

Neutropenie: il punto di vista del Laboratorio

A.M. Cenci^a, B. Biasioli^b, M. Golato^c

^aDipartimento di Patologia Clinica, Nuovo Ospedale "S. Agostino-Estense", AUSL Modena, Baggiovara (MO)

^bDipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Ospedali Riuniti", Trieste

^cStruttura Complessa di Patologia Clinica, Ospedale Civico "Renzetti", ASL Lanciano-Vasto, Lanciano (CH)

Riassunto

Lo studio delle neutropenie utilizza e trae beneficio in modo evidente dai risultati della diagnostica di laboratorio. Da sempre, infatti, il contributo dei test è risultato importante nell'inquadramento, nella diagnosi di stato, nel grading e nel follow up della patologia, primitiva o secondaria, acquisita o congenita che causa o accompagna questa entità clinica. Partendo dal semplice emocromo, oggi realizzato con l'utilizzo dei contaglobuli di ultima generazione, si attivano, in sequenza, vie analitiche che possono coinvolgere, di volta in volta, diversi settori della Patologia Clinica, quali la citofluorimetria, l'autoimmunità, la genetica medica, la biologia molecolare, la microbiologia.

In questo modo, i risultati ottenuti in tutto il campo che attiene modernamente alla Medicina di Laboratorio, possono inserirsi con notevole utilità all'interno della rete di dati provenienti da tutte le discipline diagnostiche implicate nel complesso studio dei pazienti neutropenici, con l'applicazione alla routine delle sofisticate filosofie analitiche oggi a disposizione e provenienti dalla ricerca scientifica avanzata.

Summary

Neutropenia: Clinical Pathologist's point of view

The study of the neutropenias draws consistent benefits from laboratory diagnostic activity. This contribution has continuous evidence and becomes more and more important and appreciated in patient management during staging and grading pathologies, in disease diagnosis and follow up. The several different clinical situations neutropenia related, both acquired and congenital, that cause or come out together with this clinical entity, can be found and demonstrated performing a simple test as the hemocytometric one, with a last generation haematological system. From here on, new and sophisticated laboratory investigations can be performed using many sequential flow charts and, time by time, different fields of Clinical Pathology can be involved, so as flow cytometry, autoimmunity, medical genetics, molecular biology and microbiology. In this way, Laboratory Medicine, applying to the routine activity the sophisticated analytic philosophies coming from the today advanced scientific research, with remarkable usefulness becomes a part of the data network built with all the diagnostic disciplines implied on the whole study of the neutropenic patients.

I granulociti neutrofilici sono le principali cellule fagocitiche responsabili, nell'organismo, della difesa da batteri e miceti. La loro funzione, a differenza di quella delle piastrine e dei globuli rossi, si svolge nei tessuti periferici ed è decisivo per il controllo delle infezioni. Prodotti nel midollo osseo, hanno un'emivita di circa 7 ore nel circolo sanguigno.

Solo il 50 % dei neutrofilici circolanti, tuttavia, è rilevabile nel sangue periferico, perché una sostanziale porzione, definita marginata, rimane reversibilmente adesa all'endotelio. La marginazione spiega, in parte, la mancanza di infezione in soggetti con grave diminuzione dei neutrofilici circolanti.

La neutropenia è definita da una conta assoluta di neutrofilici <1.500 / μ l.

La sigla comunemente usata ANC (absolute neutrophil

count) è equivalente alla conta totale dei leucociti per microlitro (μ l) moltiplicata per la percentuale di neutrofilici, incluse le forme segmentate e a bastoncino (band cells) riportata comunemente nella conta automatizzata. Per individui di origine europea, il limite al di sotto del quale si parla di neutropenia è circa 3.500/ μ l alla nascita, ma diminuisce a 1.000/ μ l nei primi 6 mesi; aumenta a 1.500/ μ l nel primo anno e arriva a superare 1.800/ μ l dopo i 10 anni. In certe popolazioni, quali quella Afro-Americana, Africana e Nera Beduina, il limite è più basso (<1.200/ μ l); tale situazione è definita neutropenia etnica¹.

Oggi, grazie all'utilizzo dei moderni contaglobuli che eseguono di routine la conta differenziale dei globuli bianchi è possibile una stima corretta dell'incidenza della neutropenia: essa è stata rilevata nel 2,5% di individui apparentemente sani; è di comune riscontro in molte malattie,

più rara è invece una forma isolata, la cui incidenza è pari a circa 5-10 su 1 milione di esami per anno.

La neutropenia, sinonimo di granulocitopenia, differisce dal concetto di agranulocitosi che implica una neutropenia severa in cui la conta dei neutrofili è $<500/\mu\text{l}$. In accordo con la WHO si possono definire quattro gradi di neutropenia:

- *lieve*: grado 1 con PMN >1000 ed $<2000/\mu\text{l}$,
- *moderata*: grado 2 con PMN >500 ed $<1000/\mu\text{l}$,
- *severa*: grado 3 con PMN >100 e $<500/\mu\text{l}$,
- *a rischio di vita*: grado 4 con PMN $<100/\mu\text{l}$.

Il significato è tuttavia influenzato dal contesto clinico: una forma lieve o moderata è normalmente reperibile in corso di infezioni virali (es. mononucleosi, immunodeficienza acquisita) e nelle malattie autoimmuni (es. Lupus Eritematoso Sistemico); frequente è il riscontro in corso di malattie ematologiche e neoplastiche, in questo caso il grado è in stretto rapporto con la fase clinica della malattia e ne può influenzare il decorso.

Con neutropenia moderata o severa, segni e sintomi come febbre, malessere, faringite o artralgie possono essere manifestazioni di infezioni virali e/o piuttosto di malattie immunologiche/infiammatorie che sottendono alla neutropenia, ma la possibilità di una grave o fatale sovrainfezione batterica da agenti opportunisti deve essere assolutamente presa in considerazione. Sintomi meno specifici che si accompagnano a neutropenia possono essere costituiti da tosse, dispnea, diarrea, congestione nasale, prurito vaginale, disuria²⁻⁴.

Inquadramento

Una distinzione delle neutropenie prevede *forme congenite e forme acquisite*².

Le neutropenie congenite sono condizioni ematologiche ereditarie normalmente diagnosticate in età neonatale o infantile, spesso in occasione di seri eventi infettivi oppure inquadrate in sindromi più complesse. Le acquisite includono eziopatogenesi molteplici e possono presentarsi in ogni età. In questo gruppo sono comprese anche le forme immuni primarie (allo-immuni ed auto-immuni) e secondarie, quelle indotte da farmaci e la forma non immune idiopatica cronica dell'adulto, la post-infettiva e quella da deficit nutrizionali

I *meccanismi patogenetici*⁵ riconoscono diverse origini:

- *Inadeguata produzione da parte del midollo* osseo dovuta a riduzione del numero di cellule staminali, sostituzione del midollo osseo ed a granulocitopoiesi inefficace.
- *Distruzione dovuta ai macrofagi midollari ed ad altre cellule del sistema reticolo endoteliale.*
- *Sequestro splenico.*
- *Riduzione della durata di vita del pool circolante* (ad es.: nelle neutropenie autoimmuni).
- *Alterata dismissione da parte del midollo osseo* (ad es.: nella mielocatessi, mielodisplasia).
- *Ridistribuzione nel sistema vascolare* (ad es.: nelle prime fasi dell'emodialisi).
- *Rapida redistribuzione ai tessuti quando la dismissione midollare non compensa adeguatamente le richieste* (ad es.: nelle sepsi neonatali).

Su queste basi funzionali è stato possibile costruire una classificazione cinetica utile nell'inquadramento sia diag-

stico che clinico delle varie forme di neutropenia (vedi Tab. I)⁶.

Approccio diagnostico

In questo campo di applicazione il ruolo della Medicina di Laboratorio è cruciale; in particolare, attraverso le più recenti scoperte tecnologiche passate dal mondo della ricerca all'applicazione routinaria, essa è in grado di fornire contributi scientifici importanti anche alle altre discipline medico- diagnostiche nel percorso clinico dedicato al paziente, con risoluzione di problematiche e quesiti differenziali spesso complicati.

