

SINERGIA TRA LE DISCIPLINE DI LABORATORIO NEL PERCORSO DIAGNOSTICO DEI LINFOMI

A cura di Alessandro Ferrara, membro dei Probiviri AITIC

Esperienza dell'ASL ROMA 6 - Ospedale dei Castelli

Polo H4 Anzio Patologia Clinica

Il **linfoma** è un tumore del sistema linfatico che origina dai **linfociti**, cellule fondamentali per la risposta immunitaria, quando queste cellule si trasformano in modo anomalo, iniziano a crescere e moltiplicarsi senza controllo, formano masse tumorali nei linfonodi o in altri organi del sistema linfatico come la milza, il timo o il midollo osseo.

I linfomi si distinguono principalmente in due grandi categorie:

- il **linfoma di Hodgkin (LH)**, caratterizzato dalla presenza delle cellule di **Reed-Sternberg**,
- il **linfoma non-Hodgkin (LNH)**, che comprende un'ampia varietà di sottotipi con comportamenti clinici diversi.

Il **Linfoma di Hodgkin** (LH) prende il nome dal medico che nel 1832, per primo, descrisse i primi casi della malattia, Thomas Hodgkin.



Thomas Hodgkin

Sottotipi di Linfoma di Hodgkin

Esistono diversi sottotipi di questo **Linfoma**, contraddistinti dall'aspetto microscopico delle cellule di Reed-Sternberg, dalla composizione cellulare del microambiente che le circonda e dalla presenza di diverse proteine sulla superficie delle cellule neoplastiche.
L' Organizzazione Mondiale della Sanità classifica il LH in diverse categorie:

1. **Linfoma di Hodgkin classico** (a sua volta suddiviso in quattro sottocategorie: **sclerosi nodulare**, **cellularità mista**, **a deplezione linfocitaria**, **ricco in linfociti**);

2. **Linfoma di Hodgkin a predominanza linfocitaria nodulare**.
   Un tempo si dava molta importanza alla sotto-classificazione in sottotipi istologici, ma oggi sappiamo che ai fini prognostici e terapeutici questa suddivisione è poco rilevante ed è utile tenere separata solo la **forma a predominanza linfocitaria nodulare** da tutte le altre forme di linfoma di Hodgkin classico.
   Questo tipo di linfoma origina dai **linfociti B** che, pur avendo accumulato nel loro DNA errori incompatibili per una corretta funzionalità, sfuggono, per motivi ancora non del tutto chiari all'eliminazione da parte delle cellule di sorveglianza dando origine ad una popolazione tumorale.
   Dato che il tessuto linfatico è diffuso praticamente in tutto il corpo, il linfoma di Hodgkin è un tumore che può insorgere in diverse localizzazioni anatomiche.

I **linfomi non Hodgkin** sono convenzionalmente raggruppati in due gruppi principali:
linfomi INDOLENTI (a basso grado di malignità o a crescita lenta);
linfomi AGGRESSIVI (ad alto grado di malignità o a crescita rapida).
Un'ulteriore classificazione tiene conto del tipo di cellule prevalenti nel linfonodo malato, per cui si distinguono:
linfomi non Hodgkin a cellule B,
linfomi non Hodgkin a cellule T,
sulla base del tipo di linfocita da cui originano le cellule tumorali.
Oltre alle sedi classiche linfonodali i LNH possono interessare nel 15-20% dei casi tessuto linfoide di altri sedi, quali il tratto gastrointestinale, genitourinario, sistema nervoso centrale, mammella, ghiandole lacrimali, tiroide e cute.
È importante sapere con precisione il tipo di LNH diagnosticato per poter scegliere la terapia più adeguata.
Importantissimo è il Piano Diagnostico Terapeutico Assistenziale (PDTA) in cui si applica un unico protocollo operativo condiviso dagli operatori sanitari che si occupano della gestione dei pazienti con sospetto o accertato linfoma, esso si prefigge lo scopo di promuovere l'integrazione dell'assistenza tra diverse specialità per migliorare la qualità della vita e le cure dei pazienti.

