RIMeL / IJLaM 2007; 3 (Suppl.)

Piastrinopenie: il punto di vista del Laboratorio

P. Doretto, P. Cappelletti

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

Riassunto

Lo screening laboratoristico delle piastrinopenie (conta piastrinica <150.000/μL) deve inizialmente prevedere una conta piastrinica automatizzata precisa ed accurata e l'utilizzo di informazioni e parametri strumentali aggiuntivi. Nonostante i miglioramenti strumentali basati sull'integrazione del principio impedenziometrico con lo scatter di luce e la citofluorimetria, la lettura ottica bidimensionale e nuovi algoritmi di calcolo l'accuratezza nel conteggio piastrinico rimane una sfida. La proposta di un nuovo metodo di riferimento immunologico citofluorimetrico da parte dell'ICSH nel 2001 ha rappresentato un notevole passo avanti nel conteggio piastrinico. Tuttavia le performance strumentali a basse conte piastriniche non soddisfano ancora le necessità cliniche (soglia trasfusionale piastrinica profilattica <10.000/μL). L'esame dello striscio periferico oltre a confermare la piastrinopenia permette di evidenziare anomalie morfologiche piastriniche che possono indirizzare verso piastrinopenie congenite o piastrinopatie. Se la clinica e l'assenza di anomalie morfologiche indirizzano verso una piastrinopenia autoimmune è utile lo screening autoimmune e virale. Il dosaggio degli anticorpi antipiastrine presenta ancora problemi di specificità e soprattutto sensibilità e va riservato alle forme atipiche o dubbie. In questo caso per differenziare tra una piastrinopenia da aumentata distruzione da quella da ridotta produzione si può eseguire il conteggio citofluorimentrico delle piastrine reticolate, la determinazione della glicocalicina e della trombopoietina. In presenza di anomalie morfologiche leucocitarie ed eritrocitarie e/o di aspetti clinici suggestivi di altre patologie ematologiche, si potrà prevedere l'esame del midollo osseo o altri accertamenti specifici.

Summary

Thrombocytopenia: the role of clinical laboratory

The laboratory workup of thrombocytopenia (PLT <150.000/μL) should start with an automatic precise and accurate count, supported by instrumental information as well as additional parameters. In spite of instrumental improvement, based on the integration of the impedance principle along with the light-scatter and cytofluorimetric methods, bidimensional optic measurements and new computation algorithms, still the accuracy of platelets count represent a real challenge. The introduction of a new method based on immunologic-cytofluorometric reference, presented by ICSH in 2001, is considered to be a great step towards a more precise platelets count. However, the instrumental performance in low platelets count does not satisfy the clinical necessities, if that the prophylactic platelets transfusion threshold is <10.000/μL. Besides confirming thrombocytopenia, the examination of the peripheral blood smear allows the diagnosis of platelets morphologic abnormalities that could lead to congenital thrombocytopenias or thrombocytopathies. If the clinical picture and the absence of morphologic abnormalities should lead to autoimmune thrombocytopenia, then autoimmune screening tests and viral tests are warranted. The antiplatelets antibodies assays present specificity limitations and more sensitivity problems, and should be reserved only for atypical or complicate forms. In this specific case, in order to differentiate between thrombocytopenias due to increased destruction vs those due to decreased production, cytofluorimetric count of reticulated forms, as well as glycocalicin and thrombopoietin determination could be performed. Whenever leukocyte and erythrocyte morphologic abnormalities are detected, along with clinical pictures suggestive for other hematologic pathologies, a bone marrow biopsy coupled to other specific tests should be taken into account.

Ricevuto: 20-08-2007 Pubblicato on-line: 12-09-2007

Corrispondenza a: Dott. Paolo Doretto, SOC di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli", Via Montereale n. 24, 33170 Pordenone. Tel. 0434-399321, fax 0434-399906, e-mail paolo.doretto@aopn.fvg.it

Definizione di piastrinopenia

Per piastrinopenia si intende un conteggio piastrinico nel sangue periferico inferiore a 150.000/μL, generalmente considerato il limite inferiore dell'intervallo di riferimento per gli adulti. Una riduzione moderata e generalmente incompresa del conteggio piastrinico (riduzione della media e del 2,5 percentile del 10%) si verifica durante la gravidanza, solitamente nel terzo trimestre; questa può portare a una "fisiologica " piastrinopenia, che rappresenta una variante meno pronunciata della trombocitopenia gestazionale o incidentale, che è la più comune piastrinopenia in gravidanza, con range piastrinici solitamente tra le 110.000 e le 150.000/μL[1]. E' stata trovata una variazione stagionale del conteggio piastrinico, con valori più bassi nel periodo invernale, mediamente di poco superiori a 5.000/mL. Nella trombocitopenia immune da eparina (HIT) la trombocitopenia è definita come una conta piastrinica <100.000/μL o, nei pazienti chirurgici, anche come una riduzione relativa del conteggio piastrinico ≥ 50% del picco postoperatorio.

Intervalli di riferimento e livelli decisionali

Diversi fattori rendono difficile valutare il significato clinico di una piastrinopenia soprattutto se lieve o moderata. Gli studi sulla variabilità biologica anche recenti hanno evidenziato come la variabilità intraindividuale sia molto più piccola di quella interindividuale, rispettivamente 3,8% e 12,2%, dati 2002 del Gruppo di studio in Ematologia della SIMeL (GdS-E-SIMeL), rendendo di scarsa utilità l'utilizzo degli intervalli di riferimento per il conteggio piastrinico (indice di individualità di Harris variabile da 0,28 a 0,39 a seconda delle casistiche). La relazione inversa non lineare osservata tra il conteggio piastrinico e il volume piastrinico medio suggerisce che la massa piastrinica totale rimanga relativamente stabile per conteggi inferiori alle 200.000/μL. E' osservazione comune che non esiste una stretta correlazione tra conteggio piastrinico e comparsa di manifestazioni emorragiche. Alcuni pazienti con piastrinopenia marcata non presentano sanguinamento mentre altri per valori piastrinici più elevati hanno manifestazioni emorragiche, verosimilmente per differenze funzionali tra le piastrine dei diversi pazienti. Oltre al numero delle piastrine il rischio di sanguinamento dipende dalla causa di piastrinopenia, da patologie concomitanti (anemia, febbre, sepsi..) e dall'uso di farmaci.

