

## Alterazioni dei leucociti

### Leucocitosi

La leucocitosi è una condizione caratterizzata dall'aumento dei leucociti al di sopra di  $10 \times 10^9/L$  con ripercussioni sul numero degli altri elementi cellulari.

La **neutrofilia** è un evento di frequente osservazione nella pratica clinica ed è rappresentato da un gruppo eterogeneo di condizioni caratterizzate da un aumento del numero assoluto dei granulociti neutrofili circolanti che normalmente è compreso tra i 4.000-9.500/mmc. L'eziopatogenesi del disturbo è dominata da un fenomeno reattivo a numerose e varie patologie infettive, autoimmuni e neoplastiche extra-midollari; la neutrofilia può anche essere espressione di malattie ematologiche, come le sindromi mieloproliferative e più raramente le sindromi mielodisplastiche, o possono rappresentare un segno associato ad alterazioni congenite della funzione granulocitaria. Inoltre causa di neutrofilia si riscontra anche nei fenomeni tossici e iatrogeni.

Le possibili cause di neutrofilia sono rappresentate da:

<i>Infezioni acute</i>	Batteriche, fungine, micobatteriche, da rickettsie
<i>Stimoli aspecifici o multifattoriali</i>	Eventi fisici, eventi psico-emozionali (dolore, stress), traumatismi, interventi chirurgici, infarto
<i>Condizioni ostetriche</i>	Gravidanza, eclampsia, travaglio
<i>Farmaci</i>	Corticosteroidi, adrenalina, anestetici, litio, piombo, fattori di crescita G-CSF e GM-CSF, vaccini e veleni
<i>Disordini ematologici</i>	Neutrofilia ereditaria, leucocitosi cronica idiopatica, malattia di Down, iposplenismo, S.mi mieloproliferativa, Anemia emolitica, emorragie, associate a neutropatie
<i>Neoplasie maligne</i>	Carcinomi, malattia di Hodgkin, mieloma multipo, alcuni Linfomi non-Hodgkin, melanoma
<i>Eventi infiammatori sistemicci</i>	Febbre reumatica, artrite reumatoide, vasculiti, Polimiosite, gotta
<i>Patologie endocrine</i>	Tireotossicosi, acromegalia, S.me di Cushing, sindromi virilizzanti
<i>Flogosi d'organo</i>	Glomerulonefrite, pancreatite, tiroidite, colite ulcerosa, Crohn

Nella maggior parte dei casi la neutrofilia è solo un sintomo di laboratorio nell'ambito di un quadro clinico specifico di malattia; a volte il riscontro è del tutto occasionale in pazienti totalmente asintomatici. L'anamnesi e l'esame clinico inizialmente sono rivolti verso segni rivelatori di una patologia extraematologica (es. malattia infettiva), mentre la presenza di splenomegalia orienta verso una diagnosi di sindrome mieloproliferativa. La contemporanea alterazione di altri parametri emocromocitometrici rappresenta un indizio a favore dell'esistenza di una malattia ematologica, mentre l'incremento degli indici infiammatori suggerisce una patologia sistemica. L'esame al microscopio ottico della morfologia dei granulociti circolanti è fondamentale in quanto permette di osservare modificazioni del nucleo e dei granulociti citoplasmatici di rilevanza diagnostica in alcune malattie. In alcuni casi è opportuno lo studio della funzionalità granulocitaria. In casi di neutrofilia persistente ed isolata potrà essere necessario l'esame del midollo osseo per il sospetto di sindrome mieloproliferativa o mielodisplastica in fase preclinica. In conclusione, un incremento dei neutrofili può essere espressione di una *pseudoneutrofilia* (dovuta ad aumentata dismissione dal midollo, ad una

mobilizzazione del “pool” marginato, alla inibizione della migrazione e della chemiotassi) secondaria in genere al trattamento corticosteroideo. Negli altri casi la diagnosi differenziale della neutrofilia riguarda le diverse condizioni che possono determinarla. Tuttavia è da considerare che in un certo numero di pazienti con neutrofilia isolata non è possibile giungere ad una conclusione diagnostica definitiva.

