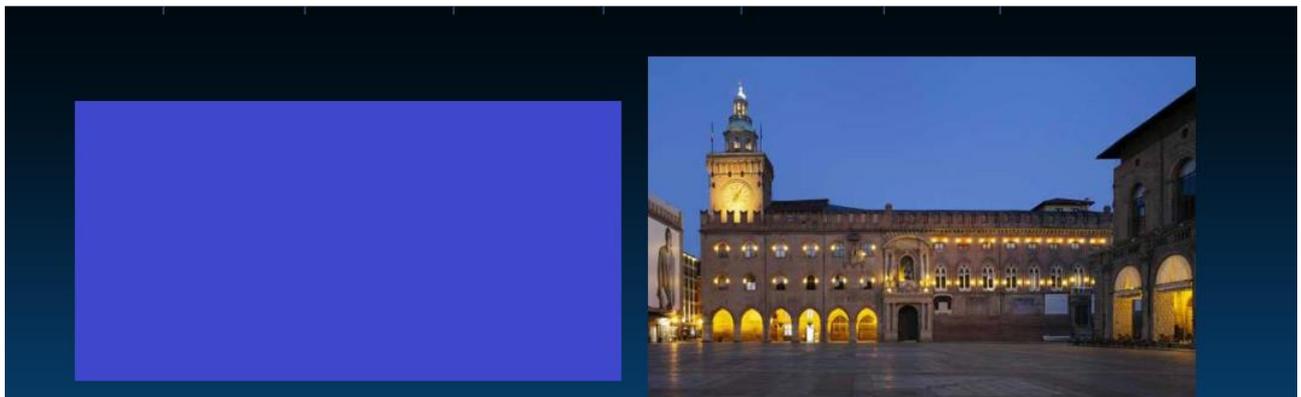


# International Society for Laboratory Hematology (ISLH)



Dedicated to International Education  
in Laboratory Hematology

[Officers](#) | [Join](#) | [Contact Us](#)



# Cohort Study: GUIDELINES IN LABORATORY DIAGNOSIS OF MYELODYSPLASTIC SYNDROMES - UPDATE JULY 2021

1. *Gina Zini , Professore Associato in Ematologia, Università Cattolica del Sacro Cuore. Direttore UOC Emotrasfusione, Direttore Banca Cordone Ombelicale UNICATT, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS – Roma*
2. *Gina Zucchi, Dirigente Medico, Laboratorio Analisi - settore ematologico specialistico - Policlinico Universitario Agostino Gemelli Professoressa Policlinico Universitario Agostino Gemelli - Roma*
3. *Bruno Modafferi, Direttore F.F. Laboratorio Analisi – settore ematologico specialistico- G.O.M. Bianchi – Melacrino – Morelli Reggio Calabria*
4. *Veronica Latella, Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico, Laboratorio Analisi – settore ematologico specialistico- G.O.M. Bianchi – Melacrino – Morelli – Reggio Calabria*

In the last two years the International Working Group on Morphology of MDS (IWGM-MDS) has published two papers with the aim of refining the morphological criteria of line dysplasia used in the WHO 2008 classification of Haematological Neoplasms and confirmed in the new WHO 2020 revision. .

The goal of our study was to establish standardized and reproducible criteria for the definition of granulocytic dysplasia. Neutrophil images were taken for each case, consecutively and not selectively. In addition to the characteristics of dysplasia reported in the WHO classification, it was also asked to evaluate alterations not included in the WHO scheme, such as the presence of nuclear appendages (classified into four types - teardrop, pyramid, filiform or racket - according to the classic Kosonow), the type of nuclear chromatin densification, the presence of macropolycytes (neutrophils of cytoplasmic and nuclear dimensions at least double compared to a normal neutrophil) and to quantize the content in granules, according to a predefined score. Six specific morphological characteristics were finally evaluated: hypogranularity, pseudo-Pelger, other alterations of the shape of the nucleus, anomalous chromatin thickening, macropolycytes and nuclear appendages.

