calcolati sulla base delle deviazioni nella posizione dei discriminatori e dell'assenza o presenza di eventi in certi settori dell'istogramma. Gli eritroblasti interferiscono, a causa del loro nucleo, nel canale dei leucociti e in particolare nel settore inferiore dei linfociti, producendo un valore falsamente alto di linfociti e leucociti. In questi casi l'unica possibilità è il conteggio manuale per la determinazione della percentuale di eritroblasti, con cui correggere il valore dei leucociti dello strumento.

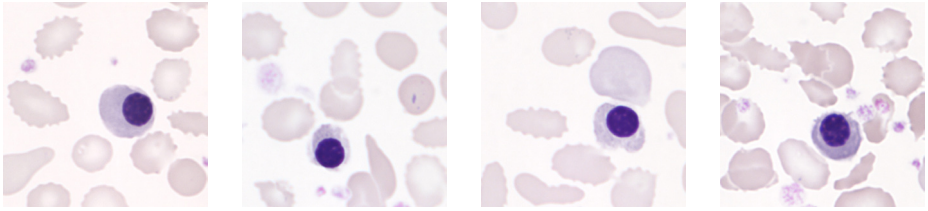
Metodo di misura degli analizzatori a cinque popolazioni

Questa classe più complessa di strumenti di ematologia fa uso di ulteriori sistemi di misura e di valutazione che permette di riconoscere meglio le interferenze. I campioni del controllo circolare vengono analizzati con un Sysmex XN-20 e con un ADVIA 2120. Di seguito approfondiremo i metodi di misura di questi due strumenti.

Serie Sysmex XN

Questi strumenti utilizzano il metodo dell'impedenza per la conta di eritrociti e trombociti. I linfociti vengono analizzati per citometria di flusso dopo l'aggiunta di una soluzione litica e la colorazione con un agente fluorescente. Le cellule passano in un canale in cui vengono colpite dal laser di un semiconduttore (lunghezza d'onda: 633 nm). Il laser viene disperso con angoli diversi secondo la dimensione della cellula e l'intensità della fluorescenza. La luce dispersa in avanti (forward scatter) è legata alle dimensioni delle cellule, la luce dispersa lateralmente (side scatter) è legata alla morfologia cellulare (per es. dimensioni del nucleo). Per la differenziazione dei leucociti, la citometria di flusso viene condotta in tre canali, i cui diagrammi della luce dispersa vengono rappresentati insieme sulle assi x e y del cosiddetto scattergram. Nel canale WNR (white cell nucleated channel) viene determinato il numero degli eritroblasti (NRBC%, NRBC#), con cui viene automaticamente corretto il numero dei leucociti e dei linfociti prima dell'emissione dei risultati.

Quando in un paziente vengono rilevati per la prima volta più di 5 eritroblasti/100 leucociti, è consigliabile ugualmente verificare il referto al microscopio.



Immagini al microscopio di eritroblasti del campione MQ 2020-1 H3b

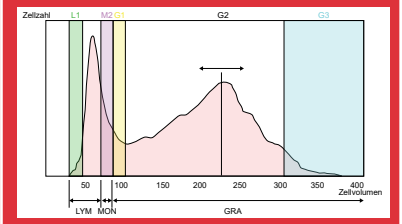
Formula per la correzione del numero totale di leucociti dopo l'identificazione microscopica di eritroblasti

Negli strumenti POCT, il numero di leucociti va corretto manualmente se il numero di eritroblasti è >5/100 Lc:

100 x misura strumentale leucociti
100 +blasti/100 Lc (conta microsc.)

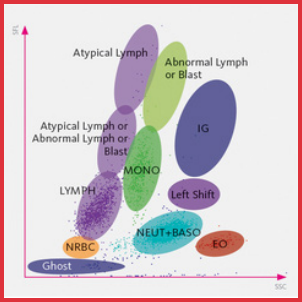
Esempio:
Numero di leucociti dello strumento: 5.60 G/l - Conta microscopica eritroblasti: 15/100 leucociti - Numero corretto di leucociti: 4.87 G/l

Curva di distribuzione WBC: Microsemi®

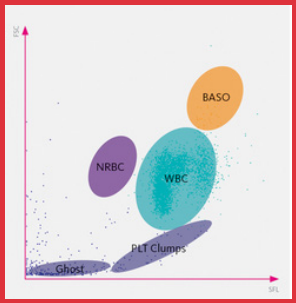


Microsemi®:
Il flag «L1» indica una presenza anomala di cellule piccole in rapporto ai linfociti nella zona fra 30 e 70 fl. Può trattarsi di aggregati trombocitici, eritroblasti o linfociti anomali. (da: Manuale Microsemi)

Serie Sysmex XN®



Posizione delle NRBC nello scattergram del canale WDF



Posizione delle NRBC nello scattergram del canale WNR
(Da: Sysmex, Measurement technology and scattergram)

Significato clinico dell'identificazione di eritroblasti (NRBC)

Nei neonati nelle prime settimane di vita l'eventuale presenza di eritroblasti nel sangue periferico è fisiologica. Se il loro numero supera i livelli di riferimento per neonati, la causa può essere una carenza di ossigeno cronica o postnatale, un'anemia, un diabete della madre, stress o malattie infettive.

Negli adulti in genere non ci sono eritroblasti nel sangue periferico. La loro presenza può indicare per esempio anemie gravi (in particolare anemie con un'eritropoiesi inefficace come per esempio la talassemia maggiore), leucemie e altre patologie ematologiche sistemiche, come le sindromi mielodisplastiche.

Inoltre, diversi studi descrivono l'analisi del contenuto di NRBC come fattore prognostico nei trapianti di cellule staminali o in pazienti in terapia intensiva. Pazienti con un numero elevato di NRBC sembrano avere un tasso più elevato di rigetto del trapianto e un tasso più elevato di mortalità.

