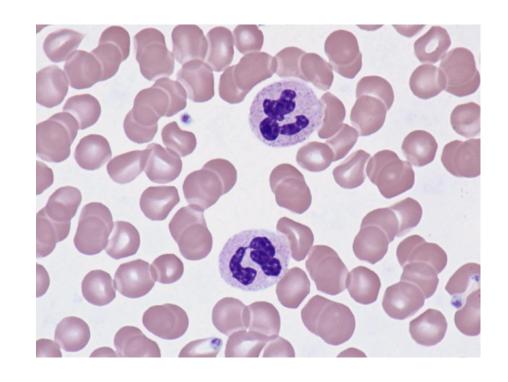
Tecniche di laboratorio di ematologia

Prof. Gian Matteo Rigolin Ematologia

5. Analisi morfologica delle cellule del sangue

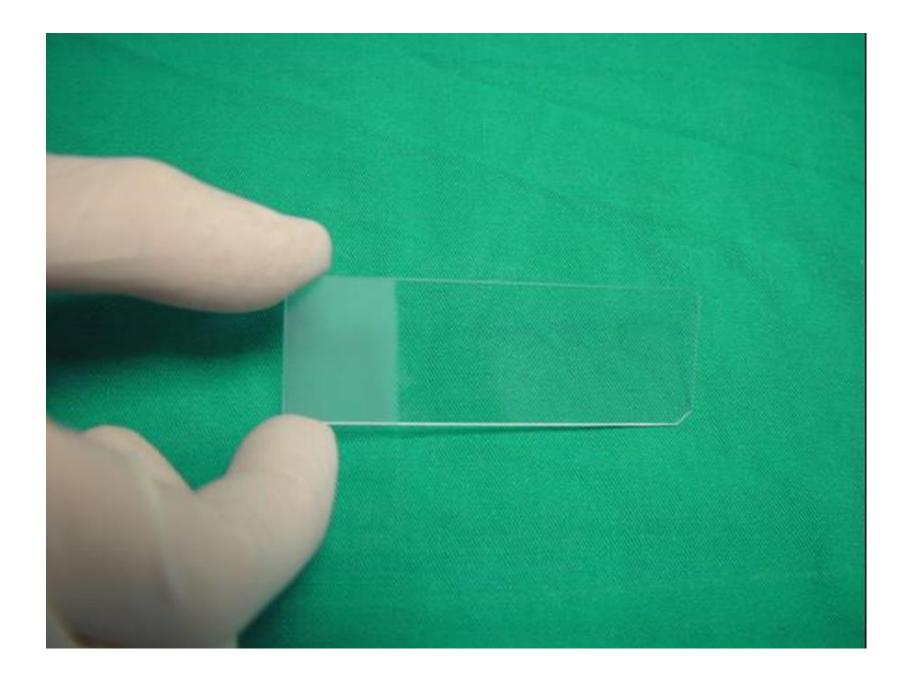


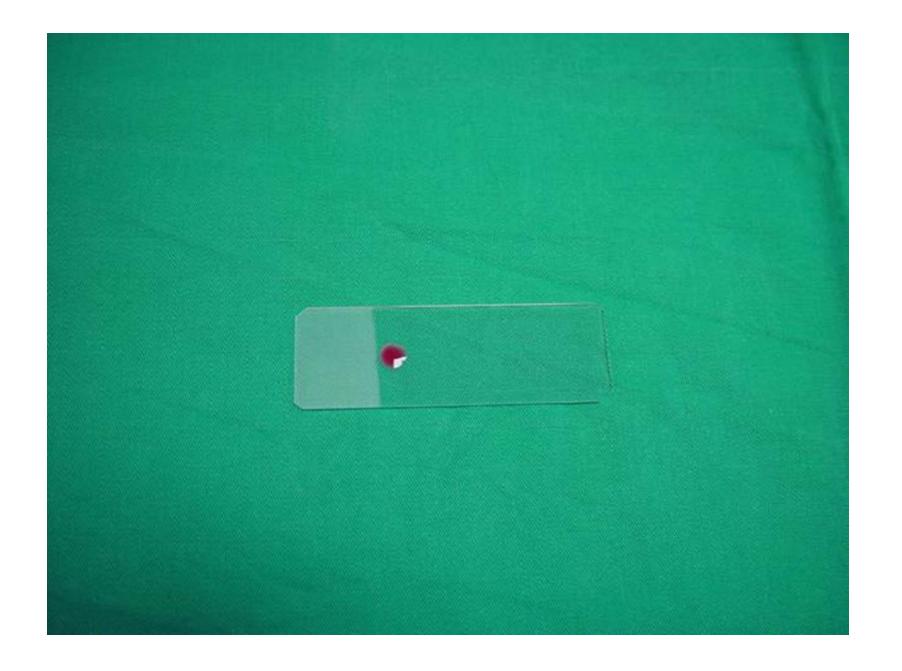
Analisi morfologica delle cellule del sangue

