

IL MONITORAGGIO AMBULATORIALE DELLA TERAPIA ANTICOAGULANTE: CONFRONTO TRA UN METODO CAPILLARE E UN METODO TRADIZIONALE

G. Angelini¹, A. Pepe¹, T. Di Battista² e C. D'Amario¹

¹ Servizio di Patologia Clinica Ospedale Civile, Atri (TE); ² Dipartimento di Teoria Economica e Metodi Quantitativi Cattedra di Statistica Università G. D'Annunzio di Chieti

In quest'ultimo decennio è notevolmente aumentata la popolazione di pazienti in terapia anticoagulante in quanto l'invecchiamento della popolazione, l'aumento delle malattie croniche degenerative, le migliori conoscenze di fisiopatologia coagulativa e di farmacocinetica clinica, hanno allargato le indicazioni alla suddetta terapia. La stima attuale dei pazienti sottoposti alla terapia anticoagulante orale (TAO) è di oltre 600.000 persone. Il 50% di questi pazienti si autoprescrive la terapia dopo aver eseguito un test di laboratorio, il 15% viene seguito dai propri famigliari, il 20% dal medico di famiglia e/o dal cardiologo, mentre soltanto il 15% viene gestito in modo ottimale da un centro di sorveglianza federato alla FCSA (Federazione Centri Sorveglianza Anticoagulati), dove esegue il test di laboratorio con adeguamento terapeutico in tempo reale, monitoraggio delle complicanze (emorragie minori), educazione sanitaria (dieta, interazioni farmacologiche pericolose, ecc.) ed assistenza in corso di manovre diagnostiche e/o terapeutiche invasive (odontoiatria, endoscopia, ecc.).

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'utilità dei metodi su sangue capillare, in alternativa ai metodi tradizionali su sangue venoso, al fine di accelerare l'esecuzione del test PT-INR in pazienti in terapia anticoagulante orale (TAO), in modo da poter monitorare l'efficacia terapeutica in tempo reale e a livello esclusivamente ambulatoriale.

MATERIALI E METODI

Sono stati studiati 31 pazienti in TAO (terapia anticoagulante orale) con prelievo venoso e contemporaneo prelievo capillare. Come metodo tradizionale è stato utilizzato il Sistema CA 6000 e reagenti (thromboplastin IS) della ditta DADE BERHING-Milano. I prelievi capillari venivano immediatamente dispensati sulle card per Sistema COAGUCHEK-PRO della ditta ROCHE-Milano (divisione point of care testing).

RISULTATI

I livelli di anticoagulazione espressi in INR, ottenuti con i due sistemi analitici, sono riportati in tabella n. 2. Per l'analisi statistica dei dati sono stati utilizzati tre metodi: analisi della regressione ($R^2 > 0.9$), test non parametrici per il confronto fra le medie, stima di densità di nucleo (Kernel). I risultati hanno evidenziato una sostanziale interscambiabilità delle due metodiche analitiche messe a confronto.

CONCLUSIONI

Il Sistema capillare COAGUCHEK-PRO si è dimostrato affidabile ed efficace nel monitorare a livello ambulatoriale i pazienti in TAO, dal momento che in pochi minuti è disponibile il dato INR con eventuale correzione del dosaggio farmacologico. Ci sembra comunque necessario possedere anche un sistema tradizionale per ricontrollare quei valori di INR di allarme, che impongono particolari livelli decisionali.

BIBLIOGRAFIA

G. Di Iorio, C. D'Amario, R. Passeri, R. Florindi. Terapia Anticoagulante Orale: nostra esperienza dopo due anni di monitoraggio. Med Lab. Vol. 5. N. 3, pp. 217-538, Ottobre 1997.

CORRELAZIONE TRA AUTOANTICORPI ANTI-COFATTORI DEI FOSFOLIPIDI E SINDROMI TROMBOTICHE.

A. Dardano, V. Fuduli, E. Fabiano, V. Celi

Cattedra ed U.O. di Patologia Clinica, DMSC, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi "Magna Græcia" Catanzaro.

Scopo del Lavoro

E' ancora da precisare l'associazione patogenetica, se esiste, tra la presenza di anticorpi anticardiolipina, anticorpi anticofattori e la sindrome primitiva da APS. Tra gli anticorpi anticofattori sembrano assumere un ruolo significativo quelli anti- β 2 glicoproteina I che, ad esempio, impedendo l'attivazione della proteina C, provocano una spiccata trombofilia e quelli prodotti nei confronti di differenti proteine della cascata coagulativa. In questo lavoro, riportiamo i dati della nostra valutazione sulla correlazione tra la presenza di anticorpi anti- β 2 GPI e di anticorpi anti-Protrombina, manifestazioni cliniche ed evolutività di quadri tromboembolici arteriosi e venosi.

Materiali e Metodi

In questo studio sono stati inseriti 40 pazienti, preselezionati sulla base della diagnosi clinica di tromboembolismo venoso od arterioso. In tutti i pazienti sono stati dosati i parametri coagulativi di base aPTT, PTT, ATIII, Fibrinogeno, D-Dimero e il sistema Proteina C-Proteina S (STA-C, Roche Diagnostic, Milano); gli autoanticorpi anticardiolipina (IgG ed IgM) utilizzando kit Elisa ORG 515 (Orgentec Diagnostika GmbH); gli autoanticorpi anti β -2 GPI (IgG, IgM) utilizzando kit Elisa ORG 521 (Orgentec Diagnostika GmbH); gli autoanticorpi IgG anti-Protrombina utilizzando un kit Elisa Bouty, Milano.

Risultati

Dei 40 pazienti arruolati in questo studio, 12 avevano valori al di sopra limiti di riferimento (5 U/ml) di autoanticorpi ACL. Di questi 8 avevano valori al di sopra dei limiti di riferimento (≥ 8 U/ml) di autoanticorpi anti β -2 GPI. Tra questi ultimi, 3 avevano valori al di sopra dei limiti di riferimento (10 U/ml) di autoanticorpi anti-Protrombina. Inoltre, altri 2 pazienti ACL positivi avevano valori elevati soltanto di anticorpi anti-Protrombina. Nei pazienti con elevati valori di autoanticorpi anti-Protrombina è stata riscontrata, costantemente, una attività biologica del sistema Proteina C-Proteina S marcatamente bassa. Tutti i nostri pazienti con valori elevati di autoanticorpi anti- β 2 GPI, mostravano oltre che ridotta attività della Proteina C-Proteina S, anche livelli plasmatici elevati di Fibrinogeno.

Discussione e Conclusioni

Sulla base dei dati da noi ottenuti in precedenza, era stato suggerito che non sembra esistere una differenza discriminante tra i pazienti che mostrano positività ai dosaggi di autoanticorpi APS ed ACL. Inoltre, era stato chiaramente, anche da noi, dimostrato che solo una quota parte minima di pazienti, tra quelli con valori elevati di autoanticorpi anti-ACL, con trombosi venose, mostrava valori elevati di anticorpi anti β 2 GPI.

Le evidenze cliniche ed i dati di laboratorio presentati in questo studio suggeriscono che è possibile distinguere, tra i pazienti anti-ACL positivi, affetti da trombosi a patogenesi autoimmune, quelli che con elevati valori di autoanticorpi anti β -2 GPI presentano prevalentemente trombosi venose e quelli che, con elevati valori di autoanticorpi anti-Protrombina presentano trombosi arteriose.

**ANNESSINA V:
UN MARCATORE DI DANNO ENDOTELIALE NELLE TROMBOSI ARTERIOSE**

Vera Fuduli, Maria Giuseppina Scarmozzino, Rosa Virelli, Rosaria Barbuto, Domenico Consoli *

Cattedra ed U.O. di Patologia Clinica, DMSC, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi "Magna Græcia" Catanzaro; U.O. Neurologia, A.O. Vibo Valentia*

Scopo del Lavoro

Annessina V, appartenente alla famiglia delle Annessine, è una proteina ad attività anticoagulante che sembra esercitare i suoi effetti biologici sull'endotelio vascolare, autoassemblandosi ordinatamente sui fosfolipidi di membrana a formare uno scudo protettivo antitrombotico. La proteina possiede interazioni ad alta affinità, calcio-dipendenti, con i fosfolipidi acidi di membrana e lega specificamente glicosaminoglicani, quali eparina ed eparansolfati, componenti maggiori dei proteoglicani di membrana. Nel modello funzionale attualmente accettato, i proteoglicani promuovono la localizzazione della Annessina V alla membrana cellulare e/o stabilizzano l'intero assemblaggio della molecola, favorendone le proprietà anticoagulanti. La presenza di autoanticorpi specifici, causano alterazioni strutturali e funzionali della molecola, provocano danno endoteliale e scatenano i fenomeni protrombotici. In questo studio riportiamo dati di laboratorio che, assieme alle evidenze cliniche, contribuiscono alla valutazione del ruolo dell'Annessina V nella patogenesi della trombosi arteriose

Materiali e Metodi

In questa fase dello studio sono stati arruolati 40 pazienti giovani adulti, di entrambi i sessi ed età compresa tra 20 e 50 anni. Tutti, al momento del ricovero, avevano un episodio di trombosi arteriosa o ne avevano avuto uno o più di uno negli ultimi tre anni. In tutti i pazienti sono stati dosati i parametri coagulativi di base aPTT, PTT, ATIII, Fibrinogeno, D-Dimero e il sistema Proteina C-Proteina S (STAC, Roche Diagnostic, Milano); gli autoanticorpi anti β -2 GPI (IgG, IgM) utilizzando kit Elisa ORG 521 (Orgentec Diagnostika GmbH); gli autoanticorpi IgG anti-Protrombina utilizzando un kit Elisa Bouty, Milano; gli autoanticorpi anti-Annessina V utilizzando un kit Elisa human anti-Annexin V 41EH0001 (Techno Genetics, Milano)

Risultati

I dati preliminari dimostrano una significativa concordanza tra la presenza di anticorpi anti-Annessina V e le manifestazioni cliniche. I pazienti con anticorpi anti-Annessina V sembrano rappresentare un gruppo omogeneo di soggetti nei quali l'insorgenza dell'episodio trombotico nel distretto arterioso è frequente in età giovanile.

Discussione e Conclusioni

I dati da noi ottenuti in precedenza dallo studio di pazienti con patologie trombotiche a patogenesi autoimmunitaria suggeriscono un algoritmo di laboratorio nel quale la positività agli autoanticorpi anti-ACL, potrebbe servire da indagine di base soprattutto nei pazienti con trombosi venose, e che questa popolazione di pazienti può essere valutata meglio, anche in termini prognostici, con la determinazione degli anticorpi anti β -2 GPI.

Le evidenze cliniche ed i dati di laboratorio presentati in questo studio suggeriscono che è possibile distinguere, tra i pazienti anti-ACL positivi, affetti da trombosi a patogenesi autoimmune, quelli che, con elevati valori di autoanticorpi anti-Annessina V, in relazione al danno endoteliale possono presentare episodi, anche ricorrenti, di trombosi arteriose sin dall'età giovanile.

ELEVATI LIVELLI DEL PRECURSORE DELLA FIBRINA NELLA MALATTIA CEREBROVASCOLARE DI NATURA CARDIOEMBOLICA.

D. De Lucia ^a, V. Del Giudice ^a, R. Marotta ^a, G. Maisto ^a, M. Laureano ^a, L. Rapacciuolo ^a, R. Quartucci ^a, M. Sorrentino ^a, M.L. Papa ^b, B. Talento ^c, R. Pisano ^c, G. Goffredi ^c.

^aIstituto di Patologia Generale ed Oncologia, II Università di Napoli. ^bLaboratorio di Emostasi e Trombosi, Divisione di Ematologia; Ospedale Pellegrini ; Napoli. ^cLaboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Oliveto Citra; Salerno.

Scopo dello studio

E' oramai accertato che uno degli eventi chiave nella formazione di un trombo intravasale è la trasformazione enzimatica del fibrinogeno circolante di natura solubile in polimeri di fibrina insolubili. Infatti, la conversione della protrombina in trombina consente il clivaggio peptidico del fibrinogeno in fibrinopeptide A. Questi complessi ottenuti dalla fibrina rappresentano un buon indice della attività trombinica circolante. Appena avvenuta la polimerizzazione del fibrinopeptide A, la trombina rimuove un'altro piccolo peptide, il fibrinopeptide B. Questo polimero solubile è l'immediato precursore plasmatico della fibrina insolubile ed è perciò definito TpP (precursore proteico del trombo/ thrombus precursor protein). Alti livelli di TpP sono stati ritrovati di recente nell'infarto del miocardio e nella angina instabile che precede episodi ischemici (Francis CW et al., 1992). Scopo del nostro studio era quello di dimostrare se anche nell'infarto cerebrale ischemico di natura atero-trombotica o cardioembolica vi fossero elevati livelli di TpP, capaci di evidenziare uno stato trombofilico.

Materiali e metodi

Abbiamo, perciò, selezionato 40 pazienti con stroke ischemico, 20 con diagnosi di stroke atero-trombotico e 20 con diagnosi di stroke cardio-embolico, e paragonato i livelli di TpP con 20 soggetti sani donatori di sangue, di uguale età, sesso, peso corporeo ed altezza. Il TpP è stato dosato con una metodica immunoenzimatica che impiega anticorpi monoclonali di tipo murino specifico per i polimeri di fibrina solubile (Italia Laboratori Bouty).

Risultati

Nei soggetti sani utilizzati come controllo e senza episodi di natura ischemica i livelli di TpP sono pari a $2.2 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$. Nei pazienti con stroke ischemico di natura aterotrombotica si osservavano valori significativamente elevati di TpP pari a $6.15 \pm 0.85 \mu\text{g/mL}$ ($p < .001$, Mann Withney U-test), mentre nel gruppo di pazienti con stroke cardioembolico i livelli erano ancora più elevati ($20.5 \pm 5.7 \mu\text{g/mL}$, $p < .0001$).

Conclusioni

Riteniamo che il TpP permetta la identificazione dei pazienti con incipiente trombosi in atto. Infatti, elevati livelli di TpP evidenziano la formazione di polimeri solubili di fibrina e perciò sono indice di trombosi in fase attiva. La diagnosi, quindi, precoce di trombosi cerebrale, con identificazione dei soggetti a rischio, dovrebbe ridurre significativamente la mortalità e la morbilità nei pazienti con stroke ischemico, e individuare sottogruppi di soggetti a più alto profilo di rischio trombofilico e quindi essere di grande ausilio nell'out-come clinico.

