

## Limiti della conta reticolocitaria automatizzata basata sulla citometria a flusso: descrizione di un caso clinico

Dino Veneri<sup>1</sup>, Pietro Solero<sup>2</sup>, Massimo Franchini<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione di Ematologia, Università di Verona, Verona

<sup>2</sup>Istituto di Chimica e Microscopia Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Verona

<sup>3</sup>Centro di Immunoematologia e Trasfusione, Azienda Ospedaliera di Verona, Verona

### ABSTRACT

#### Limits of automated reticulocyte counting based on flow cytometry: description of a case report

Automated reticulocyte counting based on flow cytometry has been widely utilized in the last few years from many hematology laboratories due to its rapidity of execution and analytical precision. However, in some cases, reticulocyte count may be overestimated due to the presence in erythrocyte cytoplasm of basophilic inclusions. In fact, we report here the case of a patient with myelodysplastic syndrome and a false raised reticulocyte count on flow cytometry analysis. Thus, in our opinion, in patients with myelodysplastic syndrome the reticulocyte count has to be verified in order to check automated flow cytometry results.

### RIASSUNTO

La conta automatizzata dei reticolociti basata sulla citometria a flusso si è rapidamente diffusa in questi ultimi anni nei laboratori di ematologia grazie alla sua rapidità di esecuzione ed alla precisione analitica. Tuttavia, in alcuni casi la conta reticolocitaria può risultare sovrastimata a causa della presenza nel citoplasma delle emazie di punteggiature basofile. Riportiamo infatti qui un caso clinico di un paziente con sindrome mielodisplastica ed una conta reticolocitaria falsamente elevata all'analisi citometrica. Pertanto, a nostro avviso, nei pazienti con sindrome mielodisplastica è necessario controllare con metodica manuale i risultati ottenuti con l'analisi citometrica automatizzata.

### INTRODUZIONE

L'introduzione delle conte automatizzate dei reticolociti, basate sulla citometria a flusso, ha portato ad un ampio utilizzo di tale parametro, in quanto di rapida esecuzione e di maggiore precisione analitica (1-4). La conta reticolocitaria automatizzata può tuttavia risultare erroneamente elevata quando siano presenti nel citoplasma delle emazie inclusioni, più frequentemente dovute alle punteggiature basofile, secondarie all'anomala persistenza e aggregazione dei poliribosomi dei reticolociti (5-8). Riportiamo qui un caso clinico di un paziente con sindrome mielodisplastica comprovante i limiti di questa metodica.

### MATERIALI E METODI

I reticolociti sono stati analizzati sia con metodica manuale che con sistema automatizzato basato sulla citometria a flusso.

Il sistema automatizzato utilizzato è stato il modello ADVIA120 Bayer HealthCare (Tarrytown, NY, USA). La descrizione della metodica automatizzata è la seguente: i reticolociti vengono prima sfericizzati isovolumetricamente mediante l'azione di un detergente a ione bipolare (tensioattivo) e poi colorati in modo diverso a seconda del contenuto di RNA mediante un colorante cationico, oxazina 750. Il rilevamento avviene mediante misurazione scat-

ter low angle (da 2° a 3°) e high angle (da 5° a 15°) per determinare la dimensione e la concentrazione di emoglobina e mediante assorbanza per determinare il contenuto di RNA cellulare, che è direttamente proporzionale all'assorbimento della luce. I limiti della metodica, per sovrastima, sono costituiti dalla presenza nel sangue periferico di macrotrombociti, di cellule falciformi, di globuli rossi nucleati, di eritrociti con corpi di Pappenheimer, corpi di Howell-Jolly, corpi di Heinz, inclusioni che generano gradazioni basofile, nei casi di malaria e anemia megaloblastica.

La metodica manuale avveniva mediante colorazione per microscopia mediante soluzione di Blu cresile brillante (Merck KgaA, Darmstadt, Germania). La descrizione della metodica manuale è la seguente: la colorazione avviene previa incubazione a fresco del sangue anticoagulato in soluzione di colorante Blu cresile brillante per 15' - 30'. Tale colorazione induce la precipitazione e l'aggregazione dei ribosomi nella sostanza granulo-filamentosa che risalta all'esame al microscopio sullo sfondo del citoplasma. Gli strisci vengono quindi effettuati su vetrino dopo la colorazione. Il conteggio dei reticolociti avviene al microscopio in modo indiretto: la proporzione dei reticolociti con sostanza granulo-filamentosa ben visibile viene determinata come frazione o percentuale dei globuli rossi secondo la formula:

Reticolociti (%) =  $\frac{\text{reticolociti}}{\text{globuli rossi (comprensivi dei reticolociti)}} \times 100$

I limiti della metodica sono rappresentati dalla presenza di corpi di Pappenheimer, corpi di Howell-Jolly e corpi di Heinz.