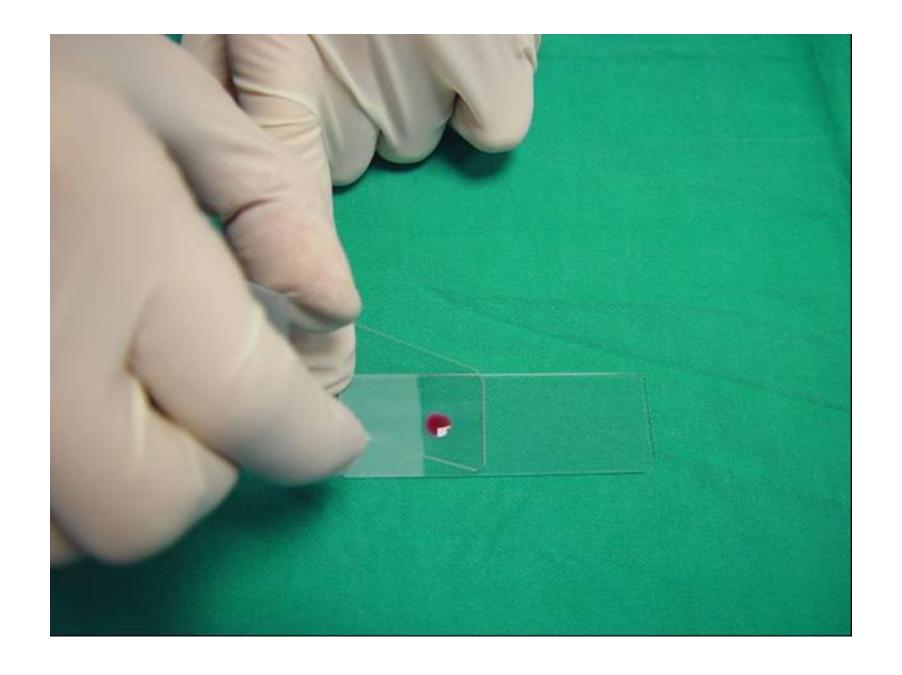
- Una attenta valutazione di preparati citologici ben allestiti è una tappa essenziale nella valutazione delle malattie ematologiche.
- Sebbene la diagnosi in alcune malattie possa essere suggerita già dallo strumento, molte malattie possono avere normali conteggi cellulari ma anomala morfologia cellulare.
- Tuttavia le analisi morfologiche possono essere limitate da una preparazione non ottimale dei preparati o da una loro colorazione inadeguata.
- Sono necessari per una diagnosi corretta una preparazione di adeguati strisci di sangue periferico da parte di personale attento e familiare con le tecniche e quindi esperienza nella lettura del preparato citologico.

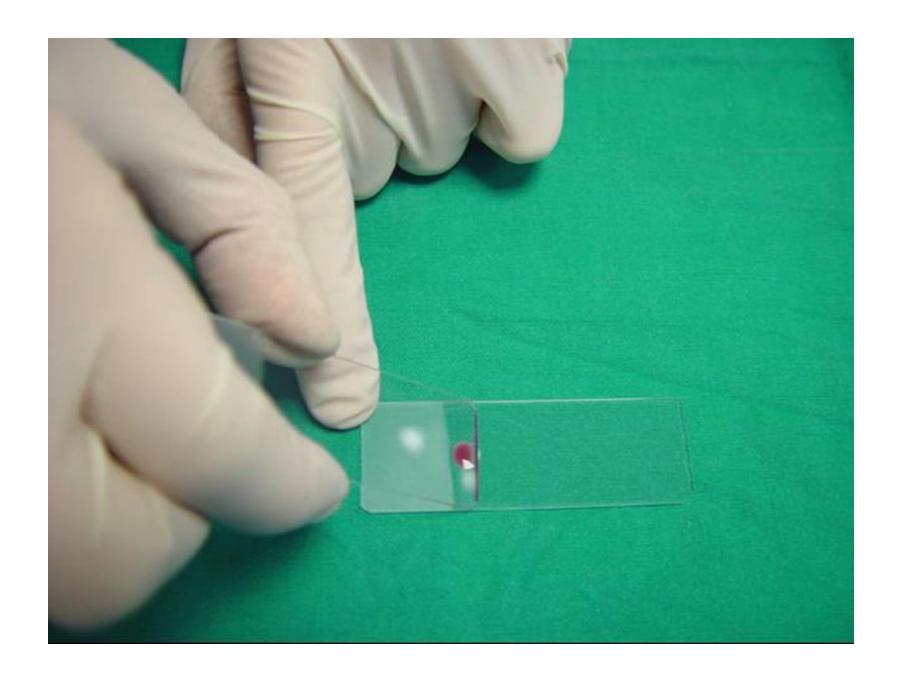
Preparazione degli strisci di sangue periferico