RAPPORTO COSTO/BENEFICIO DELLA VALUTAZIONE DELLO STATO TROMBOFILICO IN PAZIENTI CON MALATTIA TROMBOEMBOLICA VENOSA

C. Foli ^a, A. Vaccarino ^a, B. Montaruli ^a, E. Pagano ^b, GC Fiorucci ^a, M. Saitta ^a, M. Bazzan ^a

^a Ospedale Evangelico Valdese di Torino; ^b Istituto di Epidemiologia, Az. Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino.

Scopo del lavoro

Viene riscontrato un difetto trombofilico su base genetica in circa il 50% dei pazienti (pz) con malattia tromboembolica venosa (MTEV) in assenza di una causa scatenante. Abbiamo ipotizzato che il riscontro di trombofilia genetica induca una modificazione della strategia terapeutica in grado di ridurre le recidive di MTEV. Scopo del lavoro è calcolare e confrontare i costi e i benefici dello studio in una popolazione di pz con 1° episodio di MTEV.

Materiali e metodi

Casistica di 394 MTEV consecutive seguite presso il nostro Ospedale. I dati di prevalenza dei difetti sono ottenuti dalla nostra casistica, la prevalenza delle recidive, la mortalità a 5 anni, la prevalenza delle complicanze TAO da dati di letteratura. Tre diverse strategie di comportamento sono state analizzate dopo un periodo standard di terapia uguale per tutti i pz. E' stato eseguito lo screening per trombofilia nei pz. con anamnesi e storia clinica suggestiva di stato trombofilico.

Hp (1): estensione del periodo di trattamento per un anno per tutti i pz; **Hp (2):** prolungamento della terapia solo per i pz positivi allo screening; **Hp (3):** sospensione del trattamento a tutti i pz.

Ciascuna alternativa è stata analizzata sia sotto il profilo economico, valutando il costo necessario a sostenere il suo perseguimento e il costo degli eventi ad essa conseguenti, sia sotto l'aspetto degli esiti clinici da essa derivanti. Il punto di vista adottato nell'analisi è quello del SSN e i dati economici sono infatti esclusivamente quelli sostenuti dal servizio pubblico; non sono state prese in considerazione a livello quantitativo le eventuali uscite monetarie dei pz, il lavoro perso e gli aspetti psicologici legati alle diverse opzioni (qualità della vita).

Risultati

(100 pazienti)	Hp1: Tutti trattati	Hp2: Screening	Hp3: Nessun trattato
Costo totale (£)	157.075.010	154.868.379	97.552.242
Costo incrementale* (£)	59.522.768	57.316.138	-
Recidive a 5 anni (%)	12,4	12,4	20,0
Eventi evitati* (%)	7,5	7,6	-
Costo/TVP evitate* (£)	7.883.996	7.585.451	-
Eventi emorragici maggiori (£)	3,2	1,7	0,4
Mortalità (%)	0,6	0,6	1,0
Morti evitate* (%)	0,4	0,4	-
Costo/vita salvata* (£)	152.474.486	146.821.945	-

*dato calcolato rispetto all'ipotesi 3 Nessun trattato.

Discussione e Conclusioni

I nostri risultati sono, in parte "virtuali", cioè derivati da ipotesi e da tre modelli statistici. Peraltro, l'ipotesi di prolungare la terapia in tutti i pz. con anamnesi positiva appare essere la strategia più costosa per la maggiore incidenza di complicanze emorragiche. L'ipotesi di effettuare lo screening per identificare i pz. da sottoporre a prolungamento del trattamento rappresenta un'ipotesi da valutare con attenzione. A livello economico tale scelta richiede un incremento di circa il 50-60% dei costi assistenziali, a fronte di una riduzione di TVP del 38%. Poiché alle recidive di TVP è legata una mortalità del 5% e una invalidità del 30% (non calcolato nel nostro modello) la crescita dei costi può essere considerata comunque di interesse: il costo per recidiva evitata è di circa 7.000.000, a fronte di una ridotta mortalità.

MUTAZIONI E POLIMORFISMI GENETICI NELLA MALATTIA DI MONDOR

G.Antonucci*, S. Antonaci*, C. Riccioni**, A.Pellegrinotti*

*U.O.D. Medicina di Laboratorio I, Azienda Ospedaliera S.Giovanni-Addolorata,

** U.O. di Angiologia, Ospedale Nuovo Regina Margherita, Roma

La malattia di Mondor è una sindrome rara a decorso benigno, caratterizzata da una flebite a cordone a carico delle vene superficiali della parete toraco-addominale. Il processo morboso consiste in una endoflebite oblitterante a genesi ancora oggi sconosciuta. Le ipotesi etiopatogenetiche fino ad ora più accreditate sono rappresentate da traumatismi, interventi chirurgici, infezioni batteriche o virali.

Scopo del lavoro

Si è voluto valutare se in pazienti affetti da tale patologia potessero essere evidenziate delle condizioni genetiche e/o dismetaboliche predisponenti.

Materiali e metodi

In tre soggetti, di età compresa tra i 27 ed i 36 anni, affetti da malattia di Mondor, non riconducibile ad alcuna delle cause sopra menzionate, è stata ricercata con tecnica di biologia molecolare la presenza di mutazioni e/o polimorfismi a carico di FV (FVR506Q), FII (FII G20210A), MTHFR (C677T, A1298C), GpIIIa (HPA1), ApoB, utilizzando un test diagnostico su striscia che consente una rilevazione rapida e simultanea dei genotipi in esame (Nuclear Laser) ed è stata dosata l'omocisteina a digiuno con metodo PFIA (Abbott).

Risultati

Paz.	FV R506Q	FII G20210A	MTHFR C677T	MTHFR A1298C	HPA 1a/b	ApoB	Omocisteina ($\mu\text{mol/L}$)
A	Genotipo normale	Genotipo normale	Genotipo omozigote mutato	Genotipo normale	Genotipo eterozigote	Genotipo normale	26
B	Genotipo normale	Genotipo normale	Genotipo omozigote mutato	Genotipo normale	Genotipo eterozigote	Genotipo normale	12
C	Genotipo normale	Genotipo normale	Genotipo eterozigote	Genotipo eterozigote	Genotipo eterozigote	Genotipo normale	21

Discussione e Conclusioni

Di particolare interesse sembra essere la presenza in tutti i soggetti del polimorfismo HPA 1a/1b del recettore piastrinico GpIIIa, cui, dai dati presenti in letteratura, sarebbe imputabile una più bassa soglia di attivazione delle piastrine e delle mutazioni a carico dell'MTHFR, associate a livelli elevati o border line di omocisteina plasmatica. I risultati ottenuti sembrano avvalorare l'ipotesi di una condizione predisponente protrombotica, genetica e/o dismetabolica, su cui agirebbero elementi scatenanti (traumi, infezioni...) e che giustificherebbe anche le frequenti recidive cui i soggetti con malattia di Mondor vanno incontro. Tale segnalazione necessita di ulteriori conferme, anche se la rarità della malattia non permette di avere a disposizione grandi casistiche.

UN NUOVO MARKER DI TROMBOSI NELLA PATOGENESI DELLA SINDROME DA ANTICORPI ANTIFOSFOLIPIDI: IL FATTORE XII ATTIVATO.

De Lucia D.^a, G. Goffredi^b, Molinari A.M.^a, Maisto G.^a, Del Giudice V.^a, Marotta R.^a, De Francesco F.^a, Papa M.L.^c, e Sica V.^a.

^aPatologia Clinica, Laboratorio di Emostasi e Trombosi; II Università di Napoli. ^bLaboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Oliveto Citra; Salerno. ^cCentro per la Trombosi, Ospedale San Giovanni Bosco; Napoli.

Scopo del lavoro

La malattia cerebrovascolare è una malattia multifattoriale. Nella maggior parte dei casi due o più fattori di rischio sia genetico che acquisito sono necessari affinché l'evento occorra. La combinazione di più fattori di rischio può comprendere l'aumento del fibrinogeno (> 340 mg/dL), del fattore VIIa e VIIIa (> 150 IU/dL, >155 IU/dL rispettivamente), elevati titoli di anticorpi anticardiolipina/aPLs (> 20.0 U GPL/mL), il frammento protrombinico 1+2/F1+2 (>1.1 nM) ed il Dimero D/DD (> 450 ng/mL). In base a queste osservazioni è di grande ausilio lo screening coagulativo per eventualmente determinare mutazioni o difetti biochimici del sistema emostatico.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di determinare i livelli di FXIIa, di FVIIa e dei peptidi che si formano durante il processo di trombina formazione (F1+2, complessi trombina-antitrombina/T-AT) e della fibrinolisi (DD) in un gruppo di pazienti con diagnosi ben documentata di stroke ischemico associata ad aPLs (n=20) o senza aPLs (n=15).

Materiali e metodi

Settanta soggetti donatori di sangue e senza una storia di eventi ischemici venosi o arteriosi furono selezionati come gruppo di riferimento omogeneo.

Il fattore XIIa (Shield Diagnostics Ltd), i T-AT, gli F1+2 (Enzygnost, Dade Behring), ed i DD (Dimertest, Roche) furono dosati con metodica ELISA. Il FVIIa fu dosato usando una tromboplastina umana da DNA ricombinante (TF 219) come cofattore per la catalisi dell'attivazione del X da parte del FVIIa.

Risultati

I livelli di FXIIa nei pazienti con stroke aPL (+) erano significativamente più elevati (10.86 ± 2.48 ng/mL) rispetto ai pazienti con stroke ma aPL (-) (2.49 ± 1.75 ng/mL), ed ai controlli (1.15 ± 0.37 ng/mL), e ciò era anche associato ad una storia di trombosi cerebrale ($p = 0.021$). I pazienti con elevati titoli di aPLs avevano anche elevati livelli plasmatici di T-AT (6.5 ± 3.5 µg/mL vs 2.85 ± 2.25 µg/mL and 2.45 ± 2.05 µg/mL), F1+2 (2.55 ± 2.05 nM vs 0.95 ± 1.05 nM and 0.45 ± 0.35 nM), DD (635 ± 245 ng/mL vs 375 ± 225 ng/mL and 355 ± 175 ng/mL) e FVIIa (2.80 ± 1.95 ng/mL vs 1.20 ± 1.35 ng/mL e 1.40 ± 1.55 ng/mL) quando confrontati con i pazienti aPL (-) ed i controlli, riflettendo perciò uno stato sistemico di trombofilia.

Conclusioni

Gli autori ritengono che il meccanismo di generazione di FXIIa nelle malattie cerebrovascolari è tuttora non del tutto noto, ma potrebbe riflettere l'attivazione del sistema callicreिनico/chinिनico intravascolare sulle cellule endoteliali danneggiate dagli elevati titoli autoanticorpali di aPLs.

INDICI RETICOLOCITARI NEGLI ATLETI

F.Polese, M.G. Epifani, °P.Sarto, *G.M. Cappuzzo

*Laboratorio di Patologia Clinica, ASL 13, sede Ospedaliera di Mirano-Venezia

°Servizio di Medicina Sportiva, ASL 13, sede Ospedaliera di Noale-Venezia

In questi ultimi anni è divenuto sempre più importante il ruolo del Laboratorio nella identificazione degli atleti dediti ad assunzione impropria di Eritropoietina (EPO).

L'EPO induce aumento della massa eritrocitaria che comporta una maggiore capacità di veicolare ossigeno ai tessuti e quindi una maggiore potenza e resistenza dell'atleta.

I parametri reticolocitari, che sono utili nella valutazione della attività eritropoietica midollare sono stati proposti come marcatori indiretti dell'abuso di EPO da parte degli atleti.

Noi abbiamo voluto valutare tali indici in giovani atleti esenti dall'uso di EPO e in non-atleti di pari età, allo scopo di evidenziare se vi possano essere delle differenze.

Materiali e Metodi

Sono stati studiati 51 ciclisti e 15 calciatori di età compresa tra i 15 e i 33 anni e 32 non-atleti di pari età di cui sono stati valutati:

Numero assoluto dei reticolociti (N ret)

Contenuto emoglobinico medio reticolocitario (CHret)

Volume Reticolocitario Medio (MCVret)

Frazione di Reticolociti Immaturi (IRF)

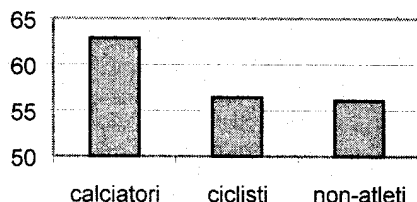
Per la valutazione di tali parametri è stato utilizzato il sistema ematologico ADVIA 120 (BAYER).

La Tabella riporta le medie geometriche ottenute per categoria.

Risultati

	CALCIATORI	CICLISTI	NON-ATLETI
Numero	15	51	32
Media Geom. N ret ($\times 10^9/L$)	62.87	56.39	56.05
Media Geom. CHret (pg)	32.61	32.01	32.55
Media Geom. MCVret (fl)	103.5	103.2	104.3
Media Geom. IRF	8.93	9.62	11.20

Numero assoluto ret.



Conclusioni

Dalla valutazione dei risultati è emerso come le due categorie sportive presentino valori medi diversi (cfr. il numero assoluto di reticolociti) probabilmente dipendenti dal tipo di allenamento. Sembra quindi avere senso la individuazione di range di riferimento specifici per categoria sportiva al fine di poter interpretare correttamente tali parametri nella valutazione della assunzione indebita di sostanze promuoventi l'attività midollare.

SYSMEX XE 2100: IL PARAMETRO RET-Y COME INDICE DIMENSIONALE DEI RETICOLOCITI. INTERVALLI DI RIFERIMENTO E APPLICAZIONI

M. Buttarello^o, V. Temporin^o, L. Toffolo^o, R. Ceravolo*, P. Bulian^o

^oLaboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Geriatrico, Padova

*Day Hospital, Ospedale Geriatrico, Padova

Scopo del lavoro

La misura del volume reticolocitario (MCVr) si è rivelata un parametro utile per valutare l'attività eritropoietica midollare sia in fase diagnostica, che, soprattutto per la verifica precoce della risposta a terapie mirate (brusco incremento in soggetti ferropriivi sottoposti a terapia marziale o, viceversa diminuzione in soggetti con anemia macrocitica B12 o folato dipendente).

