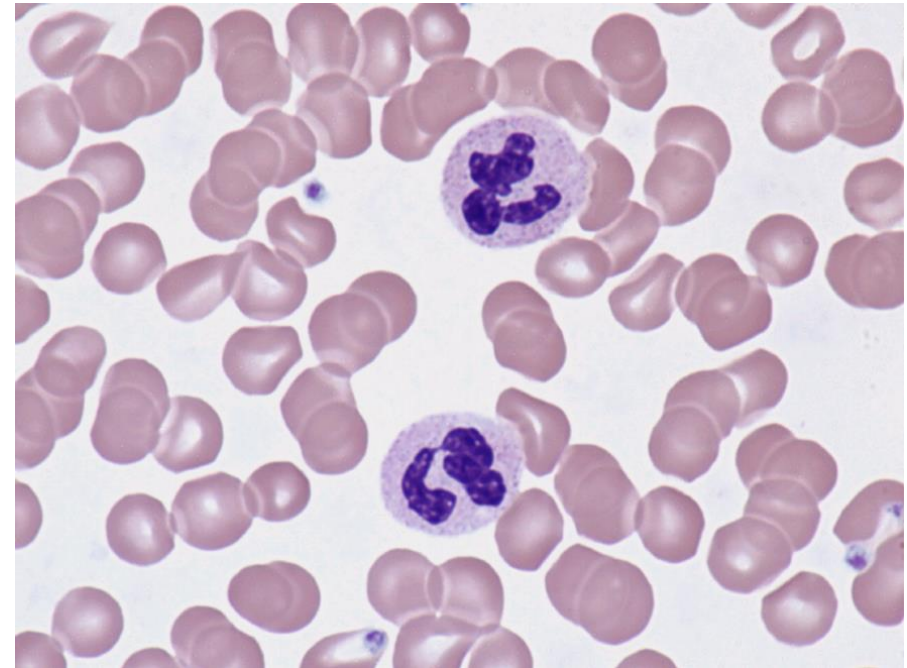


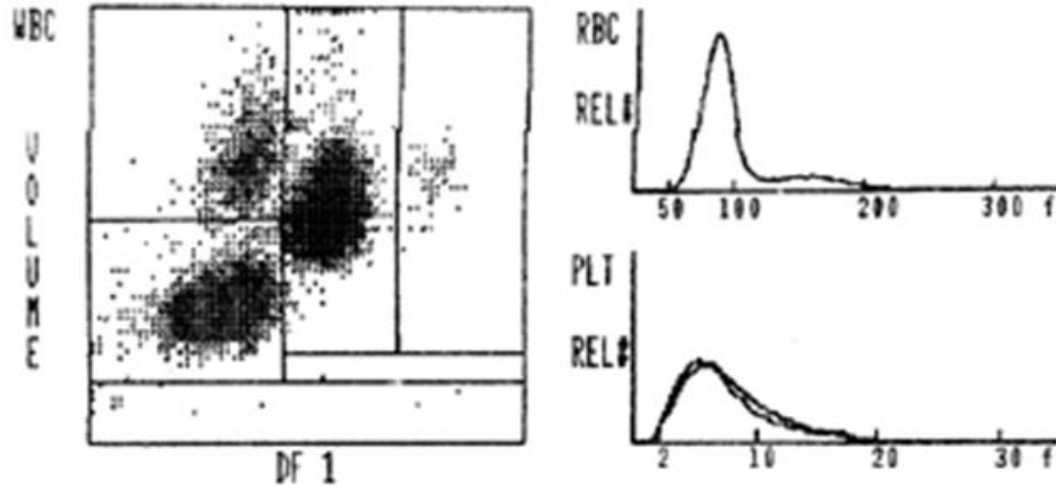
Tecniche di laboratorio di ematologia

Prof. Gian Matteo Rigolin
Ematologia

4. Emocromo



Contatori automatici



Istogramma e referto generato dal Coulter STKR.

BA, basophil;

EO, eosinophil;

HCT, hematocrit;

HGB, hemoglobin;

LY, lymphocyte;

MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC,

mean corpuscular hemoglobin concentration;

MCV, mean corpuscular volume;

MO, monocyte;

MPV, mean platelet volume;

NE, neutrophil;

PLT, platelet;

RBC, red blood cell;

RDW, red cell distribution width; WBC, white blood

cell.

ID# 1	WBC	6.7		RBC	4.56
ID# 2		%	#	HGB	13.5
Sequence #	NE	59.4	4.1	HCT	40.3
	LY	31.6	2.1	MCV	88.3
DATE: 06/21/96	MO	7.7	0.5	MCH	29.5
TIME: 08:55:45	EO	0.7	0.0	MCHC	33.5
Cass/Pos S	BA	0.6	0.0	RDW	13.4
Normal WBC Pop				PLT	202
Normal RBC Pop				MPV	8.2
Normal PLT Pop					

Parametri analitici del globuli rossi

- I globuli rossi sono definiti da 3 parametri quantitativi
 - L'ematocrito o Hct,
 - Hb,
 - La concentrazione dei GR per volume.
- 3 indici ulteriori descrivono le caratteristiche qualitative medie della popolazione eritrocitaria.
 - MCV,
 - MCH,
 - MCHC

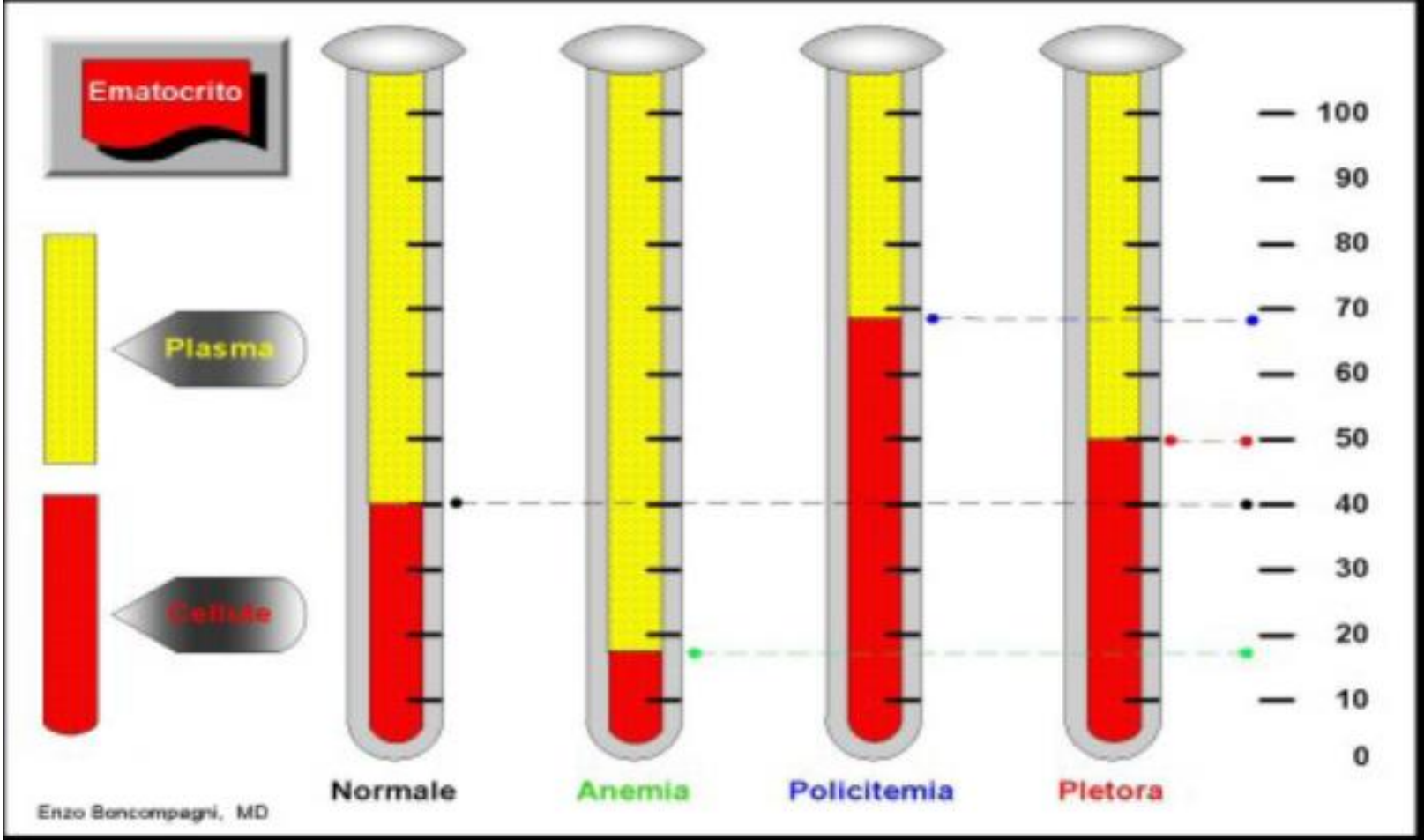
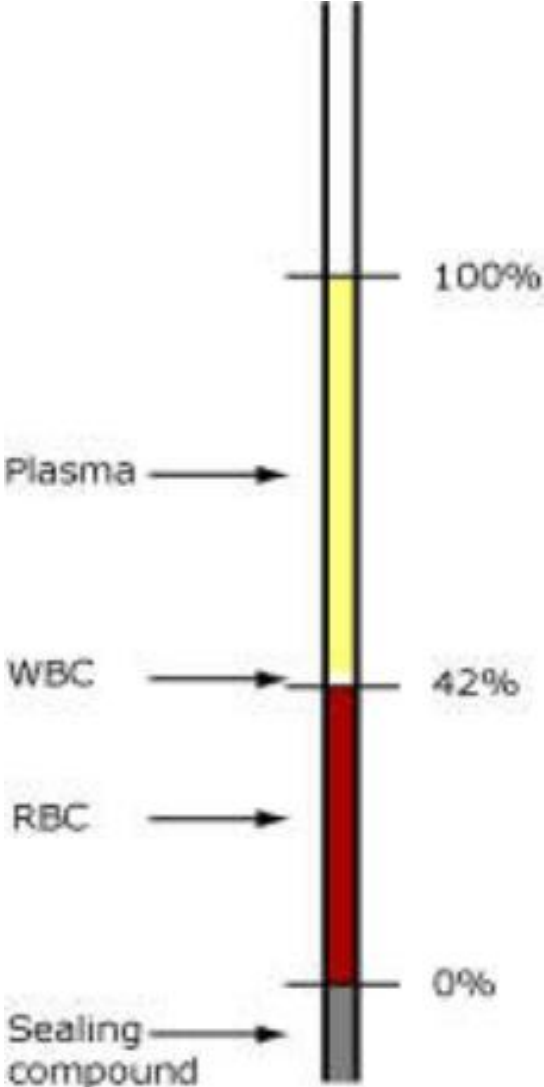
Ematocrito (HCT)

- **L'Hct è la proporzione del volume di un campione di sangue occupata dai GR.**
- Può essere determinato manualmente mediante centrifugazione del sangue ad una data velocità e tempo in una provetta standardizzata

Ematocrito (HCT)

- L'altezza della colonna di GR confrontata con il campione ematico totale dopo centrifugazione dà l'Hct.
 - Macrometodi (con provette da 3-mm) a bassa velocità di centrifugazione o
 - Micrometodi con provetti capillari ad alta velocità di centrifugazione.
- La determinazione manuale dell'Hct ha tipicamente una precisione [coefficiente di variazione (CV)] di circa il 2%.