**La leucemia mieloide cronica (LMC)** è una sindrome mieloproliferativa principalmente dell’età adulta predominante nel sesso maschile con una incidenza intorno a circa 2/100.000/anno casi. È caratterizzata da iperplasia dei precursori mieloidi nel midollo, da screzio mieloide nel sangue periferico e da un marker citogenetico patognomonico, denominato cromosoma Philadelphia. All’esordio della malattia possono essere presenti sintomi legati all’anomala espansione della mielopoiesi (sudorazione e calo ponderale), all’anemia, all’iperviscosità secondaria a leucocitosi e trombocitosi (vertigini, parestesie, disturbi visivi ecc.), alla splenomegalia o alle sue complicazioni (dolore ipocondrio sinistro, dispepsia). Spesso la malattia è asintomatica e viene diagnosticata per il riscontro occasionale di alterazioni dei valori emocromocitometrici. Il dato di laboratorio saliente è la leucocitosi quasi sempre al di sopra di  $25.000/\mu\text{L}$  accompagnata da basofilia ed eosinofilia; l’emoglobina può essere normale o lievemente diminuita; la fosfatasi alcalina leucocitaria è sempre al disotto del valore normale. *L’aspirato midollare* e *la biopsia osteomidollare* mostrano un aumento della cellularità per iperplasia della serie mielode. Diagnostica è l’analisi citogenetica che rivela la presenza del cromosoma Philadelphia [traslocazione (9;22)] e l’amplificazione mediante PCR del trascritto ibrido corrispondente dimostra la presenza del gene di fusione bcr-abl anche nei pazienti Philadelphia negativi.

La storia naturale della LMC prevede dopo una “fase cronica”, l’evoluzione verso la “crisi blastica”, spesso preceduta da una fase accelerata. La “crisi blastica” presenta un quadro ematologico simile alla leucemia acuta, caratterizzata da una particolare resistenza alla chemioterapia e da una prognosi sfavorevole. L’intervallo fra la diagnosi e la crisi blastica è di circa 4 anni. Per la presenza di una leucocitosi marcata la diagnosi differenziale viene fatta in prima istanza con le leucemie acute. In particolare le leucemie linfatiche acute possono esordire con leucocitosi, screzio mieloide, valori piastrinici normali e presenza di un tipico cromosoma Philadelphia; tuttavia l’ambiguità del quadro ematologico è solo transitoria e l’analisi molecolare mostra un riarrangiamento bcr-abl che dà luogo alla sintesi di una proteina (p190) diversa dalla p210 tipica della LMC. Le sindromi mielodisplastiche possono mostrare nel sangue periferico delle alterazioni simili alla LMC e nel midollo un aumento della cellularità soprattutto a carico della serie mieloide; ma depongono per la diagnosi di LMC l’assenza nel midollo di blocco maturativo e di alterazioni displastiche, la presenza di megacariociti di dimensioni elevate, raccolti in aggregati e il riarrangiamento bcr-abl. La presenza di quest’ultima anomalia è fondamentale per la diagnosi differenziale con le altre sindromi mieloproliferativa, rappresentate dalle policitemia vera, trombocitemia essenziale e mielofibosi idiopatica.

### ***Linfocitosi***

Un incremento del numero assoluto dei linfociti del sangue periferico al di sopra dei valori di normalità ( $> 4.000/\mu\text{L}$ ) può osservarsi in numerose patologie infettive e soprattutto di natura virale.

In questi casi la funzionalità dei linfociti non risulta alterata e l’immunofenotipo orienta verso una malattia proliferativa di natura policlonale. La linfocitosi di solito rappresenta una specifica risposta ad evidenziare determinate condizioni e disordini.