Il PDTA è costituito da 3 fasi:

Fase del sospetto clinico

Fase diagnostica e stadiazione

Fase Trattamento terapeutico

Fase del sospetto clinico

Il sospetto clinico di Linfoma rappresenta il punto di partenza del percorso diagnostico e si basa sulla valutazione del quadro clinico del paziente con particolare riferimento alla presenza di linfoadenopatie persistenti, eventuali sintomi sistematici.
La valutazione del sospetto clinico di linfoma costituisce una fase fondamentale del processo diagnostico e richiede una stretta collaborazione tra clinico, anatomopatologo e laboratorio di diagnostica ematopatologica.
L'integrazione dei dati clinici, morfoloigici, immunoistochimici immunofenotipici e molecolari consentono di orientare e perfezionare l'inquadramento diagnostico favorendo una diagnosi accurata e una corretta classificazione della patologia linfoproliferativa.

Uno dei sintomi più importanti ed immediatamente visibili è rappresentato dalla linfoadenopatia superficiale, che si osserva in circa i 2/3 dei pazienti.
Le stazioni linfonodali maggiormente interessate in ordine di frequenza sono quelle cervicali, inguinali, ascellari, raramente altre.
Bisogna tener presente che il processo morboso rimane localizzato per un breve periodo e solo il 10% dei pazienti giunge all'osservazione con lesioni localizzate.
I linfonodi si presentano aumentati di volume, di consistenza duro-elastica o duro-fibrosa, inizialmente separati, successivamente aderenti tra loro, usualmente poco dolenti.
Valutazione di una eventuale epatosplenomegalia e di altri organi.

Dopo una accurata anamnesi, si procederà ad una serie di esami clinico strumentali riportati di seguito:

-emocromo con formula

-esami di funzionalità epatica, renale e cardiaca

-lattico deidrogenasi

-radiografia del torace

-ecografia addome e dei distretti interessati -TAC o RMN a carico delle sedi interessate

-prelievo bioptico del distretto interessato

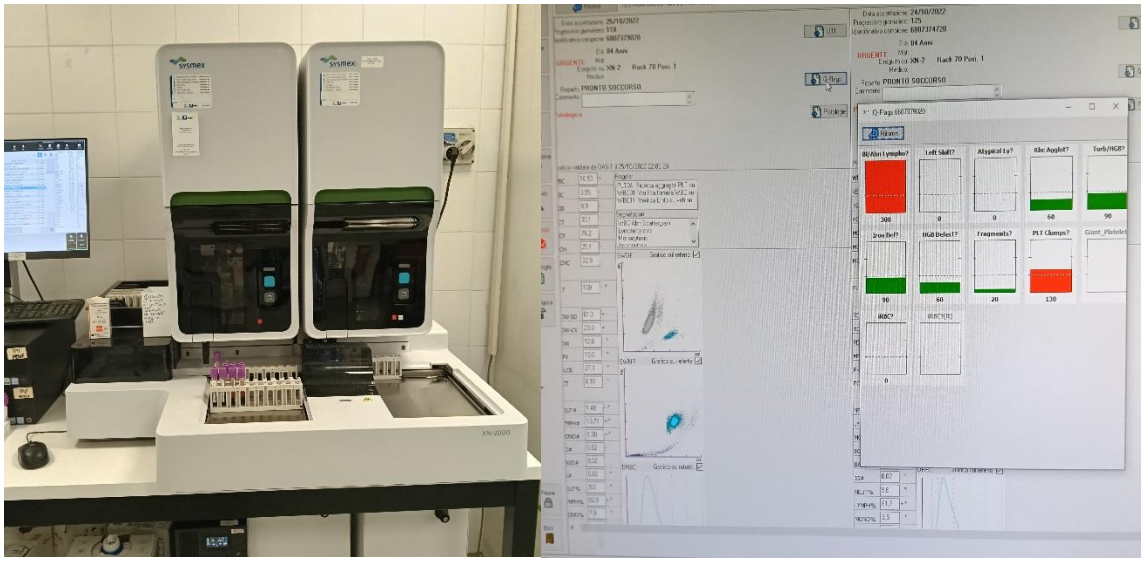
-esame citologico di eventuali versamenti (pleurico, ascitico)