The conclusions are as follows:

- for the definition of hypogranularity, a reduction of at least 2/3 of the granule content is necessary;
- in the same patient, the Pelger-Huët nuclear alteration may be associated with other alterations in nuclear segmentation and the presence of macropolycytes;
- the presence of anomalous densification of nuclear chromatin is associated with high frequency with alterations in nuclear segmentation both pseudo-Pelger-Huët and hypersegmentation;
- the presence of nuclear protrusions in number of 4 or more must be considered as an aspect of dysplasia.

All these morphological aspects, which have been shown to be accurate, precise and reproducible, must therefore be evaluated for the definition of clonal granulocytic dysplasia.

Objective of the study: evaluation of megakaryocytes. Assessment of megakaryocyte morphology can be difficult but remains essential for the diagnosis of MDS and other haematological malignancies. It can be difficult to clearly identify the wide variety of morphological features of normal or reactive megakaryocytes from dysplasia features. For example, an immature micromegakaryocyte can be confused with a lineage precursor or megakaryoblast, or a megakaryocyte with still few lobes can be classified as non-lobulated or hypolobulated. a detailed morphological description was provided.

The types identified and described have been submitted for morphological consent to the components of the IWCM-MDS and have represented the reference material for the entire duration of the work. They are the following:

1. megakaryoblast
2. immature megakaryocyte
3. mature normal megakaryocyte
4. Late normal megakaryocyte / naked core
5. megakaryocyte with non-lobulated nucleus, but of normal size
6. Small megakaryocyte, with non-lobulated or hypolobulated nucleus
8. micromegakaryocyte, mononuclear or binucleated
  - to. immature
  - b. mature
9. Multinucleated megakaryocyte, with two or more separate nuclei
10. Large megakaryocyte with hyperlobulated nucleus
11. megakaryocyte with cytoplasmic abnormalities
  - to. vacuolizations
  - b. agranularity or hypogranularity

c. persistent basophilia (nucleus-cytoplasmic asynchronism)

12. megakaryocyte damaged

to. not evaluable

b. evaluable (and therefore assignable to a category)

13. non-megakaryocytic lineage.

The diagnoses of the 14 cases were: 5 patients with MDS, 1 with CML, 1 with CML in blast crisis, 1 with TAM, 3 with ITP, 2 with ALL in CR without treatment and 1 healthy subject.

All data collected, about 2700, were centralized and subjected to statistical analysis.

The authors conclude with some recommendations to avoid the risk of overestimating the diagnosis of dysplasia of the megakaryocytic series:

- out of at least 30 megakaryocytes, only those with uniquely dysplastic morphology must be included in the count of 10% of elements with dysplasia;
- the 10% variability as confidence limits in the obtained count of dysplastic megakaryocytes on 30 elements, suggests increasing the share of the megakaryocyte count;
- the definition of megakaryocytic dysplasia on a count of less than 30 elements is possible only in the presence of a share of megakaryocytes > 10% (ie > 3 #) with univocal aspects of dysplasia;

as a pre-requisite it is important to refer to the images relating to the 12 subtypes of megakaryocytes reported in the work.

Myelodysplastic Syndromes (MDS) represent a set of diseases originating from the progressive loss of developmental capacity of the myeloid cell line. Stem cells are no longer able to complete their maturation process and therefore states of anemia, thrombocytopenia and granulocytopenia of varying severity arise.

The laboratory's approach involves the observation of the main cell lines: WBC, RBC, PLT, HGB and relative assessment of the impairment of how many and which of them. All this takes place on state-of-the-art analytical systems and instruments whose operating principle is based on flow cytometry; the cells are aligned in an orderly, constant and continuous flow, so that they can be individually evaluated (event) in the counting chamber where the analysis will take place. The phenomenon of cell ordering is called hydrodynamic focusing. The presence of two laser beams, forward and side scatter, through specific light sources that emit preset wavelengths for the excitation of fluorochromes, are used to search for specific cellular markers such as differentiation clusters, useful for the definition of the cell line to which the sample belongs. In this regard, the next step in the diagnosis of MDS is the analysis of the SSC positioning index. Provides information on cellular complexity and maturity. The observation of a reduction of the same below

140 associated with the full evaluation of the blood count parameters requires morphological study. The morphological examination that confirms the diagnostic suspicion shows dysplasia of the neutrophilic granulocyte series. Neutrophils are often hypogranulated, bilobed; it is also possible to detect the presence of Pelger cells.