E' opinione comune che livelli piastrinici superiori a 50.000/μL siano sufficienti per garantire l'emostasi in corso di interventi chirurgici, se la funzionalità piastrinica è normale. Gravi emorragie sono rare con piastrine superiori a 20.000/μL. Tale livello piastrinico ha per decenni rappresentato il livello decisionale per il ricorso a trasfusioni piastiniche a scopo profilattico. Questo sulla base di un vecchio studio pubblicato all'inizio degli anni '60[2] in cui in realtà non veniva suggerita alcuna soglia profilattica, in un periodo storico in cui si faceva largo uso di aspirina a scopo antipiretico e analgesico senza conoscerne compiutamente gli effetti sull'emostasi. Sulla base della revisione dei lavori di letteratura pubblicati negli anni '90 ed in particolare dell'iniziale lavoro di Gmur et al. del 1991[3] e di Rebulla et al. nel 1997[4] per il GIMEMA (Gruppo Italiano per lo studio delle Malattie Ematologiche dell'Adulto),

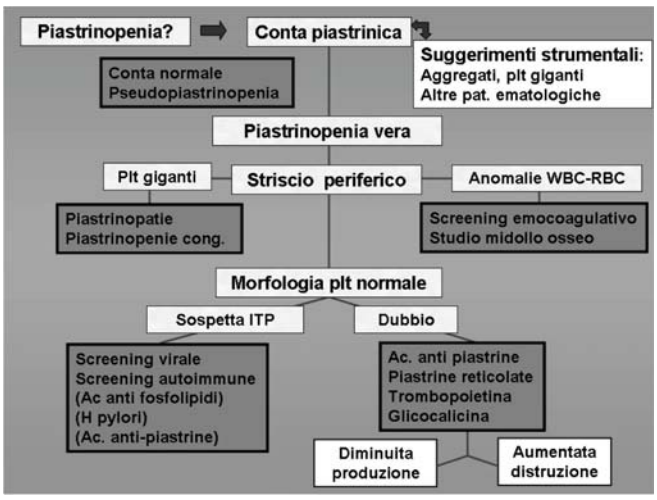

Figura 1. Work-up diagnostico in caso di sospetta piastrinopenia.

entrambi su una coorte di pazienti leucemici, si propose in una Consensus Conference on Platelet Trasfusion tenutasi ad Edinburgo nel 1997 di abbassare la soglia per la trasfusione piastrinica profilattica a 10.000/μL in pazienti stabili e di riservare soglie superiori solo in situazioni specifiche: 20.000/μL in presenza di terapia eparinica, disordini significativi della coagulazione, puntura lombare, biopsia osteomidollare; 30.000/μL per inserzione di catetere per accesso venoso centrale; 50.000/μL per interventi chirurgici minori[5]. Nel 2001 l'American Society of Clinical Oncology ha proposto le proprie linee guida per la trasfusione piastrinica profilattica nei pazienti oncologici che prevedono in particolare nei tumori solidi una soglia anche inferiore a 10.000/μL tranne che nei pazienti sottoposti a chemioterapia aggressiva per neoplasia della vescica o in caso di tumori necrotici. Nel 2003 le linee guida per le indicazioni alle trasfusioni piastriniche del British Committee for Standard in Hematology hanno confermato la soglia di 10.000/μL in pazienti non a rischio (grado B, livello Ib) con possibilità di abbassarla a 5.000/μL se c'è la preoccupazione che l'alloimmunizzazione possa portare alla refrattarietà piastrinica (grado B, livello IIa).

Approccio laboratoristico alla piastrinopenia

Lo screening delle piastrinopenia deve tener conto delle possibili cause: ridotta produzione (mielofibrosi, infiltrazione midollare neoplastica, ipoplasia midollare da radiazioni, farmaci, infezioni, alcool...), aumentata distruzione (porpore trombocitopeniche immunologiche) o aumentato consumo (porpora di Mosckowitz, CID, sepsi da gram-), sequestro (splenomegalia). Il work-up diagnostico completo (Fig. 1) deve inizialmente prevedere, oltre alla valutazione clinica adeguata, una conta piastrinica automatizzata accurata e precisa e deve tener conto delle ulteriori informazioni e suggerimenti che gli analizzatori ematologici automatizzati possono fornire (allarmi, pitfall o pseudopitfalls, citogrammi, istogrammi, indici piastrinici o altri parametri eventualmente forniti).

Il secondo step prevede l'esame dello striscio periferico per escludere una pseudopiastrinopenia e per la valutazione della morfologia piastrinica (il riscontro di piastrine giganti indirizza verso piastrinopenie ereditarie o piastrino-

patie) e di ogni altra alterazione morfologica eritrocitaria o leucocitaria, suggestiva di processi patologici specifici. Sulla base di tali indicazioni e se la clinica indirizza per una diagnosi di trombocitopenia immune è utile eseguire uno screening autoimmune e virale (epatiti, HIV, CMV, HCV..) per escludere una malattia sottostante.

In presenza di anomalie morfologiche o aspetti clinici suggestivi di diagnosi ematologiche alternative, ulteriori accertamenti possono comprendere lo screening emocoagulativo (per le microangiopatie), il dosaggio anticorpi antifosfolipidi, la ricerca dell'Helicobacter pylori e il puntato sternale e/o la biopsia ossea con valutazione clonale e citogenetica (per le mielodisplasie e le sindromi linfo e mieloproliferative). Nei casi complicati o dubbi la differenziazione tra una piastrinopenia centrale (da diminuita produzione) e una piastrinopenia periferica (da aumentata distruzione) può prevedere il dosaggio degli anticorpi antipiastrine, ed eventualmente ulteriori indagini particolari e non di routine quali e il conteggio delle piastrine reticolate e la determinazione della glicocalicina e della trombopoietina.