Le cause di *linfocitosi benigne* possono essere:

<i>A morfologia reattiva</i>	<i>A morfologia non reattiva</i>
Mononucleosi (EBV)	Whoopin cough
Infazioni mononucleosi like-syndromes: ↳ infezioni da Citomegalovirus ↳ toxoplasmosi ↳ infezioni da Adenovirus ↳ infezioni da HIV ↳ infezioni da Human herpesvirus-6	Linfocitosi infettiva
Altre infezioni virali: ↳ epatite virale ↳ rosolia ↳ roseola	Stress linfocitario transitorio
Reazione farmacologica	Persistenza linfociti B policlonali

La diagnosi di linfocitosi secondaria alle infezioni virali è di solito esemplificata dalla presenza di elevati titoli anticorpali IgM specifici del virus coinvolto (es. IgM anti-EBV, IgM anti-CMV ecc.). L'esame emocromocitometrico evidenzia una linfocitosi assoluta e relativa (5.000-40.000/mL) a volte accompagnata da una anemia e/o piastrinopenia autoimmune. L'esame morfologico dello striscio periferico spesso evidenzia dei linfociti che presentano caratteri di attivazione fino allo stadio immunoblastico (frequente nella mononucleosi). L'esame immunofenotipico delle sottopopolazioni linfocitarie ematiche evidenzia un'inversione del rapporto tra i linfociti CD4 e CD8, alterazione che tende a regredire dopo qualche settimana. Nel caso di infezione da EBV, la concentrazione sierica delle transaminasi risulta elevata, il test di Coombs è positivo nel 3-5% dei casi. Una linfocitosi reattiva si può osservare anche dopo l'assunzione di alcuni farmaci come la fentoina; in questi soggetti la conta leucocitaria è variabile e spesso la linfocitosi si accompagna ad eosinofilia e neutrofilia. Allo striscio periferico si possono osservare plasmacellule circolanti.

Difficilmente si può trovare un quadro di linfocitosi reattiva dopo una infezione batterica, ad eccezione, forse, della infezione da *Bordetella pertussis* (pertosse) che spesso si manifesta nei bambini scatenando una importante faringite e linfoadenomegalia laterocervicale. La *Bordetella pertussis*, sembra produrre un fattore solubile che ha la capacità di accumulare i linfociti, prima a livello del sangue circolante e poi dei linfonodi. All'esame dell'emocromo la conta linfocitaria raggiunge i 10.000 – 30.000/ $\mu$ L, è presente anche neutrofilia. Allo striscio periferico i linfociti sono maturi con cromatina densa e scarso citoplasma; spesso il nucleo può essere clivato e convoluto. Si tratta di linfociti T CD4+ allo studio del fenotipo.

La linfocitosi da “stress transitoria” si osserva, occasionalmente, in pazienti con infarto del miocardio, traumi, stato epilettico e altre condizioni patogene acute. In queste condizioni la linfocitosi è moderata, tra i 6.000 e 8.000/ $\mu$ L. Si tratta di linfociti maturi e linfociti tipo LGL (large granular lymphocytes).

La “persistenza di linfocitosi policlonale tipo B”, è una linfocitosi benigna di più frequente riscontro nelle donne. La causa è sconosciuta, ma c'è una stretta correlazione col fumo di sigarette. I pazienti sono spesso asintomatici; l'unico segno è dato da una conta linfocitaria assoluta mediamente elevata solitamente non superiore ai 10.000/ $\mu$ L su circa 15.000/ $\mu$ L leucociti totali. La citofluorimetria mostra antigeni di superficie appartenenti alla linea B (CD19+) con un normale rapporto  $\kappa/\lambda$ .

All'emocromo la concentrazione di emoglobina, la conta piastrinica e i neutrofili sono normali; spesso si riscontra un incremento policlonale delle IgM.

Una situazione di linfocitosi benigna entra spesso in diagnosi differenziale con alcuni disordini linfoproliferativi maligni, più frequentemente con la leucemia linfoblastica acuta (LLA) e la leucemia linfatica cronica (LLC).

Il dubbio deve sussistere quando ci si trova di fronte ad una conta leucocitaria elevata (es.  $>30.000/\mu\text{L}$ ). Pertanto l'assenza di specifici anticorpi IgM, l'assenza delle caratteristiche morfologiche dei linfociti tipiche dell'infezione, aiutano ad escludere una eventuale linfocitosi reattiva. In aggiunta, anemia e trombocitopenia sono spesso presenti nelle leucemie acute e assenti o moderatamente lievi nelle forme benigne reattive.