Attualmente sono commercialmente disponibili tre analizzatori in grado di fornire tale indice, (Bayer H3/Advia 120 con metodo light scattering previa sfericizzazione; Coulter Gen-S/LH 750 e ABX PENTRA 120 con metodo resistivo). Il nuovo analizzatore Sysmex Xe 2100 utilizzando il metodo light scattering fornisce una stima dimensionale media dei reticolociti espressa sottoforma di "canale medio o RET-Y.

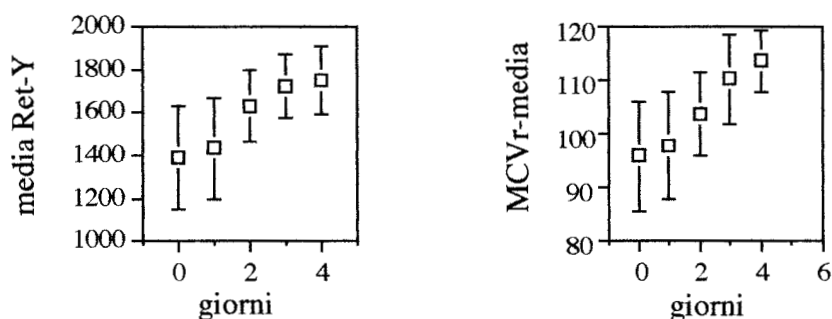
In questo lavoro si è calcolato l'intervallo di riferimento per tale parametro e se ne è verificata la sensibilità clinica in soggetti ferrocarenti in terapia marziale per confronto con l'MCV ret ottenuto con analizzatori BAYER.

Materiale e metodi

Xe 2100 è un analizzatore ematologico multiparametrico in grado di eseguire il conteggio reticolocitario in totale automazione utilizzando un colorante polimetinico con rilevazione in fluorescenza. Per ogni reticolocita analizzato viene eseguita una misura in forward scatter che tuttavia dà una stima corretta del volume solo per particelle sferiche o ellissoidali monoorientate. Nel caso di cellule non sfericizzate a orientamento casuale rispetto al raggio incidente tale misura è difficilmente trasformabile in una grandezza volumetrica (femtolitri) ma può essere espressa come stima dimensionale media della popolazione cellulare ed è stata definita RET-Y dal Costruttore. Per il calcolo degli intervalli di riferimento sono stati analizzati 153 soggetti sani. Per lo studio della sensibilità clinica sono stati confrontati i risultati di RET-Y e MCV ret su 16 pazienti ferrocarenti, alla diagnosi, e per 5 giorni consecutivi dall'inizio della terapia endovenosa.

Risultati

Gli intervalli di riferimento per RET-Y espressi come 95 percentili centrali risultano 1683.6-1911.8 con mediana di 1814. Nella figura che segue sono riportate le cinetiche di risposta nei soggetti ferrocarenti.



Conclusioni

Il comportamento di RET-Y risulta sovrapponibile a quello di MCV r con coefficiente di correlazione r pari a 0.69. Se si analizza la sensibilità clinica si nota inoltre che la risposta è a volte più precoce per RET-Y (3° giornata) che non per MCVr (4° giornata).

Sysmex XE-2100 e Sysmex SE-9000 a confronto nella routine di laboratorio
 M. Carta, D. Giavarina, S. Capuzzo, G. Mezzena, F. Zerbato, G. Soffiati
 Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia
 Ospedale "S. Bortolo", Vicenza

SCOPO DEL LAVORO

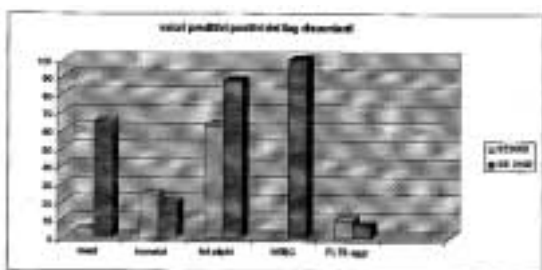
Abbiamo voluto analizzare il comportamento dei 2 contaglobuli Sysmex XE-2100 e SE-9000, valutandoli nella attività routinaria del nostro laboratorio. In particolare abbiamo cercato di valutare l'impatto della nuova tecnologia (XE-2100) per il conteggio differenziale sul numero di vetrini da esaminare al microscopio ottico, valutando quindi la sensibilità e specificità dei flag di morfologia rispetto al contaglobuli SE-9000.

MATERIALI E METODI

Abbiamo processato dapprima 1000 campioni che erano risultati privi di flag morfologici alla precedente analisi su SE-9000, sul nuovo contaglobuli XE-2100. Successivamente sono stati processati su XE-2100, 700 campioni che invece avevano acceso 1 o più flag morfologici, facendo quindi scattare la necessità di striscio. Entrambi gli strumenti erano stati precedentemente impostati con le medesime caratteristiche di selezione dello striscio. Tutti i campioni "negativi" su SE-9000 che invece risultavano avere qualche allarme morfologico su XE-2100, sono stati strisciati su vetrino e osservati al microscopio ottico da 4 operatori indipendenti; lo stesso è stato fatto per tutti i campioni "positivi" su SE-9000 che non venivano allarmati su XE-2100 o che venivano allarmati con messaggi diversi.

RISULTATI

25 campioni su 1000 "negativi" su SE-9000, sono invece stati allarmati su XE-2100 (2,5%), 5 per presenza di eritroblasti (NRBC), 1 per aggregazione piastrinica (PLTS) e 19 per linfociti atipici (Abn Lynf. L'osservazione al microscopio ha poi permesso di concludere che l'allarme per eritroblasti e aggregazione piastrinica era infondato in tutti i casi, mentre 2 casi su 19 presentavano linfociti atipici non allarmati da SE-9000. Su 703 campioni risultati "positivi" su SE-9000, 369 (52,4%) risultavano avere gli stessi allarmi anche su XE-2100, mentre i restanti 334 erano negativi su XE-2100 (115) o presentavano allarmi diversi (219).



Tra i 115 campioni allarmati da SE-9000 che invece risultavano assolutamente negativi per XE-2100, 91 erano effettivamente negativi (80%), mentre 17 presentavano forme immature della linea mieloide, 3 aggregazione piastrinica e 1 linfociti attivati alla visione al microscopio, come segnalato da SE-9000. Tra i 91 vetrini effettivamente risultati negativi, 23 erano stati allarmati per blasti, 39 per forme immature, 27 per piastrine aggregate e 2 per eritroblasti. Confrontando i valori predittivi positivi dei flag morfologici discordanti tra i 2 contaglobuli, si osserva (Fig.1) che XE-2100 ha un elevato VPP relativamente agli eritroblasti, ai linfociti atipici e ai blasti (intesi come forme immature della linea mieloide), mentre SE-9000 ha una maggior capacità di evidenziare le forme immature della linea mieloide.

CONCLUSIONI

XE-2100 dimostra una maggiore predittività positiva per i flag relativi a blasti, eritroblasti, linfociti atipici. Ha dimostrato invece una predittività minore a SE-9000 per le forme immature mieloidi e per l'aggregazione piastrinica. Entrambi questi flag però mantengono livelli assoluti di VPP bassi. La possibilità di inserire nel software centrale soglie numeriche o limiti allo striscio relativi ai reparti di provenienza dei campioni e/o all'età dei pazienti, permette di ottimizzare il lavoro routinario.

Valutazione di diversi metodi analitici di conteggio piastrinico nelle piastrinopenie critiche

P. Chiarugi¹, A.R. Miele¹, G. Gasparri¹, E. Marasti¹, L. Papotto¹, R. Cacciavellani²

¹U.O. Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche; ²U.O. Ematologia Pediatrica Azienda Ospedaliera Pisana

Scopo del lavoro

In una casistica di piastrinopenie a valori critici per la trasfusione abbiamo valutato il profilo d'imprecisione di tre metodi di conteggio piastrinico su strumenti ematologici automatizzati con differente filosofia analitica: il conteggio immunologico con anticorpi monoclonali anti-CD61 sull'apparecchio ABBOTT CELL DYN 4000, quello impedenziometrico su ABBOTT CELL DYN 3500 e quello ottico a due angoli di scatter su ADVIA 120 BAYER. Abbiamo inoltre stimato l'inaccuratezza dei due tradizionali conteggi ad impedenza e scatter ottico considerando come metodo di riferimento quello immunologico, basato sul riconoscimento antigenico delle piastrine e quindi concettualmente più affidabile.

Materiali e metodi

I campioni esaminati sono stati 25 con valori di piastrine compresi fra $5 \cdot 10^9/L$ e $40 \cdot 10^9/L$. Di ogni campione sono stati eseguiti 5 replicati su ciascuno dei tre diversi strumenti calcolando i relativi coefficienti di variazione (CV%). I valori medi di ogni determinazione su CELL DYN 3500 e ADVIA 120 sono stati confrontati con quelli ottenuti su CELL DYN 4000 tramite retta di regressione e grafico di Bland-Altman per valutarne l'inaccuratezza.

Risultati

Il profilo d'imprecisione ha evidenziato per tutte e tre le metodiche di conteggio, valori di CV% tendenzialmente più alti col decrescere del numero di piastrine. Il conteggio immunologico si è rivelato il più preciso con un CV% mediano di 1,4 (min 0,5 – max 3,5). Il metodo impedenziometrico e quello ottico hanno mostrato rispettivamente un CV% di 6,4 (min 3,6 – max 15) e di 9,2 (min 3,5 - max 22). Per quanto riguarda il confronto fra metodi, il conteggio piastrinico su ADVIA 120 ha mostrato una maggiore accuratezza in riferimento al metodo immunologico, con un scostamento mediano in valore assoluto del 17,6% contro il 20,5% ottenuto sul CELL DYN 3500 mentre i rispettivi coefficienti di regressione (R^2) sono risultati 0,95 e 0,83.

Conclusioni

L'innovativo metodo automatizzato di conteggio piastrinico sul CELL DYN 4000, basato sul riconoscimento immunologico dell'antigene CD61, offre garanzie di accuratezza e precisione che lo rendono proficuamente utilizzabile nei casi di piastrinopenia con valori critici nell'intorno della soglia decisionale per la trasfusione, dove gli altri metodi strumentali esaminati presentano una maggiore variabilità analitica che potrebbe portare al ritardo o all'inappropriatezza dell'intervento clinico.

INTERVALLI DI RIFERIMENTO DEI PARAMETRI PIASTRINICI IN GRAVIDANZE NORMALI

M. Maconi^a, B. Casolari^b, M. Giaccone^a, L. Leone^a, A.M. Cenci^b.

^aLaboratorio Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera O.I.R.M.-S.Anna, Torino; ^bLaboratorio Analisi, Ospedale S. Agostino, Modena

Scopo del lavoro

La conta piastrinica è soggetta ad oscillazioni e cambiamenti nei tre trimestri di gravidanza. Si registra in genere una diminuzione del numero delle piastrine che risulta sempre più evidente con il progredire dei mesi: tale fenomeno viene interpretato in parte come conseguenza della emodiluizione, in parte come inadeguata velocità di risposta al mutato fabbisogno. Diventa essenziale definire in maniera corretta gli intervalli di riferimento e le variazioni che intervengono per comprendere i livelli di accettabilità da applicare a questa situazione parafisiologica e per capire su quali valori si assesta la nuova linea di "normalità". Poiché anomalie durante la gravidanza a carico delle piastrine (di cui la più comune è la trombocitopenia) hanno importanti implicazioni sia per la madre che per il feto, da diverso tempo tali parametri sono oggetto di osservazione.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di individuare i valori di riferimento dei parametri piastrinici da utilizzare nei vari periodi di gestazione.

Materiali e metodi

Sono stati studiati 210 campioni provenienti da donne in differenti settimane di gravidanza. Sui campioni, raccolti in K3-EDTA, è stata eseguita una doppia analisi per stabilizzare i risultati utilizzando l'analizzatore ematologico Sysmex SE-9500. Sono state considerate alla fine le medie delle due determinazioni. I parametri presi in considerazione sono quelli normalmente forniti dallo studio delle piastrine con questo analizzatore. Un ugual numero di campioni provenienti da donne adulte in età fertile non gravide è servito come gruppo di confronto.

Risultati

I risultati ottenuti sono mostrati nelle tabelle seguenti:

Esame	Donne adulte (gruppo di riferimento, n°210)	Donne in gravidanza (n°210)
PLT (X10 ⁹ /uL)	150-400	110-340
PDW (fL)	9-17	9-17
MPV (fL)	6.8-9	9-12.7
P-LCR (%)	13.0-43.0	17.3-48.0

Esame	I trimestre (n°70 casi)	II trimestre (n°70 casi)	III trimestre (n°70 casi)
PLT	125-325	111-335	78-346
PDW	9.7-16.4	9.3-16.8	9-19
MPV	9.2-12.4	9-12.6	9-13
P-LCR	18-46	16.7-46.7	18-50

Discussione e Conclusioni

I risultati ottenuti dimostrano che i valori di riferimento delle piastrine in gravidanza presentano delle variazioni rispetto a quelli che si hanno nei soggetti non gravidi. E' importante conoscere l'entità di queste variazioni fisiologiche per poter cogliere, all'interno di ambiti ritenuti ancora "normali", l'instaurarsi di uno stato patologico che potrebbe portare a gravi conseguenze sia per la madre che per il feto. E' altrettanto importante poter considerare lo spostamento del livello inferiore della conta piastrinica rilevato in alcuni casi non come un'instaurarsi di una patologia, ma come evenienza possibile anche nella progressione di una gravidanza normale.

POSSIBILE RUOLO DELL'ADVIA 120 BAYER NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE TRA TROMBOCITOSI SECONDARIE E PRIMITIVE.