Ematocrito (HCT)



Ematocrito (HCT)

- Il metodo manuale di determinazione dell'HCT è semplice ed accurato e si effettua con strumentazioni e materiali semplici,
- Motivi tecnici di errore sono:
 - Inappropriata concentrazione di anticoagulante,
 - inadeguata miscelazione del campione o centrifugazione, o dovuti all'intrappolamento di plasma per alterazioni morfologiche dei GR (micro macrociti, cellule falciformi, etc)

ematocrito

- **Gli analizzatori automatici non dipendono dalla centrifugazione del campione per la determinazione dell'HCT, ma invece calcolano l'Hct mediante una misurazione diretta del numero dei GR e del volume dei GR**
- **Hct = numero di GR x volume dei GR.**
- **L'Hct automatico correla strettamente con l'Hct manuale, cosicché la metodologia manuale di determinazione dell'Hct è usato come metodo di riferimento per quella automatica.**

ematocrito

- Gli errori nella determinazione automatica dell'Hct sono più frequenti nei pazienti con policitemia o anomala pressione osmotica plasmatica.
- In questi casi potrebbe essere preferibile, per una maggiore precisione, la determinazione manuale.
- La precisione dell'Hct automatico è meno dell'1% (CV).

Concentrazione emoglobinica (Hb)

- L'Hb è una proteina intensamente colorata, che viene valutata con diversi metodi **colorimetrici e spettrofotometrici**.
- L'Hb nel sangue si trova in una varietà di forme (ossiemoglobina, carbossiemoglobina, metemoglobina, ed altre componenti minori).
- Tutte queste possono essere convertite in un unico composto stabile, la cianmetemoglobina, mescolando il sangue con la soluzione di Drabkin, che contiene **ferrocianuro di potassio e cianuro di potassio**.
 - La Sulfemoglobina non è convertita ma è raramente presente nel sangue in quantità significative.

The haemiglobincyanide (cyanmethaemoglobin) method is the internationally recommended method for determining the haemoglobin concentration of blood

TABLE 3-1

DRABKIN-TYPE REAGENT

Reagent	Amount
Potassium ferricyanide (0.607 mmol/l)	200 mg
Potassium cyanide (0.768 mmol/l)	50 mg
Potassium dihydrogen phosphate (1.029 mmol/l)	140 mg
Nonionic detergent*	1 ml
Distilled or deionised water	To 1 litre

*Suitable nonionic detergents include Nonidet P40 substitute (Sigma–Aldrich; www.sigmaaldrich.com, Roche Diagnostics; <http://lifescience.roche.com> and other suppliers) or Triton X-100 (Sigma–Aldrich).

Calculation of haemoglobin concentration

$$\text{Hb (g / l)} = \frac{A^{540} \text{ of test sample}}{A^{540} \text{ of standard}} \times \text{Conc. of standard} \times \frac{\text{Dilution factor (201)}^\dagger}{1000}$$

Concentrazione emoglobinica

- L'assorbanza della cianmetemoglobina è misurata con uno spettrofotometro a 540 nm per determinare l'Hb.
 - Metodi simili sono utilizzati sia per la determinazione manuale che per quella automatica.
- **L'Hb è espressa in grammi per decilitro (g/dl).**
- Le maggiori cause di errore sono dovute ad errori nella diluizione o aumentata torbidità del campione per lisi dei GR, leucocitosi, o aumentati livelli di lipidi o proteine nel plasma.
- Con metodi automatici la precisione è meno dell'1% (CV).

Conteggio dei globuli rossi (GR)

- I GR vengono contati dopo diluizione del sangue in un mezzo isotonico
- Poiché il numero dei GR eccede di molto quello dei GB (di un fattore 500 o più), l'errore introdotto contando entrambe le popolazioni è ininfluente sul conteggio dei GR.
- Quando è presente una marcata leucocitosi, il conteggio dei GR e la determinazione del loro volume può essere alterato per effetto dei GB.
- La precisione (CV) per il conteggio dei GR con gli analizzatori automatici è < dell'1% a confronto di una precisione con i contatori manuali pari a circa l'11%.

Volume corpuscolare medio (MCV)

- Il volume medio dei GR è un indice eritrocitario utile nell'inquadramento diagnostico delle anemie
- L'MCV con gli analizzatori automatici è **generalmente misurato direttamente** ma può essere calcolato con la seguente formula :
- **$MCV = Hct \times 1000 / \text{conteggio GR } (10^{12}/l)$**
- L'MCV è misurato in femtolitri (fl).

Volume corpuscolare medio (MCV)

- L'agglutinazione dei GR (ad es. malattia da agglutinine fredde), può determinare un MCV falsamente elevato.
 - La maggior parte dei contatori automatici esclude MCV sopra 360 fl, eliminando così gli aggregati cellulari, sebbene questo possa falsamente ridurre l'Hct.
- Una severa iperglicemia (glucosio >600 mg/dl) può causare un rigonfiamento osmotico osmotico dei GR, che porta ad un falsamente aumentato MCV.
- **Il CV per la determinazione dell'MCV nei sistemi automatizzati è circa l'1%.**

Emoglobina corpuscolare media (MCH)

- *L'MCH* è una misura del contenuto emoglobinico medio per GR.
- Può essere determinato in modo manuale o automatico con la formula:
- **$MCH = Hb \text{ (g/dl) / conteggio dei GR } (10^{12}/L)$**
- *L'MCH* è espresso in picogrammi (pg)
- *L'MCH* riflette la massa emoglobinica per GR.

Emoglobina corpuscolare media (MCH)

- Nelle anemie nelle quali la sintesi dell'Hb è insufficiente (anemia ferro carenziale), l'Hb per GR si riduce con un corrispettivo decremento dell'MCH.
- L'MCH può essere falsamente elevato nella iperlipidemia, come pure un aumento della torbidità del plasma può erroneamente elevare l'Hb.
- Una leucocitosi può in modo spurio elevare MCH.
 - La centrifugazione del sangue per eliminare la torbidità con la determinazione manuale dei livelli di Hb permettono la correzione del MCH.
- **Il CV è < dell'1% per il metodo automatico e circa il 10% per quello manuale.**

Concentrazione emoglobinica corpuscolare media

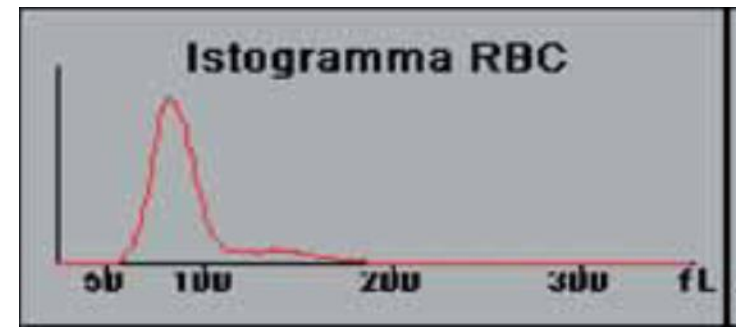
- MCHC è calcolata con la seguente formula:
- **$MCHC = Hb \text{ (g/dL)} / Hct$**
- L'MCHC è espresso in grammi di Hb per decilitro.
- Rappresenta la misura dell'Hb in relazione al volume del GR.