**La leucemia linfoblastica acuta (LLA)** è un'emopatia maligna caratterizzata dalla proliferazione clonale e dall'accumulo di cellule linfoidi immaturi. La LLA si riscontra più frequentemente nel bambino, nel quale rappresenta la più comune forma di leucemia, ma si riscontra anche negli adulti e anziani. Nell'adulto l'incidenza è di circa 1/100.000/anno, è molto più rara delle leucemie acute mieloidi e costituisce il 20% del totale delle leucemie acute. L'eziologia è sconosciuta anche se alcune sostanze chimiche, fattori genetici e alcuni virus (es. virus Epstein-Barr nel linfoma di Burkitt) sono responsabili nel determinare l'insorgenza.

Nell'adulto l'LLA è per la maggior parte di tipo B linfocitaria, mentre circa il 20-30% sono di derivazione T. Il decorso clinico è molto rapido e, se non trattate, portano rapidamente a morte il paziente. La chemioterapia, oggi, ha notevolmente migliorato la prognosi della malattia, e mentre nel bimbo si ottiene una guarigione in circa il 70% dei casi, per la maggior parte degli adulti la guarigione non è tuttora possibile. Questa differenza è probabilmente dovuta al fatto che la biologia della malattia nell'adulto, presenta una maggior incidenza di fattori di rischio, come il cariotipo sfavorevole Philadelphia positivo [traslocazione (9;22)] e le condizioni fisiologiche dell'adulto sono comunque peggiori rendendo più problematica la sopportazione della chemioterapia. Tuttavia la diagnosi di LLA non dovrebbe essere eseguita senza che venga prima confermata da un attento esame dello *striscio periferico* in cui sono, di solito, presenti cellule immaturi, linfoblasti che possono essere distinti morfologicamente in tre gruppi (secondo la classificazione FAB). A questo segue un altrettanto attento esame del *mieloaspirato* che rivela un ricca cellularità midollare e un'infiltrazione massiva da parte di elementi immaturi di aspetto linfoide. L'esame *immunofenotipico* tramite l'uso di anticorpi monoclonali ne consente l'attribuzione alla linea B o T e il rispettivo livello di differenziazione. Lo *studio citogenetico* ha una importante valenza sia diagnostica ma soprattutto prognostica, in particolare per evidenziare anomalie cromosomiche sfavorevoli come le traslocazioni (9;22) e (4;11) o le traslocazioni (8;14), (8;22) e (2;8) tipiche della leucemia di Burkitt. Infine, da non sottovalutare, sono le indagini di *biologia molecolare*, necessarie per evidenziare eventuali riarrangiamenti genici [(BCR/ABL), c-MYC ecc.] che hanno un'importanza decisiva agli effetti diagnostici, terapeutici e prognostici. Queste indagini permettono anche di definire il persistere della "malattia minima residua", o la sua ricomparsa, spesso con ampio anticipo rispetto all'esame morfologico.

La diagnosi differenziale con la **leucemia linfatica cronica (LLC)** è generalmente facile e alla portata del medico non specialista. L'età adulta-senile del paziente, la scarsità di sintomi, i reperti dell'esame emocromocitometrico e dello striscio di sangue periferico consentono per lo più l'esclusione di altre condizioni. La LLC è un'emopatia maligna caratterizzata dalla progressiva espansione di piccoli

linfociti di derivazione B, apparentemente maturi ma immunoinecompenti, che si accumulano progressivamente nel sangue, nel midollo osseo e negli organi linfoidi. L'esame *emocromocitometrico* evidenzia una leucocitosi con inversione della formula leucocitaria per presenza di linfocitosi di grado variabile, di solito compreso tra 15.000 e 50.000/ $\mu$ L. L'esame microscopico dello *striscio periferico* mostra linfociti di piccole dimensioni e di aspetto maturo, indistinguibili dai linfociti di un soggetto normale. Molti di questi linfociti appaiono come cellule rotte, le cosiddette "ombre di Gumprecht". In più del 50% dei casi è presente ipogammaglobulinemia e iperuricemia. L'*aspirato midollare* e la *biopsia osteomidollare* mostrano un'infiltrazione variabile di linfociti. Infine per una determinazione diagnostica completa, è necessario l'esecuzione dell'*immunofenotipo* dei linfociti circolanti che dimostra una espansione di cellule B (CD19+) che coesprimono CD5, CD23 e immunoglobuline a bassa densità con restrizione clonale per le catene leggere (solo  $\kappa$  o solo  $\lambda$ ). L'*analisi citogenetica* non utile ai fini diagnostici, evidenzia vari tipi di anomalie, la più frequente delle quali è la trisomia 12.