M. Scancarello, A. Mengozzi, P. Deambrogio

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Laboratorio Analisi, Ospedale Santo Spirito, Casale Monferrato (AL)

Scopo del lavoro

La trombocitosi, cioè un aumento della conta piastrinica superiore a $400 \times 10^3/\mu\text{l}$, è una frequente alterazione ematologica (4-5% degli emocromi analizzati nel nostro laboratorio). Si distinguono trombocitosi primitive (TP) costituite dalle sindromi mieloproliferative (trombocitemia essenziale, mielofibrosi idiopatica, policitemia vera, leucemia mieloide cronica) e trombocitosi secondarie (TS). Le difficoltà di diagnostica differenziale tra TP e TS riguarda soprattutto la trombocitemia essenziale (TE) in fase iniziale, quando la conta piastrinica è ancora relativamente bassa. Riconoscere la TE in questa fase è importante poiché questa patologia, caratterizzata da una proliferazione di tipo neoplastico, può dar luogo alla comparsa di gravi complicanze vascolari. Sarebbe quindi utile distinguere già al momento dell'effettuazione dell'emocromo le TP dalle TS; a questo scopo è stato studiato il possibile ruolo dei parametri piastrinici forniti dall'ADVIA 120 Bayer.

Materiali e metodi

L'ADVIA 120 effettua la conta piastrinica tramite lettura con luce laser di tipo bidimensionale (lo scatter low angle fornisce il volume e lo scatter high angle l'indice di rifrazione delle piastrine). Il sistema riesce a distinguere piastrine, grandi piastrine, eritrociti, frammenti eritrocitari ed ombre eritrocitarie. La conta degli aggregati piastrinici avviene invece sul canale della perossidasi, utilizzato per la determinazione della formula leucocitaria. Sono stati valutati i parametri forniti dallo strumento in 2 gruppi di soggetti affetti da piastrinosi (10 pazienti con TP e 10 con TS).

Risultati

L'analisi statistica ha evidenziato una differenza significativa nei due gruppi, per i seguenti parametri:

Parametri	Unità di misura	Media± DS TP	Media± DS TS	T di Student
Piastrine	$\times 10^3/\mu\text{L}$	1007±205	594±56	P=0,00006
Piastrinocrito	%	0,97±0,28	0,61±0,14	P=0,002
Aggregati piastrinici	$\times 1/\mu\text{L}$	238±205	76±56	P=0,02
Ombre eritrocitarie	$\times 10^6/\mu\text{L}$	0,06±0,037	0,032±0,020	P=0,05
Frammenti eritrocitari	$\times 10^6/\mu\text{L}$	0,096±0,032	0,061±0,015	P=0,007
Grandi piastrine	$\times 10^3/\mu\text{L}$	39,6±25,4	20,9±16,3	P=0,06

Discussione

I dati riguardanti il numero delle piastrine ed il piastrinocrito appaiono scontati, poiché una delle caratteristiche delle trombocitosi primitive, in particolare delle trombocitemie essenziali, è l'elevata conta piastrinica. Lo stesso discorso vale per le grandi piastrine e gli aggregati piastrinici, poiché sono reperti comuni all'esame dello striscio periferico delle trombocitosi primitive. La debole significatività del dato delle grandi piastrine può essere dovuta alla scarsa numerosità dei campioni. L'alto numero di ombre e frammenti eritrocitari nelle forme primitive non è facilmente spiegabile; potrebbe essere legato al fatto che si tratta di malattie che interessano la cellula staminale totipotente, quindi con un interessamento anche della linea eritrocitaria, oppure potrebbe trattarsi di una non corretta lettura di piastrine anomale.

Conclusioni

Alcuni parametri forniti dall'ADVIA 120, se questi dati saranno confermati da casistiche più ampie, potrebbero permettere di individuare in fase precoce le TP ed in particolare la Trombocitemia Essenziale ed a prevenirne quindi le complicanze vascolari trombotico-emorragiche.

MICROCITOSI E CONTA DELLE PIASTRINE

Elisabetta RAMO Silvana ORRO

Laboratorio analisi – Ospedale “BINAGHI” – CAGLIARI.

Scopo del lavoro

Verificare la performance della conta piastrinica sul contaglobuli SISMEM SE9500 in soggetti con microcitosi.

Materiali e metodi

Sono stati considerati 101 soggetti con microcitosi (MCV<80 fl). Sui campioni provenienti da questi pazienti la conta piastrinica è stata eseguita con i seguenti metodi:

- 1) tramite contaglobuli SISMEM SE9500 su sangue intero;
- 2) da PRP (plasma ricco di piastrine) con cui le piastrine sono contate su plasma e non su sangue intero, eliminando quindi le eventuali interferenze legate alla presenza di emazie;
- 3) con il sistema UNOPETTE, considerato come sistema di riferimento.

Abbiamo determinato il grado di concordanza fra due metodi messi a confronto (UNOPETTE – SE9500; SE9500 – PRP; UNOPETTE – PRP) utilizzando il test statistico di Bland e Altman che studia la differenza delle medie.

Due metodi si dicono concordanti e quindi interscambiabili se i limiti di concordanza ($media \pm 2DS$) non sono clinicamente rilevanti.

Risultati

Nel confronto fra SE9500 e sistema UNOPETTE, la conta piastrinica può essere superiore di 50000 pp o inferiore di circa 35000 pp rispetto alla conta effettuata al microscopio ottico. Questi limiti potrebbero essere inaccettabili da un punto di vista clinico, ma sono state considerate anche conte pp che venivano segnalate dallo strumento con allarme.

Nel confronto fra SE9500 e PRP i limiti di accordo sono molto ampi: il PRP rispetto al SISMEM SE9500 sopravvaluta di circa 57000 pp e sottovaluta di circa 60000 pp.

Anche il PRP rispetto all'UNOPETTE sopravvaluta la conta piastrinica di circa 57000 e la sottovaluta di circa 49000.

A questo punto abbiamo voluto valutare i limiti di accordo tra sistema UNOPETTE e PRP nei 20 soggetti in cui il SISMEM SE9500 dava un allarme di conta. In questo caso i limiti di accordo sono buoni, potendo variare da +23000 a -20000 pp.

Conclusioni

- 1) la concordanza fra UNOPETTE e SISMEM SE9500 è buona per conte $PLT > 100 \times 10^9/l$ e senza nessun allarme
- 2) il PRP non fornisce risultati concordanti buoni forse perché risente di numerose variabili preanalitiche
- 3) il PRP può rappresentare un'alternativa alla conta al microscopio ottico quando le piastrine sono inferiori a $100 \times 10^9/l$ o quando ci sono allarmi

SYSMEX SE-9500: SIGNIFICATO DELL'ALLARME "BLASTS" PRESENTE SUI GLOBULI BIANCHI NELLA GRAVIDANZA

M. Maconi^a, B. Casolari^b, M. Giaccone^a, L. Leone^a, A.M. Cenci^b.

^aLaboratorio Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera O.I.R.M.-S.Anna,Torino; ^bLaboratorio Analisi, Ospedale S. Agostino, Modena

Scopo del lavoro

La gravidanza presenta fisiologici cambiamenti nei valori dell'emocromo; in particolare compaiono una leucocitosi e delle variazioni nelle formula leucocitaria, con comparsa in circolo di elementi immaturi della serie mieloide. Questi fatti, quando si utilizzino per le conte strumentazioni in grado di eseguire anche uno screening leucocitario differenziale, mostra spesso lo scatto di allarmi morfologici corrispondenti alla presenza di tali cellule. In particolare riveste particolare importanza l'allarme "BLASTS" segnalato in alcuni casi durante l'esame di campioni provenienti da donne in gravidanza utilizzando sistemi TOA SYSMEX. Questo allarme è in genere riferito a cellule estremamente immature e che comunemente si ritrovano in patologie di notevole severità .

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la relazione tra l'allarme morfologico "BLASTS" quando espresso dal contaglobuli SYSMEX SE-9500 in emocromi di donne gravide e la morfologia osservata al microscopio ottico sullo striscio periferico.

Materiali e metodi

Sono stati analizzati 210 campioni provenienti da una popolazione mista di donne in diverso periodo di gestazione, in parte interne ospedalizzate, in parte esterne ambulatoriali. La popolazione arruolata comprende 70 pazienti per ogni trimestre di gravidanza.

I campioni per emocromo, raccolti in K3-EDTA, sono stati analizzati in doppia analisi con il contaglobuli Sysmex SE-9500 (2 diverse conte per ogni campione) e controllati al microscopio ottico (lettura di 200 Globuli Bianchi eseguita da due operatori su strisci colorati con May-Grunwald-Giemsa, secondo i comuni protocolli in uso).

Risultati

L'allarme BLASTS si presenta in 13 campioni sui 210 analizzati (6%). In particolare, come mostra la tabella sottostante, la segnalazione correla come presenza ed incidenza con l'avanzare delle settimane di gestazione.

Trimestre di gravidanza	Numero pazienti	Allarme "BLASTS"
I	n=70	n=0
II	n=70	n=1
III	n=70	n=12

La revisione microscopica ha dimostrato che in nessuno dei 13 campioni che presentavano l'allarme erano presenti cellule francamente riconoscibili da un punto di vista morfologico come blasti in una formula su 200 elementi. Nella maggior parte dei casi si segnalava la presenza di mielociti e metamielociti in diverso numero (da un minimo di 1 a un massimo di 6); più raramente comparivano promielociti (3 casi) o elementi con modiche alterazioni della maturazione (2 casi).

Discussione e Conclusioni

Nelle gravidanze osservate, l'allarme "BLASTS" non sembra correlare con cellule a chiara morfologia di tipo blastico, ma piuttosto con la presenza di progenitori in cui si possono già apprezzare granulazioni mieloidi. Il conseguente impatto sul protocollo comportamentale è stato quindi di proporre di non avviare a revisione microscopica quei campioni provenienti da donne gravide in cui compariva l'allarme "BLASTS", ma tutti gli altri parametri dell'emocromo cadevano all'interno degli intervalli di riferimento.

UTILITA' CLINICA DEL SISTEMA EMATOLOGICO COULTER GEN•S

G. Lobreglio, R. Torsello, S. Arcuti, P. Pensa

Laboratorio Analisi Azienda Ospedaliera Vito Fazzi, Lecce

Scopo del Lavoro

La capacità di segnalare e di identificare la presenza di anomalie o alterazioni morfologiche leucocitarie è uno dei requisiti fondamentali che il laboratorio richiede agli analizzatori di ematologia. Scopo del lavoro è stato di valutare le performance diagnostiche e l'utilità clinica degli allarmi morfologici del sistema Coulter GEN•S, analizzatore che esegue in completa automazione l'analisi differenziale di formula leucocitaria e la determinazione dei Reticolociti, in confronto al microscopio ottico come riferimento.

Materiali e Metodi

Per lo studio di utilità clinica sono stati analizzati 386 campioni di sangue di pazienti diversi con varie patologie ematologiche, primitive o secondarie ad altra patologia. Per ciascuna flag di morfologia fornita da Coulter GEN•S è stata valutata la Sensibilità (SEN), Specificità (SPE), il Valore Predittivo Positivo (VPP), il Valore Predittivo Negativo (VPN), Efficienza (EFF) in base alla presenza dell'alterazione cellulare indicata dalla flag su strisci di sangue esaminati a microscopio ottico, secondo i criteri NCCLS H20-A. La Tab. 1 riporta i risultati di utilità clinica delle flag RBC Nucleati (NRBC), Piastrine Aggregate (PLT CL), Linfo/Mono/Neutro Blasti (BLAST), Granulociti Immaturi (GR-IM), Linfociti Varianti (AT-LY). La colonna ALL si riferisce alla valutazione complessiva delle flag di morfologia, indipendentemente dalla concordanza della singola flag con l'anomalia cellulare indicata. Ulteriori 93 campioni di pazienti senza anomalie morfologiche e con valori nei rispettivi intervalli di riferimento sono stati utilizzati per valutare la correlazione della formula leucocitaria rispetto al conteggio a microscopio, effettuato da due operatori diversi ognuno su 200 cellule. I dati statistici sono riportati in Tab. 2 (r = Coeff. Correlazione, a = pendenza, b = slope).

Risultati

Tab. 1	NRBC	PLTCL	BLAST	GR-IM	AT-LY	ALL
SEN	90,4	83,3	94,8	92,4	89,6	96,3
SPE	96,2	88,3	95,0	97,1	98,3	83,4
VPP	59,7	53,5	65,2	71,2	73,4	83,9
VPN	98,9	95,6	99,2	98,9	97,1	98,5
EFF	93,3	86,8	94,9	94,7	95,8	87,0

Tab. 2	r	a	b
NEUTR	0,984	1,010	0,480
LINFO	0,990	0,989	0,493
MONO	0,979	0,982	0,740
EOSIN	0,963	0,957	0,364
BASO	0,676	0,480	0,343

Discussione e Conclusioni

La valutazione di utilità clinica delle flag di morfologia strumentale ha evidenziato ottime prestazioni del sistema Coulter GEN•S nella corretta identificazione di anomalie e alterazioni cellulari. Anche la valutazione complessiva delle flag di morfologia evidenzia la elevata sensibilità clinica del sistema, con un ridotto numero di falsi negativi in base alle segnalazioni di sospetto morfologiche (4 su 109 patologici dei 386 campioni analizzati), che Coulter GEN•S ha segnalato con altri allarmi di distribuzione o quantitativi. Oltre ai buoni dati di sensibilità clinica, Coulter GEN•S ha evidenziato anche una buona specificità, con risultati di efficienza globale molto soddisfacenti (da 86,8% a 95,8%).

La correlazione di formula leucocitaria è ottima per Neutrofili, Linfociti, Monociti ed Eosinofili. Per i Basofili i valori, comunque soddisfacenti, sono indicati solo per completezza di informazioni considerate le già note limitazioni in simili analisi statistiche.

Valutazione comparativa della conta degli eritroblasti eseguita al microscopio con i dati forniti dall'analizzatore ematologico Abbott CELL-DYN 3500

A.R. Miele¹, P. Chiarugi¹, M. Baroni¹, G. Gasparri¹, S. Loni¹, E. Michelucci¹, S. Pierini¹, A. Cuffano², P. Ghirri².

¹U.O. Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche; ²U.O. Terapia Intensiva Neonatale
Azienda Ospedaliera Pisana

Scopo del lavoro

Nell'ambito di una valutazione multicentrica alla quale ha aderito il reparto di Terapia Intensiva Neonatale della nostra Azienda al fine di valutare se la conta degli eritroblasti alla nascita può essere utilizzata come marker di asfissia fetale e come fattore prognostico di danno neurologico a lungo termine, il nostro Laboratorio ha deciso di correlare i dati della conta microscopica degli eritroblasti previsti da tale protocollo con i dati resi disponibili dall'analizzatore ematologico Cell-Dyn 3500 (CD 3500) da noi utilizzato in regime d'urgenza.

