

Serie di Ematologia di Laboratorio - a cura del GdS-E SIMeL

L'Ematologia di Laboratorio

P. Cappelletti

Laboratorio di Patologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio
Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli, Pordenone

Riassunto

L'Ematologia nasce come una disciplina di laboratorio, morfologica e tecnologica, e clinica. Lo stretto rapporto tra la clinica e la morfologia, si rompe nella seconda metà del secolo scorso con l'emergere di nuovi metodi diagnostici, la citometria a flusso ed in modo particolare la rivoluzione genetica e molecolare. In questo quadro entra in crisi il concetto stesso di ematologia di laboratorio.

Tuttavia, il ruolo della morfologia ottica e strumentale nella integrazione delle informazioni più complesse per la diagnosi ed il monitoraggio delle emopatie e nel "case-finding" e la crescente importanza delle misure di laboratorio nella "ematologia non ematologica" confortano l'idea di una logica diagnostica dell'ematologia di laboratorio, poggiata su solide basi di conoscenza medica e tecnologica, sull'integrazione delle informazioni diagnostiche ottenute con mezzi diversi, su un corretto ed integrato processo di validazione ed interpretazione, sulla "espressiva" trasmissione dei risultati per una efficace azione clinica, sulla comunicazione biunivoca con la clinica per un appropriato utilizzo delle risorse e delle potenzialità attuali.

Summary

The Laboratory Hematology

Since its birth, the Hematology is both a laboratory (morphologic and technologic) and clinical discipline. During the second half of the past century, the hematology laboratory has become a world remote from the clinician, because of both technical progress, i.e. the flow-cytometry, and remarkable scientific advances, especially the genetic and molecular revolution. Thus, the concept of Laboratory Hematology is challenged.

Nevertheless, the continue role of the optical and "cytometric" morphology in case-finding and diagnosis, the need of integration of all available information, including genetic, immunophenotypic, biologic, clinical and morphologic features for the classification of hematopoietic and lymphoid neoplasm, the growing importance of the laboratory measurements in the so-called "non-hematological hematology", support the idea of an actual laboratory hematology diagnostic logic. It is based on solid medical and technologic knowledge, on the integration of the diagnostic information by different tools, on a correct and effective process of validation and interpretation of the findings, on an "expressive" results for the effectiveness of the clinical action, and on a two-ways communication with the clinicians for an appropriate and efficient use of the Hematology Laboratory.

1. Introduzione

Berend Houwen, il fondatore dell'International Society for Laboratory Hematology (ISLH), nel suo ultimo scritto¹ al quale stava lavorando al momento della sua dipartita, si chiede se quelle valutazioni morfologiche, a cui aveva dedicato tanto tempo ed attenzione, avessero un reale impatto sulle decisioni cliniche. La domanda sorge dalla constatazione della bassa incidenza dell'ematologia di laboratorio sull'atteggiamento del clinico, in ordine ai motivi e schemi mentali della richiesta, ma anche in relazione alla quantità e qualità dei messaggi del laboratorio ricevuti e

decodificati dal curante.

Paradossalmente, nello stesso periodo, la morfologia ematologica ha ricevuto un entusiastico rilancio. Il New England Journal of Medicine ospita nel suo numero del 4 agosto 2005 un "review article"² di Barbara Bain, dedicato all'importanza diagnostica dello striscio di sangue, anche nell'età dell'analisi molecolare: i clinici dovrebbero richiederlo quando vi sono le indicazioni cliniche (che dovrebbero conoscere!) e i laboratoristi dovrebbero esaminarlo quando i dati emocromocitometrici lo indicano come essenziale per l'interpretazione. Per evitare errori diagno-

stici, i moderni e sofisticati metodi di indagine diagnostica in ematologia dovrebbero essere interpretati alla luce della morfologia sanguigna e del contesto clinico.

La ancora attuale importanza dello striscio periferico è sottolineata dalla recente introduzione di fotografie di sangue periferico in nuove rubriche sia di Blood che del British Journal of Haematology. Presentando la nuova serie illustrativa della morfologia ematologica, con un editoriale dal titolo "A (blood) smear campaign"³, l'Editor-in-chief di Blood, Sanford Shattli ricorda che, come aveva affermato Jand nel suo Textbook of Hematology nel 1987, è ancora vero che "more information can be gained from examining the blood smear than from any other single hematologic procedure".

Gli ematologi di laboratorio avvertono la parzialità e l'obsolescenza di molte risposte tradizionali, a fronte dell'esplosione di altri metodi di indagine. Gli ematologi clinici^{3,4}, per converso, celebrando i trionfi dell'ematologia di oggi, riconoscono al laboratorio di ematologia (citometria a flusso, citogenetica, ematologia molecolare) il ruolo principale nei successi diagnostici ed anche terapeutici di questi ultimi anni e rivendicano lo studio e la potenza della morfologia: "Inside blood: a picture (in the microscope) is worth a thousand words"⁵. La domanda (inquietante) è, dunque, se esista e cosa sia nel nuovo millennio l'ematologia di laboratorio.

2. Ematologia: una disciplina morfologica

Nel 1877 Paul Ehrlich⁶ introdusse la colorazione triacida per il riconoscimento delle cellule sanguigne dando inizio all'**era morfologica dell'ematologia** o alla ematologia moderna tout-court, utilizzando il perfezionamento del microscopio ottico e le conoscenze chimiche sui coloranti, in particolare il "boom dell'anilina", intervenuti durante il XIX secolo.

Lo studio degli elementi corpuscolati del sangue, reso possibile dal riconoscimento delle diverse popolazioni leucocitarie circolanti con la colorazione di Ehrlich e sue successive modificazioni, è in realtà un aspetto eclatante della citologia, che prende quota proprio nella seconda metà dell'Ottocento, separandosi dall'istologia, da cui trae, affinandoli, i metodi della microscopia e delle colorazioni anatomiche. L'affermarsi della citologia è il frutto della rivoluzione di Rudolf Virchow: il suo "Cellularpatologie" del 1858 segna la nascita della medicina moderna. "Con l'avvento della dottrina di Virchow, la clinica cede il posto alla patologia e il laboratorio diviene il simbolo della clinica"⁷. La nascita dell'ematologia, come aspetto della citologia, fa parte, d'altro canto, del processo di "specializzazione" in medicina, il cui concetto e pratica nascono proprio nella seconda metà del secolo ventesimo. In quel periodo i centri universitari austro-tedeschi occupano una posizione preminente in campo clinico ed il fenomeno è parallelo agli sviluppi del laboratorio in quei paesi. In poco tempo l'ematologia si afferma come un campo ricco di prospettive: gli studi di Ehrlich sui leucociti circolanti tra il 1878 e 1891; la scoperta di Bizzozzero delle piastrine nel 1882; la individuazione della plasmacellula ad opera di Unna nel 1891; la descrizione delle forme "irritative" dei linfociti da parte di Türk nel 1904. Nel 1910 Pappenheim, il primo che forse possa essere definito ematologo clinico e di laboratorio,

pubblica il libro "Morphologische Haematologie": la disciplina è battezzata, nel suo essenziale rapporto con la morfologia.

"Esiste una microscopia scientifica accanto a quella diagnostica e negli sviluppi della medicina importerà soprattutto questo: se il microscopio fu solo un mezzo diagnostico o non piuttosto un vero strumento di riforma"⁸.

Nella presentazione del suo magnifico trattato ed atlante "Cellules du sang, Normal e pathologique", Marcel Bessis⁹ confessa che scrivere un libro di citologia sanguigna era relativamente semplice nel 1948 perchè era sufficiente descrivere le cellule su uno striscio, appassionante nel 1954 perchè bisognava applicare alle cellule sullo striscio le nozioni di citologia generale in piena fioritura, impossibile per un sol uomo nel 1972 perchè le cellule sullo striscio sono cose morte (des cadavres aplatis et brillamment colorés) ma che hanno avuto una vita intensa ed è quella vita, la storia naturale delle cellule del sangue, che l'ematologia si sforza di ricostruire. "Une belle image éclaire ce que l'on savait confusément, excite l'imagination et se fixe pour toujours dans la mémoire, avec ses vertus d'explication et de suggestion". Tre anni dopo¹⁰, criticando gli "antivisuali" che considerano la morfologia una disciplina sorpassata, intendono sostituire il numero all'immagine e vogliono fare della citologia senza l'ausilio degli occhi, ricorda le qualità intrinseche della forma delle cellule viventi: il legame forma-funzione, dipendente dal patrimonio genetico e dagli accidenti occorsi alla cellula durante la sua evoluzione. Secondo Bessis¹¹, l'immagine non è la realtà (essendo un insieme di segni che trasformiamo in un sistema di simboli), è ambigua (perché solo l'interpretazione trasforma il vedere in comprendere), non è un veicolo di idee (perché aspetti morfologici intermedi non provano una discendenza), ma ne stimola la nascita e, d'altra parte, ci si può accostare alla cellula reale solo con l'immaginazione.

L'attenzione per la morfologia delle cellule leucemiche è sempre stato predominante nell'ematologia, fin dai primi studi di Virchow pubblicati nel 1853.