### ***Leucopenie***

La leucopenia è una condizione caratterizzata dalla diminuzione del numero dei leucociti al di sotto di 4.000/ $\mu$ L.

Tale diminuzione si può osservare a carico dei neutrofili o dei linfociti o di entrambi; più frequentemente la leucopenia è caratterizzata da una diminuzione del numero dei neutrofili.

La ***neutropenia*** o ***granulocitopenia*** è una condizione caratterizzata da una diminuzione del numero assoluto dei neutrofili circolanti. Dal momento che la concentrazione dei neutrofili varia notevolmente nel sangue circolante a seconda dell'età, sesso, razza, attività fisica e momento della giornata in cui viene effettuato il prelievo.

Per convenzione si parla di neutropenia quando il conteggio dei neutrofili in un soggetto adulto di razza bianca è al di sotto di 2.000/ $\mu$ L e di agranulocitosi se il valore è inferiore a 500/ $\mu$ L.

Le neutropenie vengono classificate, in base alla loro eziopatogenesi, in due categorie: ***da diminuita produzione*** a livello del tessuto emopoietico e ***da aumentata distruzione*** periferica.

Nel primo gruppo è frequente osservare una diminuzione del numero dei precursori emopoietici spesso associata ad anomalie di maturazione della serie mieloide; le cause possono essere congenite (es. la neutropenia ciclica e la neutropenia cronica benigna) oppure acquisite per malattie intrinseche midollari (es. emopatie sistemiche come le leucemie, le sindromi mielodisplastiche, l'aplasia midolare, le anemie perniciösiformi) o per tossicità dei farmaci sul compartimento proliferativo emopoietico con meccanismo dose-dipendente o idiosincrasico. Nel secondo gruppo la distruzione dei granulociti avviene preferibilmente a livello periferico secondariamente a risposte immunologiche di tipo cellulare o umorale nell'ambito di malattie autoimmuni (es. collagenopatie, sindrome di Felty) o di reazioni autoanticorpali spesso scatenate da farmaci.

Alterazioni quantitative dei granulociti neutrofili (neutropenia):

<b>Da diminuita produzione</b>		<b>Da aumentata distruzione</b>	
<i>Congenite</i>	Neutropenia ciclica Neutropenia cronica benigna Sindrome di Kostman Associata ad agammaglobulinemia Associata a deficit di transcobalamina II Associata a neutropatie congenite	<i>Ipersplenismo</i>	
<i>Acquisite</i>	Emopatie sistemiche (aplasie, leucemie, mielodisplasie ecc.) Metastasi midollari di neoplasie non ematologiche Deficit di Vit. B12 o folati Infezioni (mononucleosi, epatite, HIV, gram-negativi, malaria, TBC ecc.) Farmaci: <ul style="list-style-type: none"> <li>↳ radiochemiotrapia antineoplastica</li> <li>↳ cloramfenicolo</li> <li>↳ fenotiazine</li> <li>↳ clozapina</li> <li>↳ antitiroidei</li> <li>↳ sali d'oro</li> </ul>	<i>Associate a malattie autoimmuni</i>  	LES Artrite reumatoide Sindrome di Sjögren Sindrome di Felty
		<i>Neonatale alloimmune o isoimmune</i>	
		<i>Da attivazione del complemento</i>	Emodialisi By-pass cardiopolmonari Aferesi
		<i>Da farmaci</i>	Analgesici Penicillina Chinidina Procainamide Cefalosporine

La neutropenia determina essenzialmente una suscettibilità alle infezioni sostenuta da germi normalmente presenti sulla cute e sulle mucose delle vie aeree e dell'apparato digerente. Il rischio di queste complicanze è strettamente legato al numero assoluto dei granulociti neutrofili: basso se la conta varia da 1.000-2.000/ $\mu$ L, alto se inferiore a 500/ $\mu$ L. In caso di agranulocitosi l'infezione si manifesta con un quadro di setticemia: febbre elevata preceduta da bivridi, lesioni orofaringee e anorettali, focolai broncopneumonici. Un'attenta anamnesi del paziente neutropenico, permette di valutare la presenza di malattie concomitanti di natura ematologica o immunologica, nonché la precedente esposizione a farmaci; con l'esame obiettivo si valutano la presenza di focolai infettivi soprattutto a livello delle mucose del cavo orale e della regione anale, l'esistenza di una splenomegalia e di altri segni correlati ad una eventuale malattia sistemica.