Conteggio piastrinico

1. Evoluzione della tecnologia

Storicamente i primi metodi per il conteggio piastrinico furono quelli indiretti (Fonio 1912, Demasheck 1932) in cui i globuli rossi venivano contati direttamente e determinato il rapporto con le piastrine in uno striscio di sangue colorato, a cui sono seguiti i metodi diretti microscopici in camera inizialmente a luce normale (Rees-Ecker, 1923) e poi in contrasto di fase (Breker-Cronkite, 1953). Si sono quindi sviluppati i metodi diretti semiautomatici su plasma ricco di piastrine (PRP) (Bull, 1965) per poi passare ai metodi pienamente automatizzati su sangue in toto, dapprima su canale specifico e poi sullo stesso canale di conta dei globuli rossi, utilizzando il principio impedenziometrico, elettro-ottico e citofluorimetrico.

I metodi iniziali erano inaccurati ed imprecisi. Il metodo diretto manuale con microscopio a contrasto di fase è ancora riconosciuto dall' International Council for Standardization in Haematology (ICSH) come "gold standard" e fino a pochi anni per era utilizzato per la calibrazione degli analizzatori ematologici automatizzati e per la preparazione dei controlli di qualità commerciali. E' inoltre ampiamente utilizzato, in quanto poco costoso, semplice e proficuo, sia nei laboratori o centri di ricerca che non hanno accesso a strumentazione automatizzata sia nella routine laboratoristica in caso di basse conte piastiniche o in presenza di piastrine atipiche. Tuttavia se eseguito secondo il protocollo standardizzato (necessario ai fini dell'accuratezza) è un metodo dispendioso in termini di tempo, tedioso, soggettivo e altamente impreciso, con coefficiente di precisione (CV%) interosservatori variabile dal 10 al 25% che tende ad aumentare proporzionalmente al diminuire del numero delle piastrine.

L'introduzione negli anni '70 del conteggio piastrinico automatizzato con tecnologia impedenziometrica ha drammaticamente migliorato l'imprecisione, con CV <3% nel range di normalità, grazie all'elevato numero di piastrine contate. Il conteggio piastrinico automatizzato ha presentato e presenta tuttora delle problematiche analitiche che possono inficiare la precisione e l'accuratezza dei conteggi piastrinici (e che sono almeno in parte legate al conteggio nello stesso canale dei globuli rossi) quali l'errore di diluizione, l'errore di coincidenza e la separazione delle piastrine dagli eventi non piastrinici. La prediluizione del campione, elevata soprattutto nei contatori non dotati di focalizzazione idrodinamica, è necessaria per ridurre gli errori di coincidenza, ma aumenta l'imprecisione analitica per i piccoli numeri in gioco; di fatto la diluizione scelta nei più moderni analizzatori (Coulter LH-750 1:6250; Abbott Sapphire 1:32; Sismex XE 1:500 impedenziometrico, 1:204 ottico; Bayer ADVIA 1:625; Horiba ABX Pentra 1: 10000) rappresenta un compromesso tra l'esigenza di minimizzare gli errori e la necessaria precisione dei conteggi. L'errore di coincidenza, cioè il contemporaneo passaggio di due o più eventi nella camera di conta, può portare a false riduzioni nel conteggio piastrinico ed è dovuto non solo a piastrine coincidenti ma anche al passaggio contemporaneo di eritrociti che precedono o seguono una piastrina. Le coincidenze, non eliminabili, possono essere previste e quantificate teoricamente sulla base della concentrazione delle piastrine e delle emazie e, di fatto, sono corrette elettronicamente a posteriori in modo automatico dagli analizzatori. Tuttavia il principale problema in termini di accuratezza è rappresentato dalla necessità di discriminare correttamente le piastrine dagli altri elementi con lo stesso volume, cioè da una parte identificare correttamente le grandi piastrine rispetto alle emazie microcitiche e dall'altro separare le piastrine dal rumore elettrico di fondo rappresentato soprattutto da frammenti eritrocitari o leucocitari, ombre eritrocitarie, fibrina, immunocomplessi, particelle contaminanti. Si tratta di definire la cosiddetta finestra piastrina, lo spazio compreso tra due soglie volumetriche, una superiore e una inferiore che definisce la zona di conteggio piastrinico. Questo problema è particolarmente critico per gli analizzatori di tipo resistivo perché la discriminazione piastrinica si basa sull'analisi della dimensione cellulare ed è influenzata dal fattore forma. Il problema è stato affrontato in modi diversi dai vari costruttori, sostanzialmente con aggiustamenti di tipo elettronico, con posizionamento di soglie fisse o mobili a vari livelli e con algoritmi di elaborazione degli impulsi alla base dei quali c'è sempre l'integrazione dei volumi piastrinici in una curva di distribuzione log-normale. Per tutti gli analizzatori il conteggio piastrinico è dato dal numero degli impulsi tra le due soglie volumetriche che abbiano una distribuzione log-normale moltiplicati per una costante dipendente dalla diluizione, dal volume analitico, dalle coincidenze e per il fattore di calibrazione.

Le principali interferenze nel conteggio piastrinico che portano a conte piastriniche falsamente aumentate sono rappresentate da particelle contaminanti che aumentano il rumore di fondo, frammenti leucocitari compresi frammenti apoptotici (come nelle leucemie e soprattutto nella leucemia linfatica cronica, nei pazienti in chemioterapia), frammenti eritrocitari (come nelle anemie emolitiche, nella coagulazione intravascolare disseminata, nelle microangiopatie trombotiche, nelle protesi valvolari), crioglobuline, emazie microcitiche, parassiti e miceti. Conteggi piastrinici falsamente diminuiti sono dovuti a microcoaguli, alla presenza di piastrine giganti che escono dal gate di conta, ad

aggregazione piastrinica o ad adesione delle piastrine ai leucociti (satellitismo).