120 anni dopo, la definizione internazionale FAB¹², proposta nel 1976 e più volte rivista ed ampliata, riposa ancora su criteri morfologici e citochimici. Lo sviluppo della citofluorimetria e il moltiplicarsi degli anticorpi monoclonali e dei CD riconoscibili induce negli anni 80 e 90 l'idea¹³ di una nuova e più certa identificazione delle leucemie, che approda nel 1995 alla proposta¹⁴ del Gruppo Europeo per una classificazione immunologica delle leucemie (EGIL) che definisce il pannello di CD per l'individuazione delle leucemie acute linfoblastiche (ALL) e loro sottotipi, la distinzione tra ALL e leucemie acute mieloidi (AML), la definizione delle leucemie acute bifenotipiche (BAL). Ma, benché una fila di fenotipi di AML siano stati identificati durante gli anni 80 e 90, la sottoclassificazione di AML non è divenuta uno strumento clinico valido così come per ALL. La ragione sta probabilmente nel fatto che AML è eterogenea fin dall'origine e che molti tipi sono definiti non da una singola uniforme popolazione leucemica ma dalla presenza di differenti tipi di blasti o dalla concomitante presenza di altre componenti cellulari. Concludono i ricercatori dell'Università di Vienna¹⁵: "From our experience, we suggest that *together with morphologic and cytochemical examination*, a panel of mAbs against MPO, cyCD3,

cyCD79a, CD13, CD33, CD10, CD19, CD2, and CD117 might be a cost-effective, highly predictive screening tool to predict lineage differentiation of acute leukemias.”

Commentando i criteri proposti dal Gruppo FAB nel 1985 per la definizione di M7 (dimostrazione ultrastrutturale della perossidasi piastrinica, MoAb anti glicoproteina IIb/IIIa)¹⁶, Clara Bloomfield e Richard Brunning, in un Editoriale¹⁷ dal titolo significativo (FAB M7: Acute Megakaryoblastic Leucemia – Beyond Morphology), si chiedono se gli ematologi non siano già pronti per una classificazione totalmente nuova delle AML, basata primariamente su dati citogenetici o immunologici o almeno ad una sistematica combinazione di questi con la morfologia e se le nuove tecniche siano sufficientemente diffuse ed economicamente supportabili. Tuttavia, solo 15 anni dopo sono stati proposti sistemi classificativi delle AML con l'obiettivo di integrare i dati morfologici con tutte le informazioni disponibili e principalmente quelle citogenetiche, per la capacità di individuare sottotipi specifici a significato prognostico e terapeutico non prevedibile dai parametri tradizionali: la classificazione World Health Organization (WHO)¹⁸ e la Realistic Pathologic Classification (RPC)¹⁹.

La classificazione WHO classifica AML in 4 gruppi principali: sulla base esclusiva di anomalie citogenetiche ricorrenti (AML con specifiche anomalie citogenetiche); sulla presenza di almeno 20% di blasti midollari e displasia multilineare (concetto non incluso in FAB); AML e sindromi mielodisplastiche (MDS) terapia-relate; AML non altrimenti categorizzate (not otherwise categorized) comprendente la maggior parte di sottotipi FAB, non correlati a specifiche prognosi o trattamenti. WHO, inoltre, rivede la classificazione delle MDS, introducendo il concetto di citopenia refrattaria con displasia multilineare senza (RCDM) o con sideroblasti ad anello (RCDM-RS) e spostando la leucemia mielomonocitica cronica (CMML) dalle MDS ad un gruppo di malattie mielodisplastiche/ mieloproliferative (MDS/MPD) comprendente anche la leucemia mieloide cronica atipica e la leucemia mielomonocitica giovanile.

WHO, peraltro, stabilisce: 1) la definizione microscopica di blasto e di blasto-equivalente; 2) i criteri della conta dei blasti sul sangue periferico e sul midollo; 3) la impossibilità di sostituire alla conta morfologica dei blasti quella delle cellule CD34+ 4) l'importanza dell'evidenza morfologica della displasia multilineare nella diagnosi di AML con displasia multilineare e nella differenziazione tra le mielodisplasie unilineari (RA e RARS) e mielodisplasie multilineari (RCDM o RCDM-RS).

La classificazione RCP, invece, sottolinea che alterazioni citogenetiche e genetiche sono fondamentali per diagnosi e follow-up ma semplifica la complessa classificazione WHO in 2 grandi gruppi (AML de novo e AML Myelodysplasia-Associated) ed enfatizza le relazioni morfo-citogenetiche. I sottogruppi con alterazioni citogenetiche specifiche prevedibili con i criteri morfologici FAB sono 4: i casi correlati a t(8;21), dai blasti CD19+/CD34+ con grossi granuli coalescenti color salmone di un sottotipo di M2; la leucemia promielocitica (APL) correlata alla perdita di HLA-DR e t(15;17), dai promielociti neoplastici con nuclei ovali o piegati (citoplasma con Auer o microgranulare); i casi correlati a inv(16) o t(16;16) con gli eosinofili

abnormi contenenti granuli basofili misti a quelli eosinofili della M4Eo. La traslocazione 15;17 (q22;q21) risulta in una fusione PML/RAR α che identifica i blasti che rispondono al trattamento con acido retinoico. Vi sono peraltro casi che non rispondono, in cui manca la traslocazione RAR α o vi è una fusione PLZF/RAR α , correlata a t(11;17)(q23;q21), che hanno un corrispettivo morfologico in cellule con nuclei rotondi e granuli citoplasmatici fini o grossolani e numerose cellule pelgheroidei e dovrebbero essere classificati come un sottotipo a se stante. Infine M7 è diagnosticata tradizionalmente con i metodi ultrastrutturali od immunofenotipici di FAB ed è correlata a 3 tipi di difetti genetici. La AML Myelodysplasia-Associated presenta anomalie citogenetiche complesse e le cellule non blastiche mostrano anomalie morfologiche di displasia multilineare caratteristiche della mielodisplasia.

Le conclusioni sono che è l'integrazione dei dati morfologici, immunologici, citogenetici e clinici il principio indispensabile per la cura di AML.

3. Ematologia: una disciplina tecnologica

Maxwell Wintrobe²⁰, delineando i momenti storici salienti dello studio del sangue, sottolinea come il passaggio alla modernità è strettamente connesso al progresso tecnologico. L'uso del microscopio, scoperto da due secoli²¹ ma sviluppato nella prima metà dell'800, è alla base della quantificazione delle variabili biologiche del sangue²²: Gabriel Andral per primo, a Parigi, enumera i globuli rossi del sangue e ne dà notizia nel suo "Essai d'Hematologie Pathologique" del 1843, mentre nel 1851 JH Bennett, professore ad Edimburgo e importatore di corsi di microscopia alla locale facoltà di Medicina, descrive la leucemia in cui "il sangue conteneva un insolito numero di corpuscoli incolori". D'altra parte la chimica della prima metà dell'Ottocento è la chimica dei coloranti e tra questi in particolare dell'anilina, derivata dal catrame come sottoprodotto dell'estrazione dell'indaco²³. La grande versatilità dell'anilina nel dare coloranti per azione di diversi composti chimici (fucsina nel 1859, magenta e blu anilina nel '60, violetto anilina nel '63), lo studio dei mordenzanti e la scoperta di altri coloranti come l'eosina dalla fucsina e gli azocomposti di Kekulé furono alla base dell'esplosione industriale tedesca del settore - Friedrich Bayer e soci 1862; Meister, Lucius e soci (Hoechst) 1863; Badische Anilin und Soda Fabrik (BASF) 1865 - ma anche dell'utilizzo dei coloranti in campo medico (1870-80).

Le parole di Marcel Bessis negli anni 70 e 80 del secolo scorso, d'anzì ricordate, riflettono il trionfo della morfologia ematologica, sorretta dalla tecnologia microscopica sempre più raffinata (a scansione, elettronica) e capace di fotografare il movimento (ektacitometro), confermando quel legame forma-funzione così caro agli ematologi, ma anche la crisi della morfologia tradizionale, a fronte di quella che Wintrobe²⁰ definisce **la rivoluzione tecnologica dell'ematologia**, prepotentemente esplosa nel secondo dopoguerra con l'automazione delle conte cellulari e la possibilità di misurare accuratamente i loro volumi, a partire dalla scoperta del metodo resistivo da parte di Wallace Coulter²⁴ tra il 1949 ed il 1956, e poi con l'automazione del riconoscimento della morfologia leucocitaria, sulla base della meccanizzazione della citochimica nell'Hemalog D²⁵.

Nei sessant'anni passati uno straordinario progresso tecnologico e scientifico ha travolto l'ematologia. Sotto il profilo tecnologico, i test di laboratorio sono divenuti sempre più automatizzati e standardizzati, più accurati e precisi, più rapidi nell'esecuzione e maggiormente utili sotto il profilo clinico. Ad esempio, negli anni 1930, Maxwell Wintrobe²⁰ dedica buona parte della propria attenzione alle variazioni numeriche e qualitative dei leucociti circolanti in rapporto alla diagnosi differenziale e alla prognosi dei processi infiammatori ed infettivi. Se oggi alcune di quelle alterazioni morfologiche hanno perso di evidente valore (p. es. i granuli "tossici"), aspetti di "morfologia strumentale" ne hanno preso il posto (p. es. parametri posizionali ed enzimatici dei neutrofili²⁶; conta accurata di NRBC²⁷) nella valutazione prognostica.