Gli esami di laboratorio devono anzitutto escludere le pseudoneutropenie che si verificano quando nel sangue esistono paraproteine capaci di aggregare i leucociti o quando il conteggio viene effettuato dopo molto tempo dal prelievo. L'esame emocromocitometrico viene ripetuto più volte per valutare il grado

ed il comportamento della neutropenia nel tempo (neutropenia ciclica) nonché per evidenziare la compromissione di altre componenti cellulari (monocitopenia, linfocitopenia) che potrebbero aumentare il rischio infettivo. Altri esami (immunoglobuline, autoanticorpi, fattore reumatoide) sono consigliati nel sospetto di neutropenie immunomediate. Lo studio morfologico del sangue periferico e midollare è importante per identificare le forme di neutropenia secondaria a malattie congenite (neutropatie) o sistemiche (emopatie neoplastiche). In caso di agranulocitosi il quadro midollare varia da una ipocellularità a forme ipercellulari con un blocco maturativo a livello dei promielociti. Infine in presenza di setticemia grave si possono avere segni di coagulopatia da consumo e piastrinopenia. L'obiettivo principale degli esami ematologici sopra citati e dell'esame obiettivo è l'identificazione di malattie sistemiche che compromettono il tessuto midollare. Mentre la raccolta di una attenta anamnesi è utile per correlare la neutropenia alla eventuale somministrazione di farmaci a livello midollare o periferico. Negli adulti, spesso è difficile differenziare una neutropenia cronica benigna da una sindrome mielodisplastica iniziale, pertanto è importante programmare studi di ordine citogenetico e colturale "in vitro".

La **leucemia mielodisplastica acuta** (LMA) è una emopatia neoplastica dovuta all'invasione del midollo e del sangue periferico da parte di precursori emopoietici che presentano un blocco differenziativo e maturativo più o meno completo. Colpisce prevalentemente il sesso maschile ed è più frequente nell'età adulta o avanzata; infatti la sua incidenza, stimata tra 2-5/100.000/anno casi, aumenta progressivamente dopo i 30 anni. Diversi studi epidemiologici indicano una stretta correlazione eziologica tra LMA e agenti mutageni chimici o fisici: elevata è l'incidenza della malattia nei sopravvissuti ad esplosioni nucleari, nei pazienti sottoposti a röntgenterapia e chemioterapia. Un altro fattore eziologico è l'immunodepressione: infatti la LMA insorge con maggior frequenza nei soggetti sottoposti a terapie immunodepressive protratte o affetti da malattie linfoproliferative croniche. L'*esame del mieloaspirato* mostra la sostituzione parziale o completa del parenchima emopoietico midollare da parti di blasti della serie mieloide. Secondo la classificazione FAB vengono distinte 8 varietà che presentano determinate caratteristiche morfologiche, citochimiche, immunofenotipiche, citogenetiche e cliniche. Gli *esami di laboratorio* presentano quasi sempre anemia e piastrinopenia, pressoché costante è la neutropenia che può accompagnarsi a leucopenia. Altri esami mettono in evidenza una iperuricemia, aumento dell'LDH e per la varietà M3, segni di CID (coagulazione intravascolare disseminata), come l'allungamento del PT e del PTT, il calo del fibrinogeno e l'incremento degli FDP/XDP. Ma la diagnosi di LMA si basa sull'esame del midollo completata dalle indagini citochimiche, immunofenotipiche e citogenetiche. Nella M3 è particolarmente utile per la diagnosi la ricerca della traslocazione cromosomica t(15;17) e del corrispettivo marker molecolare costituito dal riarrangiamento pml-rar- $\alpha$ . La storia naturale della LMA è quella di una malattia che conduce a morte il paziente in poche settimane. Attualmente il decorso è radicalmente mutato nei pazienti giovani, che possono giovarsi di trattamenti aggressivi (chemioterapia), e negli anziani dove la sola terapia di supporto permette di migliorare anche sensibilmente la sopravvivenza. La terapia convenzionale consente la guarigione clinica nel 25-35% dei casi trattati. Risultati più significativi (>50%) si possono ottenere con il trapianto allogenico, a prezzo di una mortalità precoce e di complicanze tardive legate alla "graft versus host disease" (GVHD). La relazione tra LMA e mutageni chimici o fisici ha portato a limitare l'esposizione lavorativa agli idrocarburi aromatici, alla abolizione della röntgenterapia a scopo anti-infiammatorio. Dato che la LMA può insorgere come complicanza secondaria alla radio-chemioterapia, in alcuni pazienti neoplastici è importante bilanciare l'aggressività terapeutica con l'esigenza di ridurre il rischio leucemico a distanza.