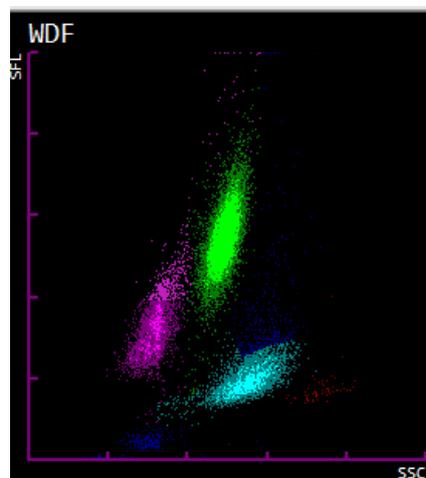
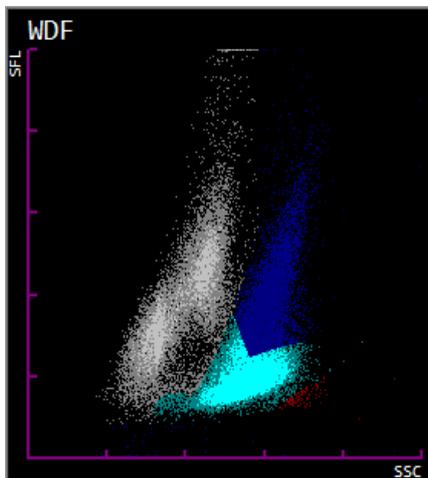
After the transformation and proliferation of the clone cellure into a neoplastic clone, it will replace the medullary tissue, supplanting, with a variable timing, the activity of normal hematopoietic cells. In a significant portion of cases (30-40%) the disease will further evolve and turn into Acute Myeloid Leukemia (AML). In this regard, a study is underway on patients with overt myelodysplasia in evolution towards AML, who present, in addition to the classic picture of neutropenia and related dysplasia, monocytosis, thrombocytopenia and anemia, an important dysplasia and cytoplasmic alteration affecting the eosinophilic granulocyte population.

6 cases have been studied that present these characteristics:

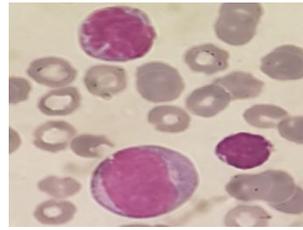
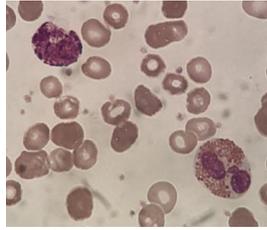
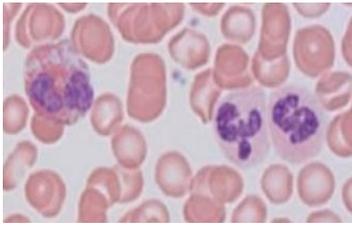
WBC  $\geq$  20,000  $\mu$ L

HGB  $\leq$  10.0 gr / dL

PLT  $\leq$  100,000  $\mu$ L



with its morphological picture:



The dysplasia of the neutrophilic granulocyte series, synonymous with already overt MDS, is evident. To this is added the presence of compromise also at the level of eosinophils which can present anomalous granularity. This anomaly affecting eosinophils is an indication for the patient of an advancement and progression of the disease; in fact there are immature cellular elements: myeloid blasts.