Materiali e Metodi

Dal sangue del cordone ombelicale di 47 neonati abbiamo eseguito l'emocromo sul CD 3500 e preparato strisci colorati con May Grunwald-Giemsa per la valutazione degli eritroblasti al microscopio, come percentuale su 200 globuli bianchi. Il CD 3500 esegue la conta dei globuli bianchi in due canali separati, ottico (WOC) e impedenziometrico (WIC). Se sono presenti eritroblasti la conta in WIC risulta maggiore di quella in WOC poiché include anche i nuclei delle emazie. In tal caso l'apparecchio fa scattare l'allarme NRBC e fornisce anche una loro stima numerica in base alla differenza percentuale fra i conteggi nei due canali.

Risultati

La segnalazione della presenza di eritroblasti da parte del CD3500 comparata all'osservazione microscopica non ha evidenziato falsi positivi con conseguente specificità del 100%, mentre la sensibilità è risultata del 48% anche se i falsi negativi si riferivano tutti a campioni con bassa percentuale di eritroblasti, cioè inferiore al cut-off fisiologico del 10% proposto in letteratura per i neonati. La stima numerica strumentale nei campioni positivi ha inoltre mostrato una buona correlazione con la conta su vetrino ($R^2=0,875$).

Conclusioni

L'elevata specificità da noi riscontrata per l'allarme di eritroblasti del CD 3500 congiuntamente con una sensibilità bassa in assoluto ma accettabile se riferita a campioni con una quota di elementi circolanti clinicamente rilevante, rende questo strumento affidabile per un referto d'urgenza che valuti in maniera preliminare il rischio di patologie neonatali correlate.

DALLA FORMULA LEUCOCITARIA AL SOSPETTO DI INFEZIONE DA EBV, TOXOPLASMA GONDII E CMV: UTILIZZO PRATICO DEL DATO ANALITICO

V. Pirini *, T. Venezian °, A. Pederzoli ^

* Laboratorio di Biocompatibilità dei Materiali da Impianto, Centro di Ricerca Codivilla-Putti;

° Laboratorio di Patologia Clinica - Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche;

^ Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale - Banca dell'Osso;

Istituti Ortopedici Rizzoli, Via di Barbano 1/10, 40136 Bologna

Scopo del lavoro

Lo scopo della presente valutazione era di stimare l'impatto di una corretta valutazione dell'istogramma leucocitario per suggerire una probabile infezione da virus di Epstein-Barr (EBV), *Toxoplasma gondii* (Toxo) o Cytomegalovirus umano (CMV)

Materiali e metodi

Sono stati inclusi nello studio 100 campioni consecutivi non selezionati della nostra "routine" analitica per i quali la valutazione dell'esame emocromocitometrico con il sistema Abbott Cell-Dyn3500 aveva evidenziato una somma delle percentuali dei linfociti e dei monociti uguale o superiore al 55% del totale dei leucociti. I campioni di siero degli stessi soggetti sono stati sottoposti ad indagini sierologiche con metodi commerciali per la determinazione di IgG e IgM specifiche anti-CMV e Toxo (Vidas, BioMérieux), di anticorpi eterofili per mononucleosi (Monoslide Diesse, Menarini) e di IgG e IgM dirette contro l'antigene nucleare di EBV (Monolert 2, Meridian Diagnostics)

Risultati

I 100 pazienti (60 femmine e 40 maschi) presentavano un "range" di età tra 11 e 66 anni, con media di 30 ± 11 anni e mediana di 29 anni. La frequenza di positività per IgG anti-toxo e anti-CMV è risultata rispettivamente del 23% e del 71%, mentre il 2% e 4% dei soggetti, rispettivamente, mostravano positività per le IgM specifiche. Per quanto riguarda i marcatori di infezione da EBV, la prevalenza di IgG anti-EBNA era molto elevata (75% di risultati positivi e 10% di risultati dubbi), mentre il Monotest è risultato positivo o dubbio rispettivamente nel 13% e nel 5% dei casi e le IgM anti-EBNA erano rilevabili in ben 34 casi su 100 (10 positivi e 24 reattivi deboli). Nel complesso, 38 casi sui 100 esaminati mostravano un quadro di sospetta monocleosi infettiva: 4 casi con Monotest dubbio o positivo e EBNA IgM negative, 14 casi con Monotest dubbio o positivo e IgM positive e 20 casi con Monotest negativo e IgM positive deboli o positive, tutti positivi per IgG specifiche

Discussione e conclusioni

La valutazione della formula leucocitaria come indicatore di possibili infezioni da agenti linfotropi è apparsa, nella nostra esperienza, di una certa utilità limitatamente alla infezione da virus di Epstein-Barr. Infatti, mentre i dati di prevalenza per anticorpi anti-CMV e anti-toxo non sono risultati significativamente differenti rispetto alle percentuali riscontrabili nello "screening" di routine, oltre 1/3 dei soggetti con somma delle percentuali dei linfociti e dei monociti uguale o superiore al 55% mostrava delle reattività sierologiche suggestive di una infezione acuta o recente da EBV. In questi soggetti, peraltro, i dati sierologici risultano raramente concordanti, e appare quanto mai opportuno che la richiesta di determinazione di anticorpi eterofili sia accompagnata dalla ricerca delle IgG e IgM specifiche anti-EBNA e/o anti-VCA, al fine di migliorare l'accuratezza diagnostica.

PROFILO BIOCHIMICO DEL METABOLISMO DEL FERRO

M.Ruggeri, A.Pellegrinotti

U.O.D. di Medicina di Laboratorio 1 -Azienda Ospedaliera S.Giovanni – Addolorata-Roma

Si propone un grafico per la valutazione “a colpo d’occhio” dello stato metabolico del ferro in pazienti anemici.

La valutazione del metabolismo del ferro necessita della determinazione di alcuni parametri che rispecchiano diversi compartimenti. Pool metabolico: emoglobina, pool di deposito: ferritina e pool di trasporto : transferrina (TRF) e recettore solubile della transferrina (sTfR) che media l’incorporazione del ferro nei precursori degli eritrociti e funge da collegamento tra la transferrina e l’emoglobina.

Abbiamo utilizzato il programma DSS-COM collegato al BNII della Dade Behring, finalizzato alla definizione di profili proteici in situazioni patologiche diverse ed abbiamo inserito nello stesso schema informazioni di natura ematologica per ottenere un grafico che evidenzi con immediatezza lo stato metabolico del ferro in soggetti diversi per età o per sesso.

Una linea retta marcata unisce il valore medio normale (100%) di tutti i parametri. Il range di riferimento è rappresentato da una zona grigia.

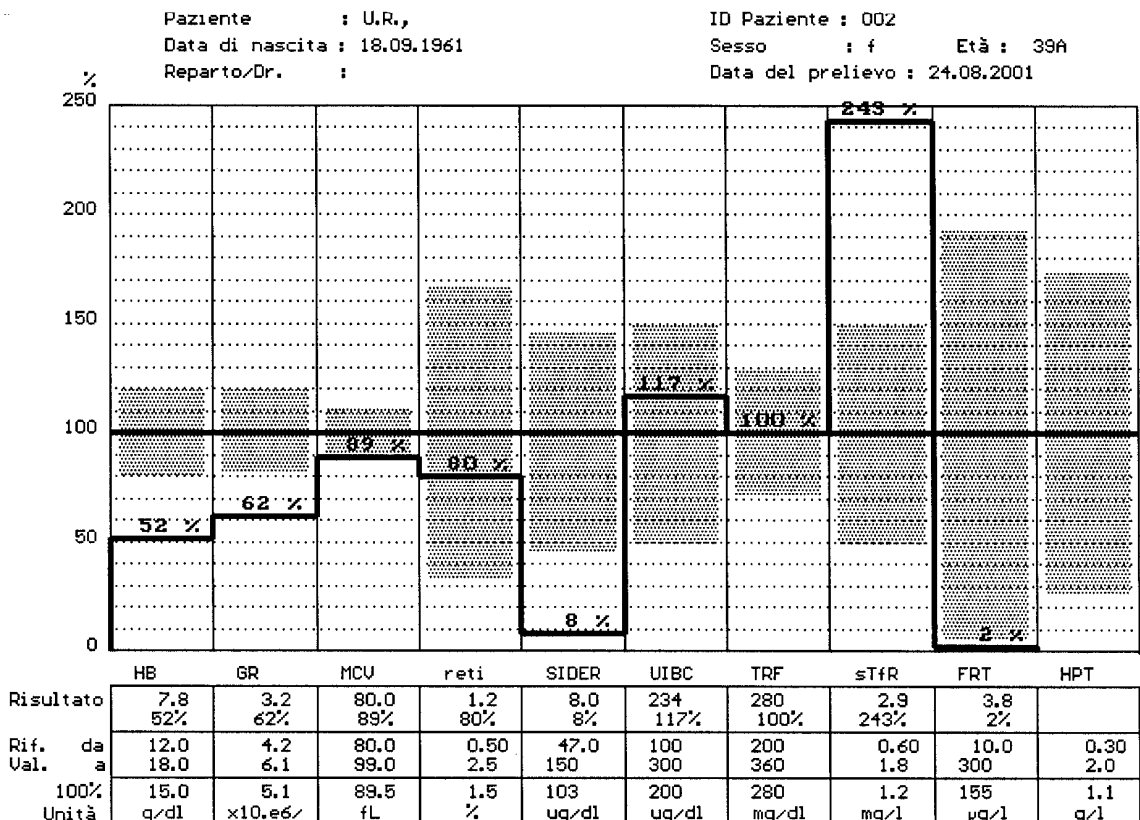
I parametri presi in considerazione sono: Hb, GR, MCV, reticolociti, sideremia, UIBC, TRF, sTfR, ferritina ed aptoglobina.

I risultati dei test sono espressi in percento della media dei valori di riferimento e sono rappresentati da una linea marcata spezzata con il valore percentuale riportato sopra questa.

L’attuale sistema prevede l’utilizzo vincolante di dieci parametri; abbiamo privilegiato l’MCV alla TIBC per il maggior numero di informazioni che esso può dare.

Si rappresenta un grafico tipo riferito a paziente di sesso femminile affetta da anemia ferrocarenziale.

I singoli dati, normalmente richiesti dal clinico, raccolti sul grafico consentono una visione ed una valutazione immediata.



VARIAZIONE QUALITATIVA DELLE POPOLAZIONI CELLULARI MIDOLLARI IN RELAZIONE AL VOLUME DI SANGUE ASPIRATO.

PAPARO^a C., MARTINELLI^a F., CAMETTI^b G., TOMMASI^c M., REVERSO GIOVANTIN^a E.

^aLaboratorio Analisi, ^bDivisione di Medicina, Ospedale Maggiore Chieri (TO).

^cAbbott Divisione Diagnostici Roma.

Scopo del lavoro: valutare se la leucocitometria differenziale midollare subisca variazioni significative in base al volume di sangue aspirato.

Materiali e metodi.

Abbiamo eseguito 34 agoaspirati midollari e per ogni campione sono state prelevate due aliquote differenti di 1 ml e 5ml di sangue midollare anticoagulati con EDTA-K₃.

I campioni sono stati analizzati senza alcun pretrattamento su contaglobuli Abbott Cell-Dyn 4000 in modalità lisi estesa.

Lo strumento ha fornito per tutti i campioni la leucocitometria differenziale e il conteggio eritroblastico, quest'ultimo espresso percentualmente rispetto a 100 leucociti (NRBC/WBC).

Le popolazioni cellulari midollari, espresse in valori percentuali, che sono state prese in esame sono quelle maggiormente rappresentate, neutrofili, linfociti, monociti/blasti, eritroblasti. La serie neutrofila comprende tutti gli stadi maturativi che vanno dal promielocita al granulocita neutrofilo, così come la serie eritroide.

I monociti/blasti sono stati accorpati in una popolazione unica in quanto occupano la stessa zona del citogramma nell'analisi strumentale. Abbiamo calcolato il valore medio, minimo e massimo per entrambe le aliquote e i risultati sono espressi in tabella.

La nostra casistica comprende 5 citopenie secondarie, 3 gammopatie monoclonali benigne, 1 policitemia secondaria, 12 malattie linfoproliferative croniche, 3 sindromi mieloproliferative croniche, 9 sindromi mielodisplastiche, 1 leucemia acuta. L'età media dei pazienti è di 70 anni, il più giovane ha 18 anni mentre il più anziano ne ha 90.

Risultati:

	% neutrofili		% linfociti		% monociti/blasti		% NRBC/WBC	
	1 ml	5 ml	1 ml	5 ml	1 ml	5 ml	1 ml	5 ml
34 casi								
MEDIA	49.67	52.05	27.37	27.86	16.25	13.52	24.32	17.78
MINIMO	1.14	2.45	4.80	6.07	2.39	2.51	3.53	2.59
MASSIMO	88.90	89.70	95.80	95.30	65.30	46.20	107.00	29.50

Discussione e conclusioni.

Dai nostri dati si ricava che la serie neutrofila aumenta nella seconda aliquota (+4,6%), probabilmente in quanto il sangue sinusoidale è simile al sangue periferico e quindi più ricco in neutrofili, la serie linfocitica è invariata, mentre si ha una diminuzione di eritroblasti e monociti/blasti. La diminuzione è significativa per gli eritroblasti (-27%), meno marcata ma comunque importante per i monociti/blasti (-16,8%).

Di tutto questo bisognerebbe tener conto quando si correlano risultati di metodiche differenti, come ad esempio le cellule blastiche in immunofenotipizzazione con il mielogramma morfologico tradizionale eseguito in genere sulle prime gocce.

ANALISI QUALITATIVA DEL SANGUE MIDOLLARE SU SISTEMA EMATOLOGICO ABBOTT CELL-DYN 4000.

PAPARO^a C., STACCHINI^b A., CAMETTI^c G. TOMMASI^d M., REVERSO GIOVANTIN^a E.

^aLaboratorio Analisi Chimico– Cliniche e Microbiologia, ^cDivisione di medicina, Osp. Maggiore, Chieri (To); ^bServizio Anatomia Patologica, Ospedale Molinette, Torino; ^dAbbott, Divisione Diagnostici, Roma.