Concentrazione emoglobinica corpuscolare media

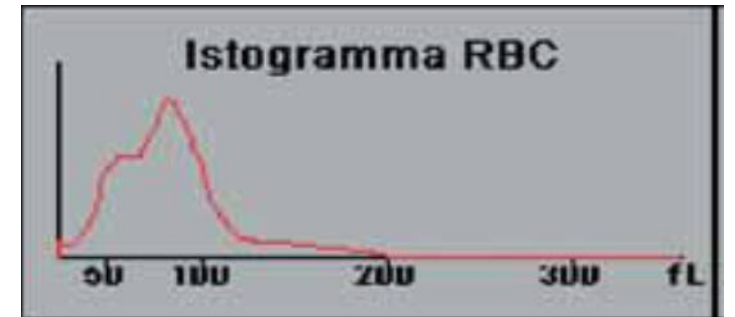
- Con l'eccezione della sferocitosi ereditaria ed alcuni casi di anemia a cellule falciformi o emoglobina C omozigote, i valori di MCHC non eccedono I 37 g/dl.
- Questo livello è vicino al limite di solubilità dell'Hb e ulteriori incrementi in Hb possono portare alla cristallizzazione.
- L'accuratezza nella determinazione del MCHC è influenzata da fattori che influiscono su Hct (intrappolamento del plasma o presenza di GR anomali) o Hb (iperlipidemia, leucocitosi).
- **il CV per MCHC con i metodi automatici è tra 1.0 e 1.5%.**

Indici eritrocitari

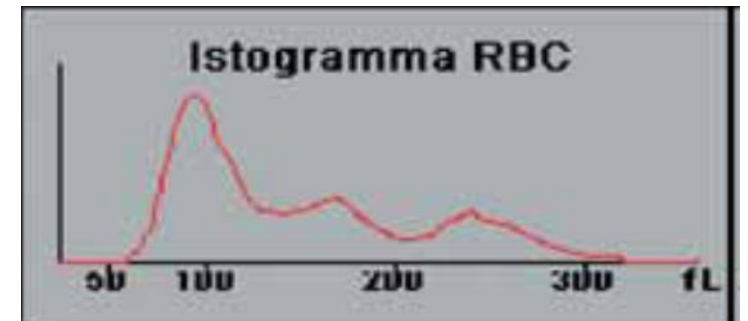
- MCV, MCH, e MCHC riflettono valori medi e possono non descrivere in modo adeguato il campione in esame sptt quando vi è una popolazione mista di GR.
- É pertanto importante valutare lo striscio di sangue periferico al microscopio ottico oltre che l'istogramma dei GR per evidenziare popolazioni dimorfiche.
- L'MCV è estremamente utile nell'inquadramento diagnostico delle anemie mentre MCH e MCHC spesso non forniscono informazioni cliniche rilevanti.
- Tuttavia MCH e MCHC hanno un ruolo importante nei controlli di qualità del laboratorio perchè questi valori rimangono stabili nel tempo per un dato campione.



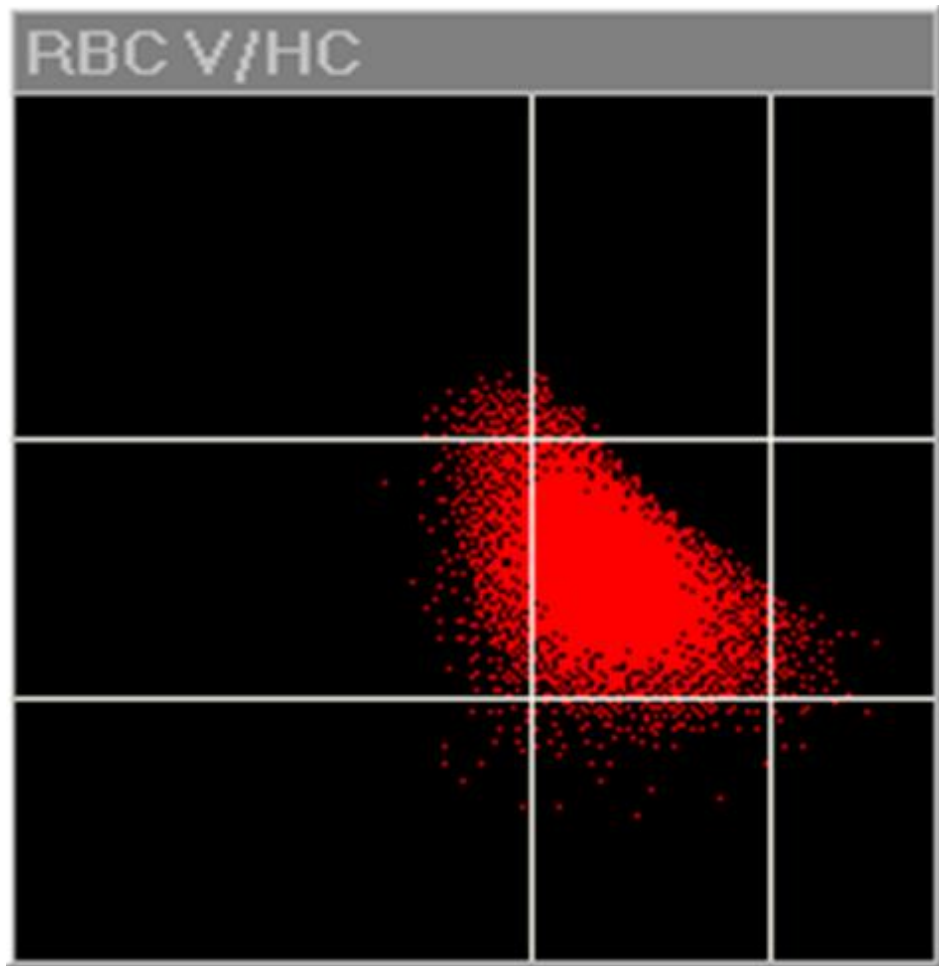
GR normali



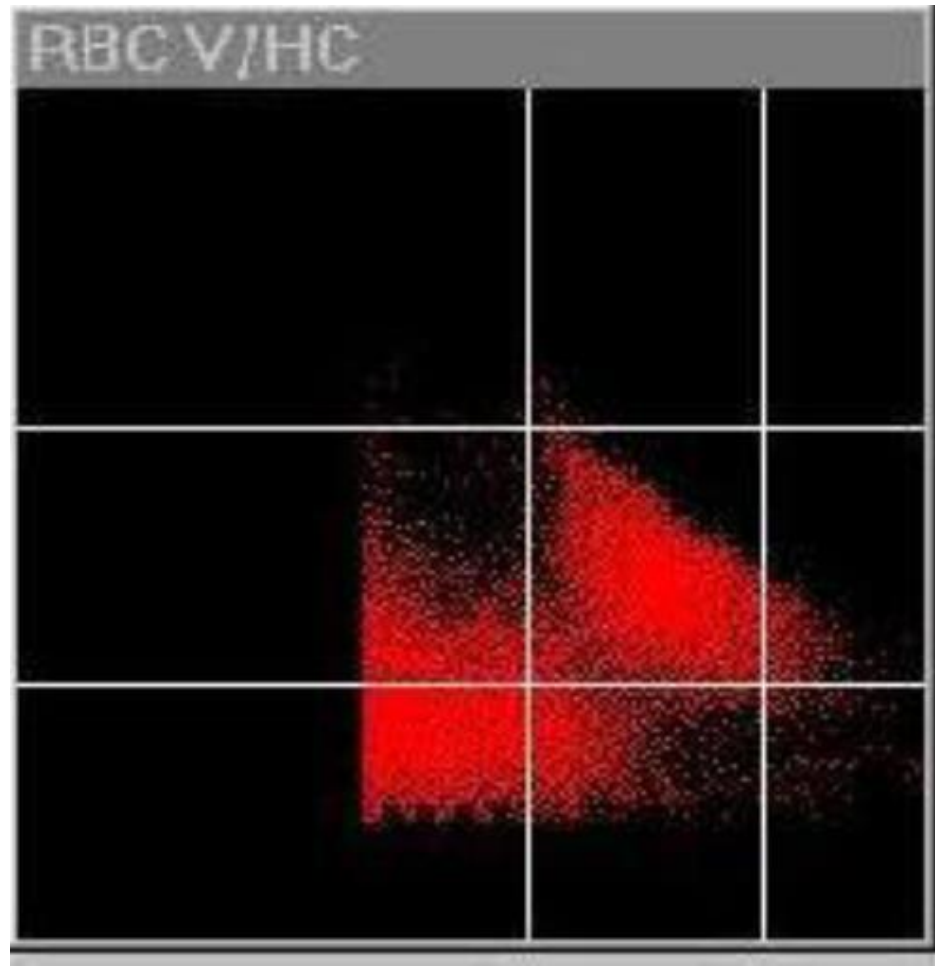
GR dimorfici



GR agglutinati



normale

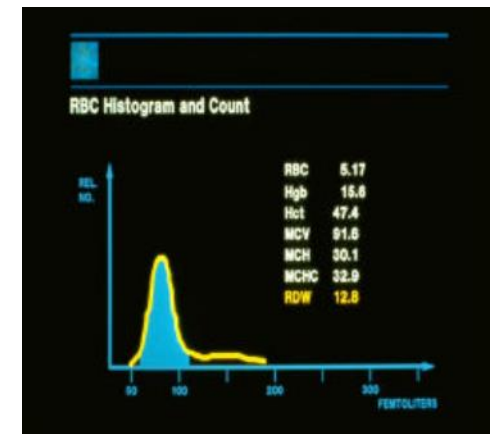
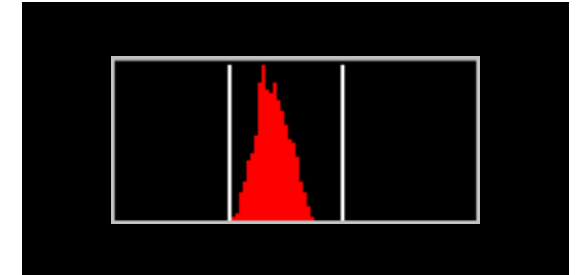


trasfuso

Ampiezza di distribuzione dei GR

Red Cell Distribution Width

- La **RDW** è una misura che quantifica l'eterogeneità del volume dei GR e riflette il range delle dimensioni dei GR.
 - La RDW può essere utile nella classificazione precoce delle anemie perché si altera prima nelle anemie da carenza nutrizionale rispetto ad altri indici eritrocitari sptt nei casi di carenza di ferro.
 - L'RDW è utile nelle anemie microcitiche, per distinguere l'anemia da carenza di ferro (alto RDW, MCV ridotto) e la talassemia eterozigote (RDW normale, MCV ridotto).
 - per la conferma diagnostica sono però necessari test più specifici.
- L'RDW è anche utile nell'individuazione di **frammentazioni** eritrocitarie, agglutinazione, o popolazioni cellulari dimorfiche (compresi i pazienti che hanno effettuato trasfusioni o sono stati trattati per un carenza nutrizionale).