-ago biopsia linfonodale eco/TC guidata

-rachicentesi esplorativa -scintigrafia ossea in caso di localizzazione ossea

In caso di sospetto linfoma l'**emocromo con striscio di sangue periferico (su vetrino)** rappresenta un esame iniziale fondamentale

1) 2)



I valori quantitativi dei globuli bianchi, rossi e piastrine possono essere alterati a seconda del tipo di linfoma e della sua diffusione (fig1-2)

Globuli bianchi (Leucociti):

Possono risultare aumentati (linfocitosi assoluta) se le cellule del linfoma passano nel sangue periferico (leucemizzazione), oppure ridotti in caso di infiltrazione massiva del midollo osseo.
Anemia (Globuli rossi bassi) e Piastrinopenia (Piastrine basse):
Si verificano frequentemente se il linfoma sta sostituendo il tessuto sano all'interno del midollo osseo, riducendo la normale produzione di cellule
Quindi l 'emocromo può mettere anche in evidenza un quadro di anemia, in genere modesta, di leucocitosi neutrofila o di eosinofilia.

Spesso è possibile repertare un'anemia emolitica autoimmune, la presenza di una anemia emolitica con test di Coombs negativo, è indicativa di invasione midollare.
L' allestimento dello striscio di sangue periferico in caso di sospetto linfoma segue le procedure standard dell'ematologia di laboratorio, mirate a preservare l'integrità dei leucociti per l'analisi morfologica.

La colorazione d'elezione per questo tipo di indagine è la **colorazione di May-Grünwald-Giemsa** (o in alternativa la **Wright-Giemsa**).
Il metodo di May-Grunwald Giemsa consiste nel fare agire successivamente due coloranti neutri : soluzione di May Grunwald (eosinato di blu di metilene) e la soluzione Giemsa (Blu di metilene eosinato di azzurro e di violetto di metile), l'interazione tra coloranti acidi e basici e i diversi componenti cellulari determinano una colorazione differenziale evidenziando il carattere acido o basico del citoplasma e le granulazioni dei leucociti, i nuclei si colorano in rosso-viola e rosa, i citoplasmi basofili in blu, acidofili in rosso o rosa e i policromatofoli in grigiastro –violaceo

Tecnica di May-Grunwald-Giemsa

asciugare all'aria gli strisci;

May-Grunwald soluzione per 5 minuti;