Una storia particolarmente istruttiva e intimamente connessa all'anima storica dell'ematologia è quella del riconoscimento cellulare. Durante gli anni 60 sistemi basati sull'automazione della microscopia classica sono pensati per l'esame degli strisci vaginali o per la differenziazione dei leucociti circolanti. Gli strumenti riproducono l'attività di riconoscimento morfologico per pattern e sono molto apprezzati dai morfologi, ma hanno problemi meccanici e di produttività. Oggi essi tornano prepotentemente di moda^{28,29}.

Ma è la citometria a flusso il principale artefice delle trasformazioni del cinquantennio passato, attraverso il superamento dei primitivi limiti tecnologici (p. es. la "coincidenza" o il fattore "forma") per determinare in modo non precedentemente possibile conte ed indici cellulari (eritrocitari e piastrinici), il sincretismo tecnologico sempre più spinto ad incorporare filosofie tecnologiche diverse (metodi elettro-ottici e ad impedenza con corrente continua od alternata; polarizzazione; lisi cellulare selettiva; fluorescenza) e metodi sempre più sofisticati nell'individuazione corretta dei cluster popolazionistici (gating elettronico). Gli strumenti fanno a gara nel proliferare di informazioni aggiuntive che individuano discrepanze nei riconoscimenti cellulari secondo i pattern interiorizzati o che segnalano caratteristiche cellulari di possibile interesse clinico (flagging) e nell'identificazione delle cellule rare (blasti) o "difficili" (piastrine e piastrine reticolate; frammenti di leucociti ed eritrociti) e della filiera maturativa cellulare (reticolociti, eritroblasti; forme immature mieloidi). La possibilità di valutazioni di nuovi indici piastrinici, eritrocitari e reticolocitari, di accurata conta e sensibile rivelazione dell'imaturità piastrinica o della frammentazione eritrocitaria (schistociti) nella diagnostica differenziale della microangiopatia trombotica sono altri significativi esempi.

Infine si prospetta la identificazione di funzionalità cellulari, con l'uso di specifici enzimi che hanno chiarito vecchi concetti patologici e clinici (p. es. i deficit di mieloperossidasi neutrofila ed eosinofila; y-bar o Neut-y come segnali prognostici), con l'utilizzo di specifici antigeni di superficie correlati allo stato funzionale di attivazione (p. es. CD11b e CD64) e con lo studio delle caratteristiche tintoriali delle cellule che consente di valutare la vitalità leucocitaria e pertanto il tasso di apoptosi con implicazioni prognostiche e terapeutiche.

Nascono il concetto di "morfologia strumentale" come insieme dei dati numerici, allarmi, istogrammi e citogrammi

degli strumenti che l'occhio clinico compone secondo pattern dai correlati morfologici ed il compito del medico di laboratorio nell'integrare i dati strumentali e morfologici, per operare i dovuti approfondimenti diagnostici e segnalare i suggerimenti interpretativi, utilizzando al meglio le notizie cliniche, quando disponibili.

Hematology beyond microscopy

La vicenda fin qui delineata resta, tuttavia, negli ambiti della ematologia tradizionale. Le novità tecnologiche vengono costantemente rapportate, per la verifica e l'interpretazione ai concetti e ai metodi conosciuti. All'automazione è riconosciuta la precisione, per motivi teorici statistici³⁰, e la velocità di esecuzione.

Per molto tempo l'accuratezza strumentale è provata contro la camera di conta. Ancora recentemente la misura strumentale delle piastrine negli ambiti estremi della citopenia, laddove è maggiormente diagnostica in riferimento al progressivo abbassamento della soglia per la trasfusione, è messa in discussione contro il conteggio microscopico ($>30 \times 10^9/L$)³¹ e ne è dimostrata l'inaccuratezza a 5, 10 e $15 \times 10^9/L$ contro il metodo immunologico (CD41 e CD61) proposto come riferimento internazionale³². Ancor oggi il paradigma delle conte differenziali strumentali è la classica "formula leucocitaria" (NCCLS H-20A)³³, seppur si discute animatamente almeno per il metodo di riferimento dei monociti³⁴. La difficoltà della valutazione, dunque, sta in gran parte nel metodo di riferimento tradizionale, di difficile valutazione mano mano che il numero degli eventi diventa troppo piccolo (p. es. basofili), come avviene con i conteggi strumentali oggi possibili per cellule non tradizionali nella "formula leucocitaria" e nell'esame morfologico: reticolociti ed eritroblasti; piastrine reticolate; forme immature mieloidi e blasti.

Per ovviare ai falsi negativi e falsi positivi gli strumenti sono andati arricchendosi di "flag" suggestivi di specifiche cellule circolanti. Molte segnalazioni sono state di volta in volta proposte con diverso successo: LUC; IG; Atyp; BI; LIC; ALY; MPXI; LI; platelet clumps; micro fragmented reds; IMI; HPC; IPF; ecc. La politica dello screening strumentale seguito dalla verifica morfologica, basata sulla migliore sensibilità clinica strumentale, è stata recentemente sintetizzata da Robert Pierre³⁵, che ricorda un datato ma fondamentale lavoro di Koepke et al³⁶, nel quale 73 tecnici esaminarono con una conta a 100 elementi 496 strisci di pazienti con anomalie distribuzionali presenti nel 34% dei campioni: i falsi positivi furono pari al 1.6%, ma i falsi negativi il 14.1%.

Fin dall'inizio dell'automazione lo sguardo degli ematologi e dei patologi ha oscillato tra l'entusiasmo delle nuove possibilità e lo scetticismo del confronto. Il riconoscimento dei risultati spuri diviene un nuovo compito del tecnico di laboratorio, non solo per prevenire risultati scorretti ma anche per fornire importanti informazioni cliniche³⁷. Accanto alla conoscenza delle alterazioni suggestive di artefatti o anomalie patologicamente rilevanti dei dati numerici (in particolare di MCHC negli strumenti a filosofia resistiva), si fa strada l'importanza a tal fine della attenta valutazione dei dati iconografici presentati a display o in istogrammi, nel confronto con la morfologia tradizionale. Le anomalie strumentali possono allora essere classificate come

risultati spuri veri (pitfall) che alterano l'accuratezza del dato e devono essere conosciuti per evitarli oppure come "pseudopitfall", dato alterato ma segno di altra alterazione fisiologica o patologica vera, spesso specifica (p.es. emazie resistenti alla lisi; deficit di perossidasi). "Il riconoscimento dei pitfall e l'interpretazione degli pseudopitfall consente di migliorare l'accuratezza e fornire nuove informazioni al fine di un referto clinicamente espressivo"³⁸.

Il dibattito sulla sensibilità e specificità strumentale è lungo e complesso. Agli strumenti si chiede fondamentalmente di funzionare da screening di patologia, distribuzionale o qualitativa, da verificare con i metodi tradizionali, in primis la microscopia. La dimostrazione sperimentale che cellule atipiche non sono rilevate da una conta su 100 elementi se non superiori al 2.3% è del 1980³⁹ e la dimostrazione statistica che l'abitudine di una rapida occhiata al vetrino prima di cominciare la conta "ufficiale" non migliora la probabilità del riconoscimento è del 1985⁴⁰. Gli avanzamenti tecnologici (GdS-E SIMeL. Dati non pubblicati. 2003) dimostrano un valore predittivo negativo (VPN) per gli allarmi generici oscillante tra il 98.3 e il 100% e un VPN cumulativo per gli allarmi specifici intorno al 99%, anche se il VPN per i singoli allarmi è decisamente inferiore (per i blasti tra il 91 e il 95%, anche a distanza di 10 anni⁴¹). Tuttavia, si stima che l'insieme degli allarmi distribuzionali e specifici è in grado di offrire un VPN complessivo superiore al 99%. In riferimento al riconoscimento dei leucociti i dati di sensibilità sono stabili: nel 1990 Krause⁴² indica nella propria realtà universitaria di Pittsburgh e con l'utilizzo di H1 un tasso di falsi negativi del 3% e un dato simile americano (2-4%). A metà del decennio Hoyer et al⁴³ affermano di aver virtualmente riconosciuto tutti i casi di leucemia attraverso una combinazione dei dati numerici e dei flag strumentali (Coulter STKS) e la revisione degli strisci segnalati. Una recente valutazione⁴⁴ di regole di selezione per lo striscio ematologico uscite da un Gruppo di Consenso internazionale ha rilevato un tasso di falsi negativi pari al 2.86%, in 13.298 pazienti esaminati in 15 laboratori di 6 Nazioni. Di questi falsi negativi il 33% si riferisce a morfologia eritrocitaria e piastrinica, il 52% a forme immature granulocitarie, il 6.6% ad eritroblasti e solo 1.3% (4 casi) a blasti. Per comprendere l'impatto di questi falsi negativi è necessario considerare, almeno sinteticamente, i criteri usati per definire uno striscio come "positivo" (morfologia eritrocitaria e piastrinica $\geq 2+$, meta > 2 e mielo/promielocito ≥ 1 , NRBC ≥ 1 , blasti ≥ 1), la prevalenza di patologia (11.20%), il numero delle revisioni richieste (29.80%) e la qualità delle regole di selezione. Agli inizi degli anni 90 del secolo scorso, l'efficienza degli allarmi più utilizzati oscilla tra 88.3 e 91.1% per i blasti, 80.8 e 88% per le forme immature mieloidi, 78.8 e 86.7% per i linfociti varianti, 81.4 e 90.5 per eritroblasti⁴¹.