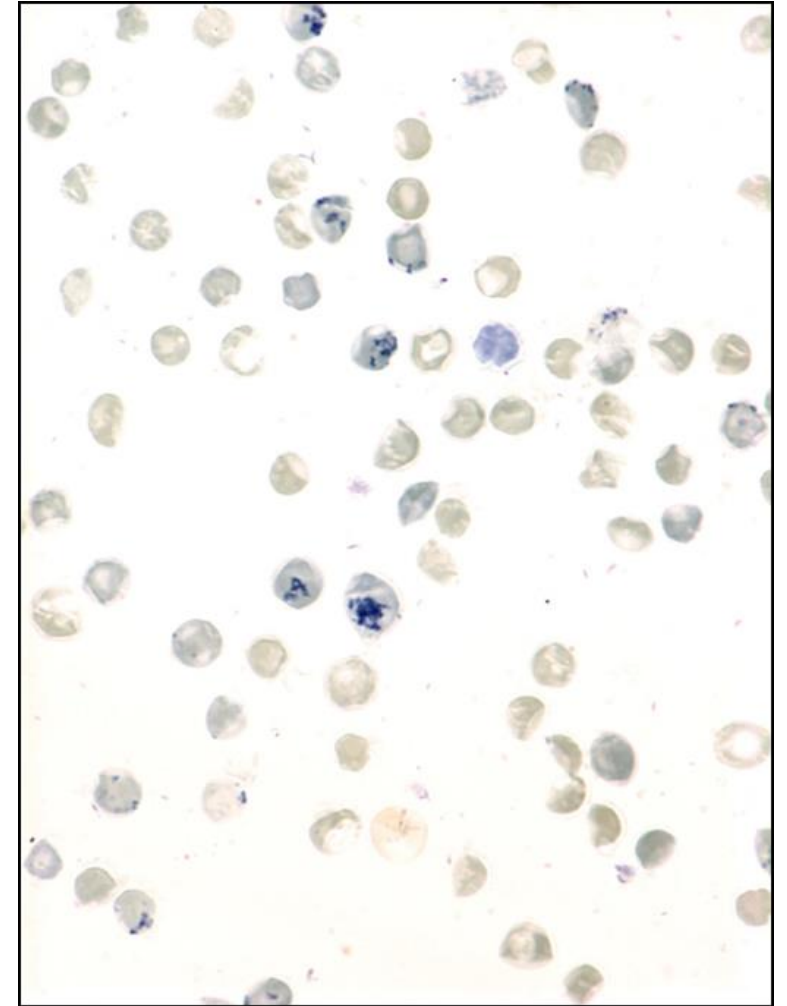


Reticolociti (v.n. 0,8-2,5 % dei GR)

- Cellula priva di nucleo precursore del GR: GR giovane
 - Il valore dei reticulociti è influenzato dal grado di anemia e va corretto per l'Hct.
 - $\% \text{ corretta di reticulociti} = \% \text{ reticulociti} * \text{Hct del paziente} / \text{Hct normale}$
- Il conteggio dei reticulociti è indice dell'attività eritropoietica midollare
 - ridotti nelle anemie da ridotta produzione eritrocitaria
 - aumentati nelle anemie da ridotta sopravvivenza eritrocitaria

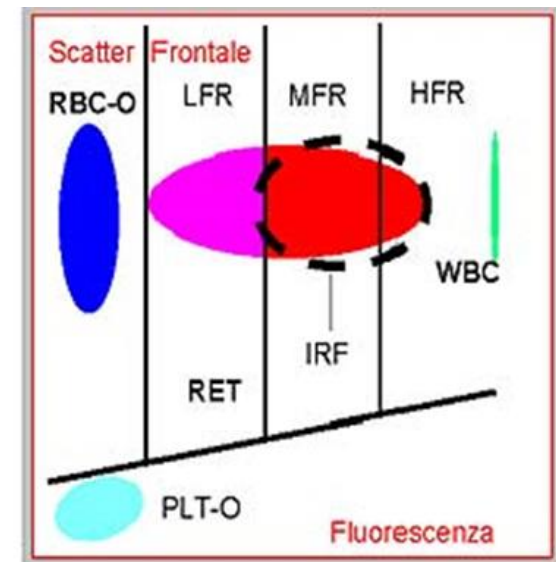
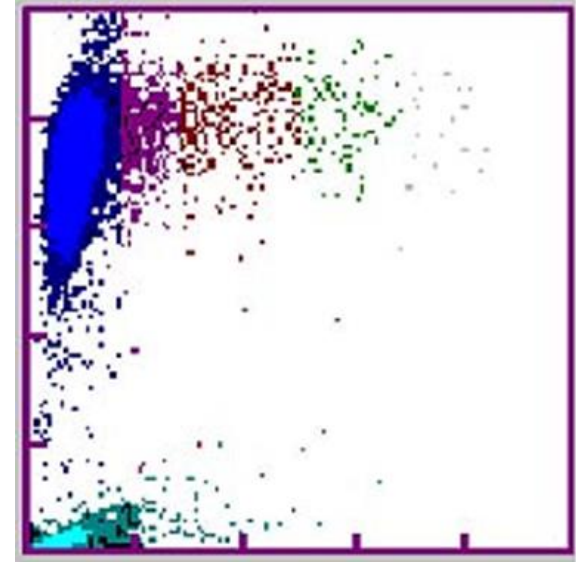
Conteggio reticolocitari automatico

- Nel passato, il conteggio dei reticolociti era effettuato in modo manuale con colorazioni sopravitali (ad es. blu di metilene blue, blu brillante di cresile).
- Nei reticolociti l'RNA precipitato appare come granuli blu scuro (almeno 2 per cellula)
- A causa del loro basso numero il CV per il conteggio reticolocitario manuale è 10 - 20%.
- Per aumentare l'accuratezza metodi alternative con la citometria a flusso e la colorazione con l'arancio di acridina o thioflavin permettono di analizzare più cellule con maggiore accuratezza e precisione.



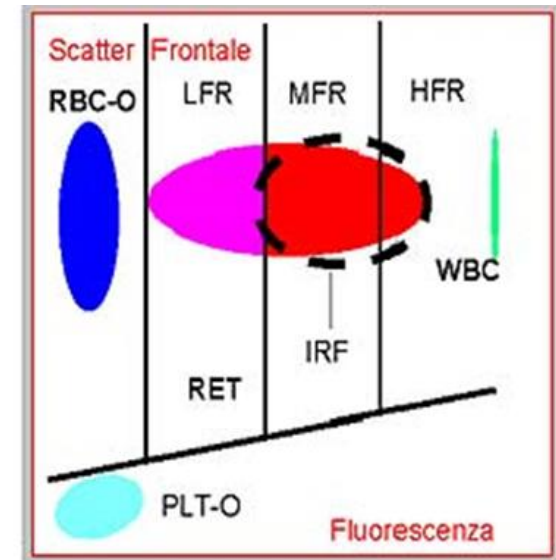
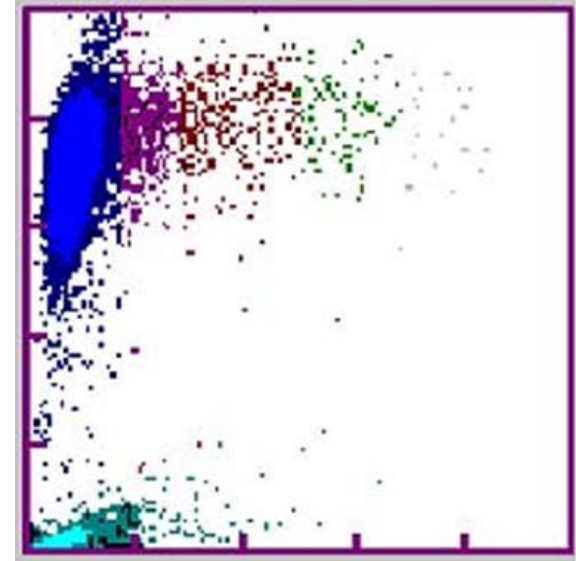
Conteggio dei reticolociti

- Il colorante penetra attraverso la membrana cellulare, colorando l'RNA nei reticolociti e il DNA/RNA nelle cellule nucleate.
- I reticolociti sono separati dagli eritrociti maturi in funzione del differente contenuto di RNA e dalle cellule nucleate in funzione del differente contenuto di DNA/RNA.



Conteggio dei reticolociti

- I reticolociti vengono identificati utilizzando il FSC ed il SSC.
 - Maggiore è il contenuto di acidi nucleici in una cellula e maggiore sarà il segnale di SSC sull'asse X.
 - Maggiore è la dimensione di una cellula e maggiore sarà l'intensità del segnale di FSC sull'asse Y.
- I reticolociti vengono suddivisi in 3 frazioni (HFR, MFR e LFR) in funzione della quantità di RNA.
- I reticolociti sono chiaramente separati dai GB perchè, per le loro caratteristiche di fluorescenza e volume, i leucociti si collocano in un'area dello scattergrama distinta da quella dei reticolociti.
- Il CV è compreso tra il 5-8%.



Conteggio dei globuli bianchi (GB)

- I GB possono essere contati in modo manuale od automatico.
- I GB vanno contati dopo diluizione del sangue con un diluente che lisi i GR (di solito acido o detergente).
- Il conteggio manuale presenta un CV tra il 6.5% (in casi con conteggio normale o con leucocitosi) al 15% (nei casi con leucopenia).
- I contatori automatici hanno invece un CV tra 1 e 3%.
- Il conteggio automatico può essere falsamente aumentato in presenza di crioglobuline o criofibrinogeno, aggregati piastrinici, e di cellule eritrocitarie nucleate o quando c'è una lisi dei GR incompleta.
- Conteggi falsamente bassi di neutrofili sono stati descritti per agglutinazione dei granulociti secondaria ad interazione con immunoglobuline di superficie.