2. Le pseudotrombocitopenie

Il termine di pseudotrombocitopenia (PTCP), coniato da Gowland nel 1969 per indicare le piastrinopenie EDTA dipendenti, si riferisce ad un fenomeno che accade solo in vitro, immediatamente o a distanza di tempo dal prelievo, dovuto ad aggregazione o a satellitismo piastrinico e che porta a conte piastriniche falsamente basse e talora a pseudoleucocitosi[6]. Le PTCP hanno una frequenza variabile dallo 0.07% allo 0.1% delle determinazioni ematologiche. Possono essere sospettate dalla mancata associazione con il quadro clinico di trombocitopenia, da valori piastrinici diversi in conteggi successivi e dai segnali sui citogrammi strumentali. Le PTCP sono prevalentemente dei reperti occasionali in soggetti clinicamente sani, ma possono talora associarsi a malattie autoimmuni, neoplasie solide, leucemie e linfomi, epatopatie acute e croniche, crioglobulinemie. Pragmaticamente le PTCP sono suddivise in EDTA e non EDTA dipendenti. Queste ultime sono le più frequenti e sono dovute essenzialmente a manovre improprie del prelievo (prelievo indaginoso, protratta permanenza del sangue non anticoagulato in siringa) o di anticoagulazione (anticoagulante insufficiente, effetti controversi dell'eparina), meno frequentemente da satellitismo piastrinico, con aderenza delle piastrine ai polimorfonucleati o ai monociti mediata da anticorpi IgG e dalla presenza di agglutinine a frigore (anticorpi agglutinanti IgM). Le PTCP EDTA dipendenti si riscontrano esclusivamente o prevalentemente in campioni anticoagulati con EDTA. Riconoscono un meccanismo autoimmune: l'EDTA con il suo effetto calcio chelante induce dei cambiamenti di carica elettrica sulla superficie piastrinica, esteriorizzando e modificando il complesso glicoproteico (GP) IIb/IIIa con esposizione di epitopi reattivi ad autoanticorpi piastrinici circolanti, quasi esclusivamente IgG. Le PTCP EDTA indotte non presentano significative o peculiari associazioni con ben definite patologie. Le PTCP vanno sempre riconosciute per evitare orientamenti diagnostici e terapeutici scorretti. La diagnosi di laboratorio si basa sull'analisi dei dati strumentali (allarmi, anomalie negli istogrammi piastrinici o leucocitari o nei citogrammi dei conteggi leucocitari differenziali), sul limitato effetto protettivo del tempo (conteggio immediato dopo prelievo e ad intervalli successivi) e della temperatura (esecuzione a temperatura ambiente e a 37°C) e sull'esame microscopico per osservare gli eventuali aggregati. Poiché la diagnosi di PCTP può essere posta solo se il reperto è presente in due prelievi successivi, è necessaria la ripetizione del prelievo anche con altro anticoagulante per confermare le forme EDTA dipendenti. L'anticoagulante di scelta è il CPT che oltre a fornire accurati conteggi piastrinici fornisce valori emocromocitometrici (CBC) correlabili a quelli ottenuti con EDTA.

3. Performance tecnologiche e necessità cliniche

L'abbassamento della soglia di trasfusione piastrinica profilattica alla fine degli anni '90, se da una parte ha comportato una drastica riduzione dei costi, della ricerca di donatori e dei casi di allo immunizzazione nei trasfusi, dall'altro ha portato la necessità, ai fini di una più appropriata decisione clinica, di conteggi piastrinici più precisi e soprattutto più accurati con i metodi automatizzati, visti i ben noti limiti del conteggio manuale in camera.

Per i conteggi automatizzati nel range di normalità l'*imprecisione* ha da tempo raggiunto un CV <3% (2,4% nello studio di Pordenone del GdS-E-SIMeL). Utilizzando le specifiche di qualità basate sulla variabilità biologica, lo stato dell'arte ci dice che nel range piastrinico di normalità la variabilità analitica (CV medio 2,4%) raggiunge ampiamente il livello ottimale per lo screening, mentre non raggiunge il livello di qualità desiderabile per i monitoraggi. Tuttavia ai livelli piastrinici normali ciò è clinicamente irrilevante; situazione più problematica nelle piastrinopenie spinte. Alle soglie trasfusionali di 10.000/μL e 20.000/μL l'imprecisione espressa come ampiezza dell'intervallo di confidenza varia a seconda delle tecnologie utilizzate da 4.4 a 5.8 e da 4.0 a 5.0 rispettivamente; questo significa che ad una conta piastrinica vera di 20.000/μL il range di conta può variare da 14.700 a 21.700/μL e a 10.000/μL da 4.500 a 11.600/μL[7]. Più importante e tuttora esistente è il problema dell'identificazione delle "vere" piastrine. Per valori <20.000/μL l'*accuratezza* dei conteggi piastrinici con i metodi impedenziometrici si riduce per problemi di natura statistica, per i pochi eventi analizzati e per la maggiore influenza del background elettrico e delle particelle non piastriniche. Questo può portare a differenti risultati analizzando lo stesso campione su differenti analizzatori impedenziometrici sia per differenze nei metodi d'analisi, sia per una diversa linearità, sia per il numero di cellule contate. Questi problemi sono stati affrontati cercando un miglioramento a livello strumentale e un vero nuovo metodo di riferimento che sostituisse il conteggio manuale. I nuovi trend strumentali sono stati la combinazione/convergenza di principi di citometria a flusso, quali lo scatter di luce laser e la focalizzazione idrodinamica, con la tecnologia impedenziometrica che ha facilitato la determinazione simultanea dei parametri di scatter e di fluorescenza delle piastrine (Abbott CD 4000 e Sapphire; Sysmex XE 2100); il perfezionamento del principio ottico con la misura integrata di parametri diversi dipendenti dai diversi angoli di misura adottati per una migliore separazione delle piastrine degli eventi non piastrinici e quindi un miglioramento dell'accuratezza (Bayer ADVIA; Abbott CD 4000 e Sapphire); il conteggio piastrinico immunologico citofluorimetrico automatizzato con anticorpo monoclonale anti piastrinico CD61 (Abbott CD 4000 e Sapphire); nuove e più specifiche strategie di gating e nuovi algoritmi di calcolo (Coulter LH 750); il proliferare di informazioni aggiuntive (piastrine giganti, ombre eritrocitarie, frazione piastrinica immatura, componente piastrinica media..). Nonostante l'introduzione di questi nuovi metodi ci sono ancora situazioni in cui l'accuratezza nel conteggio piastrinico rimane una sfida.