La metodologia di approccio diagnostico nella neutropenia varia in relazione ai livelli di gravità, alle modalità e tempi di insorgenza, acuta o cronica, ed all'eziopatogenesi.

Il primo esame di laboratorio utilizzato è l'emocromo e, su questa base, si innestano in sequenza test più complessi, risolutivi per la comprensione della patologia in atto.

L'emocromo è imprescindibile nella definizione di neutropenia, concorre all'inquadramento eziopatogenetico ed alla classificazione, diventa necessario nel follow-up terapeutico e per la valutazione delle complicanze e del rischio clinico.

Il percorso inizia con la conferma del dato strumentale e prosegue considerando, in ogni singolo caso, il contesto clinico in cui la neutropenia si presenta accertando fin dall'inizio se trattasi di:

- *Neutropenia isolata*, costante o intermittente. oppure
 - *Neutropenia associata ad altre condizioni* (es. secondarie ad infezioni, somministrazioni di farmaci, epatopatie croniche, deficit di B12 e Folati, malattie con ipersplenismo, chemio/radioterapia, malattie ematologiche, patologie su base immunologica, malattie oncologiche).
- Questa distinzione è molto importante perché dà l'avvio a scenari diagnostici⁷⁻¹¹ diversificati.
- Considerando che molto spesso la diagnosi eziologica è di presunzione, un quadro di orientamento più chiaro si ha integrando clinica e laboratorio¹² attraverso il confronto del dato analitico con l'anamnesi e l'esame obiettivo del paziente al fine di capirne la patogenesi ed individuarne la causa.
- *La storia clinica*, deve tener conto, innanzitutto dell'età ed evidenziare l'etnia e la familiarità; deve essere definita l'insorgenza come acuta o cronica (se superiore a 6 mesi). Tra i dati anamnestici sono fondamentali le patologie associate (neoplasie, collagenopatie, ipertiroidismi, presenza di disturbi metabolici ecc.) come anche le infezioni recidivanti, le abitudini di vita (assunzione cronica d'alcool), l'uso di farmaci ed esposizioni a sostanze tossiche (es. antitumorali).

In questi ultimi casi la minuziosa raccolta dei dati con attenzione alla tipologia, modalità e durata di somministrazione diventa di vitale importanza al fine di identificare la causa iatrogena e di evitare così l'eventuale insorgenza di una grave agranulocitosi che rappresenta un'emergenza medica¹³.

- *L'esame obiettivo* verificherà la presenza di splenomegalia, epatomegalia, eventuali linfadenopatie, artralgie, ecchimosi, alterazioni dello stato nutrizionale, stati anoressici, presenza, sedi e frequenza d'eventuali focolai infettivi,

Tabella I. Classificazione cinetica delle neutropenie⁶.

| | |
|--|---|
| <p>Neutropenie da Ridotta Produzione</p> <p><i>Congenite</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ciclica • Croniche • Sindrome di Kostmann • Sindrome di Shwachman • Sindrome di McKusick • Associata a deficit di Ig • Familiare • Disgenesia reticolare • Sindrome di Fanconi • Discheratosi congenita <p><i>Acquisite</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Farmaci o sostanze tossiche • Infezioni • Infiltrazioni midollari | <p>Neutropenie da Aumentata Perdita</p> <p><i>Aumentata distruzione</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Neutropenie immuni associate a forme sistemiche o isolate • Farmaci • Infezioni <p><i>Aumentato utilizzo</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Infezioni severe da Gram Negativi <p><i>Aumentato sequestro SRE</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ipersplenismo |
| <p>Neutropenie da Mielopoiesi Inefficace</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mielocatessi • Sindrome di Chediak-Higashi • Deficit di Felati e Vitamina B12 | <p>Neutropenie da Aumentato Shift Marginale</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pseudoneutropenie |
| <p>Neutropenie da ridotta uscita dal pool di deposito</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sindrome del Leucocita pigro | |

anormalità fenotipiche e accrescitive.

Accertata la neutropenia e precisato il grado e la durata, i dati devono essere integrati con una valutazione microscopica della morfologia cellulare. Gli esami di laboratorio necessari alla conferma dell'ipotesi diagnostica saranno stabiliti, diversificati ed attivati secondo la severità della neutropenia^{14,15} e selezionati, in sequenza o contemporaneamente, dalle informazioni cliniche.

Le indagini

In caso di neutropenia lieve persistente o moderata, (spesso dovuta a distruzione e/o marginazione dei polimorfonucleati), sarà necessario eseguire:

- Indagini infettivologiche (causa di più frequente riscontro insieme alle terapie farmacologiche).
- Dosaggi di anticorpi antineutrofili, anticorpi anti-nucleo(ANA)^{2,16,17}.
- Esami concernenti la funzionalità epatica e renale.

Nei casi in cui la neutropenia assume le caratteristiche di un aumentato grado di severità e/o di alterazioni su altre linee cellulari, sarà necessario inserire nel pannello dei test:

- Uno studio midollare per chiarirne la patogenesi anche nel sospetto di patologie che provocano un'alterata produzione/dismissione cellulare (ad es. neoplasie, mielodisplasie).

In caso di neutropenia grave oltre ai test succitati, dovrà essere eseguito, sin dall'inizio:

- L'agoaspirato midollare (morfologia, immunofenotipo, cariotipo, coltura, valutazione delle riserve e del rischio di AML/MDS) ed una eventuale biopsia osteo-midollare.

L'orientamento diagnostico, se sono interessate più li-

nee, verterà verso una forma di aplasia o leucemia acuta o una forma di mielopoiesi inefficace¹⁸⁻²⁰; se è coinvolta solo la linea granuloblastica potrebbe trattarsi di una forma congenita, immunologica, tossica o ciclica: le ulteriori indagini saranno guidate dalla storia clinica.

Nelle neutropenie associate a disturbi nutrizionali (stati anoressici, alcolisti cronici) e/o ad alterazione degli indici corpuscolari medi, sarà importante valutare anche i livelli di vitamina B12 e di acido folico.

In caso l'anamnesi sia indicativa per sospetta *m.autoimmune* i test differenziati per patologia, saranno quelli relativi alla ricerca di autoanticorpi (ENA, ds-DNA, ANCA, F.R., anti CCP, transglutaminasi).

Per lo studio delle *neutropenie nei pazienti con immunodeficienza* sarà necessario esaminare l'assetto immunologico⁸ (Immunoglobuline sieriche, CIC, C3 e C4, sottopopolazioni linfocitarie); nelle forme di *neutropenia congenita con sintomi di alterazioni funzionali*⁸ di più organi saranno fondamentali, oltre alla valutazione dei polimorfonucleati, i parametri emato-chimici implicati in diversi metabolismi quali:

- Esami relativi alla funzionalità epatica e renale.
- Esami relativi alla funzionalità pancreatica.
- Emogasanalisi, aminoacidemia e aminoaciduria.

Nelle forme di neutropenia congenita ed in alcune acquisite è oggi imprescindibile ai fini diagnostici e prognostici, l'esecuzione di esami di approfondimento quali i test genetici.

In un paziente con una storia di neutropenia cronica, in assenza di assunzione di farmaci o esposizione a sostanze tossiche e negatività agli esami di laboratorio per sepsi, malattie infiammatorie o autoimmuni, potrebbe porsi l'ipotesi di una neutropenia stabile e benigna che comprende

casi di neutropenia cronica idiopatica²¹ e forme di pseudoneutropenie.

Esse, sia congenite quanto acquisite, si possono ritrovare in qualsiasi età e con severità variabile.

Il percorso diagnostico nella valutazione delle neutropenie ha dunque delle tappe obbligate attraverso un network a cui devono giungere necessariamente informazioni anche da altre discipline per la valutazione del dato analitico nel contesto clinico complessivo.

Le aree fondamentali della medicina di laboratorio direttamente coinvolte sono:

- *L'Ematologia di Laboratorio.*
- *L'Autoimmunologia.*
- *La Genetica e la Medicina molecolare.*
- *L'Infettivologia e la Microbiologia.*

L'ematologia di Laboratorio

I test che fanno capo allo studio ematologico sono l'esame emocromocitometrico, lo studio del midollo e la tipizzazione immunofenotipica.