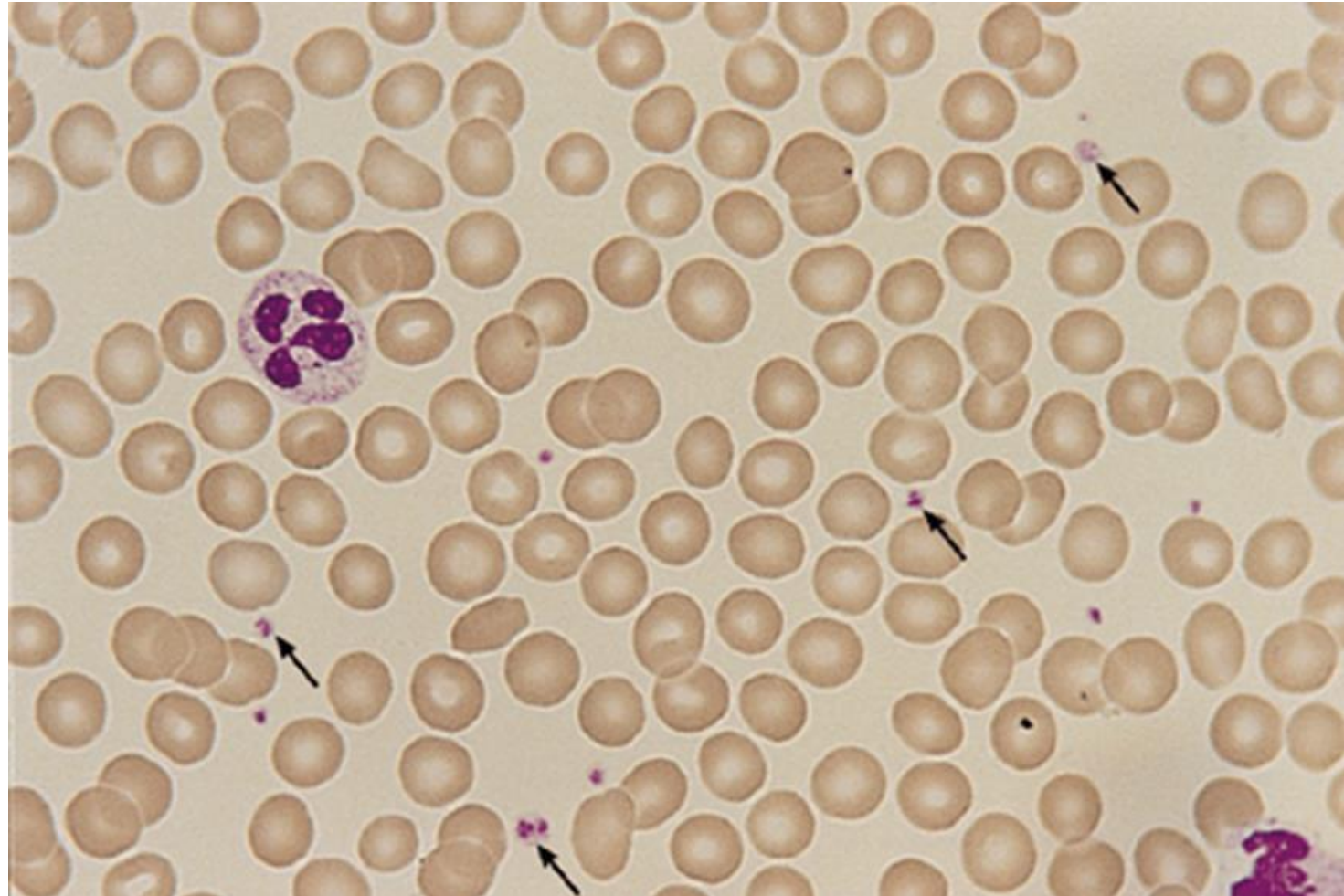
Microscopio ottico



Conteggio differenziale dei leucociti

- La valutazione della formula leucocitaria (percentuale delle diverse popolazioni leucocitarie), fornisce importanti informazioni nella valutazione dei pazienti.
- È importante valutare lo striscio a piccolo ingrandimento per assicurarsi che le cellule atipiche e la distribuzione cellulare siano evidenti.
- Negli strisci di sangue, i leucociti tendono ad aggregarsi nelle **code** ed ai bordi piuttosto che al centro del vetrino.
- Anche le cellule di maggiori dimensioni (blasti, monociti) tendono ad aggregarsi ai **bordi** del vetrino.

Striscio di sangue periferico



Conteggio differenziale manuale

- Nella formula manuale le principali fonti di errore sono dovute a:
 - La distribuzione delle cellule sul vetrino
 - Riconoscimento cellulare,
 - Campionamento statistico.
- Una scarsa **qualità nell'allestimento** del vetrino e nella **colorazione** contribuiscono agli errori di riconoscimento cellulare e distribuzione.
- Gli errori statistici di **campionamento** sono dovuti al basso numero di cellule contate (100 o 200 cellule).
 - Il CV nei conteggi manuali è tra 5 e 10% ed è anche dipendente dall'abilità e competenza di chi lo legge.
 - L'accuratezza aumenta aumentando il numero di cellule esaminate, anche se per motivi pratici il conteggio viene generalmente effettuato su 100 cellule
- **I metodi automatici sono più accurati** perché effettuano conteggi su un numero di cellule maggiore ed hanno un CV del 3-5%.

Effetto della conservazione sulla morfologia delle cellule del sangue

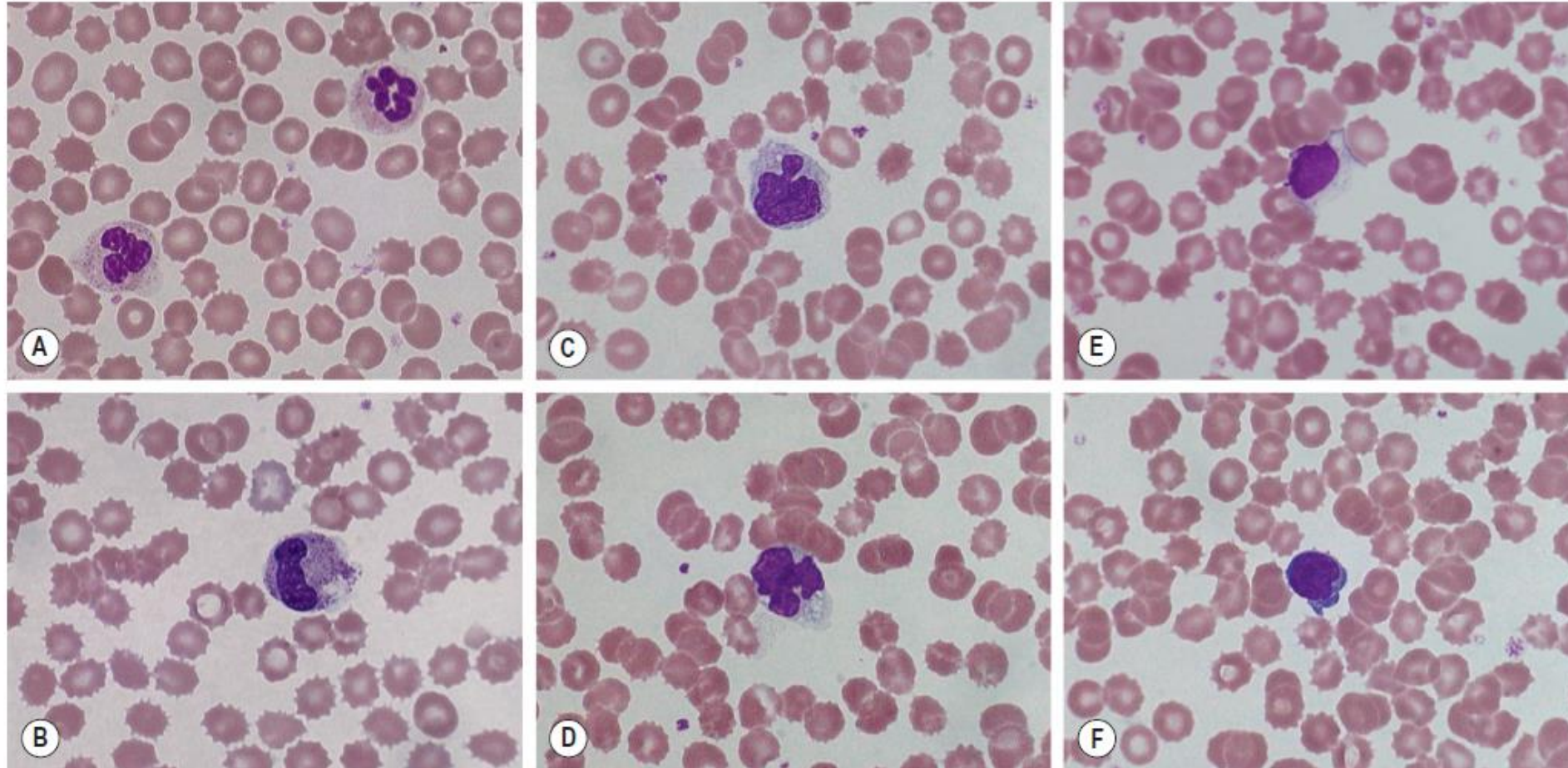


FIGURE 1-2 Effect of storage on blood cell morphology. Photomicrographs from films made from ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) blood after 24 h at 20 °C. (A, B) Polymorphonuclear neutrophils; (C, D) monocytes; (E, F) lymphocytes. Red cell crenation is prominent in all images.