Il crescente interesse nello sviluppo di una migliore *procedura di riferimento* per ottimizzare il conteggio piastrinico automatizzato ha portato nel 2001 l'ICSH e International Society of Laboratory Hematology (ISLH) a proporre un nuovo metodo da usarsi per la calibrazione con sangue intero dei contatori cellulari e per l'assegnazione dei valori ai materiali di calibrazione[8]. Questo metodo di basa sul

conteggio piastrinico indiretto immunologico con anticorpo monoclonale fluorescente (CD41 e CD61) e determinazione con citofluorimetro del RBC/plt; successivo calcolo delle piastrine dopo accurato conteggio dei RBC con analizzatore semiautomatico monocanale non focalizzato. I principali vantaggi di questo metodo sono l'eliminazione del problema delle coincidenze, visto l'elevata diluizione del campione, e un conteggio indipendente da errori di pipettamento e da artefatti da diluizione. Il livello di precisione si è dimostrato eccellente e superiore al metodo manuale di riferimento anche nei campioni piastrinopenici (CV <5%); notevole è l'accuratezza anche a basso conteggio, superiore ai metodi automatizzati soprattutto impedenziometrici, senza sovrastima delle piastrine (non essendo interferito da rumori di fondo o debris) e sottostima (contando accuratamente le grandi piastrine).

Lo sviluppo di un metodo immunologico citofluorimetrico, ratificato e proposto dall'ICSH come metodo di riferimento, ha rappresentato il maggior progresso per il conteggio piastrinico. L'assegnazione di valori più accurati ai calibranti e ai controlli di qualità aiuterà a migliorare la calibrazione degli analizzatori ematologici. Inoltre la disponibilità di questo rapido metodo ha facilitato lo studio e il confronto sull'accuratezza dei conteggi piastrinici dei vari strumenti ematologici presenti sul mercato e il suo impatto sulle decisioni cliniche. Un ampio studio multicentrico che ha valutato l'inaccuratezza dei conteggi piastrinici automatizzati nelle trombocitopenie severe (plt <20.000/μL) rispetto al nuovo metodo di riferimento citofluorimetrico, ha dimostrato che tutti degli strumenti tranne uno sovrastimano i conteggi (mediamente da 1.200 a 3.800/μL) e hanno un CV alto a livello della soglia piastrinica profilattica, con differenze tra gli stessi strumenti di diversi laboratori[9]. Diversamente da studi precedenti che avevano utilizzato come metodi di riferimento il conteggio manuale, i metodi ottici non si sono dimostrati superiori ai metodi impedenziometrici. Il metodo più accurato è quello immunologico automatizzato con anticorpo fluorescente CD61. L'inaccuratezza a bassi conteggi è ancora presente e si sente la necessità di controlli di qualità esterni per migliorare la calibrazione strumentale a basse conte piastriniche. La sottotrasfusione piastrinica, legata alla sovrastima dei conteggi, senza apparentemente aumentati rischi di sanguinamento, può far pensare alla possibilità di una rivalutazione della soglia piastrinica trasfusionale, ma senza l'ampia disponibilità di metodi routinari di conteggio precisi ed accurati per conte tra 5.000 e 15.000/μL è attualmente improponibile. Lo sviluppo futuro è l'implementazione del conteggio piastrinico immunologico citofluorimetrico come metodo di riferimento definitivo per la calibrazione degli strumenti, per l'assegnazione del valore ai calibratori, per lo sviluppo di controlli di qualità esterni che valutino l'accuratezza del conteggio nelle piastrinopenie e per il conteggio piastrinico diretto che porti ad un referto affidabile nei bassi conteggi piastrinici tale da rendere i clinici confidenti nelle loro scelte terapeutiche o trasfusionali nelle piastrinopenie.

Parametri strumentali aggiuntivi

Tutti gli analizzatori ematologici automatizzati forniscono istogrammi e citogrammi bidimensionali relativi ai volumi o ad altre misurazioni piastriniche: questi possono associarsi ad eventuali allarmi quantitativi o morfologici quali piastrine giganti, aggregati piastrinici o altro che possono essere utili nell'indirizzare verso un sospetto diagnostico e che vanno comunque confermati dalla valutazione morfologica dello striscio di sangue periferico. Sulla base del conteggio piastrinico e dell'istogramma della distribuzione dei volumi piastrinici tutti gli analizzatori forniscono i cosiddetti indici piastrinici: il volume piastrinico medio (MPV), l'ampiezza della distribuzione dei volumi piastrinici (RDW) e il piastrinocrito (Pct). L'interesse verso gli indici piastrinici, iniziato negli anni '80, si deve alla loro possibile applicazione clinica per la correlazione tra alcune attività e funzioni piastriniche e sindromi o alterazioni patologiche caratterizzate da variazioni di tali parametri. Il Pct, prodotto del conteggio piastrinico per l'MPV, rappresentando la frazione percentuale di sangue occupata dalle piastrine, riflette la massa piastrinica e quindi la massa emostaticamente attiva: potrebbe essere usato per valutare meglio il rischio emorragico. Tuttavia risulta poco affidabile per il doppio errore inerente il conteggio piastrinico e l'MPV da un lato e l'espressione in decimali dall'altro. Del PDW è stata sottolineata la validità nell'evidenziare l'anisocitosi piastrinica nelle sindromi mieloproliferative croniche e nelle mielodisplasie. Tuttavia è calcolato in modo non omogeneo tra metodi e strumenti con lo stesso metodo: CV% per Bayer ADVIA e Sysmex XE 2100, deviazione standard moltiplicata per una costante per Coulter LH 750 e Abbott CD 4000 e Sapphire, larghezza della curva di distribuzione misurata ad una altezza pari al 20% del valore modale per Sysmex XE 2100, ampiezza della curva compresa tra due soglie meno il 15% del numero delle piastrine per Horiba ABX Pentra. Un indice simile è la percentuale delle grandi piastrine (P-LCR) fornito da Sysmex XE 2100 che è il numero di cellule contate al di sopra di una soglia fissa posta a 12 fL diviso per numero totale delle piastrine. Un valore del 20-40% è espressione dell'aumentato turnover piastrinico e si visto essere associato a distruzione immunologia periferica delle piastrine.