I problemi restano ancora per il riconoscimento del "left shift" e la distinzione tra blasti linfoidi, linfociti varianti (atypical), cellule linfomatose circolanti e linfociti normali⁴⁵. Nonostante ciò, un recente obiettivo dell'ISLH⁴⁶ è la implementazione strumentale della conta differenziale estesa (extended differential count, EDC), comprendente come parte integrale della conta elettronica i granulociti immaturi e gli eritroblasti, i linfociti varianti, i blasti e le cellule progenitrici ematopoietiche (non il left shift). Ci si aspetta

che ciò sostituisca gradatamente la gran parte della routine ematologica, riservando l'esame morfologico a casi del tutto particolari. Benché il problema di fondo sia quello di metodi di validazione diversi dalla morfologia, il riferimento è ancora alla capacità di individuazione delle cellule sanguigne morfologicamente definite nella loro "differenza" orizzontale (i diversi citotipi leucocitari e non) e nella loro "differenza" verticale (gli stadi maturativi normalmente presenti nel midollo). La discussione ruota intorno all'inserimento nella EDC di quelle categorie cellulari di soggettiva interpretazione nonostante una definizione internazionale accettata (band cells) o di mal definita tipologia (variant lymphocytes). La irriproducibilità microscopica tra osservatori ed il bias indotto dal risultato strumentale sull'esaminatore umano portano a concludere per una valutazione a commento e non numerica di queste cellule e alla domanda inevasa di quale utilità clinica reale queste segnalazioni abbiano⁴⁷. In questa proposta e in questa discussione risuona ancora il principio degli anni 70 di una ematologia "beyond microscopy" piuttosto che "without microscopy".

Hematology without microscopy

Un ramo della citometria a flusso, separatosi negli anni 70 dal tronco principale e di grande importanza, è quello della citofluorimetria. Dalla microfluorimetria, basata sulla doppia lettura scatter della fluorescenza rossa e verde da arancio di acridina ed utilizzata dai citofluorografi della Bio/Physics System Inc. e dal sistema presentato da Adam e Kamensky⁴⁸, si passa rapidamente, non appena sono disponibili anticorpi monoclonali (MoAb) che possono essere fluorescinati, al riconoscimento e quantificazione di marcatori cellulari di superficie in grado di individuare sottotipi leucocitari non precedentemente identificabili negli strisci di sangue periferico o di midollo colorati con i metodi convenzionali. All'inizio degli anni 80, durante l'epidemia mondiale di AIDS, la citometria a flusso in fluorescenza diviene il "gold standard" per la conta dei linfociti T CD4+, parametro guida per la progressione della malattia e di risposta alla terapia. Dalla metà di quel decennio la citometria a flusso, gli anticorpi monoclonali e il "cell sorting" hanno un drammatico impatto sulla ricerca ematologica ed immunologica, divenendo via via degni di fede quali riferimenti identificativi di cellule e di funzioni, nonostante che ciò avvenga senza quel tipo di informazioni morfologiche di cui noi abbiamo bisogno per immaginare le cellule.

Questo passaggio dalla citometria a flusso, costruita sulla riproduzione dei criteri morfologici classici o in grado di fornire pattern di "morfologia strumentale", alla citometria a fluorescenza costruita su segnali di variabile intensità riferiti a macromolecole superficiali o intracellulari di cellule morfologicamente anodine ed omogenee oppure solo teoricamente e schematicamente immaginabili innesca l'analogia con il pipistrello, sulla scia del famoso lavoro di teoria cognitiva di Thomas Nagel⁴⁹ "What is it like a bat?".

Il sistema concettuale interpretativo della citofluorimetria è "altro" da quello della morfologia ottica e del suo "doppio" citometrico.

Questi metodi sono proposti come un nuovo paradigma in ematologia, "making morphology irrelevant", per la

loro capacità di identificare molte più linee e sottolinee di leucociti maturi ed immaturi di quante ne avessero mai contemplate gli ematologi fino agli anni 70 del secolo scorso e di fornire metodi di riferimento “oggettivi” per le prestazioni dei citometri routinari.

La citofluorimetria, in effetti, ha segnato il filo della corrente dello sviluppo nell'estrazione delle caratteristiche specifiche nell'analisi cellulare, ma non è necessariamente in grado di compensare una concomitante perdita della maggior parte se non di tutte le informazioni morfologiche.

Come precedentemente visto, il Gruppo EGIL si riprometteva, nel 1995, di focalizzare una classificazione immunologica delle AML. Nel 2002 una valutazione¹⁵ dell'immunofenotipo di 325 leucemie acute dell'adulto, in confronto con le caratteristiche morfologiche e di genetica molecolare, conclude che, mentre la classificazione immunologica delle ALL ha provato la propria riproducibilità e il valore clinico, l'espressione dei marcatori immunologici nelle AML è così eterogenea da rendere difficile incorporarla in un sistema classificativo riproducibile e clinicamente espressivo. Pertanto, il ruolo maggiore dell'immunofenotipizzazione nelle AML è ancora la differenziazione di AML M0 dalle ALL (97.2% dei casi descritti). Inoltre la enorme varietà di MoAb e di metodi può essere sconcertante per l'immunofenotipizzazione di routine, come in qualche modo mostrato dalla verifica di qualità esterna olandese⁵⁰, dove sono evidenti la selezione non ottimale degli anticorpi monoclonali ed errate interpretazioni dei risultati.

Sotto il profilo tecnologico, anche i più semplici citometri a flusso incorporano un certo irriducibile livello di complessità e di costo. Il miglioramento prestazionali e il sempre minor costo degli strumenti di cattura di immagine, in particolare le camere charge-coupled device (CCD), di sorgenti luminose efficienti come i light-emitting diodes (LED) e i personal computer fa sì che possano essere assemblati per costruire strumenti meno complessi, meno costosi, a bassa risoluzione, utilizzabili per gli stessi compiti citometrici. La risposta può essere nei “low-resolution cellular astronomy imaging cytometry”, come il Kodak KAF 0402ME che viene accreditato della stessa precisione e sensibilità dei citometri a flusso e della possibilità di misure multiparametriche. Questi sistemi possono apparire come la resurrezione della morfologia: “give us a CCD and we instinctively try to get morphology information we may not need”. In realtà essi amplificano la distanza dalla morfologia tradizionale, come chiarisce il termine di “cellular astronomy” utilizzato da Howard Shapiro⁵¹. “Gli astronomi non sono in grado di risolvere i dettagli strutturali delle stelle eccetto che del Sole; tutte le informazioni che li mettono in condizione di caratterizzare altre stelle vengono da misure di intensità di radiazioni elettromagnetiche a varie lunghezze d'onda e da variazioni temporali delle configurazioni di emissione. Per raccogliere queste informazioni, gli astronomi correntemente usano strumenti di imaging digitale come camere CCD, ma hanno dovuto diventare dei big pixel thinkers”.

4. Ematologia: una disciplina clinica

Adolfo Ferrata, scolaro dei grandi ematologi tedeschi e di Pappenheim in particolare, scrive nel 1912 il fortunato li-

bro “Morfologia del sangue normale e patologico” che diviene, nelle edizioni del 1919-21, “Le Emopatie”, segnando anche nella metamorfosi del titolo la transizione da una disciplina citologica ad una pienamente clinica.