Effetto della conservazione sulla morfologia delle cellule del sangue

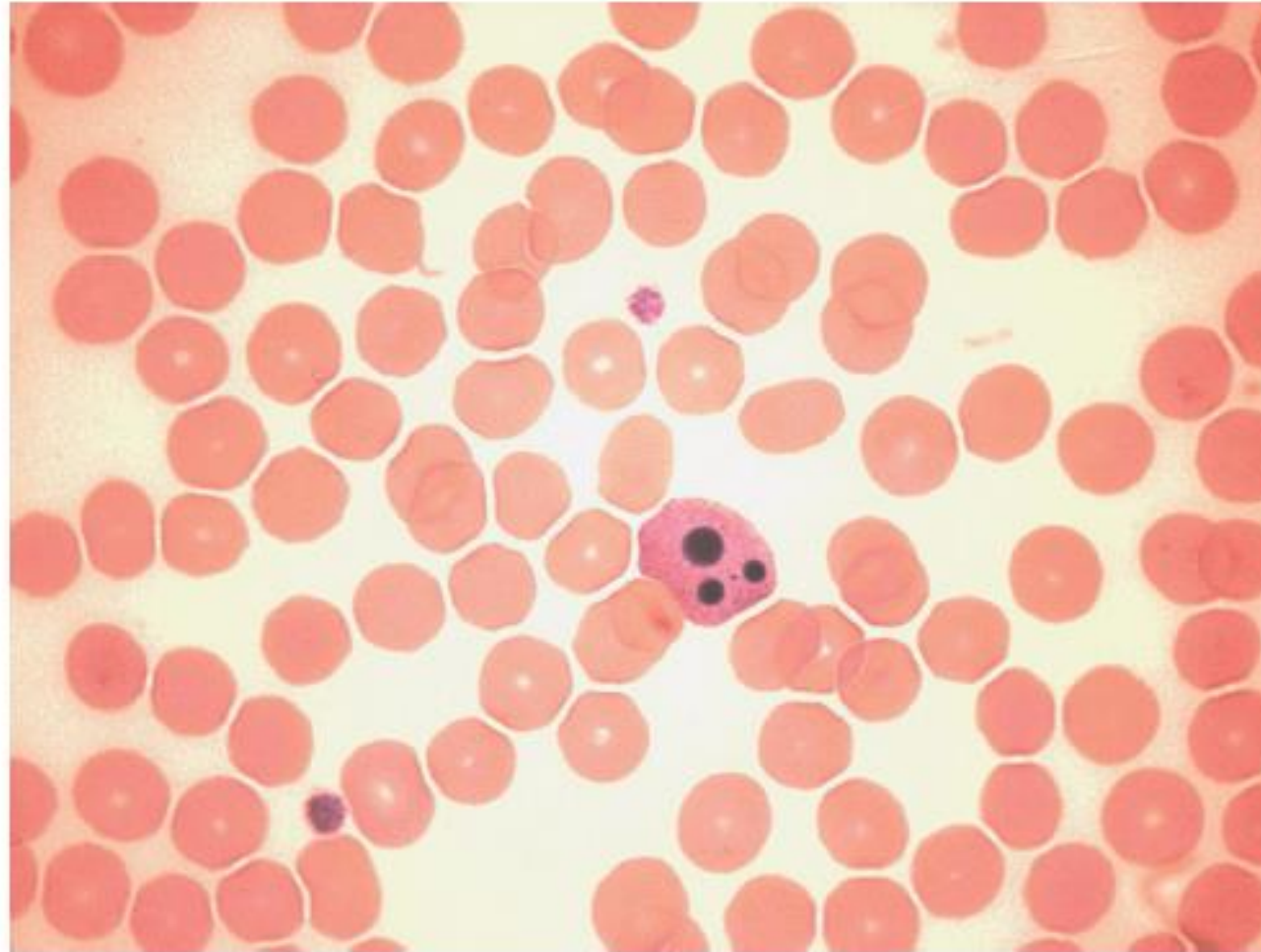
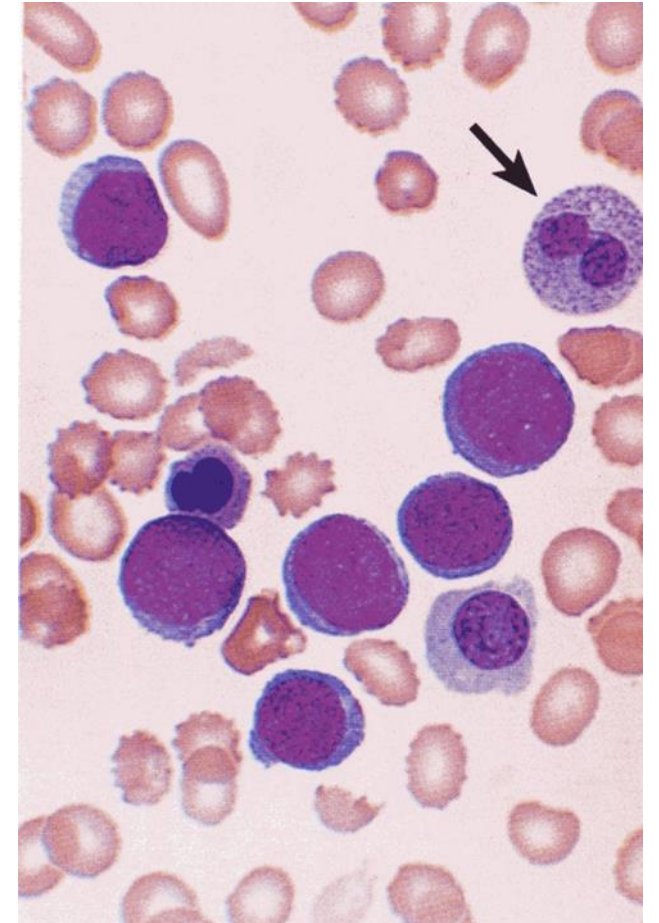


FIGURE 1-3 Morphological features of apoptosis.

Conteggio differenziale automatico

- I metodi automatici riducono in modo evidente i tempi ed il costo delle determinazioni di routine della formula e aumentano l'accuratezza.
- Tuttavia i metodi automatici non sono in grado di identificare in modo accurato e di classificare tutti i tipi cellulari e particolarmente le cellule immature o anomale
- Per tale motivo la maggior parte degli analizzatori automatici identificano le popolazioni anomale **con allarmi strumentali**, che indicano la necessità di un esame di conferma da parte di un ematologo esperto.



Conteggio differenziale automatico

- Gli strumenti automatici utilizzati per la determinazione automatica della formula leucocitaria sono generalmente di 2 tipi:
 - **Sistemi a flusso** che riconoscono le cellule sulla base delle dimensioni, della complessità e delle caratteristiche della colorazione.
 - Quelli che identificano le cellule sulla base di un **pattern di riconoscimento** usando vetrini colorati e microscopi automatizzati

Conteggio differenziale automatico

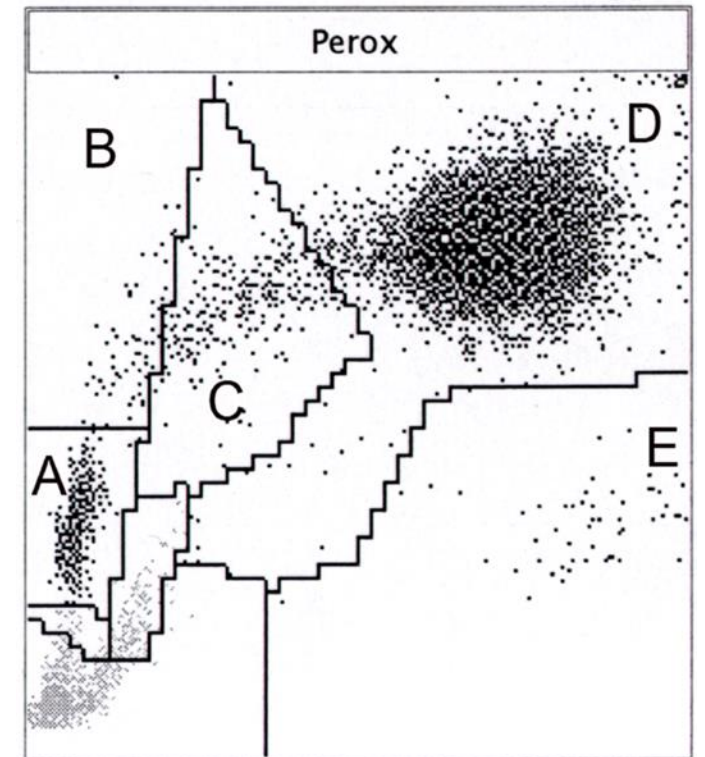
- I metodi di flusso consentono di analizzare grandi numeri di GB con elevati livelli di precisione rispetto ai metodi manuali.
- La determinazione dei GB si basa
 - o sulle dimensioni cellulari e le caratteristiche di colorazione citochimica)
 - o sul volume cellulare e la complessità interna misurata dalla impedenza elettrica e dalle caratteristiche di scatterizzazione della luce.

Conteggio differenziale automatico

- I sistemi che usano le caratteristiche **di colorazione della mieloperossidasi (MPO)** delle cellule, effettuano il conteggio differenziale dei GB attraverso una analisi citometrica a flusso continuo di campioni di sangue lisati e fissati.
- Le cellule vengono risospese nel diluente e fatte passare attraverso una cella con un flusso continuo in modo tale che le cellule sono analizzate in base alle **dimensioni cellulari** (dark field light scatter) e delle caratteristiche citochimiche della **colorazione con la MPO** (bright field detector).
- I dati sono plottati come una scattergramma sulla base della **dimensione** (light scatter) **sull'asse delle y** e dell'intensità della colorazione con la **mieloperossidasi sull'asse delle x**, dando origine ad un differenziazione in 6 popolazioni (neutrofili, linfociti, monociti, eosinofili, basofili, e LUC [large unstained cells]).

