

Linfonodi

Introduzione

Le spiegazioni che seguono si limitano alle variazioni emo-linfopatologiche del linfonodo (LN), cioè essenzialmente ai linfomi e alle leucemie, tenendo conto delle linfadenopatie reattive. Tuttavia, le metastasi linfonodali sono esplicitamente escluse in questa sede e sono trattate in modo specifico per gli organi, soprattutto per quanto riguarda il tema del linfonodo sentinella (cfr. carcinoma mammario, melanoma maligno). D'altra parte, le linee guida qui stabilite sono in gran parte valide per le proliferazioni linfo-ematologiche principalmente extranodali.

Informazioni cliniche

Il quadro clinico è parte integrante della valutazione complessiva delle variazioni linfo-ematologiche. Per una diagnosi ottimale, il patologo dipende dal fatto che gli vengano resi noti i referti clinici rilevanti. Le informazioni essenziali sono:

- Dati anagrafici del paziente (nome, età, sesso)
- Diagnosi cliniche sospette
- Stato clinico (linfadenopatia solitaria, con informazioni topografiche, o generalizzata, epatosplenomegalia, sintomi B, stato generale del paziente)
- Referti ematologici (emocromo con striscio periferico e referto del midollo osseo, se disponibili)
- Valori di laboratorio (PCR, LDH, β 2-microglobulina, sierologie infettive come HIV, EBV, Borrelia, epatite, ecc.)
- Citazione di altre malattie aggiuntive rilevanti (patologie autoimmuni, altre neoplasie) e di terapie attuali o passate (stato post-trapianto, terapia immunosoppressiva, radioterapia/chemioterapia o farmaci)

Raccolta dei tessuti (clinico) e trattamento dei campioni di tessuto (patologo)

La **biopsia del linfonodo (LN)** deve essere eseguita da un chirurgo esperto e il LN deve essere rimosso con un metodo che preservi gli organi il più possibile. I frammenti di LN traumatizzati perdono enormemente di significato patologico-diagnostico. Il LN più grande di un gruppo affetto non è sempre necessariamente il più adatto (possibili complicanze da necrosi). Se possibile, selezionare LN facilmente accessibili a livello chirurgico, preferibilmente i LN cervicali. I LN inguinali sono spesso fibrotici e i LN ascellari sono lipomatosi e atrofici (epifenomeno non specifico dovuto alla topografia).

L'**agobiopsia tru-cut** è riservata al **caso eccezionale** di localizzazione poco accessibile (retroperitoneale, mediastinica, intra-addominale), perché durante la biopsia con ago tranciante si può ottenere pochissimo tessuto a fini diagnostici, spesso troppo poco per eventuali esami supplementari che possono essere necessari; l'esperienza ha, inoltre, dimostrato che il tessuto mostra spesso notevoli artefatti di rimozione che limitano ulteriormente la valutazione. L'agobiopsia porta spesso a risultati falsi negativi e in generale a ritardi nella diagnosi.

La **biopsia con ago sottile (FNAB)** con valutazione citologica sull'aspirato fornisce nella maggior parte dei casi un primo orientamento diagnostico differenziale e risparmia al paziente i cambiamenti reattivi della biopsia invasiva. Tuttavia, la diagnosi citologica del linfoma di solito deve essere verificata con ulteriori esami molecolari (analisi della clonalità e/o individuazione di specifiche traslocazioni) o, meglio ancora, con l'esame istologico di una biopsia. In caso di sospetto di un linfoma clinico, è necessario eseguire principalmente una biopsia dei LN.

Anche per la diagnostica primaria, la necessità di **materiale fresco** non è più tassativa. Tuttavia, il preparato istologico ha mantenuto la sua importanza diagnostica ad esempio nella diagnosi differenziale del linfoma di Burkitt (citoplasma vacuolizzato). Il preparato istologico fornisce anche il materiale d'esame ottimale per diversi esami supplementari, come la citometria statica (analisi dell'immagine cellulare), l'analisi FISH su cellule intere, l'analisi FACS e la citogenetica classica. L'ibridazione del Southern blotting, che si basa su grandi quantità di materiale fresco, è diventata molto meno importante nell'attuale scenario diagnostico. Ai fini della ricerca, anche le banche dei tumori sono sempre più utili, soprattutto per gli studi basati sull'espressione e per le firme di espressione genica. Idealmente, se si sospetta un linfoma clinico, un linfonodo deve essere estirpato completamente e intatto e inviato per metà non fissato come materiale fresco e per metà fissato in formalina tamponata. Tuttavia, si deve prima di tutto garantire che un numero sufficiente di tessuti rappresentativi possa essere esaminato per la diagnostica.

Quando si invia **materiale fresco**, è essenziale assicurarsi che il tessuto, spedito possibilmente refrigerato e avvolto in una garza satura di NaCl allo 0,9% all'interno di una piccola camera umida, debba poter essere lavorato nel reparto di patologia **non più tardi di 1 ora** dopo la rimozione.

Il materiale fresco prelevato per il rilevamento degli agenti patogeni deve essere trattato in condizioni sterili in collaborazione con l'istituto di microbiologia o con laboratori speciali (cave: mezzo corretto).

Il fissativo di prima scelta per il tessuto emato-linfatico è la **formaldeide tamponata al 3,8%** (anche la soluzione di Schaeffer è obsoleta). A questo scopo, i pezzi di tessuto di non più di 1,5 x 1,5 cm di dimensioni e non più di 0,3 cm di spessore devono essere recisi e incorporati.