L'esame emocromocitometrico

Un accurato conteggio seguito da osservazione microscopica per la valutazione morfologica delle cellule da comunemente inizio al percorso diagnostico;

Questo semplice test consente di definire la neutropenia stabilendone i limiti in base al numero assoluto dei neutrofilo, differenziato secondo le etnie, il sesso e l'età.

La prima valutazione da fare è verificare se la neutropenia è isolata o se sono presenti alterazioni di altri parametri e nel contempo stabilirne la severità attraverso una graduazione.

Tutto ciò sottolinea inequivocabilmente il peso dell'accuratezza e della precisione dei conteggi assoluti dei neutrofilo derivanti dalle letture strumentali, nonché l'importanza della variabilità biologica per la valutazione clinica.

La conoscenza degli analizzatori, a tal fine, deve essere totale, per comprendere specificità, sensibilità e significato dei flags²².

La valutazione del dato strumentale

Al fine di ottenere un dato corretto è indispensabile:

- adottare procedure, nel laboratorio di ematologia, al pari di linee guida condivise con i clinici, per il controllo di tutte le fasi del processo analitico e per stabilire livelli decisionali per approfondimenti diagnostici;
- porre attenzione alle variabili preanalitiche riferite alle condizioni del paziente al momento del prelievo, alla raccolta del sangue, alla conservazione del campione nonché alla presenza di coaguli o paraproteine che possono inficiare i risultati dell'esame;
- valutare eventuali errori dei conteggi dei globuli bianchi causa di false neutropenie, non molto comuni ma comunque possibili. Alcuni di questi errori possono essere evidenziati da allarmi più o meno specifici oppure dal rilievo di determinazioni improbabili nelle misure strumentali²²⁻²⁷. Altri errori, dovuti ad esempio alla presenza di agglutinine a freddo, possono essere svelati da misure inverosimilmente alterate di parametri anche non leucocitari, quali MCV e MCHC. Si possono riscontrare, infi-

ne, anomalie rispetto ai quadri comunemente registrati su citogrammi ed istogrammi di distribuzione dei cluster cellulari;

- considerare eventuali errori da fattori interferenti con il corretto conteggio dei neutrofilo (ad es. i casi di iperbilirubinemia).

Le *false neutropenie* possono essere attribuite ad una serie di cause quali:

- conservazione del campione a temperatura ambiente per 24h e/o lisi cellulare da sangue non fresco;
- aggregazione di leucociti e/o di piastrine dovuta ad anticorpi, ad alterazioni delle membrane cellulari o alla presenza di cellule neoplastiche portatrici di caratteristiche anomale (aggregazione neutrofila anticorpo mediata, aggregazione da mucine nell'adenocarcinoma, aggregazione di cellule linfomatose o di plasmacellule neoplastiche);
- agglutinine a freddo;
- pseudoneutropenie rilevate da strumenti che utilizzano la perossidasi leucocitaria per differenziare i neutrofilo, in caso di deficit di mieloperossidasi.

Nella *neutropenia persistente* l'attenta valutazione del dato strumentale e della morfologia permette la prima importante distinzione tra forme isolate e quelle associate ad eventuali patologie.

Andranno pertanto sempre osservati:

- eventuali allarmi indicanti anomalie o precursori cellulari;
- alterazioni numeriche anche a carico delle altre popolazioni;
- indici cellulari quali il volume corpuscolare medio (MCV), spia di una possibile riduzione di vitamina B12 e/o folati^{19,28,29}, da confermare con test specifici (metodi immunometrici).

La *riduzione di B12 e/o folati* può causare anemia e neutropenia da mielopoiesi inefficace con ipersegmentazione dei neutrofilo; neutropenia e megaloblastosi possono riscontrarsi nei seguenti casi:

- deficit nutrizionali;
- difetti genetici di Folati, Cobalamina e Transcobalamina II²¹ (neutropenia associata ad anemia e trombocitopenia), la cui conferma è appannaggio della genetica di laboratorio;
- sindrome di Didmond (diabete insipido, mellito, atrofia ottica e sordità).

Il follow-up

E' importante ai fini diagnostici e prognostici, controllare l'esame emocromocitometrico per un breve follow up per valutare se la neutropenia è transitoria o ciclica.

Sarà anche qui il grado della neutropenia a stabilire la frequenza dei controlli^{14,15,30}: dopo 4 settimane se i valori assoluti (v.a.) dei PMN sono >1000/ μ l e <1500 / μ l; ripetuti per 3 volte, dopo 7 giorni se i v.a. dei PMN sono <1000/ μ l.

L'andamento dei conteggi, ripetuti 2-3 volte alla settimana (per un minimo di 6 settimane), con la ciclicità della sintomatologia (es.infezioni, ulcere) potranno indirizzare la diagnosi verso una neutropenia ciclica che dovrà essere confermata con lo studio della struttura del gene ELA 2.

Nella neutropenia insorta in paziente sottoposto a terapie farmacologiche e/o con febbre la rivalutazione dell'emocromo va effettuata da 4 a 9 giorni dopo la sospensione

ne del medicamento e una volta a settimana per 6 settimane dopo un'infezione recente. Tali conteggi saranno particolarmente utili per differenziare le forme da farmaci e le forme transitorie post-infettive in cui si verifica il ripristino dei neutrofili da altre forme severe di diversa eziologia.

Il controllo esteso anche ai familiari e ripetuto durante gli episodi febbrili, in pazienti con negatività all'anamnesi per altre patologie permette di porre il sospetto diagnostico di neutropenia cronica idiopatica^{21,30}.

Bisogna considerare che i quadri dell'emocromo possono cambiare in presenza di infezioni batteriche in grado di apportare, se pur in forma ridotta, un incremento dei neutrofili e nelle forme di infestazioni parassitarie in cui si accompagnano ad eosinofilie di vario grado.

Alcune forme di neutropenia severa possono associarsi ad un aumento dei monociti, nel tentativo attuato dall'organismo di compensare, sia pure parzialmente, il deficit presente nella fagocitosi; in questo caso i pazienti possono non avere infezioni.

L'osservazione microscopica

E' necessaria per la verifica di alterazioni morfologiche quali:

- Anomalie a carico della granulazione⁸ (ad esempio, il gigantismo dei granuli nella sindrome di Chediack-Higashi).
- Cellule displastiche con alterazioni morfologiche a livello citoplasmatico e nucleare, (nuclei tetraploidi, picnosi gravi, ipersegmentazioni e/o iposegmentazione, possono deporre per mielocatesi, o sottendere l'esistenza di mielodisplasie⁵).
- Cellule parassitate (es. malaria).

Diventa insostituibile per confermare la presenza di cellule progenitrici ematopoietiche: blasti, eritroblasti, larghi Linfociti Granulati, che depongono per patologie ematologiche e richiedono un immediato approfondimento con l'esame morfologico del midollo osseo.

Anche se ad oggi è migliorata la performance strumentale nella capacità di suggerirne la presenza attraverso allarmi di sospetto, conteggi specifici su canali dedicati, sofisticati algoritmi elaborati da parte del software strumentale, queste cellule necessitano ancora di verifica diretta da parte dell'operatore.

L'esame del midollo osseo

L'esame del midollo osseo, in alcune forme di neutropenia (Np.) di grado lieve o moderato è ritenuto discrezionale³⁰, in particolare nella Np. cronica benigna nell'infanzia, nella Np. benigna familiare, in quelle autoimmuni o allo-immuni, nella farmaco-indotta e nella post infettiva come anche in alcuni casi di ipersplenismo.

Invece lo studio morfologico del midollo osseo (morfologia, fenotipo immunologico, cariotipo, colture) si impone da subito:

- nelle forme di neutropenia grave;
- in tutte le citopenie severe nelle quali non sia giustificata la riduzione dei valori assoluti;
- nelle neutropenie in cui la valutazione completa dell'emocromo ha fatto supporre la presenza di una patologia ematologica; in tal caso, potrà essere confermata una patologia sospettata già dallo studio della morfologia cellulare sul sangue periferico;
- nelle forme isolate, ma persistenti oltre otto settimane.

