

Il significato clinico degli eritroblasti: un insolito esordio di anemia refrattaria con eccesso di blasti di tipo 2

Marco Moretti, Filippo Centis, Simonetta Gasperoni, Simona Rapa, Barbara Pieretti, Maria Rita Sadori, Daniela Sbrozzi, Giulia Tombari, Enzo Pazzaglia

Patologia Clinica, AO Ospedali Riuniti Marche Nord, Pesaro (PU)

ABSTRACT

The clinical relevance of nucleated red blood cells: an unusual onset of refractory anaemia with excess blasts.

Nucleated red blood cells (NRBCs) in adult peripheral blood (PB) are often a signal of severe haemopoietic stress. Refractory anaemia with excess blasts (RAEB) is a myelodysplastic syndrome characterized by ineffective hemopoiesis and diserythropoiesis; two categories of RAEB (1-2) are recognized, defined by the amount of blasts in the bone marrow (BM) and in PB. We describe an unusual onset of RAEB-2 in a patient with asthenia, weight loss and fatigue. The automated blood cells analysis and optical microscopic PB smear revision showed severe anemia, mild thrombocytopenia, blasts, NRBCs and dysplasia. After definitive diagnosis (RAEB-2) and one year of appropriate treatment, the patient shows normalized haematological values with just some optical microscopic hints of dysplasia. NRBCs play a pivotal role to trigger the diagnostic process and are useful in the follow-up. We highlight the role of automated haematology analysers with improved features in NRBCs analysis.

CASO CLINICO

Il caso clinico descritto riguarda un paziente di 75 anni per il quale il medico di medicina generale (MMG) aveva richiesto un pannello esteso di esami di laboratorio (funzionalità epatica, renale, metabolismo glicemico, esame emocromocitometrico, bilancio marziale, indici di flogosi ed esame delle urine) per astenia e calo ponderale negli ultimi due mesi.

Sono risultati nella norma tutti i parametri richiesti a eccezione di una grave alterazione dei parametri ematologici. L'esame emocromocitometrico, condotto mediante emocromocitometria automatizzata (Sysmex® XN) e revisione microscopica ha evidenziato: severa anemia lievemente ipocromica-microcitica (globuli rossi $2,07 \times 10^{12}/L$, emoglobina 48 g/L, volume eritrocitario medio di 79 fL, contenuto e concentrazione emoglobinica leggermente diminuiti e marcato aumento dell'indice di anisocitosi eritrocitaria) con marcata anisopoichilocitosi e policromasia, modesta presenza di dacriociti e schistociti, punteggiatura basofila e anelli di Cabot. Erano presenti inoltre numerosi eritroblasti (108/100 globuli bianchi) a diversi stadi maturativi con marcati segni di displasia (ponti nucleari e citoplasmatici, binuclearità, alterazioni della emoglobinizzazione). La conta reticolocitaria automatizzata era 0,6%; le piastrine

erano diminuite ($82 \times 10^9/L$) con anisocitosi e alcune piastrine giganti. I globuli bianchi erano $5,68 \times 10^9/L$ di cui 70% neutrofili ($3,976 \times 10^9/L$), 12% linfociti ($0,68 \times 10^9/L$), 6% monociti ($0,34 \times 10^9/L$). Si riscontrava il 6% di precursori mieloidi (3% promielociti e 3% mielociti) e il 6% di blasti con presenza di marcati segni di displasia nucleare e citoplasmatica.

Il quadro laboratoristico ha avviato, secondo quanto previsto dalla procedura di gestione e comunicazione dei valori critici della nostra Unità Operativa, il contatto immediato con il MMG richiedente che ha disposto in giornata il ricovero in reparto specialistico del paziente per le iniziali terapie di supporto (trasfusioni di emazie concentrate) e gli accertamenti necessari per arrivare alla diagnosi definitiva.

L'analisi immunofenotipica dell'aspirato midollare, normocellulare, ha evidenziato un profilo compatibile con una mielodisplasia in trasformazione, caratterizzato da importante incremento della frazione CD45- associabile a precursori eritroidi (CD36+, CD71+/-). La componente leucocitaria era ridotta con una discreta percentuale linfoide matura senza evidenza di alterazioni nei rapporti quantitativi delle principali sottopopolazioni, la frazione granulocitaria matura era diminuita con presenza di un "cluster" (8%) di elementi di piccole dimensioni con ridotto valore di "Side Scatter", a fenotipo mieloide

Corrispondenza a: Marco Moretti, Patologia Clinica, A.O. Ospedali Riuniti Marche Nord, Pesaro. Tel. 0721882695, Fax 0721882304, E-mail marcomoretti18@libero.it

Ricevuto: 17.02.2015

Revisionato: 15.03.2015

Accettato: 31.03.2015

immaturato (CD34+, CD117+, DR+, CD3+, CD15-).