# **Studio di Coorte: LINEE GUIDA NELLA DIAGNOSI DI LABORATORIO DI SINDROMI MIELODISPLASTICHE – AGGIORNAMENTO LUGLIO 2021**

5. *Gina Zini , Professore Associato in Ematologia, Università Cattolica del Sacro Cuore.  
Direttore UOC Emotrasfusione, Direttore Banca Cordone Ombelicale UNICATT,  
Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS – Roma*
6. *Gina Zucchi, Dirigente Medico, Laboratorio Analisi - settore ematologico specialistico -  
Policlinico Universitario Agostino Gemelli Professoressa Policlinico Universitario  
Agostino Gemelli - Roma*
7. *Bruno Modafferi, Direttore F.F. Laboratorio Analisi – settore ematologico specialistico-  
G.O.M. Bianchi – Melacrino – Morelli Reggio Calabria*
8. *Veronica Latella, Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico, Laboratorio Analisi –  
settore ematologico specialistico- G.O.M. Bianchi – Melacrino – Morelli – Reggio Calabria*

Negli ultimi due anni l'International Working Group on Morphology of MDS (IWGM-MDS) ha pubblicato due lavori con l'intento di rifinire i criteri morfologici di displasia di linea utilizzati nella classificazione WHO 2008 delle Neoplasie Ematologiche e confermati nella nuova revisione WHO 2020.

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di stabilire criteri standardizzati e riproducibili per la definizione della displasia granulocitica. Le immagini relative ai neutrofili sono state prese per ciascun caso, in maniera consecutiva e non selettiva. Oltre alle caratteristiche di displasia riportate nella classificazione WHO, è stato chiesto di valutare anche alterazioni non incluse nello schema WHO, come la presenza di appendici nucleari (classificate in quattro tipi – a goccia, a piramide, filiforme o a racchetta- secondo il classico schema di Kosonow), la tipologia di addensamento della

cromatina nucleare, la presenza di macropoliciti (neutrofili di dimensioni citoplasmatiche e nucleari almeno doppie rispetto a un neutrofilo normale) e di quantizzare il contenuto in granuli, secondo un punteggio predefinito. Sei specifiche caratteristiche morfologiche sono state infine valutate: ipogranularità, pseudo-Pelger, altre alterazioni della forma del nucleo, addensamento anomalo della cromatina, macropoliciti e appendici nucleari.

Le conclusioni sono le seguenti:

- per la definizione di ipogranularità è necessaria la riduzione di almeno 2/3 del contenuto in granuli;
- nello stesso paziente l'alterazione nucleare Pelger-Huët può essere associata ad altre alterazioni della segmentazione nucleare e alla presenza di macropoliciti;
- la presenza di addensamento anomalo della cromatina nucleare si associa con elevata frequenza alle alterazioni della segmentazione nucleare sia pseudo-Pelger-Huët che ipersegmentazione;
- la presenza di estroflessioni nucleari in numero di 4 o più deve essere considerata come un aspetto di displasia.

Tutti questi aspetti morfologici, che si sono dimostrati accurati, precisi e riproducibili, devono pertanto essere valutati per la definizione di displasia granulocitica clonale.

---

Obiettivo dello studio: valutazione dei megacariociti. La valutazione della morfologia dei megacariociti può essere difficile, ma rimane essenziale per la diagnosi delle MDS e di altre neoplasie ematologiche. Può essere difficile identificare chiaramente la grande varietà degli aspetti morfologici dei megacariociti normali o reattivi dagli aspetti di displasia. Ad esempio un micromegacariocita immaturo può essere confuso con un precursore di linea o con un megacarioblasto, oppure un megacariocita con ancora pochi lobi può essere classificato come non-lobulato o ipolobulato. Inoltre la valutazione minima di 30 megacariociti può essere quantitativamente insufficiente e aumentare il rischio di errore nella diagnosi di displasia di linea. Fondamentale rimane, per l'identificazione degli aspetti di displasia dei megacariociti, il riscontro di uno o più dei tre aspetti morfologici di chiaramente elencati nella classificazione WHO a partire dall'edizione 2008: micromegacariocita, megacariocita con nucleo ipo o non-lobulato, megacariocita multinucleato, con due o più nuclei separati.

Obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare la riproducibilità nella identificazione di specifici aspetti di displasia da parte di un gruppo di esperti morfologi, su immagini di pazienti affetti da MDS e non, utilizzando un esercizio di controllo di qualità.