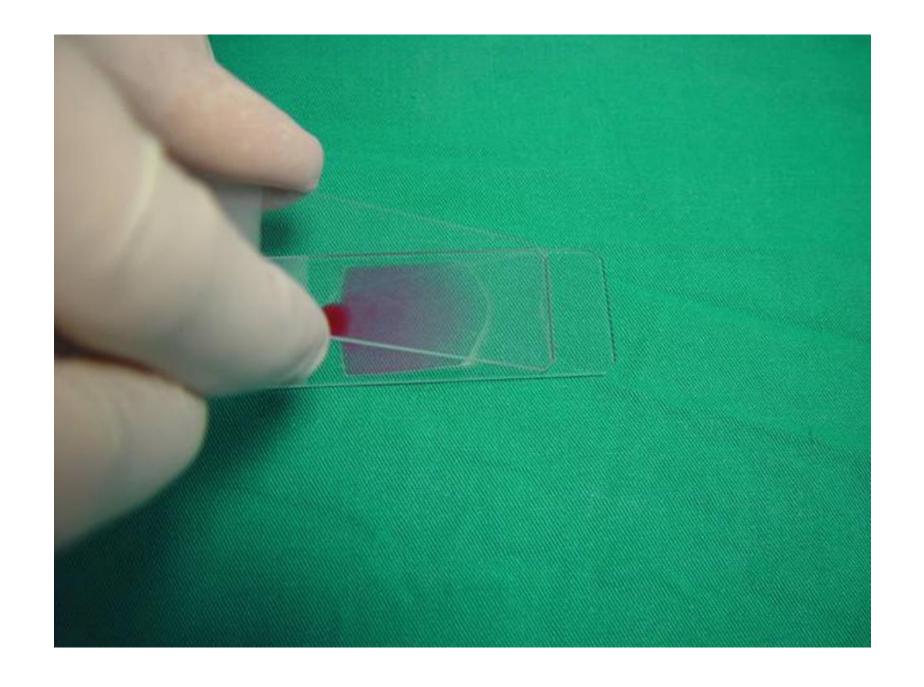
- Gli strisci di sangue periferico sono allestiti vetrini di vetro generalmente utilizzando sangue anticoagulato ottenuto dalla provetta utilizzata per il conteggio cellulare.
- Tuttavia l'anticoagulante può indurre la formazione di artefatti nella morfologia cellulare.
- La valutazione ottimale della morfologia dovrebbe essere effettuata su sangue non anticoagulato, ottenuto dal dito.
- La distribuzione meccanica delle cellule sul vetrino può inoltre distorcere la morfologia cellulare anche se questi artefatti possono essere minimizzati da una adeguata tecnica di allestimento del vetrino.