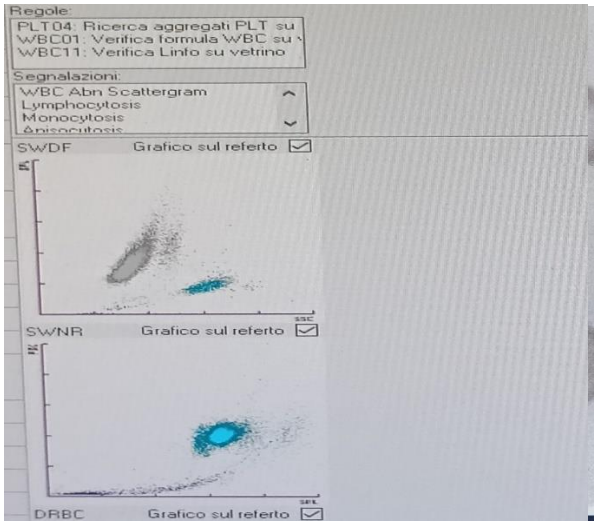
lavare acqua corrente,

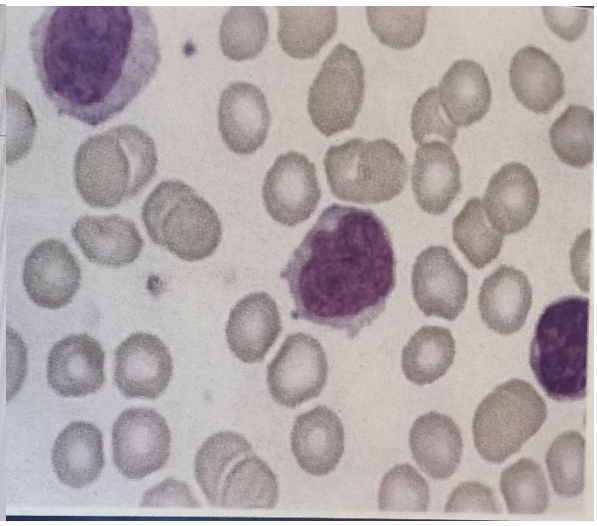
Giemsa soluzione per 15 minuti;

Sciacquare in acqua corrente;

asciugare all'aria ,non necessariamente montare

Risultati: Nuclei rosso-viola; granulazioni: in rosa (eosinofili), porpora (cellule linfonodi); marrone bluastro(neutrofili); blu (basofili).





L'emocromo mostra una combinazione di leucocitosi (aumento dei globuli bianchi) e piastrinopenia (riduzioni delle piastrine), lo striscio di sangue periferico colorato con MGG rileva la presenza di linfociti pleomorfi di medie dimensioni con nuclei irregolari tipici del linfoma a cellule mantellari.

L' emocromo e lo striscio di sangue periferico forniscono un forte orientamento diagnostico, ma la conferma e la tipizzazione precisa del linfoma richiedono sempre esami di approfondimento come la biopsia linfonodale o midollare.

Gli indici di flogosi (VES, fibrinogeno) sono costantemente aumentati nella fase florida della malattia. La VES rappresenta un indice altamente sensibile, seppure non specifico, in assenza di infezioni in atto, nel monitorare l'evoluzione della malattia.
Per quanto riguarda la lattico-deidrogenasi (LDH), indice aspecifico di massa neoplastica, il suo incremento riveste un significato prognostico importante. Il parallelo incremento delle LDH e della fosfatasi alcalina è suggestivo di interessamento epatico, l'incremento della fosfatasi alcalina contestualmente ad una ipercalcemia è indicativo di un interessamento osseo.