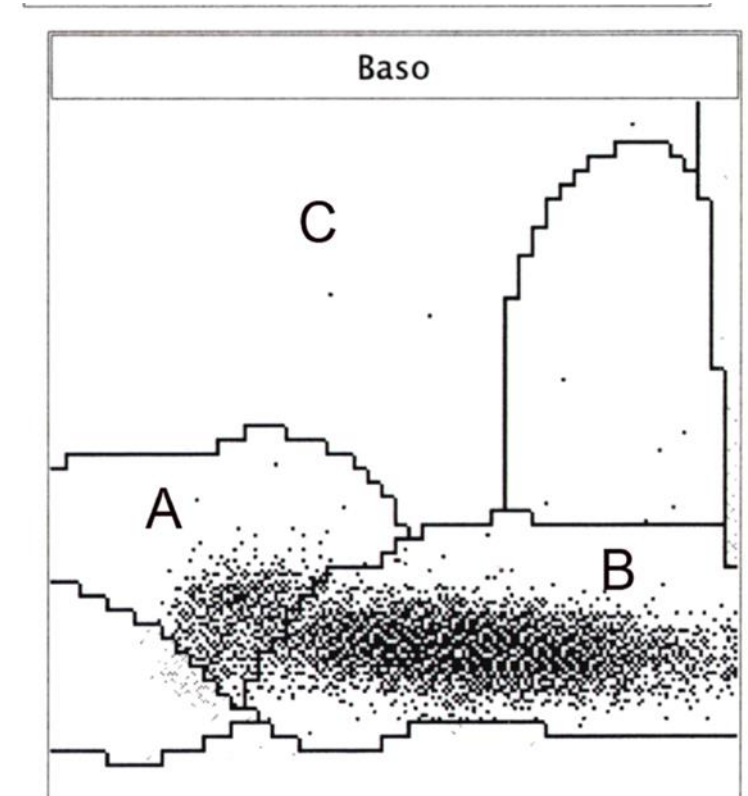
Conteggio differenziale automatico

- Il conteggio totale dei GB, dei neutrofili, linfociti, monociti ed eosinofili sono effettuati nel canale della MPO.
 - I linfociti sono cellule piccole (basso scatter) non colorate.
 - Linfociti atipici più grandi, i blasti, le plasmacellule circolanti cadono nell'area delle canale delle LUC.
 - I neutrofili hanno una MPO più intensa ed appaiono come cellule più grandi.
 - Gli eosinofili hanno una attività MPO molto intensa ma appaiono più piccoli dei neutrofili perchè tendono ad assorbire parte del loro stesso side scatter.
 - I monociti hanno livelli più bassi di MPO e si trovano di solito nell'aresa tra i neutrofili e le LUC.
 - Il sistema utilizza soglie di MPO variabili per adattarsi alle differenze individuali di MPO.



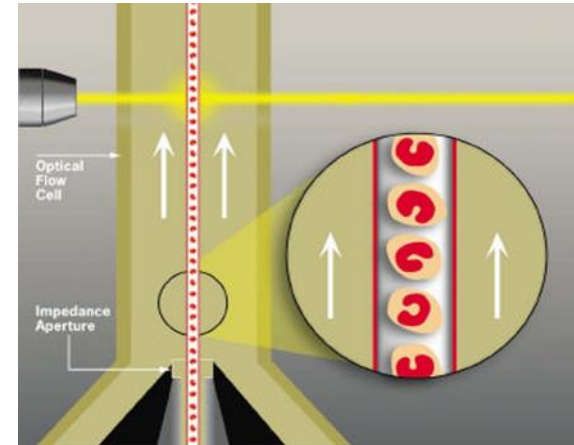
Conteggio differenziale automatico

- Per contare i basofili, viene usato un canale di lobularità nucleare per i basofili.
- Per questa determinazione, i GR ed i GB vengono lisati, lasciando solo i nuclei dei GB, con l'eccezione dei basofili, che sono resistenti alla lisi e possono essere contati in base alla dimensione cellulare
- I dati di scatterizzazione della luce ottenuti dai nuclei dei GB possono anche aiutare ad identificare i blasti che hanno un minore scatter della luce rispetto ai nuclei dei linfociti maturi.
- L'indice di lobularità nucleare è una misura che può aiutare ad identificare gli elementi mieloidi immaturi e le cellule eritroidi nucleate in relazione alla MPO media e ad conteggio cellulare
- Queste popolazioni anomale generano un allarme che indica la necessità di una analisi morfologica manuale.

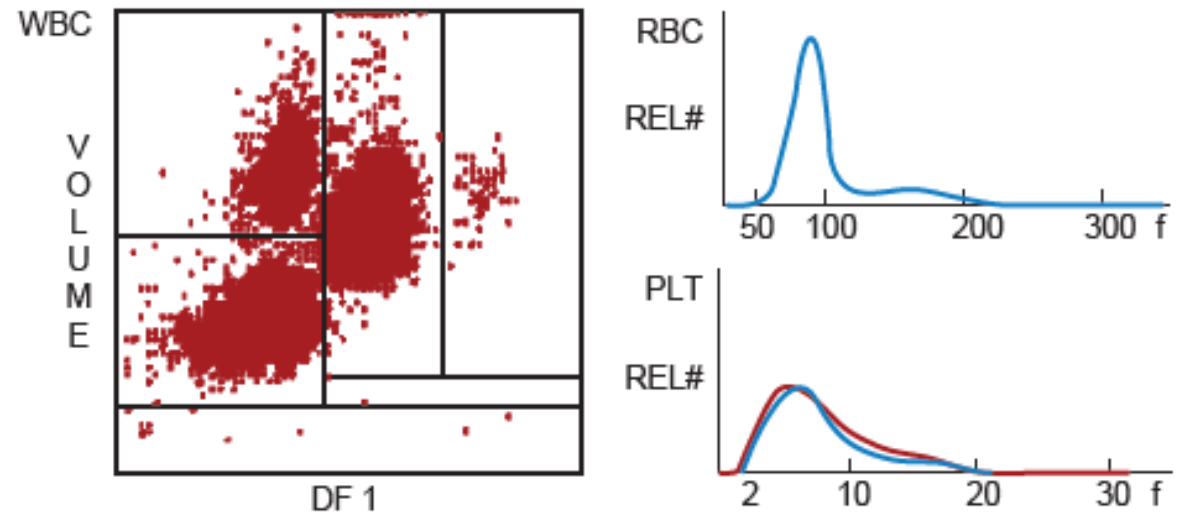


Conteggio differenziale automatico

- Altri strumenti utilizzano per il conteggio differenziale **la determinazione del volume dei GB mediante l'impedenza elettrica associato ai dati di scatterizzazione della luce laser che correlano con la complessità cellulare citoplasmatica e con il contenuto in granuli.**
- Con questa tecnologia è possibile ottenere una formula leucocitaria automatica a 5 parametri.
- In questo modo si genera un grafico tridimensionale che separa i leucociti in neutrofili, linfociti, monociti, eosinofili, e basofili con allarmi in caso di presenza di popolazioni anomale.
- Alcuni strumenti usano invece l'impedenza ed i dati elettromagnetici per identificare i neutrofili, monociti e linfociti e mentre gli eosinofili ed i basofili vengono identificati sulla base delle di un agente lisante.



Conteggio differenziale



ID# 1	WBC	6.7		RBC	4.56
ID# 2	%		#	HGB	13.5
Sequence #	NE	59.4	4.1	HCT	40.3
	LY	31.6	2.1	MCV	88.3
DATE: 06/21/96	MO	7.7	0.5	MCH	29.5
TIME: 08:55:45	EO	0.7	0.0	MCHC	33.5
<u>Cass/Pos</u> S	BA	0.6	0.0	RDW	13.4
Normal WBC Pop				PLT	202
Normal RBC Pop				MPV	8.2
Normal PLT Pop					

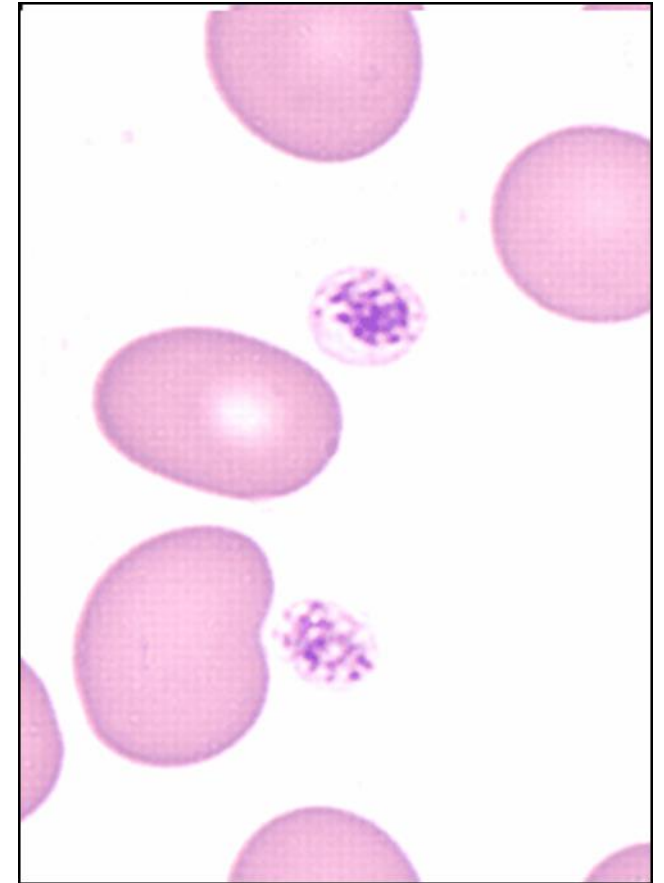
FIGURE 1.2. Histograms and printout generated by the Coulter automated hematology analyzer utilizing light scatter and electrical impedance. BA, basophil; EO, eosinophil; HCT, hematocrit; HGB, hemoglobin; LY, lymphocyte; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; MO, monocyte; MPV, mean platelet volume; NE, neutrophil; PLT, platelet; RBC, red blood cell; RDW, red cell distribution width; WBC, white blood cell.

Conteggio differenziale automatico

- **Il confronto tra strumenti con diversa tecnologia mostra una eccellente accuratezza e precisione per l'uso clinico** in campioni routinari con piccole differenze ma un notevole miglioramento rispetto al conteggio manuale.
- La maggior parte degli studi evidenziano una scarsa correlazione nel conteggio dei **basofili** probabilmente per il loro basso numero.

Analisi delle piastrine

- Le piastrine sono frammenti citoplasmatici anucleati del diametro di 2-4 micron.
- Possono essere conteggiate manualmente od in modo automatico.
- Il conteggio manuale si ottiene dopo diluizione del sangue in camera usando il microscopio in contrasto di fase.
- Cause principali di errore: la diluizione e piccolo numeri
- Il CV, sptt nei casi di piastrinopenia, può essere $>$ del 15%.