Sui preparati, osservati sia in panottica che con colorazioni citochimiche, deve essere sempre valutata:

- la cellularità;
- il rapporto leuco-eritrogenico;
- la progressione maturativa delle diverse serie cellulari con particolare attenzione all'aumento o alla diminuzione dei precursori mieloidi;
- il grado di riserve midollari.

Le informazioni che si desumono, consentono una distinzione dei meccanismi patogenetici, spesso coesistenti, delle neutropenie, con quadri midollari correlati alle fasi della patologia in atto e variamente caratterizzati, da^{11,12}:

- *Midollo normo-cellulare o con ipercellularità* e arresti maturativi di diversa entità dei precursori mieloidi, preminenti nelle neutropenie da *aumentata perdita*, suddivise in Np. da aumentata distruzione (neutropenie immuni isolate o associate, da farmaci o infezioni), da aumentato utilizzo (infezioni gravi), da sequestro (ipersplenismo).
- *Midollo normo-cellulare o con ipocellularità* con diverso grado di insufficienza midollare, possibili blocchi maturativi e diminuzione delle riserve mieloidi, nelle neutropenie da *ridotta produzione* distinte in congenite (cicliche e croniche), acquisite (farmaci, sostanze tossiche, infezioni, disturbi nutrizionali) e Np. da mielopoiesi inefficace.

In particolare²¹, *nelle forme di neutropenia ciclica* la morfologia del midollo osseo, mostra aspetti correlati alla fase clinica della malattia. E' osservabile una ipoplasia con arresto maturativo allo stadio di promielocita e mielocita, quando si è vicini al nadir dei neutrofili circolanti, ed un aspetto di modesta iperplasia nella fase di recupero. *Nella Neutropenia Congenita Severa*^{2,3,8}, lo studio del cariotipo è determinante per rilevare anomalie cromosomiche clonali con alterata elasti leucocitaria. L'osservazione morfologica potrà evidenziare alterazioni non gravi della cellularità globalmente considerata. I disturbi maturativi sono a carico della serie mieloide che mostra un'apoptosi accelerata, con basso rapporto mieloide/eritroide, forme post-mielocitiche scarsamente rappresentate, iperplasia megacariocitaria e ipereosinofilia ed un arresto maturativo allo stadio di promielocita e mielocita. Atipie nucleari di diversa entità e degenerazioni vacuolari citoplasmatiche sono presenti nei promielociti e mielociti. In questi pazienti si raccomanda di ripetere, una volta l'anno, l'esame midollare completo al fine di verificare l'eventuale comparsa di anomalie, caratteristiche di condizioni preleucemiche. *Nella mielocatesi* si evidenzia un incremento delle cellule nella fase band e segmentate ma con i fenomeni degenerativi reperiti anche negli elementi del sangue periferico. Il deficit di dismissione da parte del midollo è condizionato da alterazioni funzionali dei neutrofili.

Nelle neutropenie da *carenza di B12 e folati*, il midollo presenta anomalie maturative caratteristiche quali la morfologia megaloblastica, i metamielociti giganti e i granulociti ipersegmentati.

Nella Sindrome di Felty (S.F.)³¹, lo studio midollare è necessario soprattutto in considerazione della frequente associazione con la leucemia a grandi linfociti granulari T (T-LGL). La S.F. rappresenta una forma di Artrite Reumatoide con impegno sistemico e vasculite; l'osservazione midollare può evidenziare una lieve ipercellularità con maturazione mieloide con moderata deviazione a sinistra della curva matu-

rativa, ma anche occasionalmente una ipocellularità con blocchi maturativi dei precursori mieloidi. Di conseguenza i progenitori cellulari possono o meno essere sufficientemente rappresentati, ma in entrambi i casi i neutrofili segmentati o band sono scarsi. Ciò suggerisce che la neutropenia è il risultato sia di una distruzione periferica da immunocomplessi, che di una inibizione della granulocitopoiesi legata a citochine proinfiammatorie e ad espansione linfocitaria. Possono essere coinvolte anche le altre linee cellulari eritroidi e megacariocitiche. La coltura midollare dimostra una diminuzione di crescita delle colonie granulocitarie.

Nella leucemia T-LGL³¹, frequentemente associata a Sindrome di Felty (S.F.), il midollo presenta un infiltrato di cellule T con distribuzione interstiziale e sinusoidale ed una prevalenza dei precursori mieloidi più immaturi accanto a splenomegalia, infezioni della pelle e dell'orofaringe. Discriminante per la diagnosi differenziale con le forme reattive sarà l'immunofenotipo e studi di genetica, per i quali saranno implicate altre aree della diagnostica del laboratorio.

Nella neutropenia indotta da farmaci gli aspetti midollari e la giustificazione ad eseguire l'agoaspirato dipendono da variabili, quali la farmacocinetica (tossicità diretta o immuno-mediata), la fase clinica del paziente, la presenza di patologie che ne possano incrementare la concentrazione (es. insufficienza renale), il tempo di somministrazione e la necessità di valutazione delle riserve midollari. Possono essere presenti aspetti fisiologici o ipercellularità con apparente arresto maturativo^{28,32} dei precursori mieloidi dovuto alla citodistruzione delle cellule degli stadi più maturi quali il mielocita, il metamielocita ed il granulocita, o ipoplasia cellulare. In quest'ultimo caso prevarranno le cellule della serie linfoplasmacellulare e macrofagiche. In corso di terapie citotossiche anti tumorali si può incorrere in quadri di aplasia con una grave agranulocitosi che rappresenta una emergenza a rischio di vita per il paziente. Nella fase di ripresa la granulocitopoiesi può subire un notevole incremento tale da assumere anche aspetti leucemoidi, ponendo problemi di diagnosi differenziale che si risolvono con il ripristino dei valori fisiologici dei neutrofili nel follow-up.

Nelle neutropenie autoimmuni, nella cui diagnosi non sussiste in genere la stretta necessità di ricorrere allo studio midollare, si può osservare un arresto maturativo con precursori mieloidi ancora chiaramente identificati, ma in assenza degli elementi leucocitari più maturi. L'entità di tale arresto mostra variabilità tra i pazienti dipendente dalla diversa espressione nelle cellule (neutrofili e/o precursori mieloidi immaturi) delle molecole bersaglio degli autoanticorpi.

Nelle neutropenie associate a patologie ematologiche le informazioni derivanti dallo studio morfologico, immunofenotipico e genetico del midollo consentono una diagnosi eziologica e differenziale favorendo un corretto indirizzo terapeutico. Verrà così evidenziata la presenza di cellule neoplastiche e la possibile sostituzione, parziale o totale, dei progenitori fisiologici delle diverse linee cellulari.

Nell'approccio diagnostico alle neutropenie, quando la storia clinica e le informazioni provenienti dalle diverse aree analitiche non ne rilevano la causa, è necessario eseguire, su materiale midollare, ricerche approfondite, che vanno dal-

l'immunofenotipizzazione, che contribuisce ad evidenziare il grado di maturità, atipia e funzione degli elementi presenti, allo studio del cariotipo per la presenza di eventuali anomalie cromosomiche.

Risulta a volte utile per l'indirizzo terapeutico, anche quando la diagnosi è già stata effettuata, allestire colture midollari con i saggi clonogenici per la crescita di progenitori emopoietici, mentre nei casi di grave compromissione cellulare, la biopsia ossea^{19,29} può contribuire a chiarire quadri anche complessi.

Essa si renderà necessaria quando l'agoaspirato mostrerà una "punctio sicca", come nel caso della fibrosi che spesso si accompagna a neoplasie anche solide di diverso tipo o anche ad alcune malattie ematologiche maligne primitive, quali, ad esempio, la mielofibrosi e la leucemia a cellule capellute. E' anche determinante per l'indirizzo prognostico che si avvale di informazioni derivanti dall'osservazione microscopica come la posizione anomala dei precursori immaturi (es. ALIP nelle mielodisplasie) e lo studio della cellularità e dell'entità dell'invasione midollare (es. Leucemie Acute Mieloidi).

Infine le tecniche sopra descritte sono indispensabili nel monitorare la comparsa di eventuali mutazioni leucemiche; a tal fine devono essere ripetute una volta l'anno.