Letteratura

1. Da Rin, G. Performance evaluation of the automated nucleated red blood cell count of five commercial hematological analyzers. International Journal of Laboratory Hematology, 39(6), 663-670.

Colophon
Autrice *Annette Steiger*
Fotografie *Dr. Roman Fried*

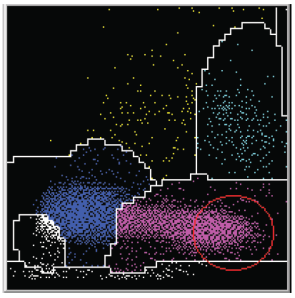
Consulenza scientifica C. Hviid, Dr. C. Widmer, Klinik für Medizinische Onkologie und Hämatologie, Universitätsspital Zürich, Dr. J. Goede, Kantonsspital Winterthur

© 2019 Verein für medizinische Qualitätskontrolle www.mqzh.ch

ADVIA 2120

Anche questo strumento utilizza due tecniche differenti. Nel canale Baso viene eliminato il citoplasma di tutte le cellule ad eccezione dei basofili. I leucociti vengono poi suddivisi in cellule mono- e plurinucleate a seconda della loro forma. Inoltre, i leucociti vengono fissati e colorati con perossidasi. I neutrofili, gli eosinofili e i monociti assumono la colorazione; i linfociti, i basofili e altre cellule grandi non colorate (LUC= large unstained cells) si separano in diversi settori. L'asse y del diagramma riporta l'assorbimento della luce, che è proporzionale alla quantità di perossidasi. L'asse x riporta la luce diffusa, proporzionale alle dimensioni cellulari. Gli eritroblasti compaiono nel canale Baso nella zona delle cellule polimorfonucleate (PMN), il loro numero viene però calcolato dai dati del citogramma Perox, in cui gli eritroblasti, negativi alla perossidasi e di piccole dimensioni, sono rappresentati in basso a sinistra. I valori calcolati di NRBC (% e #NORMO) correggono poi automaticamente il risultato del numero di leucociti.

È tuttavia consigliabile verificare il risultato al microscopio se il referto di eritroblasti appare per la prima volta.



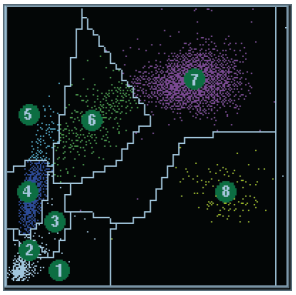
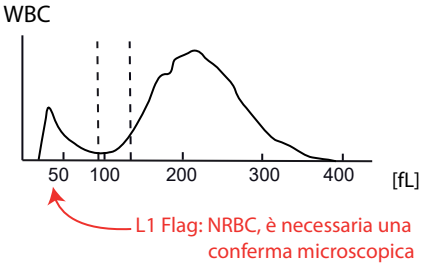


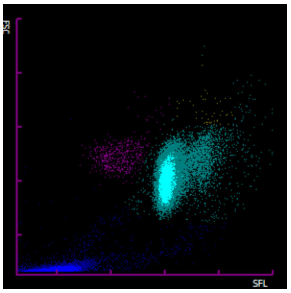
Fig. a sinistra: posizione delle NRBC in testa alla popolazione PMN nel canale Baso.

Fig. a destra: posizione delle NRBC nella zona nr. 2 del citogramma Perox.
1 = rumore di fondo
2 = eritroblasti
3 = aggregati piastrinici
4 = linfociti/basofili
5 = LUC- grosse cellule non colorate
6 = monociti
7 = neutrofili
8 = eosinofili

Risultati del campione MQ 2020-1 H3B



Microsemi®: Flagging nel canale WBC



Sysmex XN-20: eritroblasti nel canale WNR

L'analisi microscopica del campione ha rilevato tre eritroblasti su 100 leucociti, corrispondenti a un valore assoluto di 0.57 G/l. Inoltre, era evidente una notevole aniso-poichilocitosi con molti ovalociti, pochi acantociti e forme a goccia. I sistemi a tre popolazioni presentano un istogramma RBC con una curva allargata a causa dell'anisocitosi. Gli strumenti Mythic e Sysmex XP300 presentano una vistosa spalla nella parte inferiore della curva, causata probabilmente da ovalociti e piccoli eritrociti. Mythic produce un allarme FR1 "Microciti" e Sysmex una Flag RL, che indica una frequenza anomala di eventi nelle vicinanze del discriminatore RBC inferiore. Solo Microsemi CRP segnala una possibile presenza di NRBC a causa dell'anomalia nel settore inferiore della curva leucocitaria. Con tali risultati si rendono necessarie l'analisi e determinazione manuali del numero di NRBC e la correzione dei risultati strumentali.

Fra gli strumenti a cinque popolazioni, Sysmex XN20 rileva NRBC in una quantità pari a 2,9% (0,56 G/l), ADVIA 2120 non riporta NRBC. Sysmex corregge poi automaticamente il risultato dei leucociti. In questo esempio, la quantità ridotta di eritroblasti influenza solo minimamente il numero totale dei leucociti. In campioni leucopenici con quantità più elevate di NRBC invece, la differenza tra il numero di leucociti non corretto e quello corretto può diventare importante e portare anche ad un'interpretazione falsamente favorevole del numero assoluto di neutrofili (diagnosi di un'agranulocitosi). Le differenze fra le sensibilità degli strumenti Sysmex XN e ADVIA nel riconoscimento di eritroblasti è stata descritta per esempio in Da Rin et al 2017, International Journal of Laboratory Hematology, in cui viene determinato un limite di rilevabilità di >0.019 G/l per Sysmex XN e >0.167 G/l per ADVIA.