La biopsia midollare ha evidenziato ipercellularità eritroide, citopenia mieloide e piastrinica con segni di disgranulo e dismegacariocitopenia e alterazioni nella topografia tissutale (eritropoiesi e megacariocitopenia dislocate nelle aree normalmente occupate dalla frazione granulocitaria, moderato incremento della trama reticolinica e modesta infiltrazione linfocitaria), elementi CD34+ pari al 10-12%.

L'analisi citogenetica mediante ibridazione *in situ* fluorescente, ha mostrato il 60% di nuclei in interfase con delezione 5q31 e monosomia del cromosoma 7 e il 45% dei nuclei con delezione 12p13.

La diagnosi definitiva è stata di anemia refrattaria con eccesso di blasti di tipo 2 (AREB-2) con "International Prognostic Scoring System" (IPSS) intermedio/2.

Il paziente è stato trattato con cicli di azacitidina ottenendo un progressivo miglioramento del quadro clinico e dei parametri ematologici senza più necessità di trasfusioni. A distanza di un anno l'esame emocromocitometrico, automatizzato e con verifica microscopica, mantiene valori di normalità nei conteggi, assenza di blasti ed eritroblasti con persistenza di alcuni segni di displasia eritrocitaria e granulocitaria.

DISCUSSIONE

Le sindromi mielodisplastiche sono un gruppo eterogeneo e complesso di neoplasie ematologiche clonali della cellula staminale ematopoietica, che producono un'emopoiesi alterata e inefficace per difetti irreversibili della differenziazione cellulare e aumentata apoptosi. Sono caratterizzate da citopenie, displasia uni o multilineare, presenza di blasti midollari inferiore al 20%, frequenza elevata di alterazioni citogenetiche/molecolari e rischio significativo di evoluzione in leucemia acuta (1). L'AREB costituisce il 40% di tutte le sindromi mielodisplastiche, è caratterizzata dalla presenza di blasti in percentuale compresa fra il 5-19% nel midollo osseo (MO) e il 2-19% nel sangue periferico (SP). Colpisce principalmente soggetti di età superiore ai 50 anni con esordio clinico legato ai segni di insufficienza midollare (anemia e/o trombocitopenia e/o neutropenia).

Oltre alla riduzione quantitativa di una o più linee cellulari ematiche, l'analisi microscopica del SP evidenzia la presenza di segni di displasia: anisopoichilocitosi, policromasia, punteggiatura basofila (serie eritroide), anisocitosi piastrinica con piastrine giganti e ipogranularità (serie megacariocitaria), alterazioni nella segmentazione nucleare e della granulazione (serie granulocitaria). La displasia è accompagnata dalla presenza in circolo di una quota variabile di blasti che possono avere o meno granuli citoplasmatici e corpi di Auer.

L'esame immunofenotipico dell'aspirato midollare presenta un aumento delle cellule CD34+ e/o CD117+, "human leukocyte antigen" (HLA)-DR e antigeni mieloidi come il CD13 e il CD33. Spesso è presente un asincronismo maturativo nella espressione degli antigeni della serie mieloide o l'espressione di antigeni aberranti

della serie linfoide come il CD7 e il CD56.

Il MO è generalmente ipercellulare (solo una piccola percentuale di AREB presentano ipocellularità midollare) con aumento dell'eritropoiesi e megacariocitopenia dislocate nelle zone paratrabecolari normalmente occupate dalla granulopoiesi. Nel 15% dei casi è presente fibrosi midollare.

L'eritropoiesi è inefficace e displastica, gli eritroblasti presentano alterazioni della lobularità dei nuclei e talora binuclearità, ponti internucleari e intercitoplasmatici e disemoglobinizzazione. Anche la megacariocitopenia è solitamente incrementata, inefficace e displastica con la presenza di "cluster" di megacariociti e di micromegacariociti con alterazioni nella lobulazione nucleare. Le alterazioni più frequenti della linea mieloide riguardano ipo o ipersegmentazione dei nuclei, ipogranularità citoplasmatica e asincronie maturative nucleo-citoplasmatiche. I blasti, individuati mediante immunocitochimica, tendono a formare aggregati lontano dalle trabecole e dalle strutture vascolari del MO.

Nel 30-50% dei casi sono presenti alterazioni citogenetiche quali +8, -5, -7, del(5q), del(7q) e del(20q) con presenza, talora, di cariotipi complessi.

In base alla percentuale di blasti nel MO e nel SP si distinguono due categorie di AREB: l'AREB-1 con percentuali di blasti nel MO e SP comprese rispettivamente fra il 5-9% e il 2-4% e l'AREB-2 con percentuali comprese fra il 10-19% nel MO e il 5-19% nel SP. La presenza di corpi di Auer nei blasti, prescindendo dalla loro percentuale, classifica il quadro come AREB-2. Il razionale della classificazione è legato alla diversa sopravvivenza e alla diversa incidenza di evoluzione in leucemia mieloide acuta nelle due categorie (25% vs 33%) con prognosi peggiore nel tipo 2.