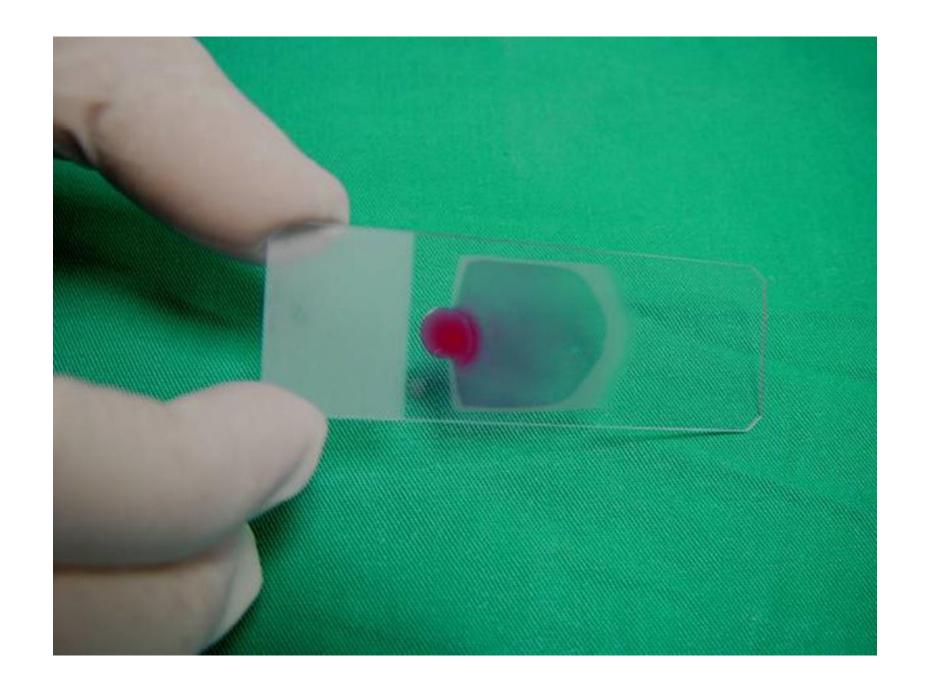












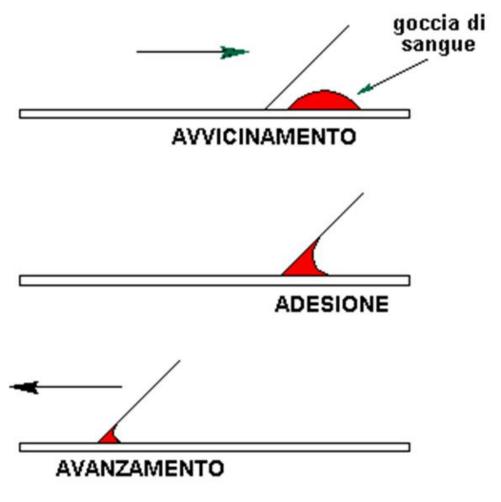
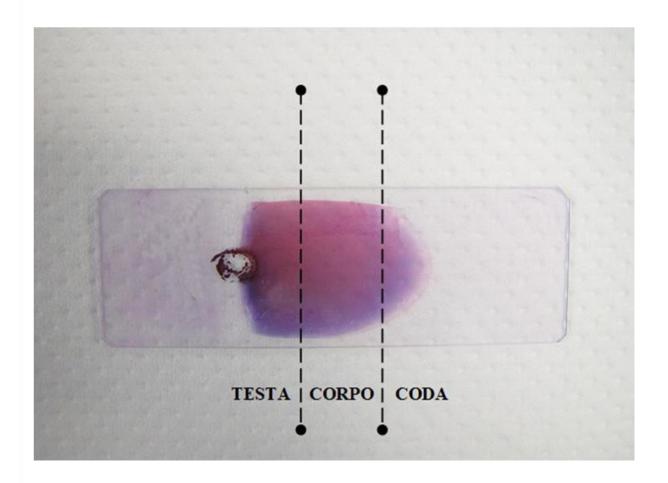


Fig. 7 - Come preparare uno striscio di sangue



Blood films made on slides.

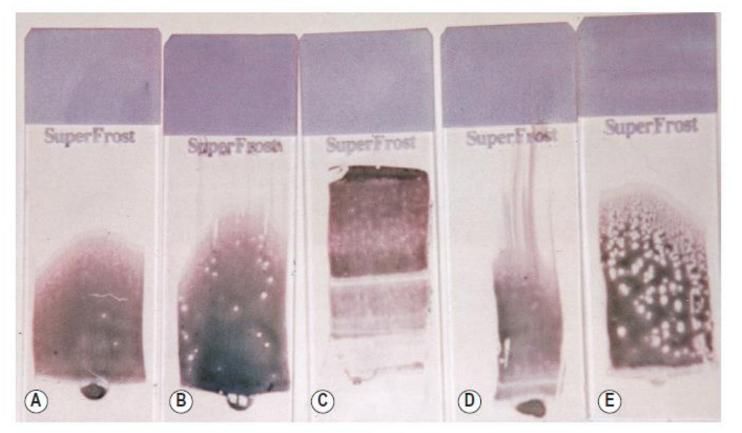


FIGURE 4-1 Blood films made on slides. (A) A well-made film. (B) An irregular patchy film on a dusty slide. (C) A film that is too thick. (D) A film that has been spread with inconsistent pressure and using an irregularly edged spreader, resulting in long tails. (E) A film made on a very greasy slide.