Da un punto di vista metodologico, come prima parte del lavoro è stata identificata una lista di 13 tipi di megacariociti e per ognuno di essi è stata fornita una dettagliata descrizione morfologica.

Le tipologie identificate e descritte sono state sottoposte per il consenso morfologico ai componenti dell'IWCM-MDS ed hanno rappresentato il materiale di riferimento per tutta la durata del lavoro. Esse sono le seguenti:

1. megacarioblasto
2. megacariocita immaturo
3. megacariocita normale maturo
4. megacariocita normale tardivo/nucleo nudo
5. megacariocita con nucleo non lobulato, ma di dimensioni normali
6. megacariocita di piccole dimensioni, con nucleo non lobulato o ipolobulato
8. micromegacariocita, mononucleato o binucleato
  - a. immaturo
  - b. maturo
9. megacariocita multinucleato, con due o più nuclei separati
10. megacariocita di grandi dimensioni con nucleo iperlobulato
11. megacariocita con anomalie del citoplasma
  - a. vacuolizzazioni
  - b. agranularità o ipogranularità
  - c. basofilia persistente (asincronismo nucleo-citoplasmatico)
12. megacariocita danneggiato
  - a. non valutabile
  - b. valutabile (e pertanto assegnabile a una categoria)
13. cellula di linea non megacariocitica.

Le diagnosi dei 14 casi erano: 5 pazienti con MDS, 1 con LMC, 1 con LMC in crisi blastica, 1 con TAM, 3 con ITP, 2 con LAL in RC in assenza di trattamento e 1 soggetto sano.

Tutti dati raccolti, circa 2700, sono stati centralizzati e sottoposti ad analisi statistica.

Gli autori concludono con alcune raccomandazioni per evitare il rischio di sovrastima della diagnosi di displasia della serie megacariocitica:

- su una quota di almeno 30 megacariociti, soltanto quelli con morfologia univocamente displastica devono essere inclusi nel conteggio del 10% di elementi con displasia;
- la variabilità del 10% come limiti di confidenza nel conteggio ottenuto di megacariociti displastici su 30 elementi, suggerisce di aumentare la quota del conteggio dei megacariociti;
- la definizione di displasia megacariocitica su un conteggio inferiore a 30 elementi è possibile solo in presenza di una quota di megacariociti >10% (cioè >3#) con aspetti univoci di displasia;

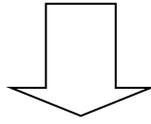
come pre-requisito è importante avere come riferimento le immagini relative ai 12 sottotipi di megacariociti riportati nel lavoro.

---

Le Sindromi Mielodisplastiche (SMD) rappresentano un insieme di malattie originate dalla progressiva perdita di capacità di sviluppo della linea cellulare mieloide. Le cellule staminali non sono più in grado di completare il loro processo maturativo e quindi si instaurano stati di anemia, piastrinopenia e granulocitopenia di gravità variabile.

L'approccio del laboratorio prevede l'osservazione delle principali linee cellulari : WBC, RBC, PLT, HGB e relativa valutazione della compromissione di quante e quali delle medesime. Il tutto avviene su sistemi analitici e strumenti di ultima generazione il cui principio di funzionamento si basa sulla citometria a flusso ; le cellule vengono allineate in un flusso ordinato, costante e continuo, in modo da poter portarle valutare singolarmente (evento) nella camera di conta all'interno della quale avverrà l'analisi. Il fenomeno di ordinamento delle cellule viene chiamato focalizzazione idrodinamica. La presenza di due fasci laser , forward e side scatter , tramite specifiche fonti luminose che emettono lunghezze d'onda prefissate per l'eccitazione di fluorocromi, vengono utilizzati per la ricerca di specifici marcatori cellulari come per esempio i cluster di differenziazione, utili per la definizione della linea cellulare di appartenenza del campione. A tal proposito step successivo nella diagnosi di MDS è l'analisi dell'indice di posizionamento SSC. Fornisce informazioni riguardo la complessità e maturità cellulare. L'osservazione di una riduzione del medesimo al di sotto di 140 associato alla valutazione in toto dei parametri dell'emocromo richiede l'approfondimento morfologico. L'esame morfologico che

conferma il sospetto diagnostico, presenta displasia a carico della serie granulocitaria neutrofila. I neutrofili sono spesso ipogranulati, bilobati ; è inoltre possibile rilevare la presenza di cellule di Pelger.