## **Linfocitopenie**

Nell'adulto si parla di linfocitopenia quando la conta dei linfociti totali nel sangue periferico è inferiore a 1.000/ $\mu$ L.

Circa l'80% dei linfociti circolanti è di tipo T CD3+ e circa i due terzi dei linfociti T sono CD4+ (T-helper); la maggioranza dei soggetti con linfocitopenia hanno una carenza del numero assoluto dei linfociti T CD4+.

Le principali condizioni cliniche associate a linfocitopenia sono:

<i>Immunodeficienze congenite</i>	Immunodeficienza severa combinata Aplasia timica congenita Sindrome di Wiskott-Aldrich
<i>Difezioni nutrizionali</i>	Carenza di dieta proteica
<i>Infezioni</i>	Virali (HIV, epatite) Tubercolosi Tifo Sepsi
<i>Malattie autoimmuni</i>	Artrite reumatoide LES Miastenia grave
<i>Malattie sistemiche</i>	Sarcoidosi Insufficienza renale Malattia di Hodgkin
<i>Iatrogene</i>	Radioterapia Chemioterapia Terapia corticosteroidea Anestesia e chirurgia
<i>Idiopatica</i>	T-linfocitopenia CD4+ idiopatica

I segni e sintomi del paziente con linfocitopenia sono quelli legati alla patologia di base. Solitamente pazienti con immunodeficienza umorale e/o cellulare sono soggetti a frequenti infezioni di basso grado o da agenti opportunisti. In questi pazienti è facile il riscontro di neoplasie maligne soprattutto linfomi. L'immunodeficienza severa combinata è caratterizzata da una condizione di severa deficienza immunitaria sia cellulare sia umorale. I pazienti sono affetti da frequenti infezioni batteriche, virali, funginee e da protozoi fino dall'età di 3 anni. Pazienti affetti da AIDS hanno frequenti riscontri di infezione soprattutto da agenti opportunisti come la polmonite da *Pneumocystis carinii*, polmonite da *Mycoplasma* o infezioni sistemiche da candida, virus dell'epatite B, citomegalovirus e herpesvirus. Frequente è il riscontro di neoplasie maligne (sarcoma di Kaposi, linfoma) e di malattie autoimmuni (trombocitopenia). Una attenta anamnesi è necessaria a determinare la reale causa o concausa di una condizione di linfocitopenia. La conta leucocitaria con formula leucocitaria e un aspirato midollare permettono di ricercare una eventuale causa ematologica. Importanti sono anche la determinazione quantitativa delle immunoglobuline, l'analisi citofluorimetrica dell'immunofenotipo dei linfociti, test per l'HIV, anticorpi antinucleo (LES) e la biopsia linfonodale (sarcoidosi).

## **Applicazioni citofluorimetriche in ematologia**

Lo studio dell'immunofenotipo dei linfociti, ossia dei marcatori cellulari di superficie, è oggi ampiamente utilizzato grazie all'introduzione della citofluorimetria (CFM), la quale è una metodica che consente la misurazione delle caratteristiche fisiche e/o chimiche di particelle microscopiche. La CFM è una metodica utilizzata per l'analisi dell'espressione cellulare di alcune molecole e del contenuto di DNA, per il monitoraggio di alcuni eventi biologici e per lo studio dinamico di alcune caratteristiche cellulari. La sua applicazione clinica e di laboratorio è ampiamente conosciuta nei settori dell'*immunologia* (lo studio e la classificazione delle immunodeficienze, il monitoraggio della terapia immunosoppressiva) e dell'*ematologia* (caratterizzazione e classificazione delle leucemie acute, croniche, dei linfomi e dei mielomi).