Citofluorimetria ed immunofenotipo

L'analisi citofluorimetrica è un presidio diagnostico, attualmente della massima importanza nello studio delle neutropenie, per verificare la presenza di anticorpi antineutrofili, per identificare la funzionalità cellulare attraverso la rilevazione di deficit enzimatici (ad es. mieloperossidasi), per valutare la vitalità dei leucociti e studiarne le fasi di attivazione, di maturazione ed apoptosi²².

I progressi tecnologici (hardware e software) di questa metodica ne hanno consentito l'utilizzo in routine con possibilità di analisi multiparametriche e l'impiego di un numero sempre maggiore di fluorocromi legati ad anticorpi monoclonali³³.

I contributi forniti alla diagnostica ematologica, con la opportunità di identificare più antigeni coespressi sulla membrana e nel citoplasma delle cellule, sono stati utilizzati nella pratica clinica con risvolti di particolare importanza per il follow-up del paziente.

Lo studio dell'immunofenotipo è essenziale quando le neutropenie si presentano in associazione con malattie ematologiche per identificare sia i precursori mieloidi dei neutrofili normali, immaturi e displastici quanto i cloni protagonisti della malattia, causa di eventuali neutropenie secondarie. L'utilizzo di pannelli di anticorpi quali MPO, cyCD3, CD79a, CD13, CD33, CD10, CD19, CD2, CD117, affiancati alla morfologia e alla citochimica consentono uno screening di linea (mieloide, linfoide) delle leucemie acute^{22,34}.

In una storia clinica di disordini funzionali, i deficit di MPO, oggi sono facilmente rilevabili tramite anticorpi monoclonali.

La chemiotassi attualmente è misurabile attraverso le variazioni del segnale Forward Scatter (FCS) causate dalle modifiche di forma dei neutrofili che precedono la migrazione leucocitaria. I disordini di adesione, fagocitosi e opsonizzazione, sono identificabili con le differenze di

concentrazioni degli antigeni di membrana, come nel deficit del recettore beta 2 presente sulle cellule mieloidi (CD11/CD18) importante per l'adesione e la migrazione transendoteliale dei neutrofili.

L'immunofenotipizzazione è molto utilizzata per la diagnosi differenziale tra le forme di neutropenia non immune e quelle su base immunologica in cui sono identificabili anticorpi legati ai granulociti o liberi nel sangue^{8,21,35}.

Di più recente introduzione è, infine, l'utilizzo del CD64, come marker di attivazione dei granulociti, utile nello studio delle sepsi in quanto correla maggiormente con le fasi di malattia e con altri marker in uso, quali la procalcitonina. Tale recettore per l'Fc delle IgG è espresso a bassi livelli, in condizioni fisiologiche, sui PMN, invece in corso di sepsi la presenza di citochine infiammatorie quali interferon- γ , G-CSF e Interleuchina (IL6) ne incrementano l'espressione.

Un'applicazione particolare della metodica citofluorimetrica risulta di notevole interesse nello studio dell'Emoglobinuria Parossistica Notturna (EPN). Questa patologia, assimilata alle Sindromi Mielodisplastiche, si accompagna a neutropenia e tipicamente mostra la mancata espressione di CD55 e CD59 su eritrociti, piastrine e granulociti nel sangue periferico⁶.

Nelle neutropenie associate a Immunodeficienze Primitive o Acquisite ed a ridotta produzione midollare è importante quantificare e monitorare sia i marcatori di superficie dei linfociti quanto il rapporto helper/suppressor per il follow-up terapeutico e per la valutazione del grado di severità. Sono da considerare indici di progressione di malattia²⁴ l'inversione e la graduale riduzione di tale rapporto.

Nella neutropenia cronica idiopatica lo studio dei progenitori midollari e della produzione di CFU-GM ha documentato una riduzione selettiva dei progenitori mieloidi con fenotipo CD 34+ e CD33- con un aumento dell'apoptosi e della produzione di TNF da parte delle cellule stromali.

Nelle sindromi cliniche di neutropenia cronica associata ad un aumento persistente in circolo di larghi linfociti granulari (LGL), si deve porre il sospetto diagnostico di espansione LGL a tipo leucemico^{31,35-38}. Lo studio immunologico dei recettori di membrana ha un ruolo insostituibile nell'escludere le forme reattive e differenziare le forme di leucemia ad LGL di derivazione dai natural killer (NK), negative per il CD3, da quelle appartenenti alla linea T, CD3 positive³¹. Tale distinzione è importante per il decorso clinico della malattia, più spesso cronico nella T-LGL e acuto in quella di derivazione NK.

Nella leucemie T-LGL l'immunofenotipo caratteristico mostra positività per CD3, CD8, CD16, CD 57³¹.

Lo stesso fenotipo può essere reperito sui linfociti, molto spesso aumentati, sia a livello del sangue periferico che midollare, in pazienti con Sindrome di Felty (S.F).

L'autoimmunologia

Le neutropenie mediate da processi immunologici³⁶ sono distinte in:

- *alloimmuni*, se causate da incompatibilità materno-fetale o da reazioni trasfusionali dovute a presenza di allo-anticorpi;

- *autoimmuni* (AIN) se legate alla presenza di autoanticorpi.

Le AIN sono definite *primarie* se non sono associate ad altre anomalie immunologiche o ematologiche; *secondarie* se la neutropenia rappresenta l'estensione di un disordine quale una m.autoimmune, una patologia linfoproliferativa, o quando risulta correlata ad infezioni, o utilizzo di farmaci^{34,36}.

La prima indagine da effettuare è la ricerca degli anticorpi anti neutrofili, agenti causali delle neutropenie immuno-mediate: questi riconoscono quali molecole bersaglio, le glicoproteine espresse sulla superficie dei neutrofili maturi.

Diversi sono i metodi per la loro determinazione, ma nessuno di essi singolarmente copre lo spettro totale di tutti i possibili anticorpi antineutrofili.

I test di identificazione³⁶ sono: il GAT (granulocyte agglutination test), test di agglutinazione; il GIFT (granulocyte immunofluorescence test), test di immunofluorescenza diretto ed indiretto. *Il test diretto* utilizza i neutrofili del paziente, evidenziandone gli anticorpi adesi, tramite il legame con sieri anti IgG umane fluorescinate. Il limite della procedura è principalmente dovuto al ridotto numero dei neutrofili. *Il test indiretto* (usualmente di maggior utilizzo) ricerca gli anticorpi del paziente, legati a neutrofili eterologhi, tramite anti IgG umane fluorescinate. La fluorescenza può essere rilevata dall'ispezione diretta o dalla citofluorimetria. In entrambi i metodi viene impiegata la glutaraldeide per fissare i neutrofili allo scopo di evitare che la loro naturale fluorescenza dia luogo ad eventuali falsi positivi³⁷.

I test sviluppati successivamente, utilizzano reazioni enzimatiche (ELISA) per evidenziare il legame tra gli anticorpi ed i neutrofili, sempre mediante anti IgG umane.

I principali limiti dei test sono, per il GAT, la tendenza alla autoagglutinazione spontanea dei neutrofili e, per il GIFT, la possibilità di falsi positivi dovuta ad immunocomplessi legati ai recettori dei neutrofili ed alla possibile presenza di allo-anticorpi.

Il MAIGA (monoclonal antibody specific immobilization of granulocyte antigens) è il test che ha permesso di superare le difficoltà metodologiche³⁶. I neutrofili con antigeni specifici sono incubati con il siero del paziente e con anticorpi monoclonali diretti contro antigeni sulla superficie dei neutrofili; gli antigeni sono così isolati tramite l'affinità su una colonna ricoperta di anti-mouse-IgG e testati per la presenza di anticorpi umani. Questo test permette la simultanea determinazione di anticorpi diretti contro una varietà di antigeni.

Nel 1998 il Granulocyte Antigen Working Party dell'International Society of Blood Trasfusion ha definito tra i diversi antigeni specifici dei neutrofili quello maggiormente implicato nei casi di neutropenia immuno-mediata. Si tratta di Human Neutrophil Antigen (HNA-1), glicoproteina modificata del FcgRIIb (o CD 16)^{28,35-37}.