Fase diagnostica e stadiazione

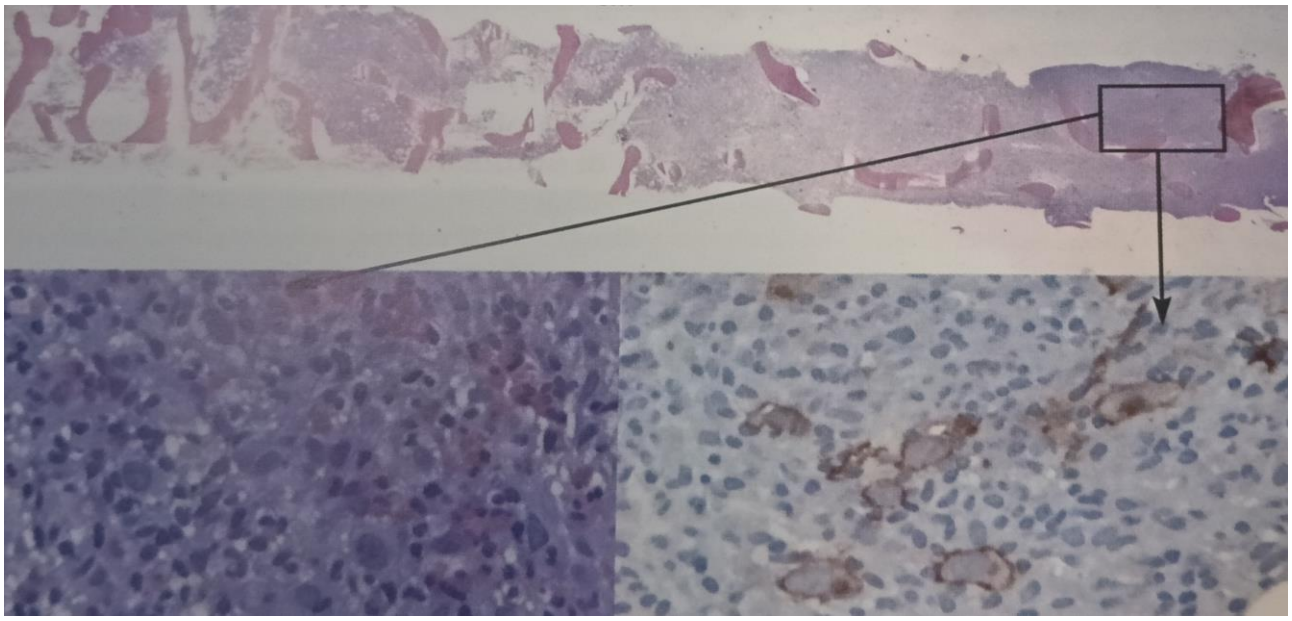
Agobiopsia linfonodale eco/tac guidata

La biopsia linfonodale imaging guidata è indicata ogni qual volta le caratteristiche ecografiche dei linfonodi non siano di reattività (ovvero caratteristiche di patologia infiammatoria benigna, infettiva e non) o in caso di positività alla PET.
Il protocollo prevede l'utilizzo di aghi di 18 G, con un numero minimo di 6 passaggi per linfonodo.
Il prelievo va fatto sul linfonodo di maggiori dimensioni o su masse/lesioni profonde sospette.
Per quanto riguarda le ecoguidate, il linfonodo presenta all'ecografia in B-mode, al color Doppler ed eventualmente all'ecografia con mdc, alterazioni di ecostruttura e vascolarizzazione sospetta;
la PET/CT può indirizzare la biopsia sul linfonodo / lesione coinvolta o su area patologica.
È di estremo aiuto nella localizzazione di aree patologiche la possibile "fusion" percettiva di imaging TC/PET e di Guida TAC nella ricerca di target patologici metabolicamente attivi.
La fusione di immagini PET e TC consente di associare le aree di correlato metabolismo glucidico potenzialmente indicative di attività linfomatosa, con la corrispondente localizzazione anatomica.
Questa integrazione permette di individuare il target lesionale più appropriato per il prelievo bioptico, eseguito sotto guida TC, al fine di ottenere materiale adeguato per la diagnosi istopatologica e gli eventuali approfondimenti immunoistochimici e molecolari.
Ove possibile, si deve sempre preferire l'agobiopsia eco-guidata (a quella TAC guidata) in quanto più facile, minor time consuming, con impegno di minor tecnologia complessa e senza utilizzo di radiazioni ionizzanti.
La Tac guidata va riservata alle aree/linfoadenopatie sospette o francamente patologiche non visibili o non chiaramente visibili all'ecografia.
Per quanto riguarda il target ecografico di linfoadenopatie patologiche, i criteri ecografici da valutare sono:

- le dimensioni
- l'indice di rotondità: se uguale ad 1 (linfonodo rotondo) è suggestivo per patologia neoplastica, mentre se superiore ad 1 (linfonodo allungato) è suggestivo per patologia benigna
- la presenza o assenza del centro germinativo
- l'ecostruttura
- il pattern vascolare (la presenza di singolo peduncolo vascolare all'ilo con regolare ramificazione verso la periferia è indice di benignità)
- l'eventuale valutazione con ecografia con mezzo di contrasto se ritenuta necessaria

Tendenzialmente ogni linfonodo superficiale di diametro pari a 1.5 cm, che persiste (o presenta un aumento volumetrico), va sottoposto a biopsia. L'iter diagnostico può essere accelerato nel caso in cui siano presenti sintomi sistemici, rapido accrescimento o comparsa di linfoadenopatie in altre sedi, e se dovesse riscontrarsi una massa mediastinica ad un radiogramma standard del torace.
Deve essere prelevato il linfonodo più rappresentativo (più voluminoso), deve essere asportato completamente con tutta la sua capsula, evitando, possibilmente, i linfonodi spesso sede di processi flogistici cronici come i linfonodi sottomandibolari, ascellari e inguinali.
E' necessario che il materiale inviato in Anatomia Patologica arrivi intatto e senza dissezioni per non pregiudicare la completezza e l'affidabilità dell'esame macro e microscopico; se l'invio del campione è immediato, questo deve pervenire avvolto in garza umida di soluzione fisiologica, se al contrario i linfonodi non possono giungere rapidamente, allora si dovrà procedere ad una fissazione in formalina tamponata neutra.