Paul Ehrlich, che tinge le cellule per scoprirne le particolarità strutturali, è anche considerato il padre dell'immunologia e il pioniere della chemioterapia, a cui lo porta la sua passione, quasi una ossessione, per i coloranti⁵². L'obiettivo è una “terapia magna sterilisans”, un'unica iniezione per distruggere tutti i germi patogeni senza ledere le cellule, basata sull'affinità tra germi e sostanze chimiche. Le sue ricerche portano al salvarsan, limitato però ad un'unica indicazione terapeutica. La speranza nella “pallottola magica” resiste nell'approccio terapeutico degli ematologi per almeno un secolo e riposa sulla visione unitaria cellulare della fisiologia e patologia ematologiche. E' nella prima metà del secolo XX che tra i morfologi si rafforza la tendenza alla **morfologia funzionale** (forma e funzione integrate), attraverso l'istochimica (e la citochimica) e l'istofisica (microscopia a fluorescenza, a scansione, elettronica). L'indissolubile legame tra la clinica ed il laboratorio (essenzialmente la morfologia) in ematologia rimane costante per sessant'anni, fino al secondo dopoguerra del secolo scorso. “In the late 1940s haematology was still largely a laboratory discipline”⁵³. L'unitarietà della ematologia clinica e di laboratorio si rompe via via che le conoscenze si ampliano ed è sempre più difficile per l'ematologo padroneggiare tutti gli aspetti clinici e i metodi di laboratorio relativi. Le subspecializzazioni proliferano, così come in molte altre discipline cliniche. Paradossalmente, mentre la clinica si basa sempre più su raffinate metodologie di laboratorio, la distanza tra l'ematologia clinica, che celebra una sua “età dell'oro”⁵⁴, e l'ematologia di laboratorio si percepisce sempre più evidentemente. Alla rivoluzione tecnologica, principalmente connessa alla citometria a flusso, si associano i grandi progressi scientifici nella comprensione molecolare delle malattie emoglobiniche, dell'emostasi, della trombosi e delle malattie neoplastiche ematologiche. Le scoperte delle alterazioni citogenetiche e molecolari sono accompagnate e seguite dai maggiori successi terapeutici dell'ematologia odierna, come l'efficacia dell'acido trans-retinoico nella leucemia promielocitica e dell'imatinib nelle leucemie mieloidi croniche associate a BCR-ABL e al riarrangiamento dei geni PDGFRA e PDGFRB.

L'esempio eclatante della rottura tra clinica e laboratorio in ematologia è l'impatto della citogenetica e della genetica molecolare nella classificazione delle leucemie, evoluta dalle proposte del gruppo FAB¹² basate primariamente su criteri morfologici e citochimici a classificazioni modificate per comprendere nuovi tipi di malattia e test ancillari (immunofenotipo; citochimica ultrastrutturale; citogenetica)⁵⁴.

Una valutazione⁵⁵ dell'impatto prognostico delle classificazioni WHO e RCP, su 228 casi di AML e RAEBt (secondo FAB) conferma l'importanza dei sottogruppi identificati dalle anomalie citogenetiche ricorrenti sopra menzionate più quelle coinvolgenti 11q23 (MLL) ed i limiti della classificazione FAB (sono prognosticamente importanti solo i gruppi M3, M4Eo ed M0 e nelle AML non identificate da anomalie citogenetiche ricorrenti o da displasia multilineare non vale la pena di operare sottoclassi-

ficazioni, in particolare con metodi citochimici per la differenziazione monocitica o mielomonocitica) ma anche la validità dell'abbassamento della soglia per i blasti a 20%, l'importanza del concetto di displasia multilineare per sole 2 linee e l'assenza in un sostanziale numero di casi di anomalie cariotipiche.

Una analoga valutazione⁵⁶ su 1600 casi di MDS, conferma la validità dei criteri citomorfologici di WHO per la separazione in 2 gruppi di RAEB (blasti < o > 10%) e per la distinzione tra RA-RARS e RCDM.

"The ultimate test of any disease classification scheme is its usefulness in guiding the selection of effective treatment strategies"⁵⁵.

Ematologia non ematologica

Nel mondo reale della medicina generale e del laboratorio, le alterazioni ematologiche più frequenti non sono quelle neoplastiche ma altre, quali le anemie secondarie e la loro diagnosi differenziale, le variazioni leucocitarie nelle malattie infiammatorie ed infettive e nelle immunodeficienze, le alterazioni numeriche delle piastrine e la loro diagnosi differenziale, le patologie coagulative e trombotiche secondarie. In tutti questi casi la decisione di testare i parametri ematologici e la loro interpretazione possono non essere banali e rappresentano il principale campo di attività dell'ematologo di laboratorio.

Prendiamo il caso dell'anemia.

L'anemia è la malattia prevalente nei bambini, nelle ragazze e nelle donne fertili, negli uomini anziani con percentuali oscillanti tra il 4.4 e il 5.9%⁵⁷. E il problema non è semplicemente l'anemia sideropenica. La probabilità di anemizzazione cresce con l'età⁵⁸. Dopo i 65 anni il 75% dei ricoverati è anemico ma solo nel 12% dei casi l'anemia è il motivo del ricovero. L'anemia è associata alla maggior parte delle malattie croniche: nel 30-70% delle malattie epatiche, nel 17-27% delle artriti reumatoide, nel 21% delle malattie infiammatorie dell'intestino, nel 30% dei casi di scompenso cardiaco cronico (CHF), nel 30-50% dei casi di AIDS e nel 30-60% delle malattie neoplastiche, in rapporto al trattamento. L'anemia non è un "innocent bystander" ma impatta decisamente sulla mortalità e morbilità e il suo trattamento ha effetti benefici evidenti. Nei dializzati un ematocrito (Ht) tra 33 e 39 abbatte del 16% la probabilità di ospedalizzazione ed è associato ad un basso rischio di morte. L'anemia è un fattore di rischio indipendente in CHF e per ogni 1% di Ht in meno vi è un aumento di mortalità di 1.6%. Nelle Sindromi Coronariche Acute la trasfusione di pazienti con Ht < 33% porta ad una minore mortalità a 30 giorni dal ricovero. Il nesso causale, in tutte queste situazioni cliniche, è che l'anemia causa aumento della frequenza, per garantire la necessaria ossigenazione, ed ipertrofia ventricolare sinistra. Età e stenosi limitano la risposta compensatoria. E' stata dimostrata una correlazione tra anemia, ossigenazione del tessuto tumorale, recidive locali e sopravvivenza: vi è un rapporto tra anemia e progressione della malattia in pazienti in radioterapia. L'anemia (Ht < 35%) è un fattore indipendente di morte in interventi di chirurgia generale. Infine l'anemia impatta la qualità di vita sia dei dializzati che nei pazienti in chemioterapia.

Questi concetti sono sinteticamente condensati nel termine "ematologia non ematologica" coniato da Angelo Bur-

lina (Pradella M. Comunicazione personale) negli anni 80, in dialettico confronto con Tiziano Barbui. Mentre nella "ematologia ematologica" predomina l'aspetto diagnostico e della specificità delle determinazioni, quindi la specializzazione, e in seconda battuta l'attenzione ad un monitoraggio volto a cogliere quanto prima l'efficacia della terapia e la ripresa della malattia, nella "ematologia non ematologica" sono il "case finding" e l'interpretazione incrociata e transpecialistica e in seconda battuta il monitoraggio delle alterazioni ematologiche secondarie il campo d'azione quasi esclusivo.

Il percorso dell'ematologia non ematologica viene da lontano e ha ancora molto da dire.

Nissenson e colleghi⁵⁷ sottolineano la necessità di identificare la tipologia e il peso dell'anemia nelle specifiche popolazioni e che mancano dati su quanto costi il loro trattamento e quanto spesso essa non venga considerata e trattata. D'altra parte sempre nuovi metodi di laboratorio consentono di definire i diversi stadi, i meccanismi fisiopatogenetici, la diagnosi differenziale delle anemie. In particolare la diagnosi della carenza di ferro (ID) nei suoi stadi prelatente (deplezione dei depositi), latente (eritropoiesi ferrocarente o carenza funzionale) e manifesto (anemia sideropenica - IDA) e la diagnosi differenziale con la anemia da malattie croniche (ACD) si sono arricchite nel tempo di misure sofisticate biochimiche, ferritina e recettori solubili della transferina (sTfR), ed ematologiche, indici eritrocitari e reticolocitari. L'approccio di Christian e Lothar Thomas^{59,60} consente, in presenza di anemia, con un plot definito dal contenuto in emoglobina dei reticolociti (Ret-He), espresso come CHr o Ret-Y, e dal rapporto tra sTfR e logaritmo della concentrazione di ferritina (log Ferritin) di individuare situazioni ferrocarenziali normali come nell'80% delle ACD, situazioni di ID carente, situazioni di carenza funzionale e situazioni di IDA classica, secondo parametri diversificati sulla base dello stato infiammatorio (proteina C reattiva < o > 5 mg/L). Soprattutto, il plot che integra i dati biochimici consente di definire l'opportuna terapia - ferro orale nelle situazione di ID latente o conclamato (IDA), ferro orale più eritropoietina umana ricombinante (r-Hu-EPO) nella carenza funzionale e r-HU-EPO nelle ACD - e il suo adeguato monitoraggio e la sua modulazione durante il follow-up.

5. La logica diagnostica della Ematologia di Laboratorio

"L'ematologo di laboratorio si trova in un punto chiave dell'iter diagnostico dell'anomalia ematologica: a lui spettano la valutazione morfologica del sangue periferico e del midollo osseo in relazione con la fisiopatologia e la clinica, la correlazione tra morfologia e i suggerimenti diagnostici degli strumenti ematologici di cui deve conoscere affidabilità tecnica e potenzialità diagnostiche, la valutazione citochimica e dell'immunofenotipo come appropriato completamento degli aspetti diagnostici e prognostici, l'approfondimento diagnostico con tecniche specialistiche quali le ricerche di biologia molecolare e genetiche, il monitoraggio della storia naturale della malattia e degli effetti non solo ematologici della terapia".