Tutti questi test sono ampiamente diffusi, ma risultano ancora di difficile interpretazione per la notevole incidenza di falsi positivi dovuti alla presenza di recettore Fc, specialmente in presenza di alti livelli di anticorpi circolanti, ma anche di falsi negativi da instabilità e bassa avidità di legame dell'immunocomplesso formato da IgG con i recettori FcgIIB e FcgIIIb presenti sui neutrofili attivati.

Altre problematiche sono legate alla fragilità dei neutrofili. A tal fine il secondo International Granulocyte Sierology Workshop raccomanda, per la determinazione degli anticorpi antineutrofili almeno due metodi, con la ripetizione soprattutto se i test sono negativi ad un primo controllo³⁵.

Infatti per diagnosticare una forma di neutropenia cronica idiopatica è consigliabile ricercare gli autoanticorpi antineutrofili 4 volte in un anno, mentre per quella alloimmune o autoimmune gli anticorpi dovranno risultare positivi in almeno due determinazioni^{21,31,35-37,39}. E' da tener presente che, l'assenza di anticorpi non esclude la diagnosi di neutropenia autoimmune in quanto essi possono agire solo sui precursori immaturi dei neutrofili; invece la loro presenza è stata riscontrata nel 35% di casi diagnosticati come idiopatici cronici. Nelle AIN secondarie, con positività di anticorpi antineutrofili, sarà ancora una volta, la storia clinica ad indirizzare le indagini nel campo delle malattie sistemiche autoimmuni e/o verso altri disordini immunologici che si verificano in corso di patologie infettive, ematologiche, neurologiche, assunzione di particolari farmaci e nei trapianti.

Nell'ipotesi di una forma di neutropenia su base immunologica^{16,17}, oltre agli anticorpi antineutrofili, alle proteine infiammatorie quale la Proteina C Reattiva, agli immunocomplessi circolanti, alle frazioni del complemento, vanno sempre testati gli anticorpi antinucleo che, nel sospetto di una malattia reumatica, rappresentano il reperto di laboratorio fondamentale.

La determinazione deve essere effettuata con metodo di immunofluorescenza indiretta (IFI), definendo anche il quadro flurescopico e il titolo.

Le più frequenti Malattie Sistemiche implicate sono l'Artrite Reumatoide (AR) e la Sindrome di Felty (S.F.), che rappresenta una forma di AR a maggior impegno sistemico, il Lupus Eritematoso Sistemico (LES), la Sindrome di Sjogren (S.Sjogren), la granulomatosi di Wegener.

Come in tutte le patologie autoimmuni, la conferma diagnostica segue i criteri classificativi previsti dall'American College of Rheumatology (ACR) e si basa sul quadro clinico e su reperti di laboratorio.

Nel sospetto di un LES^{17,40}, accanto alla neutropenia, linfopenia, è presente una positività per anticorpi antinucleo (ANA), anti-ds-DNA, anti-Sm, anti-SSB (La); in circa il 47% dei pazienti con diagnosi di LES è presente una neutropenia che è raramente severa ma è un ottimo indicatore di attività della malattia; in questa patologia la neutropenia è stata recentemente correlata sia agli anticorpi anti-RO/SSA che legano molecole di 64 kDa sulle membrane citoplasmatiche dei neutrofili e fissano il complemento che all'antigene La legato ad anticorpi antineutrofili.

Una revisione dell'ACR ha aggiunto, come reperto diagnostico importante, la positività degli anticorpi anticardiolipina e del lupus anticoagulant per i criteri classificativi.

Nel sospetto di S.Sjogren sarà effettuata, per conferma di un ANA positivo con pattern speckled, la ricerca di autoanticorpi anti-SS-A e SS-B.

La neutropenia è raramente associata (meno del 3% di casi) ad Artrite Reumatoide (RA); circa l'1% di questi pazienti sviluppa caratteristiche cliniche di S.F. quali splenomegalia, artrite deformante, leucopenia, vasculite. Il pan-

nello dei test reumatologici da effettuare sarà completato in questo caso, dal fattore reumatoide (IgM), dagli anticorpi anticitrullina, ed anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA).

Alcuni pazienti con S.F.³¹ presentano nel sangue periferico e midollare un elevato numero di LGL, che includono le cellule T citotossiche attivate e le cellule Natural Killer e che possono essere reattive, ma più spesso (nel 25-33% dei pazienti) clonali, dando origine alla Leucemia a LGL.

Tali patologie vengono considerate disordini di un unico processo morboso.

In caso di Leucemia a LGL, la neutropenia, lieve o moderata, con anemia ed epato-splenomegalia, insieme alla comparsa in circolo delle caratteristiche cellule suggerirà la diagnosi, confermata dalle peculiarità immunofenotipiche e dal riarrangiamento clonale del gene TCR.

Nel caso dai dati anamnestico-laboratoristici si sospetti invece una Cirrosi Biliare Primitiva, gli autoanticorpi da ricercare sono gli AMA2, discriminanti per la diagnosi.

Gli Anticorpi anticitoplasma dei neutrofili (ANCA), sono diagnostici nell'ambito delle vasculiti come la granulomatosi di Wegener.

La genetica e la medicina molecolare

Ulteriori importanti informazioni derivano dall'analisi citogenetica³² che si può avvalere di tecniche di ibridizzazione fluorescente in situ (FISH) per la ricerca di alterazioni cromosomiche in cellule in metafase ed interfase, dall'analisi del DNA con l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare del tipo Southern blot o polymerase chain reaction (PCR) e dall'esame dell'RNA con trascrittasi inversa (RT-PCR).

Lo scopo di tali indagini è quello di evidenziare anomalie strutturali dei cromosomi tipiche di neoplasie ematologiche con severe neutropenie e monitorare la comparsa di alterazioni nuove quali:

- la traslocazione (t 15;17) e/o PML-RAR a che si associa alla Leucemia Acuta M3, vera emergenza ematologica, che può esordire con grave granulocitopenia;
- i riarrangiamenti genici che determinano alterazioni di recettori quali quelli per il G-CSF;
- il riarrangiamento dei geni per il recettore TCR dei grandi linfociti granulari nella leucemia T-LGL;
- la presenza di eventuali mutazioni sul gene FAS.

Queste informazioni saranno essenziali, non solo per la comprensione dei meccanismi fisiopatologici, ma soprattutto ai fini prognostici e terapeutici.

Nella Neutropenia Congenita Severa^{2,3,8} le mutazioni dimostrate sono a carico degli esoni 2, 3, 4, 5 e del gene ELA2; altre mutazioni sono state, nel corso degli anni, associate a questa forma di neutropenia ma hanno un significato ancora incerto. La mutazione a carico del gene che codifica per il recettore del G-CSF, a volte riscontrata in questa forma, sembra invece essere implicata nella sua evoluzione verso una leucemia acuta.

Nella maggioranza dei casi di neutropenia congenita severa, sia la struttura dei cromosomi che del recettore per il G-CSF presente sulla membrana dei granulociti, necessario per la trasmissione alla cellula di segnali di maturazione, divisione e per l'incremento delle sue specifiche funzioni, possono non evidenziare anomalie.

La loro valutazione al momento della conferma dia-

gnostica ed il loro monitoraggio nel tempo, una volta l'anno, sono necessari per controllare l'eventuale comparsa di nuove alterazioni, segno di possibile evoluzione leucemica; ad esempio alterazioni strutturali, come la perdita di alcuni cromosomi che possono portare alla monosomia del cromosoma 7, sono da considerare una condizione preleucemica.

L'anomalia genetica nella Neutropenia Ciclica è, nella maggior parte dei casi, una mutazione germ-line dell'ELA2⁴⁰, gene che codifica per una elastasi neutrofila sintetizzata nella fase di promielocita e promonocita ed immagazzinata nei granuli primari. Sebbene si tratti di un disordine benigno, circa il 10% dei pazienti è a rischio di morte per complicanze infettivologiche durante la fase neutropenica, per cui si evince l'importanza di un chiaro inquadramento diagnostico.

Nella Sindrome di Shwachman il gene responsabile SBDS è stato localizzato lungo il braccio del cromosoma 7 alla fine del 2002.

Nella malattia di Chediak-Higashi le ricerche genetiche possono rilevare mutazioni a carico del gene CHS1 che codifica per una proteina determinante nella funzione dei lisosomi.