L'importanza dell'**analisi della sezione congelata (SS)** del LN è data per il rilevamento delle metastasi; nel caso di variazioni emato-linfoproliferative, la SS ha solo un carattere orientativo, ad esempio per chiarire se il tessuto rimosso dopo la fissazione della formalina e l'incorporazione della paraffina sia sufficiente per una diagnosi definitiva. La SS non è adatta per la diagnostica del linfoma primario. In caso di infezione nota da epatite, HIV o tubercolosi, la SS è addirittura controindicata per motivi igienici e deve essere respinta dal patologo.

La **conservazione del tessuto fresco** avviene dopo il congelamento shock in azoto liquido a -80 °C.

Diagnostica e reportistica

La prima valutazione morfologica viene effettuata sulla **sezione della paraffina**. È necessario inserire un blocco per centimetro di linfonodo o tessuto tumorale. Per una valutazione ottimale della morfologia (HE, Giemsa, impregnazione argentea Gomori e PAS) e della colorazione immunohistochimica, le sezioni extra sottili di max. 2 µm sono una *conditio sine qua non*. È vantaggioso tagliarle e colorarle in un laboratorio separato (laboratorio di immunologia) al di fuori dell'operazione di routine. A differenza degli esami patologici molecolari aggiuntivi, l'immunofenotipizzazione in linfoematopatologia fa parte dello standard diagnostico generalmente accettato e viene eseguita in modo routinario e completamente automatizzato nella maggior parte delle patologie.

Comuni **test patologici molecolari aggiuntivi**, come la reazione a catena della polimerasi (amplificazione della PCR) con analisi dei frammenti (per il rilevamento della clonalità delle cellule B e T), il sequenziamento diretto del DNA (per il rilevamento di ipermutazioni somatiche IGVH), le analisi FISH (per il rilevamento delle traslocazioni cromosomiche) o le analisi di Next Generation Sequencing (NGS) (per lo screening delle mutazioni), possono oggi essere eseguiti su tutto il materiale incorporato con paraffina e fissato in formalina praticamente senza eccezioni. Ulteriori referti patologici molecolari, che sono di importanza prognostica e soprattutto predittiva, sono sempre più richiesti dai medici ai fini della stratificazione della terapia, anche se l'esperienza ha dimostrato che sono necessari per la diagnosi differenziale solo circa nel 10-20% dei campioni linfo-ematopatologici. Inoltre, si deve riconoscere che ulteriori dati molecolari possono essere valutati in modo significativo esclusivamente insieme alla valutazione morfologica e immunofenotipica.

I linfomi e le leucemie sono sottotipizzati secondo la **classificazione OMS del 2017** attualmente valida. La diagnosi si basa sul principio delle 4 colonne di morfologia, immunofenotipo, genotipo e clinica. Ciò si traduce anche nella struttura della reportistica con diagnosi e commento strutturato. Le descrizioni microscopiche non sono obbligatorie.

La differenziazione delle alterazioni reattive di LN dalle neoplasie linfo-ematologiche è, nei singoli casi, una sfida diagnostica differenziale per il patologo, che di solito richiede esami immunohistologici e talvolta anche esami supplementari di genetica molecolare: ad esempio, la distinzione tra linfoma follicolare e iperplasia follicolare, tra linfoma angioimmunoblastico a cellule T e reazione iperimmune reattiva, tra linfoma diffuso a grandi cellule (immunoblastico) a cellule B e mononucleosi, o il classico linfoma di Hodgkin con infiltrazione parziale interfollicolare di LN e linfadenopatia reattiva. Per quanto riguarda le variazioni reattive dei LN, è necessario distinguere i **quadri clinici specifici** comuni come le granulomatosi a cellule epitelioidi giganti caseose o non caseose, la linfadenite reticolocitaria ascessuale, la linfadenite di Piringer-Kuchinka, la linfadenite di Kikuchi o la linfadenopatia dermatopatica dalla linfadenite non specifica. A seconda della costellazione istopatologica dei referti e del problema clinico, per individuare l'agente patogeno si devono poi eseguire colorazioni specifiche (ad es. Ziehl-Neelsen, Warthin-Starry, Grocott, ecc.) o analisi patologiche molecolari.

In breve:

- In linea di principio, le diagnosi iniziali devono essere effettuate solo su materiale paraffinico fissato in formalina
- Una buona diagnosi richiede una buona qualità di taglio (2 µm)
- Controllare immunohistologicamente le diagnosi morfologiche (ipotesi di lavoro) e, se necessario, fissarle con la genetica molecolare
- È possibile utilizzare la genetica molecolare praticamente senza eccezioni anche su materiale paraffinico
- I parametri molecolari possono essere interpretati solo nel contesto clinico generale e in confronto con la morfologia e l'immunofenotipo
- Classificazione dei linfomi e delle leucemie secondo l'OMS 2017 (4a edizione riveduta)
- Nella prima diagnosi differenziale si devono distinguere le variazioni neoplastiche da quelle reattive
- Nella seconda diagnosi differenziale si devono distinguere le reazioni specifiche da quelle non specifiche

La diagnostica dei linfomi ha diversi strati, è molto complessa e deve essere eseguita in istituti appositamente attrezzati con una funzione centrale.

Riferimenti

Steven H Swerdlow, Elias Campo, Nancy L Harris, Eliane S Jaffe, Stefano A Pileri, Harald Stein, Jürgen Thiele, Daniel A Arber, Robert P Hasserjian, Michelle M Le Beau, Attilio Orazi, Reiner Siebert
WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (4° edizione riveduta). International Agency for Research on Cancer, Lyon 2017.

Jaffe E et al., Hematopathology, Elsevier, 2° edizione 2017

Tzankov A and Dirnhofer S. A pattern-based approach to reactive lymphadenopathies. Semin Diagn Pathol. 2018 35(1):4-19

Autori:

S. B. Cogliatti, S. Dirnhofer
Ottobre 2018