Scopo del lavoro: analisi qualitativa degli agoaspirati midollari con metodica automatizzata e correlazione con la metodica manuale di riferimento.

Materiali e Metodi

Sono stati analizzati 44 campioni con il contaglobuli Cell-Dyn 4000 e con citofluorimetro Becton Dickinson FACS-Calibur.

Per il conteggio su contaglobuli sono stati utilizzati 0,5 ml di sangue midollare anticoagulato con EDTA senza alcun pretrattamento del campione; per la valutazione immunofenotipica la formula citometrica è stata ottenuta calcolando percentualmente rispetto al totale le seguenti popolazioni:

linfociti (somma di CD3⁺, CD19⁺, CD56⁺/CD3⁻), monociti (CD14⁺), mieloblasti (CD34⁺), elementi mieloidi (CD33⁺/CD14⁻), eritroblasti (glicoforina⁺), plasmacellule (CD38⁺/CD138⁺). Gli strisci di midollo osseo sono stati colorati manualmente secondo May-Grunwald-Giemsa e per il mielogramma sono state contate almeno 500 cellule.

Risultati

Abbiamo calcolato il valore medio, minimo e massimo per ogni metodica e correlato le metodiche automatizzate con quella manuale di riferimento. I monociti ed i blasti sono stati accorpati in una popolazione unica perché occupano la stessa zona del citogramma nel conteggio automatico. Gli eritroblasti sono stati esclusi nello studio immunofenotipico perché in parte vengono lisati durante il conteggio.

N° di Casi: 44	Valore %	Granulociti	Linfociti	Mono / Blasti	NRBC/WBC
Cell-Dyn 4000	medio	50.5	25.7	17.5	21.1
	minimo	1.1	4.8	2.4	0.0
	massimo	88.9	95.8	65.3	54.5
Morfologico manuale	medio	55.5	22.1	17.0	30.5
	minimo	1.1	1.5	0.0	1.4
	massimo	87.8	97.5	79.4	68.5
Citofluorimetria	medio	56.4	21.2	11.4	
	minimo	3.0	4.0	0.0	
	massimo	90.0	96.0	70.0	
Correlazione	citofluor./manuale	0.93	0.91	0.92	
	citofluor./ CD4000	0.86	0.94	0.92	
	CD 4000/ manuale	0.87	0.86	0.79	0.71

Discussione e Conclusioni

Abbiamo ottenuto una buona correlazione per entrambe le metodiche automatiche.

Il conteggio strumentale consente una prima rapida verifica del campione: la presenza di popolazioni infiltranti, la mancanza di nette valli di separazione o l'occupazione di zone anomale del citogramma modificano la normale distribuzione. Inoltre una stima della quota mieloide matura è comunque di valido aiuto per una corretta classificazione FAB nelle leucemie.

L'indagine immunofenotipica migliora l'accuratezza consentendo una corretta diagnosi soprattutto nei casi di leucemia linfatica cronica, di linfoma mantellare, follicolare, nell'immunocitoma e nel linfoma a cellule T periferiche con una infiltrazione minima.

VARIAZIONE DELLA CELLULARITA' MIDOLLARE IN RELAZIONE AL VOLUME ASPIRATO.

PAPARO^a C., MARTINELLI^a F., CAMETTI^b G., TOMMASI^c M., REVERSO GIOVANTIN^a E.

^aLaboratorio Analisi, ^bDivisione di Medicina, Ospedale Maggiore Chieri (TO).

^cAbbott Divisione Diagnostici Roma.

La valutazione del midollo osseo è un esame fondamentale nelle malattie ematologiche. Oltre la tradizionale valutazione morfologica citologica ed istologica, oggi si rendono necessari nuovi approfondimenti a fini diagnostici e prognostici come l'immunofenotipizzazione, le colture cellulari, la citogenetica e le indagini di biologia molecolare. Per evitare ulteriori disagi al paziente, in genere tutti questi esami vengono eseguiti con un prelievo unico e ciò comporta una diluizione dell'aspirato da parte del sangue sinusoidale.

Scopo del nostro lavoro è stato verificare la variazione quantitativa della cellularità midollare con l'aumento del volume di sangue aspirato.

Materiali e metodi.

Abbiamo eseguito 34 agoaspirati e per ogni campione sono stati prelevati dapprima 1 ml e successivamente 5 ml di sangue midollare, anticoagulati con EDTA. I campioni sono stati analizzati senza alcun pretrattamento su contaglobuli Abbott Cell-Dyn 4000 in modalità lisi estesa.

Lo strumento ha fornito per tutti i campioni il conteggio dei globuli bianchi (WBC) e degli eritroblasti (NRBC). La cellularità midollare (Totale Cellule Nucleate) corrisponde alla somma dei due conteggi: (WBC+NRBC)/mm³.

Per valutare il differente grado di contaminazione delle due aliquote abbiamo utilizzato la formula: $(RBC \text{ midollari} \times \text{cellule nucleate periferiche} / RBC \text{ periferici} \times \text{cellule nucleate midollari}) \times 100$. (1)

Risultati:

Abbiamo calcolato il valore medio, minimo e massimo delle due aliquote e i risultati sono espressi in tabella.

	Valore	1 ml	5 ml
Totale Cellule Nucleate/mm ³	medio	88128	30335
	minimo	10350	3955
	massimo	258000	90300
% contaminazione	medio	16.80	44.4
	minimo	0.63	1.28
	massimo	64.80	269

Discussione e conclusioni.

I frustoli midollari, piccoli gruppi di cellule e grasso che condizionano notevolmente il totale delle cellule nucleate, sono presenti soprattutto nelle prime gocce dell'aspirato. Nel nostro lavoro abbiamo riscontrato che, aumentando il volume di sangue aspirato, la cellularità diminuisce sensibilmente (-66%), mentre aumenta notevolmente la contaminazione con il sangue sinusoidale (+27,6%).

Per la valutazione della cellularità midollare è perciò indispensabile prelevare solo piccoli volumi di sangue midollare, 0.5÷1ml e il sangue necessario per ulteriori indagini deve essere prelevato con una seconda siringa.

Bibliografia

1. D. Batinic, M. Marusic, Z. Pavletic, V. Bogdanic, B. Uzarevic, D. Nemet, B. Labar : Relationship between differing volumes of bone marrow aspirates and their cellular composition. Bone Marrow Transplantation.6,103-107,1990.

LA QUALITÀ DEL SANGUE DI RECUPERO POSTOPERATORIO NELLA PROTESICA ORTOPEDICA MAGGIORE: VALUTAZIONE DI LABORATORIO.

B. Casolari^a, A.M. Cenci^a, M. Rambaldi^b, P. Serafini^b, A. Menegon^b.

^aLaboratorio Analisi, Ospedale S. Agostino, Modena; ^bAnestesia e Rianimazione, Ospedale S. Agostino, Modena.

Scopo del lavoro

Scopo del lavoro è quello di verificare la qualità del sangue di recupero ottenuto con l'utilizzo del presidio non wash Drentech Redax durante gli interventi di artroprotesi di anca e ginocchio e da reinfondere nello stesso paziente. La valutazione è avvenuta mediante un protocollo che prevedeva l'esecuzione di test di ematologia e di biochimica sul sangue di recupero e su prelievo venoso a 5 giorni dall'intervento.

Materiali e Metodi

Sino ad oggi sono stati inclusi nello studio n° 22 pazienti di età media 69,8 anni, operati per sostituzione artroprotesica di anca (ATA) e di ginocchio (ATG), in 1° o 2° impianto. Per ciascun paziente sono state determinate la quantità di sangue raccolta e reinfusa entro 6 ore e alcuni test di laboratorio sul sangue prelevato dal sistema prima della reinfusione stessa. Sono stati valutati: a) emocromo e conta reticolocitaria su sangue prelevato in K2-EDTA con quattro diversi sistemi ematologici (ABX Pentra 120, Sysmex SE-9000, Sysmex SE-9500, Sysmex XE-2100); b) definizione indiretta della lisi eritrocitaria tramite dosaggio della emoglobina residua e di potassio, sodio e cloro su plasma eparinato; c) valutazione microscopica della qualità delle emazie e formula leucocitaria eseguita da due operatori su 200 cellule secondo il protocollo NCCLS; d) valutazione della cascata coagulativa mediante determinazione di fibrinogeno, PT, aPTT e ATIII su plasma citratato; e) ricerca di inquinanti batterici e della loro relativa carica microbica. È stato quindi valutato l'assestamento dei valori ematochimici a 5 giorni dall'intervento con l'esecuzione dei seguenti esami: a) emocromo e conta reticolocitaria; b) elettroliti ed emoglobina residua su plasma; c) concentrazione plasmatica di bilirubina e di aptoglobina su sangue eparinato; d) formula leucocitaria; e) fattori della coagulazione.

Risultati

La quantità media delle perdite intraoperatorie si attesta su 630 ml; la quantità media di sangue raccolta su 560ml; la quantità media di sangue ritrasfusa su 535 ml.

I valori medi dell'emocromo del sangue recuperato sono risultati i seguenti: RBC $2.91 \times 10^6/\text{mL}$; Hb 8.7 g/dL; Ht 26.8 %; Plt $28.6 \times 10^3/\text{mL}$; Reticolociti 14.8 %; K⁺ 4.15 mEq/L; Hb residua 0.15 mg/dL.

Non si sono evidenziate alterazioni morfologiche di rilievo all'esame microscopico e strumentale dei campioni. In tutti i casi erano presenti in circolo elementi immaturi eritroidi e/o mieloidi in vario stadio. Tale presenza è da ricondursi verosimilmente alla qualità delle manovre (azione meccanica) esercitate sull'articolazione interessata. In particolare il contaglobuli Sysmex XE-2100, strumento di ultima generazione in grado di contare in canale dedicato gli eritroblasti, ne ha permesso la valutazione numerica validata dalla successiva rilevazione microscopica.

Nel controllo a 5 giorni non risultano alterazioni di rilievo dei parametri misurati; si evidenzia, invece, un aumento medio dell'emoglobina di circa 1 g/dL e l'assestarsi del valore di reticolociti su 25%.

Discussione e Conclusioni

Da questi primi dati il sangue di recupero postoperatorio fornito dal sistema Drentech Redax risulta di buona qualità da un punto di vista ematochimico. Questo, infatti, non presenta alterazioni rilevanti a carico della morfologia dei globuli rossi, né significativi segni di emolisi, sia diretti che indiretti. Anche la rilevazione di rari e piccolissimi aggregati piastrinici nel sangue di recupero non appare apportare un aumento di rischio trombotico al paziente ed è quindi compatibile con il suo utilizzo. La metodica, correttamente applicata, permette il recupero di un importante volume di sangue che, pur non presentando valori di emoglobina elevati, risulta comunque utile nel sostegno perioperatorio, sicuro da un punto di vista dei rischi trasfusionali e idoneo per la reinfusione.

MONITORAGGIO DELLA QUALITÀ DEI CONCENTRATI PIASTRINICI NEL CORSO DELLA CONSERVAZIONE

A. Giacomini^a, G. Gessoni^a, P. Legovini^b, S. Valverde^a, F. Antico^a, M.M. Salvadego^a, P. Hoffer^a, F. Manoni^a

^aDipartimento di Patologia Clinica, P.O. Chioggia (VE); ^bDipartimento di Matematica Pura e Applicata, Università di Padova

Scopo del lavoro

La gestione della produzione e conservazione dei concentrati piastrinici è uno dei problemi emergenti della medicina trasfusionale; di conseguenza il monitoraggio della qualità di tale emocomponente presenta risvolti di particolare interesse. Ci siamo proposti pertanto di valutare la qualità dei concentrati piastrinici in corso di conservazione grazie alla determinazione della P-Selectina (CD62), una glicoproteina contenuta negli α -granuli che viene espressa sulla superficie piastrinica a seguito della lesione da conservazione. Il comportamento nel tempo della P-Selectina è stato confrontato con quello di due parametri tradizionali della qualità del preparato piastrinico: la lattico deidrogenasi e il pH.

Materiali e metodi

Abbiamo valutato 22 concentrati piastrinici ottenuti da plasma ricco di piastrine (PRP-PC). Tutti i PRP-PC sono stati conservati per otto giorni a 22°C in un agitatore piastrinico. Piccoli campioni di PRP-PC sono stati prelevati, nei giorni 1, 3, 5, 8 di conservazione. Tutti i campioni sono stati sottoposti ai seguenti test di laboratorio: la colorazione è stata realizzata con CD62 (CD62P-PE, Immunotech, Marseille, F) e CD41 (CD41-FITC, Immunotech, Marseille, F) su piastrine fissate; l'analisi è stata eseguita con un citometro EPICS XL (Coulter Electronics, Miami, FL); l'LDH è stato determinato con il metodo raccomandato DGR (Merck, Darmstadt, D); il pH è stato determinato utilizzando il Chiron Diagnostics co-ox modulo 855 (Chiron Diagnostics Corporation, East Walpole, MA).

Risultati

La media e la deviazione standard di ciascun parametro sono presentate nella Tabella:

Giorno di conservazione	CD41/62 (%)	pH	LDH (UI/L)
1	21.99±07.33	7.25±0.06	393±115
3	29.87±12.25	7.26±0.08	457±146
5	40.66±11.25	7.17±0.18	604±285
8	50.13±10.01	6.79±0.46	740±370

I test statistici ANOVA e *post hoc* hanno dimostrato che la percentuale di piastrine che esprime il CD41/62, così come l'LDH aumentano significativamente. I valori medi dei due parametri presentano una correlazione significativa durante la conservazione ($R^2=0.99$, $P<0.01$). Il pH invece diminuisce significativamente a partire dal giorno 3. Confrontando mediante l'analisi delle curve ROC l'accuratezza dei tre parametri nel discriminare fra campioni del primo e dell'ottavo giorno di conservazione, il CD41/62 si è dimostrato essere il parametro più accurato (AUC=0.988 versus AUC=0.882 per LDH, AUC=0.904 per pH).

Discussione e Conclusioni

Nella nostra esperienza tutti i parametri valutati nello studio si sono dimostrati utili per monitorare le modificazioni del concentrato piastrinico in corso di conservazione, ma la determinazione citofluorimetrica della P-Selectina risulta essere il marcatore più accurato di lesione piastrinica da conservazione. Ci proponiamo ora di verificare la sua utilità in una più ampia casistica, mettendo in relazione la determinazione della P-selectina con la funzionalità dei PRP-CP conservati.