Test funzionali⁸

In pazienti in età pediatrica, con disturbi metabolici e neutropenie severe, la diagnostica si dovrà avvalere necessariamente delle informazioni provenienti da una rete clinico-anamnestica.

Uno scarso accrescimento accompagnato da epatosplenomegalia e/o il comparire di disturbi neurologici indirizzeranno il percorso diagnostico da intraprendere nell'ambito delle patologie da dismetabolismo.

I test più appropriati da eseguire, sia per la diagnosi che nel follow-up, sono quelli relativi allo studio di funzionalità di organo, le ricerche dei deficit enzimatici e l'equilibrio acido-base.

I piccoli pazienti con sindrome di Shwachman, accanto alle anomalie ematologiche, ed insufficienza pancreatica, mostrano alterazioni epatiche, ritardi di crescita e psicomotori.

L'insufficienza pancreatica, può essere identificata con test indiretti di funzionalità pancreatica (misura della steatorrea, dosaggio degli enzimi pancreatici sierici quali amilasi e lipasi e determinazione della chimotripsina fecale).

Nei neonati o nei bambini molto piccoli una neutropenia associata ad ipoglicemia e/o anomalie neurologiche, possono rivelare la presenza di disordini del metabolismo (malattie da accumulo, Sindrome di Barth, iperglicemia, tirosinemia o una acidosi metabolica). In tali patologie la valutazione citofluorimetrica dell'immunità cellulare al pari delle determinazioni delle Immunoglobuline IgG, IgA e IgM può dare un contributo alla diagnosi di una forma associata ad anomalie immunologiche ed al trattamento da attuare.

Altri test quali il dosaggio di citochine circolanti^{6,20,41} (G-CSF, GM-CSF e M-CSF) sono utili per la valutazione dell'attività granulopoietica.

L'infettivologia e la microbiologia

Il paziente neutropenico può presentare o meno episodi

febrili dipendenti da agenti pirogeni di origine infettivi e non (citochine, tossine, reazioni autoimmuni, prodotti di tessuto tumorali), spesso coesistenti nelle diverse fasi del processo morboso.

La realtà clinica in cui la neutropenia può essere inquadrata e che guiderà il percorso diagnostico infettivologico distingue quindi due scenari maggiori⁴²⁻⁴⁴:

- il paziente febbrile con neutropenia non severa associata ad un processo infettivo;
- il paziente con grave neutropenia ad insorgenza acuta ed infezioni cutanee e mucosali.

Nel primo caso, le indagini, selezionate dalla storia clinica, prevedono la ricerca dei più comuni agenti virali e batterici che presentano tra i sintomi anche la neutropenia.

I test da eseguire prevedono la ricerca degli agenti eziologici in ambito virologico, batteriologico e parassitologico con l'utilizzo di tecnologie immunoenzimatiche, colturali e/o molecolari o della traccia della loro presenza attraverso l'evidenza degli anticorpi specifici.

Le più comuni malattie infettive di origine virale correlate a neutropenia sono:

Rosolia, Mononucleosi, Malattia erpetica (HSV), Parotite, Epatite, infezione da Citomegalovirus (CMV), Adenovirus, Parvovirus, HIV.

Nell'ambito delle infezioni batteriche si riscontrano più frequentemente: Salmonellosi, Shigellosi, Brucellosi, Rickettsiosi, Tubercolosi, infezioni da Stafilococco Aureo.

Le infestazioni parassitarie quali il Kala Azar e la Malaria si associano in genere a neutropenia con eosinofilia.

Talvolta, una insospettata Leishmania può essere evidenziata anche per caso, in uno striscio midollare eseguito per neutropenia ingravescente, in cellule parassitate del sistema monocito-macrofagico e granulocitico.

E' necessario ripetere un emocromo di controllo 3 o 4 settimane dopo l'episodio infettivo al fine di verificare il ripristino dei valori dei neutrofili e confermare la transitorietà dell'episodio.

Nel secondo caso, paziente con neutropenia grave (o moderata ma in rapida discesa), ad insorgenza acuta e manifestazioni cliniche severe, occorre indagare che essa non sia una conseguenza di altre patologie quali leucemia acuta o una agranulocitosi dovuta ad intossicazione farmacologica. Tali situazioni rappresentano una emergenza con rischio di vita per grave compromissione midollare. In questi casi, una scrupolosa anamnesi, con un esame morfologico del sangue periferico e del midollo potranno evidenziare la presenza o meno di cloni patologici o ipoplasie e blocchi di maturazione.

Nel caso in cui una neutropenia si sviluppa in pazienti immunodepressi come quelli sottoposti a chemio/radioterapia, oltre al controllo dei test relativi alla funzionalità dei vari organi (coagulazione, rene, fegato, ecc.) le ricerche diagnostiche, dovranno essere indirizzate anche verso agenti responsabili di infezioni opportunistiche quali Candida, Aspergillus, Streptococco pyogenes, Enterococco, Stafilococco coagulasi negativi, Micobatteri atipici, batteri Gram negativi.

Rispetto alle sedi di infezione dell'organismo i microrganismi di più comune riscontro sono:

- tratto respiratorio superiore: Streptococco, Anaerobi, Herpes Simplex, Lieviti;

- tratto respiratorio inferiore: Batteri Gram negativi, Streptococco, Miceti, Mycobacterium tuberculosis, Citomegalovirus, Pneumocistis carinii;
- cute e mucose: Streptococco, Stafilococco;
- tratto gastroenterico: Anaerobi e Batteri Gram-negativi.

L'Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica (AIEOP) ha formulato delle linee guida per il paziente neutropenico che per la sua malattia di base potrebbe sviluppare delle complicanze.

Secondo tale studio, la valutazione infettivologica dovrebbe essere effettuata già dall'inizio con le seguenti indagini di laboratorio: anticorpi anti HSV, CMV, VZV, EBV, HBV, HCV, coprocoltura per Salmonella.

In questi pazienti, con l'insorgere della febbre, prima della terapia antibiotica è necessario eseguire esami colturali quali:

- almeno due emocolture;
- un tampone faringeo;
- un'urinocoltura;
- colture di qualsiasi sito sospetto per infezione (coprocoltura, liquor, espettorato, aspirati da lesioni cutanee, ecc.).

La valutazione degli indici di flogosi può essere utile per seguire il decorso così come per distinguere meglio processi infettivi da quelli che non lo sono e viene effettuata attraverso la rilevazione delle proteine e citochine proinfiammatorie che vanno dai dosaggi della proteina C Reattiva, alla determinazione delle interleuchine IL6, IL12, IL14, IL16 ed del Tumor Necrosis Factor (TNF). La procalcitonina al pari del già citato CD 64, è uno dei marcatori importanti perché ben correla con le fasi della malattia, soprattutto in corso di sepsi.

Il laboratorio nella valutazione e nella sorveglianza del rischio di complicanze

Il paziente neutropenico deve essere mantenuto sempre al centro della rete diagnostico-clinica⁴².

La problematica clinica correlata strettamente con il grado di neutropenia è il rischio infettivologico che sarà rilevato, classificato e monitorato attraverso il conteggio dei granulociti neutrofili.

I vari gradi di severità delle neutropenie stabiliscono quindi il livello del rischio per il paziente.

Una neutropenia lieve, con neutrofili con valori assoluti (v.a.) $>1000 <1500/\mu\text{l}$, definisce il rischio non significativo ed il paziente può essere seguito in ambulatorio. In una neutropenia moderata, (v.a. $>500 <1000/\mu\text{l}$), il rischio è ritenuto lieve anche se con febbre e segni di infezione.

In caso di neutropenia grave o severa (v.a. neutrofili $=/ < a 500/\mu\text{l}$) il rischio di infezione diventa significativo, tale che il paziente deve essere ospedalizzato e trattato con terapia farmacologica⁴⁴.

Infine il rischio di complicanze è notevolmente aumentato quando i valori assoluti dei neutrofili sono inferiori a $200/\mu\text{l}$. In questi casi, il paziente va comunque curato in ambiente ospedaliero anche se i segni di infezione possono non essere presenti o essere rappresentati in forma lieve.