Questa descrizione del ruolo dell'ematologo di laboratorio espressa nel 1990, al momento della formazione del

Gruppo di Studio in Ematologia della SIMeL (GdS-E SIMeL), è ancora valida, seppur con qualche aggiustamento relativo alla modifica dei rapporti di priorità di alcuni metodi – nuovi (citogenetica) o rinnovati (biochimica) – in alcune diagnostiche ematologiche.

Il concetto fondamentale è quello di una metodologia d'approccio al paziente ematologico, non all'esame emocromocitometrico, seppur nella comune carenza di notizie cliniche, partendo dagli strumenti che comunemente sono disponibili, cioè la morfologia ottica e strumentale, e dalla loro intelligente integrazione secondo i criteri della metodologia diagnostica clinica, passando attraverso la validazione "sample and patient oriented" comprendente gli opportuni approfondimenti, per approdare alla comunicazioni dei risultati in forma e contenuto più efficaci possibile.

Le basi di conoscenza

Questa metodologia si basa sulla conoscenza dell'ematologia clinica, indispensabile per avere presente il quadro di riferimento, ma in generale della medicina clinica, per l'importanza sottolineata della "ematologia non ematologica". La conoscenza della morfologia deve riposare sullo studio dei percorsi storici e dei grandi ematologi "visuali" dei 120 anni passati ma deve arricchirsi delle informazioni che continuamente fioriscono in letteratura su aspetti anche considerati ormai definiti (come affrontare le "ombre di Gumprecht"⁶¹; le immagini extra ed intra citoplasmatiche delle crioglobuline⁶²; l'ultimo e sempre definitivo parere sulle band cells⁶³; le correlazioni morfo-citogenetiche¹⁹, e così via). Essa non può ovviamente limitarsi al sangue periferico ma estendersi allo studio dell'aspirato midollare e dei liquidi biologici che possono essere interessati dalla patologia ematologica.

Così la conoscenza degli analizzatori deve essere profonda nel loro funzionamento metodologico e tecnico, per comprendere la loro prestazione, l'origine dei "flag", la loro sensibilità e specificità. Solo in questo modo si possono evitare i bias interpretativi in morfologia rispetto al "corrispettivo" strumentale. E tuttavia va ricordato come proprio i dati degli analizzatori convinsero dell'esistenza delle eritrocitosi microcitiche tipiche dei trait talassemici o delle reali concentrazioni di monociti circolanti nel sangue periferico. D'altra parte le maggiori discordanze tra strumenti e morfologia sono relativi ad elementi mal definiti morfologicamente. In ogni caso si può concordare con Hoffmann⁶⁴ quando sostiene che la pratica corrente è quella di usare i flag come trigger della revisione microscopica a prescindere dalla dimostrata utilità clinica, mentre invece dovrebbe essere il quesito clinico la motivazione per la revisione del morfologo. Una adeguata integrazione dei trigger (strumentale e clinico) garantisce l'affidabilità generale dell'esame ematologico, calato nello specifico mix di popolazione esaminata e dei diversi setting clinici.

La letteratura e i dati personali mostrano la delicatezza della specificità nel riconoscimento cellulare e della definizione degli allarmi strumentali nella efficiency complessiva della procedura. Se nel 1990⁴² viene riportato un tasso di falsi positivi (strisci esaminati sulla base dei dati ed allarmi strumentali senza patologie od anomalie morfologiche) tra 8-15%, nel 2005 il Gruppo di Consenso internazionale per

le Revisioni Ematologiche⁴⁴ segnala un dato di 18.60%. La quantità degli strisci da controllare, in una realtà americana, oscilla tra il 5% di un medio ospedale non specialistico a prevalente attività per pazienti ambulatoriali e il 30% di un ospedale di riferimento dotato di oncologia, neonatologia, terapie intensive e centro trapianti⁴⁵. Non dissimili, anche se meno elevati (2-20%), sono i dati provenienti dalla realtà italiana (GdS-E SIMeL. Dati non pubblicati 2001). Controlli troppo numerosi possono mettere in dubbio i vantaggi dell'automazione e sollevano il problema dei criteri di revisione, bilanciando la gravità delle conseguenze nell'ignorare specifici allarmi e il grado di impegno profuso in un'attività così "time and labor consuming" e ad elevata percentuale di inefficacia. L'elemento essenziale è la scelta dei limiti tollerabili di segnali ed allarmi, che non può che provenire dal loro accurato studio e dall'esperienza, meglio se disseminata. I sistemi automatici di selezione, se non comprensivi di notizie anagrafiche, ed anamnestiche possono risolversi in revisioni schematiche e ridondanti.

Il processo di validazione

Il processo di validazione dei dati emocromocitometrici è andato mutando nel tempo. Il percorso tradizionale in Italia è costituito da un passaggio di selezione congiunto dei dati numerici e degli allarmi strumentali con l'analisi dei grafici ed istogrammi (morfologia strumentale) secondo criteri spesso non scritti e comunque spesso lasciati all'interpretazione discrezionale del laureato. Il secondo passaggio è la preparazione e coloritura dello striscio a cui segue la sua lettura. L'esame morfologico porta al rifiuto dei risultati, oppure alla loro conferma e rilascio, oppure alla loro modifica ed interpretazione, eventualmente con commento aggiuntivo. Oggi, alla luce dei cambiamenti professionali e delle possibilità tecnologiche strumentali ed elettroniche, il processo di validazione deve prevedere una valutazione dei dati strumentali secondo criteri definiti ed incorporati nei software specifici e comprendenti non solo dati numerici ed allarmi ma anche dati biologici trasversali e longitudinali e clinici (anagrafica, provenienza, precedenti e possibilmente ragione della richiesta, seppur schematicamente definita in diagnosi, monitoraggio, screening). Ciò determina il rilascio automatico dei dati che passano il setaccio dei criteri di valutazione. In caso contrario il campione è avviato ad una valutazione tecnica "sample-oriented" comprendente l'analisi fisica del campione, l'analisi dei dati grezzi e dei grafici strumentali e l'analisi dello striscio, a seconda delle problematiche presenti. La validazione tecnica può portare al rifiuto del campione, al rilascio dei risultati, alla ripetizione (eventualmente con diversa metodologia) e/o al controllo morfologico. La validazione morfologica può essere susseguente quella tecnica ma può anche originare direttamente dalla "morfologia strumentale", quando patognomonica o suggestiva di specifiche emopatie, della quale comunque non può fare a meno, oppure direttamente dalla richiesta e/o dalle notizie cliniche. L'esame morfologico può condurre al rilascio dei risultati dopo la valutazione comparata dello striscio e delle notizie strumentali, pesate nella loro sensibilità e specificità nel singolo caso, oppure al rilascio con l'integrazione dei risultati ottenuti con la microscopia ottica e/o con commenti diagnostici o di suggerimento desunti dal comples-

so armamentario diagnostico di laboratorio, se contemporaneamente richiesto, oppure, infine, all'approfondimento secondo protocolli proattivi, come per esempio nella tipizzazione delle monoclonalità linfocitarie e proteiche, nella ricerca dello specifico agente infettivo causa delle alterazioni morfologiche, nella definizione di una emoglobina patologica o del quadro metabolico degli elementi nutrizionali dell'eritrono. In ogni caso la validazione morfologica è "patient-oriented".

In ambiente americano, dove il processo di validazione è stato sempre affidato ai "technologists" di livello superiore e dove il trigger per il controllo microscopico si traduce in una formula tradizionale sostitutiva di quella automatica, ma anche dove per molto tempo si è contrapposto lo "scan" dello striscio da parte del tecnico alla "formula" strumentale in termini di efficienza ed economicità, recentemente si sono levate voci per precisare l'affidabilità delle conte strumentali anche nella maggior parte delle situazioni "allarmate"³⁵, l'opportunità e l'efficienza di una verifica delle situazioni selezionate tramite un rapido "scan" del vetrino da cui decidere se rilasciare o ulteriormente commentare⁶⁵, ed infine la sottolineatura da parte di un Committee of College of American Pathologists⁶⁶ della necessità della revisione morfologica da parte di un medico, almeno in alcune situazioni cliniche e strumentali (al primo esame: presenza di blasti e displasia, indici o morfologia eritrocitaria fortemente alterati, inclusioni citoplasmatiche o intranucleari nelle diverse serie cellulari circolanti, sospetto di microrganismi circolanti; nel monitoraggio: persistenza delle alterazioni cellulari o parassitarie), tenendo conto della popolazione di pazienti, della dotazione strumentale e della qualità del personale tecnico e laureato. Il razionale dell'opinione espressa dal Comitato del CAP sta nel miglioramento dell'inquadramento diagnostico e dell'intervento clinico.

La comunicazione dei risultati

L'insieme delle attività di integrazione dei dati delle morfologie strumentali ed ottiche, del processo di validazione e degli approfondimenti proattivi deve essere guidato dall'obiettivo clinico di un referto "espressivo", cioè che si fa comprendere e risponde al quesito clinico, anche quando inesperto come nelle situazioni di "case-finding" o di inatteso risultato laboratoristico. Per tale ragione gli approfondimenti diagnostici quali l'immunofenotipizzazione e, quando disponibile, la citogenetica o la diagnostica molecolare devono essere "riflessivi" piuttosto che "riflessi", mediati cioè dall'interpretazione alla luce del problema clinico piuttosto che automaticamente attuati secondo procedure standard. E, ancora, non possono limitarsi ai metodi strettamente ematologici per risolvere i problemi della "ematologia non ematologica".