Badly spread films

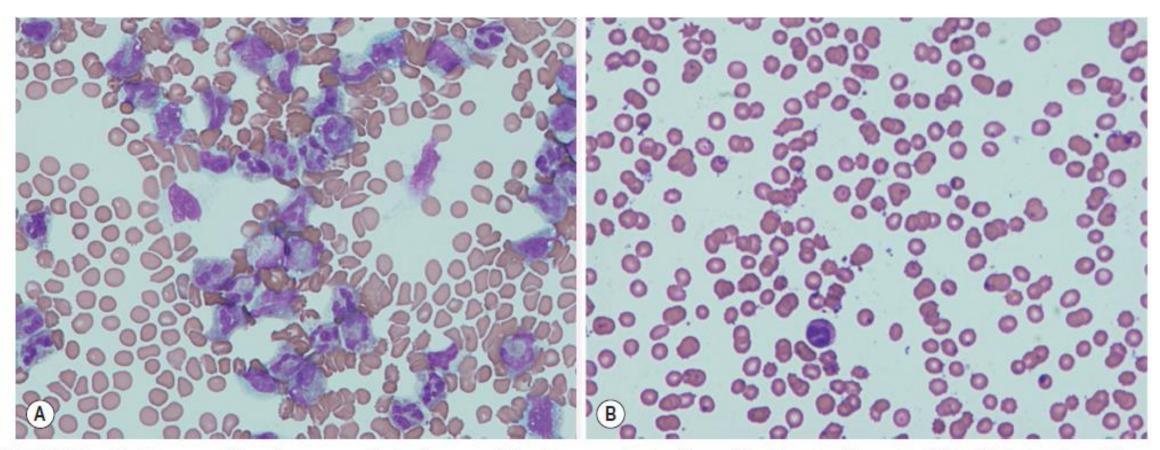


FIGURE 3-1 Badly spread film. Two areas of a badly spread film from a patient with a white blood cell count of 20×10^9 /l showing (A) many leucocytes in the tail and (B) very few leucocytes in body of film.

Colorazione degli strisci di sangue periferico

- Gli strisci di sangue sono generalmente colorati con le colorazioni di Wright o di May-Grunwald-Giemsa. Entrambe sono una modificazione della procedura di Romanowsky.
 - Il colorante può essere preparato in laboratorio ad acquistato già pronto
- Il colorante di base è costituito dal blu di metilene e dalla eosina.
- La formulazione di Wright usa il sodio bicarbonato per convertire il blu di metilene in azzurro di metilene che colora le cellule.
- Il Giemsa usa quantità definite di acido bicromico per formare i composti dell'azzurro convertito.
- Tutti i tipi di colorazione di Romanowsky sono insolubili in acqua ma possono essere dissolti in alcol metilico.
- Il colorante deve essere privo di acqua che induce artefatti nei GR.
- Gli artefatti indotti dall'acqua possono essere evitati con la fissazione dei vetrini in metanolo anidro prima della colorazione

COLORAZIONE DI UNO STRISCIO DI SANGUE IL METODO MAY-GRUNWALD GIEMSA

- Le fasi della colorazione
- Versare sullo striscio di sangue preventivamente disseccato 1 ml di liquido di May-Grunwald e attendere 3 minuti. In questa fase, essendo il colorante in soluzione di alcool metilico, si ha la fissazione del tessuto.
- Si diluisce il liquido con 2 ml di acqua distillata e si lascia agire per 5 6 minuti. Questa fase è la colorazione con il May-Grunwald.
- Agitare allo scopo di non formare precipitati. Si getta via il colorante senza sciacquare. Si copre il vetrino con 3 ml di acqua distillata e si aggiungono 3 gocce di soluzione di Giemsa. Si attende 7 minuti.
- Agitare allo scopo di non formare precipitati. Lavaggio con abbondante acqua, meglio sotto il getto di un rubinetto.
- Si asciuga con carta da filtro a temperatura ambiente e, se vogliamo un preparato permanente, si pone nel primo xilolo e si monta in balsamo sintetico. Occorre più di una goccia di balsamo per ricoprire quasi completamente la superficie dello striscio con un vetrino coprioggetto di 24 x 52 mm.

COLORAZIONE DI UNO STRISCIO DI SANGUE IL METODO MAY-GRUNWALD GIEMSA

- Per ogni seduta di colorazione devono essere definite le migliori condizioni.
- La conversione del blu di metilene nei composti azzurri continua a realizzarsi anche nella bottiglia cosicché le condizioni di colorazione possono modificarsi nel tempo.
- Gli azzurri di metile sono dei coloranti basici che impartiscono una colorazione violetta-blue ai componenti acidi della cellula, quali gli acidi nucleici e le proteine.
- L'eosina interagisce con gli elementi cellulari basici, impartendo una colorazione rossastra ai componenti citoplasmatici ed alla Hb