MODELLO SPERIMENTALE DI ATTIVAZIONE PIASTRINICA: STUDIO DELLA VARIAZIONE DELLA COMPONENTE MEDIA PIASTRINICA

A.Giacomini^a, P. Legovini^b, G.Gessoni^a, S.Valverde^a, F. Antico^a, M.M. Salvadego^a, F. Manoni^a

^aDipartimento di Patologia Clinica, P.O. Chioggia (VE); ^bDipartimento di Matematica Pura e Applicata, Università di Padova

Scopo del lavoro

Mediante analisi ottica bidimensionale delle piastrine eseguita con l'analizzatore ematologico ADVIA 120TM, abbiamo valutato le modificazioni nel tempo della componente media piastrinica (MPC) indotte da due attivatori di comune utilizzo: l'ADP e la trombina.

Materiali e metodi

Abbiamo valutato 4 campioni di plasma ricco di piastrine (PRP) ottenuto mediante centrifugazione di campioni di sangue raccolti in sodio-citrato da donatori di sangue. I campioni presentavano una concentrazione media di piastrine di 409 ± 43 / μ L. Ciascun campione è stato diviso in tre aliquote: la prima (A) è stata attivata con ADP, 0.02mmol/L (ADP REAGENT, Sigma Diagnostics, St.Louis, MO, USA), la seconda (B) è stata attivata con trombina, 0.1 NIH units/L (ACCUCLOTTM THROMBIN TIME REAGENT, Sigma Diagnostics, St.Louis, MO, USA), la terza (C) rappresenta l'aliquota non attivata di controllo.

Le Aliquote A e B sono state analizzate su ADVIA 120TM Bayer Analyser (Bayer Corporation, Tarrytown, NY) a 15, 30, 45 e 60 minuti dopo l'attivazione. L'aliquota C è stata analizzata al tempo 0 (valore basale) e dopo 60 minuti di conservazione a temperatura ambiente.

Risultati

La media e la deviazione standard di MPC (g/dL) sono presentate nella Tabella:

Tempo trascorso dall'attivazione	A	B	C
0'			25.23 \pm 0.46
15'	26.88 \pm 0.07	25.70 \pm 0.12	
30'	26.00 \pm 0.20	24.58 \pm 0.22	
45'	24.75 \pm 0.03	23.20 \pm 0.37	
60'	23.60 \pm 0.12	22.05 \pm 0.10	24.93 \pm 0.95

L'analisi della varianza di MPC dimostra che l'effetto dei due attivatori utilizzati è significativamente diverso ($p < 0.01$), mentre la velocità di attivazione a partire da $t = 15'$ non differisce significativamente ($p = 0.96$) tra i due attivatori e si mantiene costante nel tempo.

L'MPC vede una fase iniziale di aumento a circa 15', seguita da una riduzione che si fa significativa a 45' per la trombina ($p < 0.05$) e a 60' per l'ADP ($p < 0.05$). L'aliquota C non attivata presenta invece una riduzione di MPC non significativa ($p = 0.62$).

Discussione e Conclusioni

Il modello sperimentale dimostra che l'MPC è un buon marcatore di attivazione piastrinica *in vitro* in grado di discriminare nel tempo l'effetto di due attivatori con caratteristiche diverse. Sembra quindi ragionevole, data anche la sua eccellente praticabilità, proporre l'utilizzo quale marcatore di attivazione piastrinica *in vivo*.

LE GAMMAPATIE MONOCLONALI NELLA POPOLAZIONE SAMMARINESE

M. Moretti, F. Nocentini, G.F. Fantini, F. Muccioli, A. Zani, U. Turchi, F. Casali.
Laboratorio Analisi Centro Trasfusionale Ospedale di Stato Repubblica di San Marino.

Scopo del lavoro

Le gammapatie monoclonali sono quadri patologici pleiomorfi dovuti alla proliferazione clonale di linfociti B in stadi avanzati di maturazione. Caratteristica comune è il riscontro di una immunoglobulina monoclonale (talora frammenti di questa) definita Componente Monoclonale (CM) nel siero e/o nell'urina.

La diagnosi è prettamente laboratoristica ed è realizzata combinando separazione elettroforetica delle proteine plasmatiche (eseguita su capillare o acetato di cellulosa o agarosio) e tipizzazione tramite immunofissazione (IFE) su gel d'agarosio o mediante immunosottrazione con metodica capillare (ISE).

Con questo lavoro si è voluto effettuare un'analisi retrospettiva delle CM individuate nel periodo 1991-2000.

Materiali e Metodi

Nel Laboratorio Analisi/Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Stato della Repubblica di San Marino la diagnosi di Componente Monoclonale da circa due anni è effettuata mediante elettroforesi capillare seguita da immunosottrazione su strumentazione CZE 2000 Beckman.

In precedenza l'elettroforesi e l'immunofissazione erano eseguite rispettivamente con strumentazione Jokoh CTE 1000 Alfa Biotech e Beckman Paragon (manuale).

Risultati

Dal 1991 al 2000 nel nostro laboratorio sono state individuate, a fronte di circa 100000 elettroforesi eseguite, 368 pazienti con componente monoclonale dei quali 20 con doppia componente.

Sono indicate in tabella la suddivisione per caratteristiche immunochimiche delle CM individuate.

Tipo di CM	IgG/K	IgG/ λ	IgM/K	IgM/ λ	IgA/K	IgA/ λ	Doppia CM
N°	161	92	43	15	24	12	28
%	44	25	11	4	6	3	7

Discussione e Conclusioni

L'analisi dei risultati ci permette di affermare che l'incidenza e la tipizzazione immunochimica delle CM nella popolazione della Repubblica di San Marino rispecchia la distribuzione descritta in altre popolazioni sia sul piano quantitativo che qualitativo.

Si sottolinea inoltre una sostanziale conferma nell'individuazione e nella caratterizzazione delle CM da parte delle metodiche analitiche impiegate: elettroforesi su acetato vs. elettroforesi capillare e IFE vs. ISE.

Utilizzo della FRAZIONE DI RETICOLOCITI IMMATURI (IRF) in corso di aplasia indotta da chemioterapia .

A. Pupillo, M. Schinella, *A. Petrone, *N. Fioroni

*Laboratorio Analisi chimico-cliniche e Microbiologia; * U.O. Pediatria, Ospedale S.Maria del Carmine – P.le S.Maria 6, 38068 Rovereto (TN)*

PREMESSA

La misurazione combinata dei reticolociti e della Frazione di Reticolociti Immaturi (IRF) consente attualmente un approccio più completo allo studio delle malattie ematologiche associate ad alterazioni dell'eritropoiesi e, in particolare, fornisce utili informazioni come nuovo e precoce indicatore di ripresa eritropoietica midollare.

Viene descritta l'efficacia dell'IRF come indice precoce di rigenerazione midollare dopo aplasia indotta da chemioterapia in una paziente affetta da leucemia acuta promielocitica (M3).

CASO CLINICO

Paziente di sesso femminile di anni 13, affetta da Leucemia acuta non linfatica promielocitica M3 FAB. Sottoposta a chemioterapia secondo protocollo AIDA LAP 0493, prima di induzione e successivamente, in remissione di malattia, a chemioterapia di consolidamento con citosina arabinoside (ARA C) ad alte dosi e idarubicina (IDA).

Dopo 12 giorni dall'inizio della terapia di consolidamento l'esame emocromocitometrico evidenziava: GR $2.2 \times 10^6 /\mu\text{l}$, Hb 6.8 g/dL, GB $0.4 \times 10^3 /\mu\text{l}$, piastrine $9 \times 10^3 /\mu\text{l}$, reticolociti 0%, IRF 0.0. La bambina presentava inoltre febbre, per cui veniva ricoverata presso la divisione di Pediatria dell'Ospedale di Rovereto per ricevere terapia antibiotica e.v.

Durante la degenza la paziente ha ricevuto due trasfusioni di emazie concentrate rispettivamente al dodicesimo e al ventunesimo giorno dall'inizio del ciclo di consolidamento, la prima per Hb 6.8 g/dL con G.R. $2.2 \times 10^6 /\mu\text{l}$ e la seconda per Hb 6.6 g/dL con G.R. $2.4 \times 10^6 /\mu\text{l}$. Ha ricevuto anche una trasfusione di piastrine da aferesi al tredicesimo giorno per piastrine $2 \times 10^3 /\mu\text{l}$. Quotidianamente è stata sottoposta a controlli dell'emocromo, dei reticolociti e dell'IRF.

MATERIALI E METODI

Per l'esame emocromocitometrico è stato utilizzato l'analizzatore ematologico Sysmex SE 9500 (Sysmex, Kobe, Giappone).

Per il conteggio reticolocitario è stato usato il contatore Sysmex R3000 (Sysmex, Kobe, Giappone). L'IRF è stato ottenuto sommando le Frazioni ad Alta e Media fluorescenza fornite dallo strumento (V.N.0.04-0.20).

RISULTATI

La leucopenia dopo chemioterapia è durata dal dodicesimo al venticinquesimo giorno dall'inizio del ciclo di chemioterapia di consolidamento, con nadir dei G.B. = $0.3 \times 10^3 /\mu\text{l}$ prolungato dal tredicesimo al sedicesimo giorno: G.B. $< 0.5 \times 10^3 /\mu\text{l}$ sino al giorno ventiduesimo; G.B. tra $0.5 \times 10^3 /\mu\text{l}$ e $1.2 \times 10^3 /\mu\text{l}$ dal ventiduesimo al venticinquesimo giorno con neutrofili $> 0.5 \times 10^3 /\mu\text{l}$ al venticinquesimo giorno. La piastrinopenia ($< 50 \times 10^3 /\mu\text{l}$) è durata dal dodicesimo al venticinquesimo giorno dall'inizio del consolidamento con nadir al tredicesimo giorno ($2 \times 10^3 /\mu\text{l}$).

La reticolocitopenia si è protratta sino al ventitreesimo giorno. Al ventunesimo giorno dall'inizio del ciclo di consolidamento è stato osservato un innalzamento dell'IRF = 0.15 che il giorno successivo ha raggiunto il valore di 0.22.

CONCLUSIONI

L'IRF ha rappresentato il primo e più sensibile indicatore di rigenerazione midollare che ha seguito il blocco indotto da chemioterapia.

L'incremento dell'IRF infatti ha preceduto l'innalzamento del numero totale dei reticolociti, dei leucociti e dei granulociti neutrofili rivestendo un valore predittivo sulla risoluzione dell'aplasia.

STUDIO DELLA MALATTIA MINIMA RESIDUA: NUOVO APPROCCIO DIAGNOSTICO MEDIANTE CITOMETRIA A FLUSSO

M.Sanzari^a, L.De Zen^b, K.Polato^b, S.Disarò^b, E. Michelin^b, G.Basso^b, M.Plebani^{a,c}

^a Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova

^b Cl. Oncoemat. Ped., Università di Padova

^c Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

INTRODUZIONE Lo studio della malattia residua minima (MRD) in biologia molecolare si è dimostrato di fondamentale importanza nella prognosi delle leucemie linfoblastiche acute a precursori B e T dell'età pediatrica. Con l'introduzione del nuovo protocollo di terapia AIEOP-BFM dal settembre 2000 tutti i pazienti sono monitorati per MRD in base al riarrangiamento del T-Cell Receptor (TCR) e su questi dati viene decisa la categoria di rischio. La MRD può essere studiata anche in citometria a flusso, caratterizzata dall'essere di maggior rapidità di esecuzione ed analisi, economicamente più vantaggiosa e con valori di sensibilità paragonabili alle tecniche molecolari ($10^4/10^5$). In collaborazione con i Centri di Monza, Berlino e Vienna abbiamo quindi iniziato una valutazione della MRD in base all' immunofenotipo presentato alla diagnosi utilizzando un approccio multiparametrico a 4 colori.

MATERIALI E METODI Da settembre 2000 a giugno 2001 sono stati studiati 168 pazienti affetti da LLA provenienti dai Centri AIEOP. 151 erano LLA a precursori B e 16 LLA-T.

Per ciascun paziente sono state scelte due-tre combinazioni informative comprendenti antigeni espressi sulle cellule blastiche in modo aberrante per intensità di espressione, asincronismo maturativo e di linea.

Accanto allo studio del midollo osseo (BM), abbiamo considerato anche il sangue periferico (PB), molto più accessibile e quindi monitorabile con frequenza maggiore. I time-point considerati per BM + PB sono: diagnosi, 15° g, 33°g, 78°g, inizio mantenimento, fine terapia; per il PB viene studiato anche il giorno +8°.

L'analisi dei blasti non è limitata alla valutazione in termini di percentuale sulla popolazione totale, ma viene seguita una quantificazione in mm^3 utilizzando la combinazione SYTO16/CD45/CD19/7ADD.

Le combinazioni più frequentemente utilizzate sono state: CD10/CD34/CD19/CD20, CD10/CD11a/CD19/CD34, CD10/KORSA/CD19/CD34.

RISULTATI E CONCLUSIONI La citometria a flusso ci ha permesso di valutare la MRD con sensibilità di 10^{-4} confermandosi una tecnica alternativa alla biologia molecolare in particolare per le prime fasi di terapia (studio della clearance dei blasti). Da sottolineare l'aspetto rigenerante del midollo al giorno +78 con alta percentuale di cellule CD34+, che se da un lato riduce la sensibilità nell'individuazione dei blasti dall'altro ci ha permesso di evidenziare nuovi aspetti del midollo immaturo.

LA MIELOPOIESI NORMALE E LE MIELODISPLASIE IN ETÀ PEDIATRICA: NUOVO APPROCCIO DIAGNOSTICO MEDIANTE CITOMETRIA A FLUSSO

M.Sanzari^a, L.De Zen^b, K.Polato^b, S.Disarò^b, L.Del Vecchio^c, G.Basso^b, M.Plebani^{a,e}

^a Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova

^b Cl. Oncoemat. Ped., Università di Padova

^c Serv.Imm, Osp. Cardarelli, Napoli.