### CASE REPORT

Riportiamo un caso di sindrome mielodisplastica, giunto alla nostra osservazione per anemia macrocitica (Hb 10.5 g/dL, MCV 105 fL) e marcata piastrinopenia ( $15 \times 10^9/L$ ) in cui la conta reticolocitaria risultava marcatamente elevata ( $319 \times 10^9/L$ , valori normali  $22-139 \times 10^9/L$ ). L'esame dello striscio di sangue midollare mostrava una ricca cellularità con segni di disgranulocitopoiesi e diseritropoiesi; i blasti erano inferiori al 5%. I rari megacariociti avevano il nucleo iposegmentato. Nella norma risultavano i dosaggi di folati, vitamina B12 e ferritina sierici così come l'aptoglobina. Negativo era il test di Coombs diretto e indiretto. Sulla base dell'aspirato midollare e della percentuale di sieroblasti ad anello (< 15%) veniva posta diagnosi di anemia refrattaria (refractory cytopenia with multilineage dysplasia; RCMD). Tale diagnosi tuttavia contrastava con la elevata conta reticolocitaria documentata all'analisi citometrica. Invece, la conta reticolocitaria microscopica risultava ridotta (0,2%, valori normali 0,5-2%) ed era compatibile con la suddetta diagnosi.

### DISCUSSIONE

Caratteristica peculiare dei reticolociti è la presenza nel citoplasma di RNA ribosomiale, o sostanza granulo-filamentosa, la cui colorazione è alla base delle metodiche utilizzate per la loro conta (metodica automatizzata citometrica e metodica manuale microscopica).

A nostro avviso l'automazione, che fornisce indiscutibili vantaggi, riassume le antiche dispute avvenute tra illustri ematologi del passato che contendevano sul significato delle emazie con inclusioni citoplasmatiche, allora genericamente indicate come punteggiature basofile. Le conoscenze dell'epoca e le metodiche analitiche, costituite unicamente dall'osservazione al microscopio di strisci di sangue midollare e periferico, non permettevano di chiarire se le punteggiature basofile, i corpi di Jolly, e comunque tutte le inclusioni citoplasmatiche degli eritrociti fossero espressione di degenerazione o rigenerazione delle emazie. E ciò era il motivo del contendere tra sostenitori delle antitetiche ipotesi. Il dibattito è ovviamente da

lungo tempo risolto, ma si ripresenta qualora il dato della conta reticolocitaria automatizzata non sia considerata nello specifico contesto clinico. Infatti i residui di materiale nucleare possono avere significato di patologico ed essere presenti negli eritrociti in talune emopatie o dopo splenectomia. Sono evidenziabili dopo colorazione May Grumwald Giemsa, ma sono anche legate dai cromogeni utilizzati per le conte automatiche; per di più sono evidenziate dalle colorazioni sopravitali. Tali inclusi eritrocitari sono pertanto interpretati dall'analizzatore automatico alla stregua della sostanza granulo-filamentosa dei reticolociti. Il dato può generare una erronea interpretazione diagnostica soprattutto nei casi di anemie iporigenerative, quali le sindromi mielodisplastiche. Riteniamo pertanto sia necessario esaminare gli strisci di sangue periferico dopo colorazione May Grumwald Giemsa in tutti quei casi in cui una elevata conta reticolocitaria sia inattesa. L'evidenziazione di inclusi eritrocitari dopo colorazione May Grumwald Giemsa ci permetterà di ritenere non corretta la conta reticolocitaria automatica, in quanto è noto che la sostanza granulo filamentosa dei reticolociti non assume tale colorazione.

### BIBLIOGRAFIA

1. Corberand JX. Reticulocyte analysis using flow cytometry. *Hematol Cell Ther* 1996;38:487-94.
2. Brugnara C. Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. *Int J Clin Lab Res* 1998;28:1-11.
3. Utility of reticulocyte maturation parameters in the differential diagnosis of macrocytic anemias. *Clin Lab Haematol* 2003;25:283-8.
4. Pierre RV. Reticulocytes. Their usefulness and measurement in peripheral blood. *Clin Lab Med* 2002;22:63-79.
5. Lofsness KG, Kohnke ML, Geier NA. Evaluation of automated reticulocyte counts and their reliability in the presence of Howell-Jolly bodies. *Am J Clin Pathol* 1994;101:85-90.
6. Carulli G, Marini A, Azzara A, Lucchetti A, Petrini M. Pseudoreticulocytosis in a case of myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* 1998;100:156-8.
7. Espanol I, Pedro C, Remacha AF. Heinz bodies interfere with automated reticulocyte counts. *Haematologica* 1999;84:373-4.
8. Hoffmann JJ, Pennings JM. Pseudo-reticulocytosis as a result of malaria parasites. *Clin Lab Haematol* 1999;21:257-60.