Esame istologico
Il materiale bioptico (agobiopsia, biopsia escissionale chirurgica e biopsia osteomidollare) viene preso in carico dall' U.O. di Anatomia Patologica per l'esame istologico.
L'esame istologico viene effettuato da un patologo esperto in ematopatologia su campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina. I campioni istologici relativi a biopsia osteomidollare effettuano, dopo fissazione in formalina, adeguata decalcificazione
La biopsia ossea viene eseguita in caso di:
- presenza di citopenia periferica;
ha scopo di conferma diagnostica in caso di sospetto clinico di linfoma in pazienti per i quali non si evidenzino siti anatomici facilmente accessibili, ad esempio localizzazioni scheletriche (come unica sede di malattia), linfoma linfoplasmocitico, linfoma splenico, hairy cell leukemia;
- come completamento della stadiazione nei linfomi ad eccezione di LH con PET su osso negativa.



Linfoma di Hodgkin - lesione focale - sono presenti cellule mononucleate CD 30 positive (foto in basso a sinistra e a destra) confermando l'interessamento midollare della neoplasia.

L'inquadramento diagnostico dei linfomi, secondo la attuale classificazione WHO 2017, prevede una caratterizzazione immunofenotipica mediante tecniche di immunoistochimica, ed in alcuni casi selezionati dal patologo, indagini ulteriori di ibridizzazione in situ (FISH) o molecolari.
Gli approfondimenti disponibili sono:

- FISH con sonda "dual fusion" per la traslocazione t(14;18) BCL2/Ig
- FISH con sonda "dual fusion" per la traslocazione t(11;14) BCL1/Ig
- FISH con sonda "dual fusion" per la traslocazione t(8;14) myc/Ig
- FISH con sonda "break apart" per il riarrangiamento del gene myc
- FISH con sonda "break apart" per il riarrangiamento del gene BCL2
- FISH con sonda "break apart" per il riarrangiamento del gene BCL

In caso di indagini molecolari, un campione di tessuto incluso in paraffina viene inviato al Laboratorio di Biologia Molecolare per la ricerca di clonalità B e/o T riguardanti i riarrangiamenti FR2-JH e FR3-JH per la ricerca di clonalità B e i riarrangiamenti Vg11-9 - Vg21-9 - JGT1/2 e Vg11-9 - Vg21-9 - JGT3 per la ricerca di clonalità T.

Fase Trattamento terapeutico

Il **trattamento del linfoma** si basa sulla combinazione di diverse modalità terapeutiche che vengono utilizzate sulla base delle caratteristiche del paziente (età, condizioni fisiche, comorbidità) e delle caratteristiche della malattia (tipo istologico, caratteristiche biologiche, profilo molecolare).
I trattamenti utilizzati comprendono:

- **polichemioterapia**: è il trattamento utilizzato in tutti i linfomi. Si basa sull'utilizzo di un farmaco o di una combinazione di farmaci somministrati per bocca o per via endovenosa, con l'intento di uccidere le cellule malate;
- **terapie bersaglio**: si basano sull'uso di farmaci mirati a specifiche alterazioni presenti nelle cellule linfomatose, per bloccare la crescita cellulare;
- **immunoterapia**: esistono tre modalità principali:

1. anticorpi che si legano in modo selettivo a proteine presenti sulle cellule di linfoma provocandone la morte;
2. anticorpi che attivano i linfociti T normali a riconoscere e distruggere le cellule di linfoma;
3. **cellule CAR-T**: si usano linfociti T del paziente ingegnerizzati a riconoscere ed eliminare le cellule del linfoma;

- **radioterapia**: prevede la somministrazione di radiazioni ionizzanti per fermare la proliferazione delle cellule malate. Possono essere effettuati trattamenti mirati su sedi corporee limitate o, in caso di chemioterapia ad alte dosi seguita da trapianto di midollo osseo, può essere effettuata l'irradiazione dell'intero midollo ossea e del sistema linfatico per favorire l'attecchimento delle cellule trapiantate.