COLORAZIONE DI UNO STRISCIO DI SANGUE IL METODO MAY-GRUNWALD GIEMSA

- I GR hanno una colorazione arancio rosa, mentre i GB hanno nuclei violablu.
- I granuli dei neutrofili sono leggermente basici e si colorano debolmente con il componete azzurrofilo.
- Gli eosinofili sono fortemente basici e si colorano intensamente con l'eosina
- I granuli basofili contengono proteine acide e si colorano in blue-violetto.
- Sul vetrino non ci devono essere precipitati (vetrino non ben pulito).
- Le soluzioni vanno preparate giornalmente

COLOUR RESPONSES OF BLOOD CELLS TO ROMANOWSKY STAINING

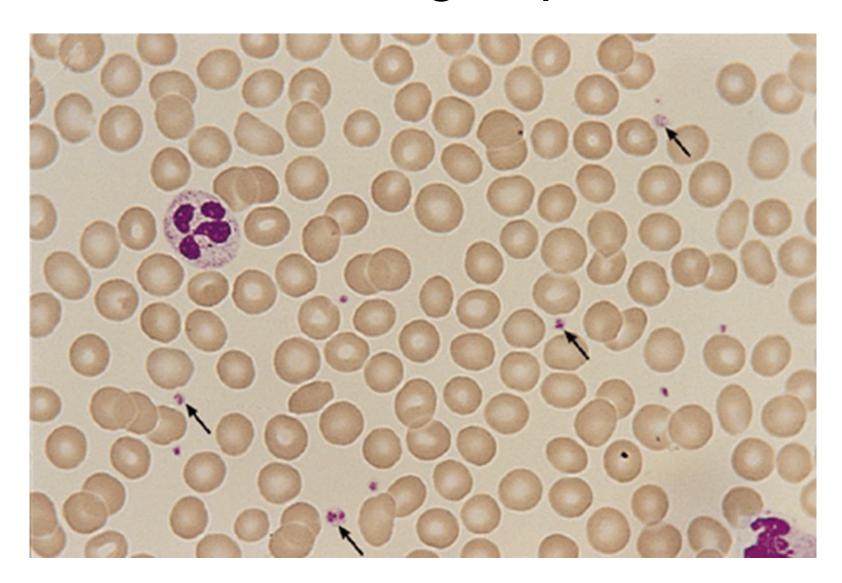
Cellular Component	Colour
Nuclei	D1-
Chromatin Nucleoli	Purple Light blue
Cytoplasm Erythroblast Erythrocyte Reticulocyte Lymphocyte Metamyelocyte Monocyte Myelocyte	Dark blue Dark pink Grey-blue Blue Pink Grey-blue Pink
Neutrophil Promyelocyte Basophil	Pink/orange Blue Blue
Granules Promyelocyte (primary granules) Basophil Eosinophil Neutrophil Toxic granules Platelet	Red or purple Purple-black Red-orange Purple Dark purple Purple
Other Inclusions Auer body Cabot ring Howell–Jolly body Döhle body	Purple Purple Purple Light blue

FACTORS CAUSING VARIATION IN STAINING

Appearances	Causes		
Too blue	Incorrect preparation of stock, eosin concentration too low		
	Stock stain exposed to bright daylight		
	Batch of stain solution overused		
	Impure dyes		
	Staining time too short		
	Staining solution too acidic		
	Film too thick		
T . 1	Inadequate time in buffer solution		
Too pink	Incorrect azure B:eosin Y ratio		
	Impure dyes		
	Buffer pH too low		
Pale staining	Excessive washing in buffer solution Old staining solution		
rate staining	Overused staining solution		
	Incorrect preparation of stock		
	Impure dyes, especially azure A		
	and/or C		
	High ambient temperature		
Neutrophil granules	Insufficient azure B		
not stained			
Neutrophil granules	Excess azure B		
dark blue/black			
(pseudotoxic)			
Other stain anomalies	Various contaminating dyes and metal salts		
Stain deposit on film	Stain solution left in uncovered jar		
	Stain solution not filtered		
Blue background	Inadequate fixation or prolonged storage before fixation		
	Blood collected into heparin as		
7	anticoagulant		
	_		