^e Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto (TV)

INTRODUZIONE Lo studio del midollo osseo normale è stato finora essenzialmente basato sulla morfologia che, sebbene cardine nella diagnostica ematologica, è una tecnica operatore-dipendente in grado di studiare poche cellule valutandone solo l'aspetto e non la funzione. La citometria a flusso analizza moltissime cellule per campione e fornisce in modo obiettivo informazioni sia morfologiche che biologiche legate all'espressione di antigeni cellulari.

Scopo del lavoro è stato quello di analizzare la mielopoiesi midollare normale in età pediatrica mediante citofluorimetria, data anche la mancanza di studi in letteratura, e di applicare i risultati ottenuti allo studio di midolli displastici.

MATERIALI E METODI Sono stati raccolti 29 campioni di aspirato midollare di bambini affetti da patologia non ematologica (stadiazione in corso di linfomi/sarcomi/neuroblastomi, epatosplenomegalia di n.d.).

Lo studio dell'immunofenotipo è stato eseguito con un pannello di combinazioni a 4 colori. Ciascuna combinazione comprendeva sempre un anticorpo monoclonale (MoAb) usato come gate immunologico; la scelta degli altri MoAbs non era casuale, ma includeva antigeni espressi sulle cellule più immature e antigeni caratteristici delle cellule mature in modo da poter evidenziare le varie fasi di differenziazione cellulare.

Il pannello applicato era il seguente: 1)CD16/CD11b/CD45/CD34, 2)CD66c/CD11b/CD45/CD34, 3)CD15/CD14/CD45/CD33, 4)CD65/CD15/CD45/HLADR.

RISULTATI L'immagine citofluorimetrica per ciascuna combinazione era in grado di identificare diversi stadi di maturazione cellulare, rappresentati da mieloblasti, caratteristicamente positivi per CD34, promielociti, con progressiva espressione di CD11b e CD66c, mielociti, metamielociti, neutrofili a bande e neutrofili maturi che mostrano una intensità di espressione sempre più alta per CD16, CD66c, CD15. Lo studio dei monociti è risultato migliore applicando la combinazione n°3, nella quale si evidenzia una progressiva espressione del CD14, molto intenso nei monociti maturi caratterizzati da una più debole intensità del CD15 rispetto agli stadi intermedi. Le immagini ottenute dallo studio dell'immunofenotipo si sono rivelate costanti in ciascuno dei midolli normali studiati. Confrontando campioni di midollo displastico, è risultato estremamente obiettiva l'identificazione di popolazioni cellulari caratterizzate da anomala maturazione. Questa anomalia di differenziazione si traduce dal punto di vista dell'immunofenotipo in diversa intensità di espressione dei MoAbs rispetto al normale (fenotipo aberrante) sia in eccesso che in difetto.

In fig. 1a è illustrato un esempio di midollo normale confrontato con un midollo displastico (fig. 1b).

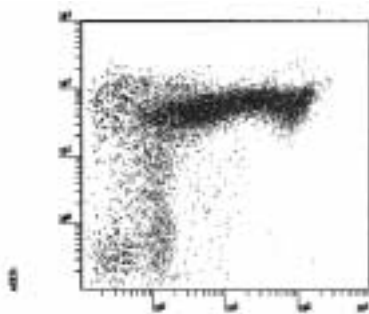


Fig. 1a

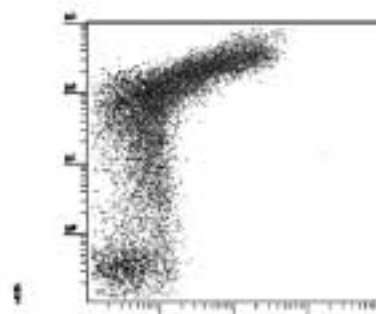


Fig. 1b

CONCLUSIONI Questo studio può contribuire ad una più accurata definizione della maturazione cellulare normale, riferimento fondamentale nella valutazione delle patologie midollari. Inoltre l'approccio multiparametrico a 4 colori si è rivelato rapido, sensibile, obiettivo e riproducibile per lo studio di alterazioni della linea mielomonocitaria.

UTILITA' DELLA CITOMETRIA A FLUSSO NELLA DIAGNOSI DI EMOGLOBINURIA PAROSSISTICA NOTTURNA

M.M. Ciriello^a, T. Callegari^a, S. Riva^a, L. Giargia^a, B. Allione^b, C. Arfini^a

^aDipartimento di Patologia Clinica, Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera, Alessandria

^bDipartimento di Ematologia e Medicina Trasfusionale, UOA Ematologia, Azienda Ospedaliera, Alessandria

Scopo del lavoro

L'Emoglobinuria Parossistica Notturna (EPN) è un raro disordine clonale della cellula staminale emopoietica caratterizzato clinicamente da insufficienza midollare, trombosi ed anemia emolitica cronica con episodi acuti. La malattia è causata da mutazioni somatiche del gene PIG-A del cromosoma X che codifica per enzimi richiesti nella biosintesi dell'ancora GPI. Più di 20 proteine "GPI-anchored" sono variamente espresse su cellule ematologiche e funzionano da enzimi, recettori, proteine regolatorie del complemento, molecole di adesione e trasduttori del segnale. La riduzione o assenza di proteine GPI-anchored determina un'alta suscettibilità dei globuli rossi affetti alla lisi mediata da complemento; lo stesso difetto biochimico sulla superficie delle piastrine potrebbe spiegare almeno in parte le manifestazioni trombotiche.

Recentemente con l'introduzione delle tecniche di Biologia Molecolare è stato possibile definire la lesione genotipica dell'EPN; un contributo altrettanto significativo e complementare deriva dalla Citometria a Flusso, che mediante l'impiego degli Anticorpi Monoclonali rende possibile la definizione delle anomalie fenotipiche dell'EPN.

Dal 1985 a oggi sono stati scoperti deficit di più di 20 Proteine "GPI-anchored" con l'uso di Anticorpi Monoclonali su tutte le popolazioni cellulari midollari (CD14, CD16, CD24, CD48, CD55, CD59, CD66b). Esse sono variamente espresse sulle cellule ematologiche: il CD59 ad esempio, è una proteina di regolazione del complemento la cui assenza causa una maggiore sensibilità delle membrane eritrocitarie alla lisi complemento-mediata.

Lo scopo del nostro lavoro, in accordo con il Gruppo Piemontese di Citometria, è stato di stabilire le linee guida per la valutazione citofluorimetrica dei cloni EPN.

Materiali e metodi

Il protocollo applicato a tutti i casi di sospetto clone EPN, prevede l'impiego dei seguenti marcatori: CD59 valutato su globuli rossi e granulociti, CD14 sui monociti, CD48 su linfociti e monociti, CD66b sui granulociti. La valutazione di tutti i marcatori si effettua su istogramma, confrontando le differenze di espressione rispetto a un sangue normale, mediante l'uso di citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson).

Risultati

In questo modo si identificano tre popolazioni: una di cellule totalmente negative al marcatore (EPN III), una di cellule debolmente positive (EPN II) e una di cellule normalmente positive (EPN I). L'immunofenotipo è compatibile con EPN quando è presente una popolazione cellulare EPN III > 15%, o quando sono presenti le due popolazioni EPN III ed EPN II.

Nella nostra esperienza abbiamo riscontrato un caso di positività all'indagine citofluorimetrica per EPN confermato dai dati clinici e dal test di Ham.

Discussione e conclusioni

Il lavoro svolto ha dimostrato che l'analisi delle proteine "GPI-anchored" effettuata su tutte le cellule ematologiche mediante Citofluorimetria a flusso risulta una tecnica specifica e sensibile per lo screening e la diagnosi dell'EPN. Essa, a differenza degli altri metodi come il test di Ham, permette di effettuare una diagnosi di EPN precocemente, così da identificare pazienti ad alto rischio trombotico.

INFEZIONE DA TRIPANOSOMA BRUCEI RHODESIENSE IN UN VIAGGIATORE DI RITORNO DA KENIA E TANZANIA.

M.Brini¹, L. Albertazzi¹, R. Longo¹, C. Capatti², E. Gabbi³

¹ Laboratorio Analisi Chimico-Clinico, ² Laboratorio di Microbiologia, ³ U.O. Malattie Infettive.

Arcispedale S. Maria Nuova –Reggio Emilia.

Scopo del lavoro

Scopo del nostro lavoro è la descrizione di un caso di tripanosomiasi africana da *Tripanosoma (T.) brucei rhodesiense* contratta da un uomo italiano di ritorno da un viaggio di 15 gg. in Kenia e Tanzania che clinicamente presentava un quadro di C.I.D. e insufficienza multiorganica (MOF).

Materiali e Metodi

Un uomo di 30 anni nel marzo 2001 è pervenuto al P.S. dell'Arcispedale "S. Maria Nuova" di Reggio Emilia con i sintomi di febbre e una lesione puruloide sulla caviglia sx. I parametri biumorali mostravano una CID in corso, incremento di AST, ALT, bilirubina, creatinina, e grave piastrinopenia (6.000/mm³). L'osservazione dello striscio di sangue periferico, eseguito per verificare al M.O. il basso valore strumentale delle piastrine, ha messo in evidenza con tempestività la presenza di T. in elevato numero (3,8 parassiti per campo 1000x). È stato immediatamente iniziato il trattamento con Pentamidina (e.v. 4 mg/Kg ogni 48 h per 10 dosi), farmaco di seconda scelta nella tripanosomiasi. Il secondo giorno è comparsa insufficienza renale con anuria che ha richiesto in trattamento con emodialisi (15 in 25 gg.)

I parassiti sono scomparsi dal sangue periferico dopo la seconda dose di Pentamidina; la creatinina è tornata normale dopo 38 gg. Il paziente è attualmente in buona salute, sotto controllo clinico e laboratoristico per 12 mesi.

Discussione e Conclusioni

La Tripanosomiasi è una patologia endemica nell'est del continente africano, ma solo pochi casi sono riportati in viaggiatori europei, solitamente di ritorno da viaggi in parchi nazionali. Ricordare l'esistenza di questa patologia, anche al di fuori delle zone endemiche, è importante poiché la tempestività della diagnosi condiziona il decorso clinico della malattia e permette la rapida attivazione nella ricerca dei farmaci di prima scelta, difficilmente reperibili.

Si ribadisce inoltre l'importanza di linee guida per i controlli al M.O. di dati strumentali anomali che possono dare indicazioni sia sul parametro valutato (in questo caso piastrine) ma anche su patologie di altra natura.

VALUTAZIONE DELLA CELLULARITA' DEGLI AGOASPIRATI DI MIDOLLO OSSEO: CORRELAZIONE FRA METODICHE MANUALI E CONTEGGIO STRUMENTALE

PAPARO^a C., MARTINELLI^a F., CAMETTI^b G., TOMMASI^c M., REVERSO^a GIOVANTIN E.,

^aLaboratorio Analisi, ^bDivisione di Medicina, Ospedale Maggiore Chieri (TO)

^cAbbott Divisione Diagnostici Roma.

Scopo del lavoro: correlazione della cellularità morfologica valutata sugli agoaspirati (citologica) e sulla biopsia osteo – midollare (bioptica) con il conteggio strumentale dell'analizzatore ematologico Cell-Dyn 4000(Abbott).

Materiali e Metodi

Abbiamo eseguito contemporaneamente in 45 campioni agoaspirato e biopsia osteo-midollare, prelevando 1ml di sangue midollare, che in parte (0.5 ml) è stato aliquotato in una provetta con EDTA-K3 per il conteggio strumentale, e in parte è servito per la preparazione degli strisci. Sono stati strisciati i frustoli isolati quando presenti, o il sangue midollare in loro assenza. In quest'ultimo caso i campioni sono stati esclusi dalla valutazione della cellularità.

Per ultimo è stato prelevato il tassello osseo, posto immediatamente nella soluzione fissativa Mielodec (Bio-Optica, Milano) per 60', al termine dei quali la soluzione viene sostituita con alcool etilico 70%, ed inviato successivamente presso il servizio di Anatomia Patologica per la normale processazione istopatologica. La cellularità citologica è stata valutata sull'osservazione del frustolo al microscopio a piccolo ingrandimento (10x) ed espressa percentualmente in base al tessuto emopoietico presente rispetto al tessuto adiposo, lo stesso approccio utilizzato dall'Anatomo Patologo.

Per l'analisi strumentale il sangue-EDTA, viene analizzato in modalità Lisi-Estesa a distanza di qualche ora dal prelievo senza alcun pretrattamento del campione.

Il conteggio strumentale ha fornito il valore WBC e il valore assoluto e percentuale rispetto a 100 globuli bianchi degli eritroblasti (NRBC) presenti. Per il calcolo della cellularità midollare totale è stata fatta la somma dei due conteggi assoluti (Totale Cellule Nucleate/mm³).

Risultati

Correlazione della cellularità citologica verso la cellularità bioptica.

Solo 33 campioni (73%) erano idonei per entrambe le metodiche, 7 (15%) non erano idonei per la biopsia e 5 (11%) non contenevano frustoli. La correlazione fra le due metodiche è stata: $r = 0.772$

Correlazione delle tre metodiche: abbiamo suddiviso, in base alla cellularità citologica, i campioni in tre classi cellulari, **1° classe con cellularità ridotta < 30%**; **2° classe con cellularità normale 30-50%**; **3° classe con cellularità aumentata > 50%** e abbiamo valutato la distribuzione dei campioni secondo le altre metodiche, ottenendo un valore medio, minimo e massimo per ognuna (tab. 1)

TAB 1	1° classe			2° classe			3° classe		
	Cell-Dyn	Frustolo	Biopsia	Cell-Dyn	Frustolo	Biopsia	Cell-Dyn	Frustolo	Biopsia
40 casi :	8	8	6	16	16	15	16	16	15
Media	32514	17.5%	32.5%	72556	40%	46.7%	126200	68.7%	64.9%
Minimo	10350	10%	20%	18310	20%	20%	12278	55%	40%
massimo	56300	25%	45%	157400	50%	70%	258000	90%	90%

Discussione e Conclusioni

La difficoltà maggiore nel classificare correttamente i campioni secondo la cellularità citologica si ha con i campioni con cellularità ridotta; in questi casi il conteggio strumentale, in presenza di frustoli, fornisce una ulteriore conferma. La correlazione tra cellularità morfologica e cellularità bioptica è risultata buona; il conteggio strumentale correla con buona approssimazione con entrambe le metodiche e consente di esprimere i risultati in valori assoluti.