Conclusioni

Le **sinergie multidisciplinari nella diagnostica del linfoma** rappresentano oggi lo standard fondamentale per garantire una classificazione precisa e impostare una terapia personalizzata e vantaggi per il paziente in termini di:

- **Riduzione dei tempi diagnostici**: ll dialogo diretto tra specialisti evita esami ridondanti e non necessari.
- **Precisione Terapeutica**: riduce il rischio di diagnosi errate o incomplete, fondamentali in una patologia dove terapie diverse si applicano a sottotipi istologici differenti.
- **Accesso a terapie mirate**: l'identificazione di biomarcatori specifici apre la strada all'uso di anticorpi specifici, immunoterapie o farmaci a bersaglio molecolare.

La diagnosi del linfoma rappresenta un processo complesso che richiede l'integrazione di competenze cliniche, radiologiche, anatomopatologiche e di laboratorio.
La collaborazione tra ematologi, radiologi, anatomopatologi e tecnici di laboratorio attraverso l'integrazione dei dati clinici, morfologici, immunofenotipici e molecolari è fondamentale per garantire una diagnosi accurata, una corretta classificazione del linfoma e un appropriato orientamento terapeutico.
Il laboratorio di Anatomia Patologica riveste un ruolo centrale in questo percorso assicurando qualità, precisione e affidabilità in ogni fase del processo diagnostico.
La sinergia multidisciplinare non è soltanto una collaborazione tra professionisti, ma un elemento imprescindibile per migliorare l'accuratezza diagnostica e contribuire concretamente alla personalizzazione delle cure e alla qualità dell'assistenza al paziente.
In ogni diagnosi corretta c'è un lavoro di squadra, e dietro ogni risultato diagnostico c'è un paziente che attende risposte.

Bibliografia

1) Anderson J.E., Litzow M.R., Appelbaum F.R. et al.: Allogeneic, syngeneic and autologous marrow transplantation for Hodgkin's disease: the 21-year Seattle experience. J. Clin. Oncol, 1993; 11: 2342-2350.
2) Armitage J.O.: Early bone marrow transplantation in Hodgkin's disease. Annals of onclology, 1994; 5 (suppl.2): 161-164.
3) Ben-Ezra J., Sheibani K., Swartz W. et al.: Relationship between eosinophil density and T-cell activation markers in lymphonodes of patients with Hodgkin's disease. Hum. Pathol., 1989; 20: 1181-1185.
4) Biermann P.J., Vose J.M. and Armitage J.O.: Autologous transplantation for Hodgkin's disease: Coming of Age? Blood, vol.83, n° 5 (march 1), 1994; 1161-1164.
5) Bonadonna G.: Linfomi maligni. In: Medicina Oncologica. Bonadonna G. e Robustelli della Cuna G. (eds), Masson, Milano, 1994; 1035-1083.
6) Bonfante V., Viviani S. e Santoro A.: Malattia di Hodgkin. In: Terapia Medica Oncologica, 1992. Santoro A. e Bonadonna G. (eds), EDISES, Parco Soleado, 1992; 213-229.
7) Burke J.S.: Hodgkin's disease: histopathology and differential diagnosis. In: Neoplastic Hematopathology. Knowles DM (ed), Williams and Wilkins, Baltimore, 1992; 497-533.
8) Carbone P.P., Kaplan H.S., Musshoff K. et al.: Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. Cancer Res, 1971; 31: 1860-61.
9) Carde P.: Hodgkin's disease-I: identification and classification. BMJ, vol. 305, 1992; 99-102.
10) Carde P.: Hodgkin's lymphoma-II:treatment and delayed morbidity. BMJ, vol. 305, 1992; 173-17
11)Stato dell'Arte nella Biologia Molecolare e nel Trattamento dei Linfomi: Dipartimento di Oncologia ed Ematologia Clinica