Nei soggetti sani, quindi, il rischio infettivo è irrilevante fino a quando la conta dei neutrofili non è inferiore a (v.a.) $500/\mu\text{l}$. ma in soggetti defedati, nei neonati, negli alcolisti la cui riserva di neutrofili è limitata, il rischio infettivo è maggiore. Allo stesso modo in altre situazioni di immu-

nodeficienza (malattie linfoproliferative, immunodeficienze acquisite o congenite, diabete e insufficienza renale) anche una neutropenia lieve o moderata determina un notevole incremento del rischio infettivo.

La presenza di fattori di comorbidità, quindi, trasforma, a parità di conteggi dei neutrofili i pazienti da basso ad alto rischio mentre una monocitosi produce un effetto opposto.

In conclusione, la problematica inerente alla diagnosi, al follow-up, alla terapia del paziente neutropenico, ruota attorno ad un semplice esame quale l'emocromo, pur inquadrato in una fitta rete di interscambi di informazioni.

Per garantire una corretta valutazione del dato strumentale, sono indispensabili una buona qualità del materiale da esaminare e la precisione dei conteggi, specialmente a livelli critici finalizzati ad un puntuale governo clinico⁴². I concetti fondamentali della Medicina di Laboratorio quali appropriatezza, accuratezza, precisione e condivisione dei percorsi diagnostici, necessitano di una adeguata integrazione tra clinica e laboratorio, condizione indispensabile per l'affidabilità e plausibilità dei dati forniti²².

Anche se oggi i risultati del Laboratorio costituiscono uno dei presidi essenziali su cui si basa una corretta diagnosi, essi possono essere utilizzati al meglio solo se completati con le informazioni provenienti dalle altre discipline diagnostiche proprio come un classico pensiero di Pascal a cui tutti dovremmo tendere per rendere più efficace la nostra ricerca: "Molti sono gli itinerari, diverse le vie, forse sentieri sconnessi, irti, difficili da seguire ma insieme riusciremo ad avvicinarci alla verità" B. Pascal.

Bibliografia

1. Boxter LA. Neutrophil Abnormalities Hematology Pediatrics. *Review* 2003; 24:52-62.
2. Berliner N, Horwitz M, Loughran T. Congenital and Acquired Neutropenia. *Hematology* 2004;63-76.
3. Zeidler C, Welte K, et al. Kostmann Syndrome and Severe Congenital Neutropenia. *Semin.Hematol* 2002; 39:82-8.
4. Palmblad J, Papadaki HA, et al. Acute and Chronic Neutropenias. What is new? *J Intern Med* 2001; 250:476-91.
5. Bain JB. Blood Cells Practical Guide. Fourth edition. Chapter 4. p. 180-1.
6. Biasioli B, Cenci AM. La Sicurezza del Paziente e la Medicina di Laboratorio. Le applicazioni: il caso dell'Ematologia. *RIMeL/IJLaM* 2006; 2(Suppl.):122-7.
7. Boxer L, Dale DC. Neutropenia: Causes and Consequences *Semin Hematol* 2002; 39:75-81.
8. Newburger EP. Disorders of Neutrophil Number and Function. *American Society of Hematology* 2006:104-6.
9. Bennett JM, Brunning RD, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes: from French-American-British to World Health Organization: a commentary. *Blood* 2002; 99(8):3074-5.
10. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100:2229-302.
11. Bennett JM. World Health Organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 2000; 72(2):131-3.
12. Cappelletti P. Il "referto" in Medicina di Laboratorio. *Riv Med Lab - JLM* 2004; 5(3):197-208.
13. Hillman RS, Ault KA, Rinder H. Hematology in Clinical Practice. New York: McGraw-Hill Professional, 3th edition; 2002.
14. Kyono W, Coates TD. A practical approach to neutrophil disorders. *Ped Clin North Am* 2002; 49:929-71.

15. Zeidler C, Boxer L, Dale DC, Freedman MH, Kinsey S, Welte K. Management of Kostmann syndrome in the G-CSF era. *Br J Hematol* 2000; 109:490-5.
16. Starkebaum G. Chronic neutropenia associated with autoimmune disease. *Semin Hematol* 2002; 39:121-7.
17. Starkebaum G, Loughran TP Jr, Gaur LK, Hsieh SC, Yu HS, Lin WW, et al. Anti-SSB/La is one of the antineutrophil autoantibodies responsible for neutropenia and functional impairment of polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 506-16.
18. Greenberg PL, Young NS, Gattermann N. Myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002:136-61.
19. Valent P, Wimazal F, Schwarzwinger I, Sperr WR, Geissler K. Pathogenesis, classification, and treatment of myelodysplastic syndromes (MDS). *Wien Klin Wochenschr* 2003; 115(13-14):515-36.
20. Bennett JM, Kouides PA, Forman SJ. The myelodysplastic syndromes: morphology, risk assessment, and clinical management (2002). *Int J Hematol* 2002; 76(2):228-38.
21. Dale DC. Neutropenia and neutrophilia. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT, eds. *Williams Hematology*. New York: McGraw-Hill; 2005. 7th edn. p. 907-91.
22. Cappelletti P. Appropriatelyzza in Ematologia di Laboratorio RIMeL/IJLaM 2006; 2(2):119-29.
23. Campana D, Counstan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Practice Research on Clinical Haematol* 2002; 15:1-19.
24. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995; 9:1783-6.
25. Whiteway AJ, Bain BJ. Artefactual elevation of an automated white cell count following femoral vein puncture. *Clin Lab Haematology* 1999; 21:65-8.
26. Hoffmann JJ. EDTA-induced pseudo-neutropenia resolved with Kanamycin. *Clin Lab Haematol* 2001; 23:193-6.
27. Bizzaro N. Granulocyte aggregation is edetic acid and temperature dependent. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117:528-30.
28. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51(2): 189-99.
29. Deeg HJ, Guardiola P. Allogeneic hemopoietic stem cell transplantation in patients with myelodysplastic syndrome or myelofibrosis. *Int J Hematol*. 2002; 76(2):29-34.
30. [http://www.aieop.org/stdoc/lineeguida algoritmo_ diagnostico. \(data di consultazione: 3.9.2007\).](http://www.aieop.org/stdoc/lineeguida%20algoritmo_diagnostico_(data%20di%20consultazione%203.9.2007).)
31. Burks EJ, Loughran TP Jr. Pathogenesis of neutropenia in large granular lymphocyte leukemia in Felty Syndrome. *Blood Rev* 2006; 20(5):245-66.
32. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol* 1991; 78(3):325-9.
33. Brown M, Wittwer C. *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology*. *Clin Chem* 2000; 46:1221-9.
34. Bain BJ, Baenett D, Linch D. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clinical and Laboratory Haematology* 2002; 24:1-13.
35. Capsoni F, Sarzi-Puttini P, Zanella A. Primary and secondary autoimmune neutropenia. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(5): 208-4.
36. Berliner N, Horwitz M, Loughran TP Jr. Congenital and acquired neutropenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004:63-79.
37. White JD, MacPherson IRJ, Evans TRJ. Auto-immune neutropenia occurring in association with malignant melanoma. *Oncology Reports* 2003; 10:249-51.
38. Bux J. Molecular nature of antigens implicated in immune neutropenias. *Int J Hematol* 2002; 76 Suppl 1:399-403.
39. Bux J, Behrens G, Jaeger G, Welte K. Diagnosis and clinical course of autoimmune neutropenia in infancy: analysis of 240 cases. *Blood* 1998; 91:181-6.
40. Skokowa J, Germeshausen M, Zeilner C, Welte K. Severe Congenital Neutropenia: inheritance and pathophysiology. *Current Opinion in Hematology* 2007.
41. Mannone L, Gardin C, Quarre MC. High response rate to Darbopoetin Alfa in "Low Risk" MDS: results of a phase II study. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2004; 104:69a.
42. Krouwer Jan S. *Managing risk in Hospitals*. AACC Press, 2004.
43. Kern WV. Risk assessment and risk-based therapeutic strategies in febrile neutropenia. *Curr Opin Infect Dis* 2000; 14:415-22.
44. Van Tiel FH, Harbers MM, Kessels AG, Schouten HC. Home care versus hospital care of patients with hematological malignancies and chemotherapy-induced cytopenia. *Ann Oncol* 2005; 16:195-205.