***Percorso di laboratorio nella diagnosi di Mielodisplasia in evoluzione maligna.***

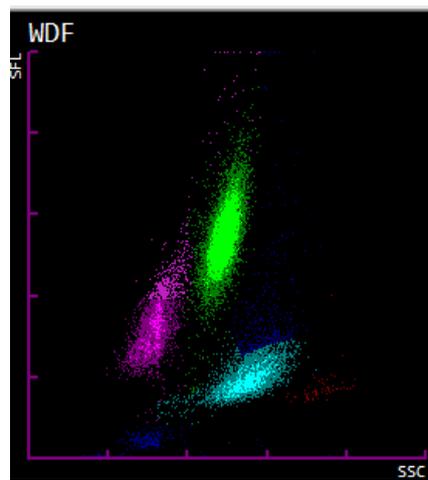
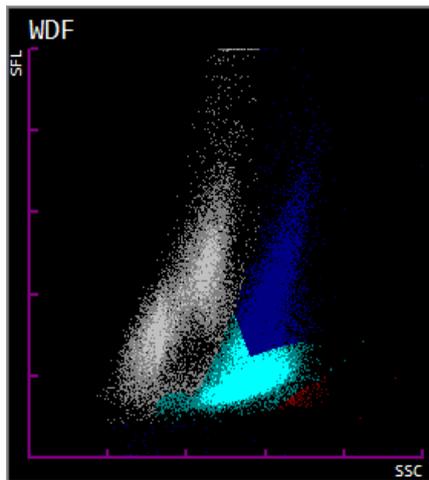
Dopo la trasformazione e proliferazione del clone cellule in clone neoplastico, il medesimo andrà a sostituire il tessuto midollare soppiantando, con una tempistica variabile, l'attività delle normali cellule emopoietiche. In una porzione rilevante di casi (30-40%) la malattia evolverà ulteriormente e si trasformerà in una ***Leucemia Mieloide Acuta (LAM)***. A tal proposito è in itinere uno studio su pazienti con mielodisplasia conclamata in evoluzione verso LAM , che presentano , oltre al classico quadro di neutropenia e relativa displasia, monocitosi, piastrinopenia ed anemia un'importante displasia ed alterazione citoplasmatica a carica della popolazione granulocitaria eosinofila.

Sono stati studiati 6 casi che presentano tali caratteristiche:

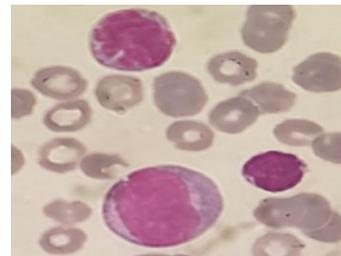
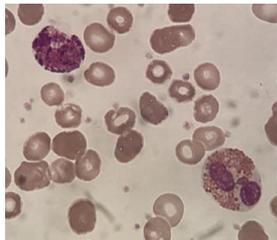
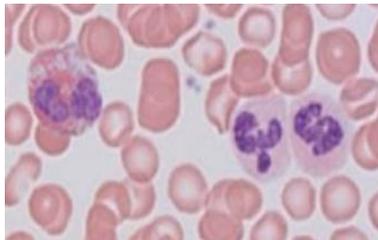
WBC  $\geq$  20.000  $\mu$ L

HGB  $\leq$  10.0 gr/dL

PLT  $\leq$  100.000  $\mu$ L



con relativo quadro morfologico:



E' evidente la displasia a carico della serie granulocitaria neutrofila, sinonimo di MDS già conclamata. A questo si aggiunge la presenza di compromissione anche a livello degli eosinofili che possono presentare granularità anomala. Tale anomalia a carico degli eosinofili è per il paziente indicazione di un avanzamento e progredire della malattia; sono infatti presenti elementi cellulari immaturi : blasti mieloidi .