Il parametro che ha avuto maggior fortuna è stato *MPV* la cui utilità clinica è legata alla differenziazione tra piastrinopenie da aumentata distruzione o periferiche da quelle da diminuita produzione o centrali o ipoplastiche, alla valutazione del rischio emorragico (valore predittivo per bassi valori) e trombotico (aumentati valori come fattore di rischio nell'infarto miocardio, diabete, ictus, preeclampsia)[10]. Il fervore è andato scemando quando si sono notati gli effetti deleteri dell'EDTA, anticoagulante di routine, sulla determinazione degli indici piastrinici. L' EDTA induce un rigonfiamento delle piastrine con modificazione del volume e quindi della forma, ma anche dell'indice di rifrazione interno che porta a valori di MPV diversi e variabili nel tempo, talora in senso opposto a seconda del principio analitico utilizzato (impedenziomatrico/ottico). Vari studi hanno dimostrato che le modificazioni di MPV indotte da EDTA sono del tutto imprevedibili, con oscillazioni artefattuali variabili dal 2% al 50%[11]. Anche il modello matematico proposto per correggere le variazioni nel tempo di MPV che tendono a stabilizzarsi alla terza ora, è limitato dal riscontro di una ipersensibilità all'EDTA in una percentuale non indifferente di soggetti. L'utilizzo di anticoa-

gulanti alternativi è limitato, ad eccezione del CPT, dal non poterli usare per la misura degli altri parametri emocromocitometrici. Per quanto ancora recentemente riproposti per la diagnosi differenziale tra trombocitopenie da aumentata distruzione e quelle da ridotta produzione, l'utilizzo clinico degli indici piastrinici risulta problematico in quanto dipendente dal metodo strumentale, dal trattamento del campione (scelta dell'anticoagulante) e dalla mancanza di un sicuro metodo di riferimento. Il GdS-E-SIMeL raccomanda di non refertare gli indici piastrinici.

La lettura dello scatter di luce a doppio angolo sugli strumenti Bayer ADVIA permette di rilevare contemporaneamente i valori relativi al volume e al cosiddetto indice di rifrazione che misura la concentrazione globale dei componenti all'interno della piastrina. La concentrazione della componente piastrinica media (*MPC*) rappresenta il valore medio del relativo istogramma di distribuzione e correla con lo stato di attivazione piastrinica. L'attivazione piastrinica è stata implicata nella patogenesi di numerose patologie quali infarto miocardio, diabete, Alzhaimer, preeclampsia, malattie infiammatorie intestinali, nefropatie, malattie mieloproliferative. MPC è stato indicato come test di screening utile per studiare il processo di attivazione piastrinica (correla inversamente con l'espressione di P-selectina sulla superficie piastrinica) e quindi potenzialmente applicabile al monitoraggio di pazienti a rischio trombotico o emorragico[12]. Tuttavia la misura di MPC richiede l'utilizzo di un anticoagulante e di un protocollo che assicuri che le piastrine siano sfericizzate e che il loro stato di attivazione non venga alterato in vitro.

Un nuovo metodo automatizzato per la quantificazione delle piastrine reticolate o piastrine giovani ed espresso come frazione piastrinica immatura (*IPF*) viene fornito con un software aggiornato da Sysmex XE 2100. Dopo colorazione con un colorante polimetinico e con l'oxazina la lettura viene fatta in citometria a flusso nello stesso canale di lettura dei reticolociti, e vengono rilevate le misure relative al contenuto in RNA (intensità di fluorescenza) e al volume (forward scatter). L'utilità clinica è stata dimostrata nella diagnosi e nel monitoraggio delle trombocitopenia: IPF aumenta nelle malattie con aumentata distruzione o consumo piastrinico (in particolare le trombocitopenie autoimmuni e la porpora trombotica trombocitopenia) mentre si riduce nell'insufficienza midollare[13]. Inoltre si è visto che la risalita di IPF precede la risalita del conteggio piastrinico nella maggior parte dei pazienti sottoposti a chemioterapia e nei trapiantati.

Valutazione dello striscio periferico

Non c'è consenso sui criteri da adottare per la revisione microscopica dei campioni ematologici con piastrinopenia rilevata dagli strumenti. I limiti di azione sono generalmente posti a valori compresi tra piastrine <100.000/μL e piastrine <50.000/μL e alla presenza di allarmi specifici. Tali differenze dipendono principalmente dalla popolazione prevalentemente analizzata nel laboratorio e dai limiti di delta-check utilizzati. L'esame del vetrino è importante per confermare la piastrinopenia ed escludere una pseudotrombocitopenia da aggregati piastrinici sia EDTA che non EDTA dipendenti. La valutazione della morfologia piastrinica è utile per indirizzare verso una forma immune (anisocitosi associata o meno a grandi piastrine) o verso una forma ereditaria (piastrine giganti compatibili con la sindrome di Bernard-Soulier, difetti del gene MYH9 quali la sindrome di May-Hegglin, la macrotrombocitopenia mediterranea; piastrine degranulate con la sindrome delle piastrine grige; piastrine molto piccole con la sindrome di Wiskott-Aldrich). L'esame morfologico va esteso alla ricerca di anomalie eritrocitarie (anisocitosi, micromacrocitosi, policromasia, schistociti, cheratociti) e leucocitarie (forme immature, inclusi citoplasmatici come i corpi di Döhle, ipersegmentazione) che possono associarsi a diverse condizioni cliniche quali leucemie acute e croniche, sindromi mielodisplastiche, anemia megaloblastica, anemia emolitica, microangiopatie, CID.