L'evoluzione della patologia è legata alla progressiva citopenia o all'evoluzione in leucemia mieloide acuta (2). È stato definito un IPSS (3) che in base alla percentuale di blasti midollari, al cariotipo e alle caratteristiche delle citopenie definisce quattro categorie di rischio (basso, intermedio 1 e 2, alto) a cui corrispondono mediane di sopravvivenza che vanno dai 72 ai 4 mesi.

La terapia è basata sul supporto delle citopenie (emazie concentrate, fattori di crescita, antiemorragici, concentrati piastrinici, antibiotici), utilizzo di demetilanti (decitabina e azacitidina) e in alcuni casi il ricorso al trapianto di cellule staminali emopoietiche.

Il quadro presentato descrive un caso di esordio di AREB-2 che, oltre alle caratteristiche tipiche della patologia, si presenta con una marcata dismissione in circolo di eritroblasti.

Questa modalità di presentazione ci ha consentito di riflettere sul significato clinico degli eritroblasti e sullo stato dell'arte nel loro riconoscimento in Medicina di Laboratorio.

Da un punto di vista clinico, salvo rare eccezioni, la presenza di eritroblasti nel sangue periferico dell'adulto è sintomo di un importante stress midollare e emopoietico (danno al microambiente midollare, emopoiesi inefficace, incremento estremo dell'eritropoiesi) che deve essere indagato (4); la loro quantificazione è inoltre un rilevante

fattore prognostico in diverse patologie (5, 6).

L'importanza clinica degli eritroblasti ha spinto la diagnostica di laboratorio verso lo sviluppo di tecnologie in grado di rispondere a questo bisogno. All'inizio dell'era dell'emocitometria automatizzata, gli eritroblasti rappresentavano un importante problema analitico che poteva simulare, a causa della loro morfologia, simile a quella dei linfociti maturi, pseudoleucocitosi e pseudolinfocitosi oltre a comportare il loro mancato riconoscimento (4). L'evoluzione tecnologica ha portato alla generazione attuale di emocitometri che sono in grado di segnalare o contare gli eritroblasti mediante allarmi o canali specifici di conta attivabili a richiesta o disponibili direttamente su tutti i campioni (7, 8).

Le offerte tecnologiche sono diverse e supportate da filosofie analitiche eterogenee che si basano su elaborazioni software, lisi cellulari selettive e utilizzo di coloranti fluorescenti.

Pur con diverse rese in termini di accuratezza del dato, l'analisi degli eritroblasti è una delle più importanti evoluzioni tecnologiche dell'emocitometria automatizzata dell'ultimo decennio.

La possibilità di conteggiare su tutti i campioni gli eritroblasti, come nel caso delle strumentazione Sysmex® XN, mediante reattivi specifici e un canale dedicato, consente di raggiungere un'ottima sensibilità per elementi che anche in piccola percentuale sono spia di un severo impegno midollare (9). Il caso presentato sottolinea inoltre come il risultato strumentale possa orientare verso l'analisi microscopica che a sua volta può confermare e integrare l'emocitometria automatizzata nei dati numerici (conta piastrinica e dei globuli bianchi), nel riconoscimento cellulare (blasti, immaturi mieoidi, eritroblasti) e nell'evidenziare la presenza di alterazioni displastiche.

E' importante, a nostro avviso, mettere in luce come una prima linea di diagnostica ematologica (analizzatori, microscopia, unitamente alla disponibilità di un sistema gestionale di settore) possa attivare un rapido iter diagnostico e costituisca un semplice ma efficace presidio per il monitoraggio della patologia (10).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. D'Onofrio G, Zini G. *Morfologia delle malattie del sangue*. Roma: Verduci Editore, 2013.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*, 4th ed. Lyon, France: IARC Press, 2008.
3. Greenberg P, Teuchler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;120:2454-65.
4. Miconi V. Gli eritroblasti: performance strumentali e significato clinico. *IJLaM* 2008;4(suppl):98-101.
5. Otsubo H, Kaito K, Asai O, et al. Persistent nucleated red blood cells in peripheral blood is a poor prognostic factor in patients undergoing stem cell transplantation. *Clin Lab Haematol* 2005;27:242-6.
6. Stachon A, Böning A, Krismann M, et al. Prognostic significance of erythroblasts in blood after cardiothoracic surgery. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:239-43.
7. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts. *State of the art. Am J Clin Pathol* 2008;130:104-16.
8. Miconi V, Cenci AM, Moretti M, et al. Erythroblasts clinical relevance and analytical performances in automated hematology. *Int J Lab Hem* 2010;32(suppl 1):85.
9. Tantanate C, Klinbua C. Performance evaluation of the automated nucleated red blood cell enumeration on Sysmex XN analyser. *Int J Lab Hematol* 2015;37:341-5.
10. Moretti M, Cenci AM. Le facilitazioni informatiche in ematologia di laboratorio. *Riv Ital Med Lab* 2014;10:136-40.