L'**immunofenotipo**, insieme allo studio citologico, citogenetico e di biologia molecolare, è oggi considerato indispensabile nella diagnosi e nel monitoraggio di diverse malattie ematologiche. L'utilizzo di un adeguato e comprensibile pannello di anticorpi monoclonali, viene oggi proposto, anche, per la valutazione prognostica dei pazienti e per la determinazione della malattia minima residua. Gruppi coperativi internazionali hanno caratterizzato numerosi anticorpi e quelli che riconoscono lo stesso antigene sono attribuiti ad un gruppo differenziativo identificato da un numero che segue la sigla CD. La CFM presenta il vantaggio di essere una metodica rapida e precisa riuscendo a valutare, potendone identificare la positività, un gran numero di cellule. E' anche possibile identificare la co-espressione di tre antigeni e di quantificarne l'espressione, più precisamente di quanto non consentano le tecniche di immunochiromica. I risultati di citofluorimetria sono più precisi se l'analisi viene eseguita su una popolazione cellulare anomala inizialmente selezionata utilizzando una procedura conosciuta come "gating", utilizzando l'espressione del CD45 (antigene leucocitario comune) con analisi di dispersione della luce. L'espressione del CD45 aumenta con la maturità delle cellule ed anche la dispersione della luce aumenta nelle cellule più mature. Sono stati proposti numerosi pannelli standardizzati per la tipizzazione immunologica iniziale di una leucemia acuta. Ma oltre al suo ruolo nel riconoscimento delle leucemie acute mieloide, linfoide e bifentipica, la tipizzazione immunologica spesso mette in evidenza un fenotipo aberrante. Ciò può essere utilizzato per il monitoraggio della malattia minima residua dopo l'induzione della remissione. Marcatori immunologici che identificano una LAM e la differenziano da una LAL includono la positività agli antricorpi CD13, CD33, CD65 e CD 117 e la positività ad anticorpi che riconoscono la proteina mieloperossidasi (MPO), anche nella sua forma di proenzima.

La tipizzazione immunologica conferma la diagnosi di LAL e suddivide le leucemie linfoidi in quelle di linea B e quelle di linea T.

Gli anticorpi monoclonali utili per l'identificazione dei blasti di linea B sono il CD19, CD79a ed il CD22. Il CD3 è l'anticorpo più utilizzato e specifico per i blasti di linea T, e anche il più sensibile nella determinazione degli antigeni citoplasmatici. Simile specificità hanno inoltre gli anti-TCR $\alpha\beta$  e gli anti TCR $\gamma\delta$ . Con le tecniche di tipizzazione immunologica attualmente utilizzate meno dell'1% di casi di leucemia acuta non può essere classificato come LAL, LAM o leucemia bifentipica; tuttavia esistono dei casi le cui cellule leucemiche non presentano marcatori linea-specifici che possono essere definiti come "non classificabili" o come leucemia acuta indifferenziata della cellula staminale. Tali forme esprimono CD34 e HLA-DR e possono esprimere TdT e CD38. Non esprimono marcatori specifici per la linea mieloide, né marcatori specifici della linea linfoide.

Riassumendo diciamo che lo studio dei markers immunologici nelle sindromi proliferative croniche e nelle leucosi acute, permette di:

- ↳ distinguere la leucemia linfoblastica acuta/immatura (TdT+) e disordini linfatici cronici con linfociti maturi (TdT-);
- ↳ caratterizzare i linfociti B o T. Nei disordini delle cellule B, i markers permettono di evidenziare anche la clonalità e quindi la differenziazione di una linfocitosi reattiva da una malattia monoclonale (espressione di K/λ);
- ↳ confermare la diagnosi di un particolare tipo di malattia;
- ↳ stabilire l'entità della “malattia minima residua” dopo terapia citostatica.