Determinazione degli anticorpi antipiastrine

Sono stati sviluppati tre tipi di test per la determinazione degli autoanticorpi antipiastrine per la diagnostica della porpora trombocitopenica idiopatica (ITP). I test di Fase I sono test indiretti in cui il siero del paziente è incubato con piastrine del donatore. Non sono né sensibili né specifici e pertanto di nessuna utilità diagnostica per la ITP. I test di Fase II sono test diretti che misurano le IgG associate alla superficie piastrinica (PAIgG) o altri anticorpi legati alla membrana piastrinica. Possono essere misurati con differenti metodi, in genere in immunofluorescenza (PIFT). Per quanto livelli aumentati si riscontrino nella maggior parte dei pazienti con ITP, non sono sufficientemente sensibili o specifici: sono elevati sia nelle trombocitopenie immuni che non immuni (es. setticemia). Secondo le linee guida della British Society for Haematology non è giustificato il loro uso nella diagnosi di ITP non complicata (grado III)[14]. I test di Fase III misurano autoanticorpi diretti contro glicoproteine specifiche piastriniche. Le tecniche più usate sono l'immunoblotting, l'immunoprecipitazione e i test di immobilizzazione delle glicoproteine, di cui i più usati sono il MACA, il MAIPA e il PAICA. Il test di immunoblot ha bassa sensibilità e specificità non ottimale. Il test di immunoprecipitazione può essere utile per identificare nuovi antigeni piastrinici, ma ha bassa sensibilità. I test di immobilizzazione delle glicoproteine specifiche piastriniche (GPIIb/IIIa e GPIb/IX) sono più specifici (fino al 90%). Tuttavia la positività si riscontra anche in quelle situazioni di trombocitopenia non immune quali le epatopatie croniche e le sindromi mielodisplastiche nelle quali dovrebbero essere di maggiore aiuto. Hanno una sensibilità (50-60%) tale da non poter escludere una diagnosi di ITP e una inadeguata riproducibilità interlaboratorio. La positività a tali anticorpi sembra correlare con la necessità di una terapia più intensiva ed anche con una aumentata frequenza di ricoveri ospedalieri per sanguinamento. Sebbene possano essere utili nella distinzione tra una trombocitopenia immune e non immune in casi complessi, atipici o sintomatici, il loro uso routinario non è giustificato per la diagnosi di ITP (livello IV, grado C)[14]. La determinazione degli anticorpi antipiastrine ha valore negli adulti con insufficienza midollare associata a trombocitopenia immuno-mediata, nella ITP refrattaria alla terapia di prima e seconda linea ed in alcune situazioni (rare) quali le gammopatie monoclonali e la tromboastenia acquisita anticorpo-mediata[14].

La determinazione degli anticorpi contro il complesso eparina/fattore piastrinico 4 può aiutare a confermare la diagnosi di HIT, che si basa su criteri clinici. Poiché tali anticorpi inducono trombocitopenia per effetto dell'attivazione piastrinica, i metodi utilizzati per determinarli sono sia funzionali (o di attivazione) sia immunologici[15]. I test funzionali utilizzano piastrine da donatore lavate e incubate con eparina e siero del paziente. Il test di rilascio di serotonina è considerato il "gold standard" per caratterizzare gli anticorpi della HIT, ma è complesso e comporta la marcatura piastrinica con composti radioattivi. Test di routine meglio disponibili sono il test di attivazione piastrinica indotta da eparina (HIPA) e il test luminescente valutati con aggregometro e i test cifluorimetrici di generazione di microparticelle o dell'espressione di annessina V. Si tratta di test indaginosi e che non possono essere utilizzati in urgenza. I test immunologici usano antigeni target legati a superfici (complessi PF4/eparina o PF4/polivinilsulfato). Il test più utile nel work-up diagnostico dei pazienti con sospetta HIT è il test di agglutinazione al gel. Questi test sono rapidi e ampiamente disponibili, ma mancano di specificità. Risultati falsamente positivi si hanno fino al 2% dei controlli normali, nel 4% di donne in gravidanza, nell'8% di malati non esposti ad eparina. Inoltre dal 30% al 50% dei pazienti in terapia eparinica sviluppano tali anticorpi senza avere segni clinici o laboratoristici di HIT. I risultati di tali test vanno sempre interpretati alla luce dei dati clinici e della probabilità pretest di una HIT. Una buona sensibilità (<5%) si ottiene combinando un test funzionale con uno antigenico.

Nelle severe piastrinopenie indotte da antagonisti della GPIIb/IIIa (abciximab, eptifibatide e tirofibam) utilizzati nel trattamento delle sindromi coronariche acute va esclusa la possibilità di una pseudotrombocitopenia (2% circa dei pazienti trattati con abciximab). Mediante citofluorimetria e tecnica MAIPA si sono trovati anticorpi abciximab-dipendenti nel 94% di pazienti con trombocitopenia in terapia con tale farmaco. Tuttavia tali test risultavano positivi in una percentuale variabile dal 10 al 17% dei controlli normali[16]. Mediante la citofluorimetria è possibile il monitoraggio della terapia con antagonisti della GPIIb/IIIa. Abciximab legandosi in vivo alla GPIIb/IIIa inibisce il legame dell'anticorpo fluorescente specifico per tale glicoproteina piastrinica. L'intensità di fluorescenza correla inversamente con il legame del farmaco alla GPIIb/IIIa.

Nelle piastrinopenie immuni indotte da farmaci test specifici per la determinazione di anticorpi farmaco indotti non sono facilmente disponibili. Le tecniche utilizzate sono quelle immunochimiche e citofluorimetriche. E' fondamentale l'utilizzo di appropriati controlli per l'accuratezza diagnostica. Si tratta di test non utilizzabili routinariamente né clinicamente validati. L'importanza clinica di un test negativo rimane incerta. Pertanto la diagnosi deve continuare a basarsi su criteri clinici.