Barbara J. Bain - Dacie and Lewis Practical Haematology- 12th ed - 2017

Striscio di sangue periferico



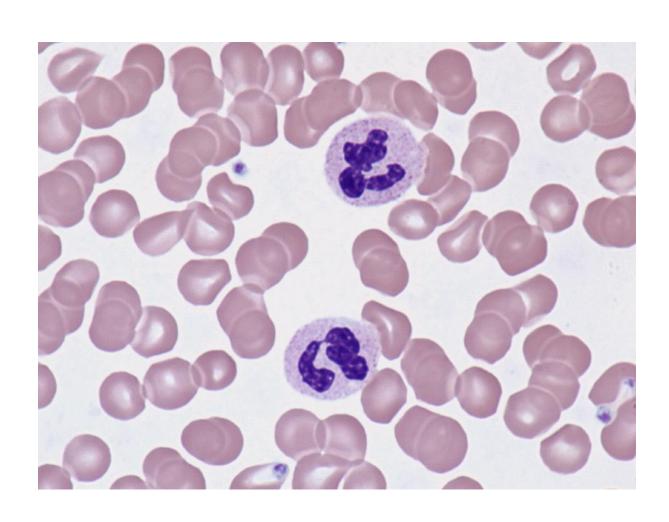
emocromo

Emocromo

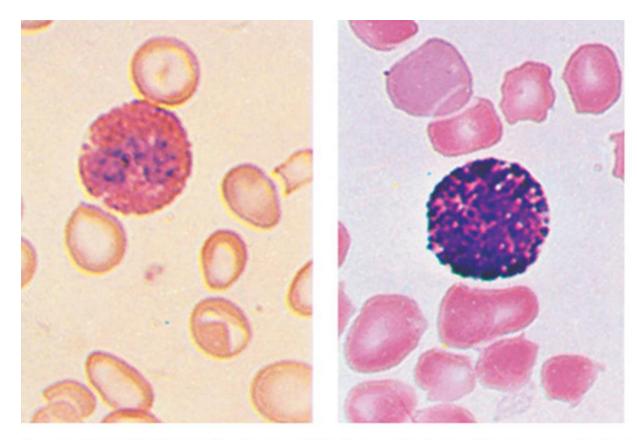
Globuli Bianchi	3.16	$x10^3/\mu l$	5.20 - 12.40
Globuli Rossi	2.97	x10^6/μL	4.20 - 6.10
Emoglobina	9.6	g/dl	12.0 - 17.0
Ematocrito	27.7	%	37.0 - 50.0
MCV	93.4	fl	80.0 - 99.0
MCH	32	pg	27 - 31
MCHC	34.7	g/dl	33.0 - 37.0
Piastrine	19	x10^3/μ1	130 - 400
MPV	8.4	fl	7.2 - 11.1
Neutrofili %	77.2	%	40.0 - 74.0
Linfociti %	9.4	%	19.0 - 48.0
Monociti %	2.7	%	3.4 - 9.0
Eosinofili %	1.3	%	0.0 - 7.0
Basofili %	0.2	%	0.0 - 1.5
LUC %	9.3	%	0.0 - 4.0
Neutrofili	2.44	x10^3/μ1	1.90 - 8.00
Linfociti	0.30	x10^3/μ1	0.90 - 5.20
Monociti	0.08	x10^3/μ1	0.16 - 1.00
Eosinofili	0.04	x10^3/μ1	0.00 - 0.80
Basofili	0.01	x10^3/μ1	0.00 - 0.20
LUC	0.29	x10^3/μl	0.00 - 0.40

- Lo striscio di sangue dovrebbe essere dapprima esaminato a <u>piccolo</u> <u>intermedio ingrandimento</u> per valutare l'adeguatezza della distribuzione cellulare e della colorazione.
- In questo modo si può avere una stima del conteggio dei GB, e si possono ricercare elementi cellulari anomali quali i blasti gli eritroblasti.
- È importante valutare l'intero vetrino per assicurarsi di non perdere alcune popolazioni cellulari che si possono concentrare ai margini.
- L'uso di un maggior e ingrandimento (100x) e di lenti ad immersione con olio consentono di effettuare la formula differenziale.
- È necessaria una valutazione sistematica per caratterizzare tutti i tipi di cellule sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo.