La comunicazione al curante dei risultati salienti ematologici avviene di norma attraverso il "referto ematologico", talora con un rapporto diretto, che se difficilmente assume le vesti esplicite e formali della "consulenza" quasi sempre ha le caratteristiche della "curbside consultation". Si pensi, per esempio, all'informazione proattiva al curante di dati ematologici inaspettati di un suo paziente, che vengono descritti, interpretati (talora con l'ausilio di approfondimenti) e resi adeguati per una diretta decisione clinica (invio allo

specialista; ricovero urgente; trattamento).

Le caratteristiche del "referto"⁶⁷ e del "referto ematologico"⁶⁸ sono state altrove delineate. Le Linee Guida per la costruzione del Referto Ematologico del GdS-E SIMeL, il cui draft è stato pubblicato alla fine del 2002⁶⁸, poggiano sui principi anzidetti del riferimento alla clinica, dell'integrazione dei dati, degli approfondimenti proattivi ed infine sulla selezione dei risultati sicuramente diagnostici, sull'espressione in commento dei dati aggiuntivi, sulla standardizzazione dei risultati e della terminologia. In quegli anni 2 lavori americani rafforzano le opinioni italiane. Nel 2001 Hookey et al⁶⁹ mostrano l'assoluta necessità della standardizzazione dell'espressione dei risultati, analizzando la variabilità di lettura dello stesso preparato da parte di 31 tecnici ma soprattutto la variabilità di interpretazione di 32 medici curanti del medesimo commento ematologico. Il termine "presente" relativo alla quantità di anomalie eritrocitarie viene percepito in modo oscillante da "più di nessuno" a "quasi tutti" e con una media intorno al 40% delle cellule esaminate. Nel 2002 Linda Sandhaus e Pamela Meyer⁷⁰ analizzano quali sono i parametri ematologici utilizzati frequentemente dai clinici: solo 4 e cioè emoglobina, ematocrito, piastrine e leucociti. La rilevazione si presta a diverse riflessioni ed almeno 2 sono rilevanti. La prima indica chiaramente la necessità di semplificazione e di "espressività" dei risultati utilizzabili dal curante, che altrimenti rischia il soffocamento intellettuale. La seconda evidenzia la insufficiente attenzione dei clinici verso l'efficacia dei dati ematologici: mantiene inopinatamente valore l'ematocrito, retaggio dei tempi in cui era misurato direttamente e più facilmente ed accuratamente dell'emoglobina, mentre non sono apprezzati reticolociti e frazioni. Questa ritardata consapevolezza dei clinici rispetto al valore intrinseco dei parametri è forse da imputare ad una carente informazione e "formazione" da parte del Laboratorio? Il maggior gradimento dei commenti morfologici rispetto ai cd parametri di Wintrobe sembra rafforzare sia l'interpretazione che la supposizione. In questo senso vanno anche i risultati della survey sulle attività interpretative in ematologia di laboratorio, recentemente pubblicate da Michael Laposata⁷¹.

I compiti dell'ematologo di laboratorio

In questa logica diagnostica, l'ematologo di laboratorio ha diversi compiti che si intrecciano. Innanzitutto è il candidato principale per la valutazione strumentale nella concreta pratica clinica: sia degli aspetti più tecnici, che della validazione delle nuove conte od allarmi nelle popolazioni dei pazienti e dei sani, dei livelli di riferimento e della variabilità biologica, che infine di quegli aspetti di valore aggiunto, al di là dell'affidabilità strumentale, della "morfologia strumentale". In secondo luogo i limiti strumentali e le nuove scoperte possono indirizzare l'industria a fornire allarmi e conteggi adeguati alle necessità cliniche. Più spesso le possibilità intrinseche della filosofia strumentale prescelta e le forze del mercato determinano i trend tecnologici, ma il peso del corpo scientifico non è da sottovalutare. In terzo luogo il compito di mediatore tra il laboratorio ed il mondo clinico che si estrinseca nell'interpretazione del "referto" per il singolo paziente e nella pratica dell'appropriatezza nei rapporti con i curanti, nel concetto di appropriatezza

za non confinato alla selezione dei test ma esteso all'intero percorso richiesta-risposta per rispondere adeguatamente al quesito clinico. Ciò enfatizza la frontiera comunicativa dell'ematologia di laboratorio e del Laboratorio in generale.

Robert Hillman⁷², venerando ematologo, afferma, commentando il lavoro del CAP "Physician review of the peripheral blood smear: when and why?" e notando lo iato tra clinica e laboratorio, ma condividendo la necessità di integrare tutte le informazioni cliniche e laboratoristiche per supportare il processo diagnostico: "The answer would seem to rest in a return to an old culture — routine visits by the clinician to the laboratory to meet with the clinical pathologist, sit at a double-headed scope, and review cases from both the clinical and laboratory perspective. Anything less than such a routine interaction runs the risk of a missed diagnosis, a mistake in management, or at least a failure to properly plan additional laboratory studies".

Mentre Bernard Howen¹, insigne laboratorista, ribadisce: "New levels of comfort and trust can emerge as clinicians see lab results that lead directly to better health outcomes, and as laboratorians learn not just what information physicians want but why they need it. Fostering this collaborative spirit is not often easy. In some cases, new avenues of communication have to be opened and then maintained. But the chance for close alignment that improves lives is too great not to make the extra effort. Such teamwork must be built on trust, which begins with reliable, timely lab information.

Part of the laboratorian's role to educate clinicians about the usefulness of certain parameters. At the same time, laboratorians need to eliminate tests that have no clinical relevance - ones being run for their own comfort or out of tradition".

L'importanza della comunicazione e della rete relazionale dell'ematologia di laboratorio era ben chiara ancora nel 1990 al GdS-E SIMeL: "Infatti, l'ematologo di laboratorio si trova al centro di una molteplicità di rapporti interpersonali: il contatto con il paziente, così frequente soprattutto nelle realtà periferiche; il colloquio con il medico di medicina generale (MMG) di cui è un consulente specialistico, soprattutto in assenza di ematologi clinici; il rapporto con l'ematologo clinico di riferimento a cui spesso indirizzare pazienti e MMG; il collegamento con gli specialisti di branca di volta in volta coinvolti (anatomico-patologo, citogenetista, biologo molecolare...)"

Anche le necessità formative in ematologia del medico di laboratorio nascono dal suo ruolo centrale nella diagnostica ematologia quotidiana e, pertanto, la *mission* del GdS-E è quella di promuovere lo studio e la conoscenza dell'ematologia di laboratorio all'interno e all'esterno della SIMeL, di formare medici di laboratorio esperti nella diagnostica ematologica in grado di interpretare quel ruolo nodale nell'iter diagnostico precedentemente descritto, di consolidare alcuni contenuti quali la standardizzazione delle metodiche, il pieno utilizzo dei vantaggi e dei suggerimenti diagnostici della tecnologia, l'appropriatezza delle richieste e dei percorsi diagnostici attraverso linee-guida e referti interpretativi, di trasmettere, in conclusione, una metodologia di approccio la paziente con problemi ematologici

fondata su solide basi scientifiche e comprensiva della complessità degli aspetti coinvolti.

Bibliografia

- Houwen B. White blood cell morphology in the balance. *Lab Hematol* 2005;11:79-82.
- Bain JB. Diagnosis from the Blood Smear. *N Engl J Med* 2005;353:498-507.
- Shattli SJ. A (blood) smear campaign. *Blood* 2003;101:2453.
- Kaushansky K. Celebrate hematology. *Blood* 2002;100:4257-8.
- Abramson N. Inside blood: a picture (in the microscope) is worth a thousand words. *Blood* 2004;103:367-8.
- Ehrlich P. Beitrag zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Arch Mikr Anat.* 1877;13:263-77.
- Premuda L. Storia della Medicina. Padova: CEDAM;1975.
- Monod J. Il caso e la necessità. Milano:Arnoldo Mondadori Editore;1970.
- Bessis M. Cellules du sang, Normal et pathologique. Paris:Masson et C;1972.
- Bessis M, Mel H. Hematology without the microscope. *Blood Cells* 1975;1:401-5.
- Bessis M. Réinterprétation des frottis sanguins. Berlin:Springer-Verlag;1980.
- Bennet JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DA, Gralnick MR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias: French-American-British Cooperative Group. *Br J Haematol* 1976;33:451-8.
- Catovsky D, Matutes E, Buccheri V, Shetty V, Honship J, Yoshida N, et al. A classification of acute leukemia for the 1990s. *Ann Hematol* 1991;62:16-21.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposal for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995;9:1783-6.
- Thalhammer-Scherrer R, Mitterbauer G, Simonitsch I, Jaeger U, Lechner K, Schneider B, Fonatsch C, Schwarzeninger I. The immunophenotype of 325 Adult Acute Leukemias. Relationship to morphologic and molecular classification and proposal for a minimal screening program highly predictive for lineage discrimination. *Am J Clin Pathol* 2002;117:380-9.
- Bennet JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DA, Gralnick MR, et al. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7): a report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Int Med* 1985;103:460-2.
- Bloomfield CD, Brunning RD. FAB M7: Acute Megakaryoblastic Leukemia – Beyond Morphology. *Ann Int Med* 1985;103:450-2.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001. World Health Organization Classification of Tumours.
- Arber DA. Realistic pathologic classification of acute