Analisi delle piastrine

- **Nei contatori automatici le piastrine sono conteggiate dopo rimozione dei globuli rossi** per sedimentazione o centrifugazione o usando sangue intero.
- Le piastrine sono quindi identificate sulla base delle caratteristiche di impedenza, di scatterizzazione della luce od entrambe.
- **In questo modo si ottengono valori molto affidabili con $CV < 2\%$.**

Analisi delle piastrine

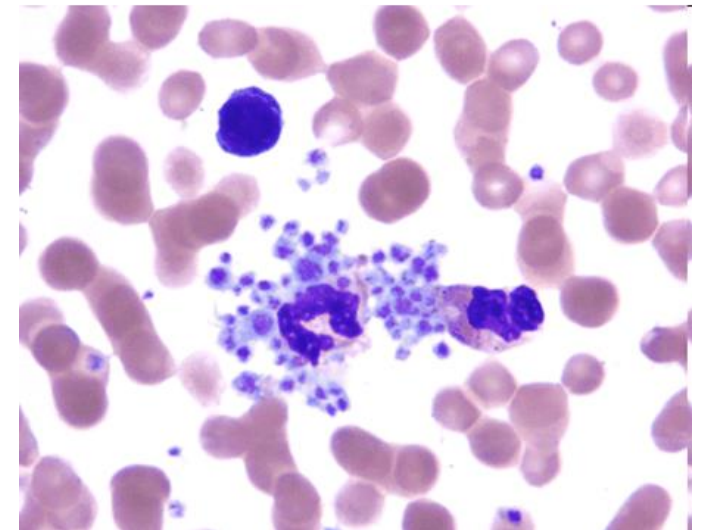
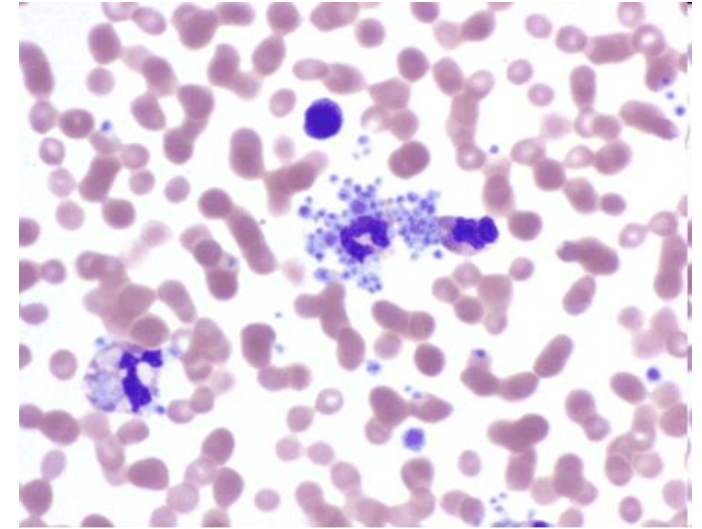
- Valori falsamente bassi si hanno nel caso di aggregati piastrinici o adsorbimento delle piastrine ai leucociti.
- Frammentazioni di Gr o GB possono elevare artificialmente il livello di piastrine ma in questo caso l'istogramma della distribuzione evidenzia questo problema.

Analisi delle piastrine

- Gli analizzatori automatici determinano anche l'MPV (volume medio piastrinico).
- In generale, l'MPV ha una correlazione inversa con il numero di piastrine:
 - alti volumi nelle piastrinopenie da aumentata distruzione periferica (porpora trombocitopenica idiopatica)
- Da notare che le piastrine tendono ad aumentare di volume nelle prime 2 ore in EDTA, ed a ridursi dopo una conservazione più prolungata.

Falsa piastrinopenia da EDTA

- È causata dalla presenza di anticorpi anti piastrine.
- In condizioni normali (in vivo) questi anticorpi non causano agglutinazione perché i relativi antigeni piastrinici restano “nascosti” all’interno della struttura piastrinica.
- Il contatto delle piastrine con l’EDTA della provetta di prelievo, causa una modifica della struttura piastrinica con conseguente “scopertura” degli antigeni nascosti che si rendono disponibili per il legame con l’anticorpo : si realizza così l’agglutinazione delle piastrine che sono sottratte al conteggio



Vantaggi e cause di errore con gli analizzatori automatici in ematologia

- L'uso degli analizzatori automatici in ematologia ha ridotto i costi ed i tempi con un aumento della accuratezza e riproducibilità dei conteggi cellulari.**
- Il CV per la maggior parte dei parametri misurati è nel range 1-2 %.**
- Questo livello di riproducibilità non è raggiunto invece con le metodiche manuali.**

Riproducibilità degli indici eritrocitari

indice	Metodo usato	% Errore (± 2 Coefficienti di variazione)
HB	Spettrofotometrico	1.0–2.0
	automatico	<1.0
MCV	Emocitometro	9.5
	Automatico	<1.0
MCH	Emocitometro	10.0
	Automatico	0.6–1.2
MCHC	Automatico	1.0–1.5

From Bentley S, Johnson A, Bishop C. Am J Clin Pathol 1993;100:626–632; NCCLS. Reference and standard procedure for quantitative determination of haemoglobin in blood, 2nd ed. Document H15-A2. NCCLS, 1994; and International Committee for Standardization in Haematology. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH Standard 1986) and specifications for international haemoglobincyanide reference preparation, 3rd ed. Clin Lab Haematol 1987;9:73–79, with permission.

Cause di errore con gli analizzatori automatici in ematologia

- Nonostante questo alto grado di accuratezza, diversi errori possono invalidare il metodo automatico.
- Una adeguata **calibrazione** dello strumento è essenziale per la raccolta dei dati.
- Un settaggio difettoso, che determina la soglia di conteggio come pure variazioni nei volumi e nelle caratteristiche di flusso, influenzano negativamente l'accuratezza.

Cause di errore con gli analizzatori automatici in ematologia

- Problemi di tipo elettrico o meccanico come pure fluttuazioni anche minime nel voltaggio possono determinare errori.
- É quindi essenziale una **attenta calibrazione iniziale** dello strumento, a cui fare seguire **frequenti valutazioni di riproducibilità** mediante l'analisi di controlli a concentrazione nota.
- Metodi di riferimento per la calibrazione sono stati sviluppati sia dal National Committee for Clinical Laboratory Standards e dall'International Committee for Standards in Haematology e sono usati nei laboratori.

Cause di errore con gli analizzatori automatici in ematologia

- Alcune **condizioni di malattia** possono inoltre associarsi con risultati falsamente alti o bassi.
- Pertanto, i singoli valori ottenuti vanno interpretati nel contesto delle osservazioni cliniche per quel paziente.
- In aggiunta la valutazione dello striscio di sangue periferico ci può dare informazioni utili aggiuntive non ricavabili dai conteggi automatici.

Cause di errore con gli analizzatori automatici in ematologia

- Ridotti livelli di GR, macrocitosi e valori molto alti di MCHC si possono osservare in pazienti con malattia da agglutinine fredde ed in pazienti con elevata viscosità serica.
- Alti livelli di paraproteine possono dare valori falsamente alti di Hb influenzando anche MCH e MCHC
- Alcuni analizzatori danno falsi elevati livelli di Hb con conteggi di GB $> 30 \times 10^9/L$ per una aumentata torbidità
- Valori molto alti di GB possono falsamente innalzare i GR dal momento che i GB vengono incorporati nel conteggio dei GR.
- Alti livelli di glicemia (>400 to 600 mg/dl) e l'associata iperosmolarità causano un rigonfiamento dei GR e conseguente aumento dell' MCV e dell'Hct con un valore falsamente basso di MCHC
- L'aumentata torbidità associata alla iperlipemia può aumentare in modo spurio l'Hb, MCH, e MCHC

Disordini e Condizioni che possono ridurre l'accuratezza dei conteggi cellulari automatici

Componente	Disordine/condizione	Effetto sul conteggio cellulare	Razionale
GR	Microciti o schistociti	Possono sottostimare i GR	Minore soglia del conteggio dei GR, la finestra di conteggio è più grande delle dimensioni dei GR.
	Corpi di Howell-Jolly	Può aumentare in modo spurio le PLT	I corpi di Howell-Jolly hanno dimensioni simili alle PLT.
	policitemia	Può sottostimare i GR	Aumentata coincidenza nel conteggio.
Adapted from Koepke JA. Laboratory hematology. New York: Churchill Livingstone, 1984.			

Disordini e Condizioni che possono ridurre l'Accuratezza dei conteggi cellulari automatici

Componente	Disordine/Condizione	Effetto sul conteggio	Razionale
GB	leucocitosi	Sovrastima dei GR	Aumentata coincidenza nel conteggio
	Leucemia acuta e leucemia linfatica cronica, infezioni virali	Possono abbassare in modo spurio il conteggio dei GB	Aumentata fragilità dei leucociti e presenza di forme immature
	chemioterapia nelle leucemie acute	Può aumentare in modo fittizio le PLT	Frammenti nucleari o citoplasmatici identificati come PLT
Adapted from Koepke JA. Laboratory hematology. New York: Churchill Livingstone, 1984.			

Disordini e Condizioni che possono ridurre l'accuratezza dei conteggi cellulari automatici

Componente	Disordine/Condizione	Effetto sul conteggio cellulare	Razionale
PLT	Aggregazione delle PLT	Può sottostimare le PLT, talora con un aumento fittizio dei GB	Alcuni aggregati di PLT riconosciuti come GB
Plasma	Agglutinine fredde	Sovrastima dei GR con macrocitosi spuria	Doppietti, tripletti etc di GR.
	Crioglobuline, crio-fibrinogeno	Variazioni nel conteggio delle PLT	Precipitati proteici identificati come PLT
Adapted from Koepke JA. Laboratory hematology. New York: Churchill Livingstone, 1984.			

Vantaggi e cause di errore con gli analizzatori automatici in ematologia

- Nonostante l'alto livello di accuratezza e precisione, i contatori automatici danno frequentemente allarmi falsamente positivi (fino al 10-25%), che richiedono una valutazione manuale dello striscio di sangue periferico.
- L'esame dello striscio di sangue periferico ha ancora un significato importante nei campioni che presentano allarmi o che mostrano quadri al di fuori dei parametri definiti in quel dato laboratorio.
- In aggiunta, alcuni tipi cellulari richiedono una valutazione morfologica per la loro identificazione.