Piastrine reticolate

Le determinazione citofluorimetrica delle piastrine reticolate è una metodica rapida che utilizza PRP e il colorante arancio di tiazolo. Come i reticolociti riflettono l'entità dell'eritropoiesi così le piastrine reticolate rifletto l'entità della megacariocitopoiesi midollare. Nei pazienti con iperdistruzione piastrinica come nell'ITP ci sono livelli percentuali più alti di piastrine reticolate che nei soggetti sani, mentre tali livelli sono più bassi nelle piastrinopenie da ridotta produzione piastrinica. La sensibilità e la specificità della percentuale delle piastrine reticolate nella diagnosi di iperdistruzione piastrinica è molto buona (85% e 86%, valore predittivo positivo 90%)[17]. La determinazione delle piastrine reticolate si è dimostrata utile come misura affidabile per ridurre la trasfusione profilattica dopo chemioterapia intensiva e per predire la risalita del conteggio piastrinico dopo chemioterapia. I limiti della determinazione delle piastrine reticolate sono rappresentati da problematiche tecniche (preparazione manuale precisa, determinazione della soglia di positività, imprecisione analitica, standardizzazione delle metodiche), dalla mancanza di un metodo di riferimento, dalla larga variabilità negli intervalli di riferimento e dalla mancanza di un ruolo diagnostico preciso che non ne raccomandano un uso corrente[14].

Trombopoietina e glicocalicina

I limiti della determinazione citofluorimetrica delle piastrine reticolate ha spinto alla ricerca di nuovi marker di valutazione della trombopoiesi e/o del turnover piastrinico. La misura della concentrazione plasmatica di trombopoietina (TPO), il principale regolatore della produzione piastrinica, è stata proposta a partire dalla fine degli anni '90 come utile marker per la differenziazione delle trombocitopenie. Nei pazienti con ipoplasia midollare i livelli plasmatici di TPO sono significativamente aumentati mentre non sono elevati o solo lievemente elevati nei pazienti con ITP[18]. I metodi utilizzati sono immunoenzimatici (ELISA) e utilizzano PPP. La glicocalicina (GC), porzione esterna della subunità alfa della GPIb, è stata proposta come marker di turnover piastrinico. I livelli plasmatici di GC (misurabili con metodi immunoradiometrici o immunoenzimatici) sono significativamente ridotti nei pazienti con piastrinopenia centrale, mentre non lo sono nei pazienti con megacariociti normali o aumentati. Poiché è stata trovata una buona correlazione tra conta piastrinica e livelli di GC in soggetti con normale turnover piastrinico, l'indice di GC (rapporto tra la GC plasmatica e la conta piastrinica) è stato introdotto per valutare la percentuale di distruzione piastrinica. Infatti l'indice di GC è elevato nei pazienti con ITP e con microangiopatia trombotica, ma non nei soggetti normali e nelle piastrinopenia da aplasia midollare[19]. Nei pazienti con ITP i livelli correlano con l'attività della malattia. La determinazione simultanea delle percentuale di piastrine reticolate e dei livelli plasmatici di TPO ha il maggior significato diagnostico nel differenziare tra piastrinopenia da aumentata distruzione e quella da ridotta produzione, mentre sembra di minor valore diagnostico la misura della GC e dell'indice di GC[17].

Bibliografia

1. McCrae KR, Bussel JB, Mannucci PM, Remuzzi G, Cines DB. Platelets: an update on diagnosis and management of thrombocytopenic disorders. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2001:282-305.
2. Gaydos LA, Freireich EJ, Mantel M. The quantitative relation between platelet count and hemorrhage inpatients with acute leukemia. N Eng J Med 1962;266:905909.
3. Gmur J, Burger J, Schanz U, FehrvJ, Schnaffner A. Safety of

stringent prophylactic platelet transfusion policy for patients with acute leukemia. Lancet 1991;338:498-502.
4. Rebulla P, Finazzi G, Marangoni F, Avvisati G, Gugliotta L, Barbui T, et al. The treshold for prophylactic platelet tranfusion in adults with acute myeloid leukemia. N Eng J Med 1997;337:1870-5.
5. Ancliff PJ, Machin SJ. Trigger factors for prophylactic platelet transfusion. Blood Rev 1998;12:234-8.
6. Lippi U, Schinella M, Biasioli B. Le pseudotrombocitopenie. Progr Med Lab 1991;5:81-98.
7. Sandhaus LM, Osei ES, Agrawal NN, Dillman CA, Myerson HJ. Platelet counting by the Coulter LH 750, Sysmex XE 2100 and ADVIA 120: a comparative analysis using the RBC/platelet ratio reference method. Am J Clin Pathol 2002;118:235-41.
8. ICSH. Platelet counting by the RBC/platelet ratio method: a reference method. Am J Clin Pathol 2001;115:460-4.
9. Harrison P, Sagal H, Briggs C, Murphy M, Machin S. Impact of immunological platelet counting (by the platelet/RBC ratio) on haematological practice. Cytometry. Part B, Clinical Cytometry 2005;67:1-5.
10. Threatte GA. Usefulness of mean platelet volume. Clin Lab Med 1993;13:937-50.
11. Lippi U, Schinella M, Modena N, Nicoli M. Unpredictable effects of K_3EDTA on mean platelet volume. Am J Clin Pathol 1987;87:391-3.
12. Macey MG, Carty E, Webb L, Chapman ES, Zelmanovic D, Okrongly D, et al. Use of mean platelet component to measure platelet activation on the ADVIA 120 haematology system. Cytometry 1999;38;250-5.
13. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. Br J Haematol 2004;126:93-9.
14. British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force. Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy. Br J Haematol 2003;120:574-96.
15. Warkentin TE. Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Thrombolysis 2000;10(Suppl 1): S21-S27.
16. Kroll H, Bresgen L, Giptner A, Thrombocytopenia due to the fibrinogen receptor antagonist abciximab may be caused by drug-dipendent antibodies. Ann Hematol 2000;79(Suppl.): Abstract V197.
17. Kurata Y, Hayashi S, Kiyoi T, Kosugi S, Kashiwagi H, Honda S, et al. Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycocalicin and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. Am J Clin Pathol 2001;115:656-64.
18. Ichikawa N, Ishida F, Shimodaira S. Tahara T, Kato T, Kitano T. Regulation of serum thrombopoietin levels by platelets and megakaryocytes in patients with aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. Thromb Haemost 1996; 76:156-60.
19. Steffan A, Pradella P, Cordiano P, Girolami A, De Marco L, Fabris F. Glycocalicin in the diagnosis and menagement of immune thrombocytopenia. Eur J Haematol 1998;61:77-83.