- myeloid leukemias. *Am J Clin Pathol.* 2001;115:552-60.
20. Wintrobe MM. The clinician's expectation of the laboratory in the remote and recent past and in the future. In *Advances in automated analysis*. Technicon International Congress 1976. Terrytown (NY): Mediad Inc.; 1977.
 21. Leeuwenhoek A. Microscopical Observations. *Philos Trans R Soc Lond.* 1674;9:121-8.
 22. Binet JL. Historical notes on quantitative blood cell measurements. *Blood Cells* 1980;6:407-11.
 23. Ball P. *Colore: una biografia*. Milano: RCS Libri;2001.
 24. Coulter WH. High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Proc National Electronics Conf.* 1956;12:1034-40.
 25. Mansberg HP, Saunders AM, Groner W. The Hemalog D white cell differential system. *J Histochem Cytochem.* 1974;22:711-24.
 26. Lippi U, Bellavite P, Schinella M, Nicoli M, Lippi G. High light scatter by neutrophils in the Bayer-Technicon H*2 analyzer: a screening test of morphologically detective responsiveness to in vitro chemotactic stimulation. *Eur J Clin Chem Biochem* 1994;32:11-7.
 27. Stachon A, Holland-Lentz T, Krieg M. High in-hospital mortality of intensive care patients with nucleated red blood cells in blood. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:933-8.
 28. Tatsumi N, Pierre RV. Automated image processing: past, present, and future of blood cell morphology identification. *Clin Lab Med* 2002;22:299-315.
 29. Krantz A, Bengtsson H-I, Casey JE, Keefe JM, Beatrice GH, Grzybek DY, et al. Performance evaluation of the CellaVision DM96 system. WBC differentials by automated digital image analysis supported by an artificial neural network. *Am J Clin Pathol* 2005; 124:770-81.
 30. Rümke CL. The statistically expected variability in differential leukocyte counting. In Koepke JA ed. *Differential Leukocyte Counting*. Skokie (IL): College of American Pathologists;1979.
 31. Hänseler E, Fehr J, Keller H. Estimation of the lower limits of manual and automated platelet counting. *Am J Clin Pathol* 1996;105:782-7.
 32. Segal HC, Briggs C, Kunka S, Casbard A, Harrison P, Machin SJ, et al. Accuracy of platelet counting haematology analysers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusion. *Br J Haem* 2005;128:520-5.
 33. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Reference Leukocyte Differential Count (Proportional) and evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard. NCCLS, Villanova (PA); 1992;document H20-A, Vol. 12.
 34. Hubl W, Tlustos L, Erath A, Andert S, Bayer PM. Proposed reference method for peripheral-blood monocyte counting using fluorescence-labelled monoclonal antibodies. *Cytometry* 1996;26:69-74.
 35. Pierre RV. The demise of eyecount leukocyte differential. *Clin Lab Med* 2002;22:279-97.
 36. Koepke JA, Dotson MA, Shifman MA. A critical evaluation of the manual/visual differential leukocyte counting method. *Blood Cells* 1985;11:137-40.
 37. Cornbleet J. Spurious results from automated hematology cell counters. *Lab Med* 1983;14:509-14.
 38. Cappelletti P, Pasini L, Doretto P, Briani G. Pitfall e pseudopitfall in citochimica automatizzata. In Chirillo R ed. *Citochimica Automatizzata*. Treviso: 3° Incontro Club Utilizzatori Hemalog D e H6000;1986.
 39. Ross DW, Bardwell A. Automated cytochemistry and the blood cell differential in leukemia. *Blood Cells* 1980;6:455-70.
 40. Rümke CL. Statistical reflections on finding atypical cells. *Blood Cells* 1985;11:141-4.
 41. Buttarello M, Gadotti M, Lorenz C, Toffalori E, Ceschini N, Valentini A, Rizzotti P. Evaluation of four automated hematology analyzers. *Am J Clin Pathol* 1992;97:345-52.
 42. Krause JR. Automated differential in the Hematology Laboratory. *Am J Clin Pathol* 1990;93(Suppl 1):S11-S16.
 43. Hoyer JD, Fisher CP, Soppa VM, Lantis KL, Handon CA. Detection and classification of acute leukemia by the Coulter STKS hematology analyzer. *Am J Clin Pathol* 1996;106:352-8.
 44. Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E. The international Consensus Group for Hematology Review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol* 2005;11:83-90.
 45. Ward PCJ. The CBC at the turn of the millennium: an overview. *Clin Chem* 2000;46:1215-20.
 46. Houwen B. The differential cell count. *Lab Hematol* 2001;7:89-100.
 47. van der Meer W, Scott CS, de Keijzer MH. Automated flagging influences the inconsistency and bias of band cell and atypical lymphocyte morphological differentials. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:371-7.
 48. Adam LR, Kamensky LA. Fluorometric characterization of six classes of human leukocytes. *Acta Cytol* 1974;18:389-91.
 49. Nagel T. Com'è essere un pipistrello? In De Palma A, Pareti G. *Mente e corpo. Dai dilemmi della filosofia alle ipotesi delle neuroscienze*. Torino: Bollati Boringhieri ed.; 2004.
 50. Kluin-Nelemans JC, van Wering ER, van't Veer MB, van der Schotte CE, Adriaansen HJ, van der Burgh FJ et al. Pitfalls in the immunophenotyping of leukaemia and leukaemic lymphomas: survey of 9 years of quality control in the Netherlands. *Br J Haematol* 1996;95:692-9.
 51. Shapiro HM. "Cellular Astronomy" – a foreseeable future in cytometry. *Cytometry* 2004;60A;115-24.
 52. Jay V. Paul Ehrlich. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125: 724-5.
 53. Bain JB. Sixty years of haematology. *J Clin Pathol* 2005;58:789-90.
 54. Bennet JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DA, Gralnick MR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: a report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Int Med* 1985;103:626-9.
 55. Arber DA, Stein AS, Carter NH, Ilke D, Forman SJ,

- Slovak ML. Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. *Am J Clin Pathol* 2003;119:672-80.
56. Germing U, Gattereman N, Strupp C, Aivado M, Aul C. Validation of the WHO proposal for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leukemia Research* 2000;24:983-92.
57. Nissenson AR, Goodnough LT, Dubois RW. Anemia. Not just as innocent bystander? *Arch Intern Med* 2003;163:1400-3.
58. Ania BJ, Suman VJ, Fairbanks VF, Rademacher DM, Melton LJ. Incidence of anemia in older people: an epidemiologic study in a well-defined population. *J Am Geriatr Soc* 1997;45:825-31.
59. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem* 2002;48:1066-76.
60. Thomas C, Thomas L. Anemia of chronic disease: pathophysiology and laboratory diagnosis. *Lab Hematol* 2005;11:14-23.
61. Macdonald D, Richardson H, Ruby A. Reporting of Smudge Cells. *Arch Pathol Lab Med* 2003;157:105.
62. Maitra A, Ward PCJ, Kroft SH et al. Cytoplasmic Inclusions in Leukocytes. An Unusual Manifestation of Cryoglobulinemia. *Am J Clin Pathol* 2000;113:107-12.
63. Cornbleet PJ. The clinical utility of the bands count. *Clin Lab Med* 2002;22:101-36.
64. Hoffmann JJM. How useful are haematology analyzer flags? *Clin Chem Lab Med* 2004;42:357-8.
65. Lantis KL, Harris RJ, Davis G, Renner N, Finn WG. Elimination of instrument-driven reflex manual differential leukocyte counts. *Am J Clin Pathol* 2003;119:652-62.
66. Peterson P, Blomberg DJ, Rabinovitch A, Cornbleet PJ, for the Hematology and Clinical Microscopy Resource Committee of the College of American Pathologists. Physician review of the peripheral blood smear: when and why. An opinion. *Lab Hematol* 2001;7:175-9.
67. Cappelletti P. Il "referto" in Medicina di Laboratorio. *RML JML* 2004;3:197-208.
68. Cappelletti P. Linee guida per il referto ematologico. *RML JML* 2002;3-S1:87-93.
69. Hookey L, Dexter D, Lee DH. The use and interpretation of quantitative terminology in reporting of red blood cell morphology. *Lab Hematol* 2001;7:85-8.
70. Sandhaus LM, Meyer P. How useful are CBC and reticulocyte reports to clinicians? *Am J Clin Pathol* 2002;118:787-93.
71. Laposata ME, Laposata M, Van Cott EM, Buchner DS, Kashalo MS, Dighe AS. Physician survey of a Laboratory Medicine Interpretive Service and evaluation of the influence of interpretations on laboratory test ordering.
72. Hillman R. Blood smear interpretation: how about the "by whom". *Lab Hematol* 2001;7:174.