neutrofili

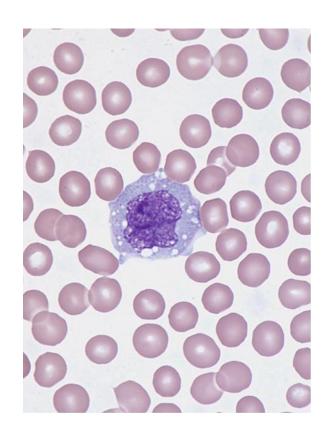


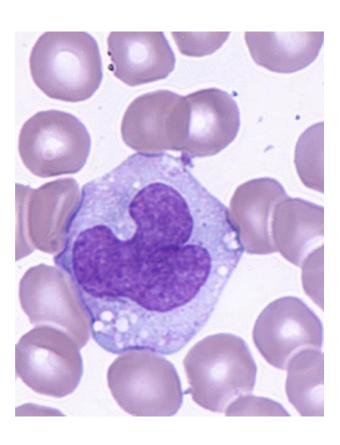
Eosinofilo e basofilo



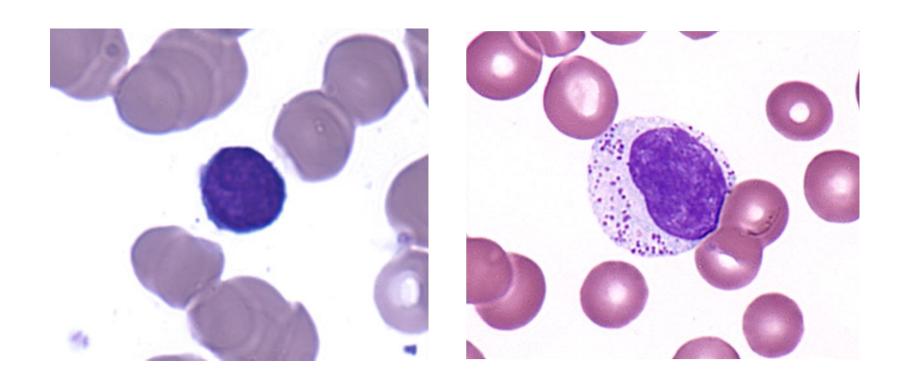
Source: Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition: http://www.accessmedicine.com Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

monociti

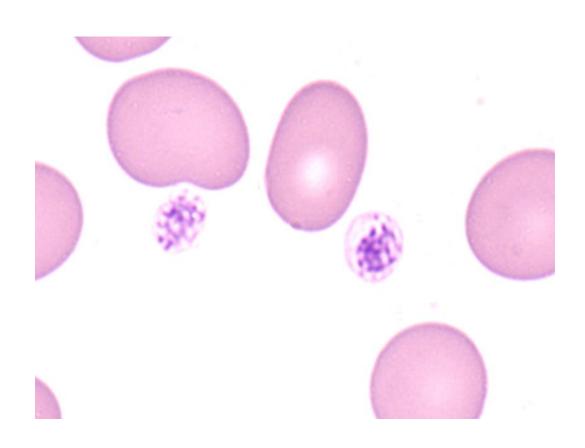




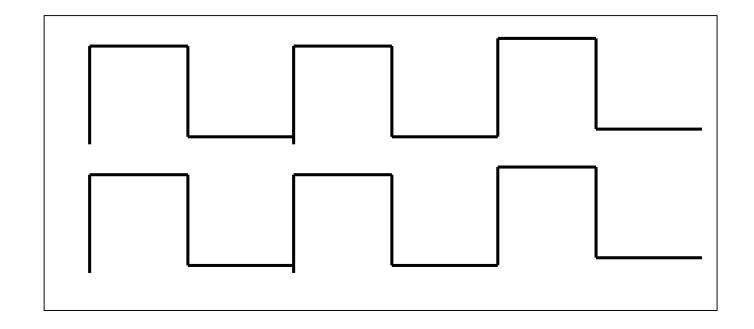
linfociti



piastrine



Lettura striscio



- È difficile su un vetrino valutare le anomali quantitative dei GR
 - Tuttavia i GR devono essere valutati per dimensione, forma, e distribuzione dell'Hb, e presenza di inclusioni nucleari.
 - I GR sono distribuiti in modo non uniforme nel vetrino.
 - Per una valutazione ottimale dei GR è necessario porsi in un'area dove i GR sono vicini ma non sovrapposti.
 - in alcuni strisci, i GR appaiono attaccati tra di loro formando i cosiddetti
 rouleaux. che suggeriscono la presenza di una paraproteina che riveste i
 GR e causa la loro agglutinazione a causa della perdita della normale
 repulsione elettrostatica tra I GR.

- I GR devono essere di forma e dimensione uniforme, con un diametro medio di 7.2-7.9 μm.
- Una variazioni nella dimensione è definita anisocitosi.
 - Cellule >di 9 μm e con un buon contenuto di Hb vengono definite macrociti.
 - I GR più giovani (reticolociti) sono macrocitici ed hanno una colorazione bluastra dell'Hb (policromatofilia) o avere fini inclusioni basofile dovute all'RNA ad ai ribosomi residui
 - I microciti sono GR del diametro inferiore a 6 μm.
- I GR normali sono rotondi

- Variazioni nella forma prendono il nome di poichilocitosi.
 - i GR devono avere un'area pallida centrale con una rima periferica rossaarancio di Hb.
 - L'ipocromia riflette un ridotto contenuto di Hb e dà luogo a ad una rima di hb molto fine e ad un'area pallida centrale maggiore.
 - Una anomala distribuzione dell'Hb può risultare nella formazione di un GR con uno spot centrale di Hb circondato da un'area pallida chiamata Target cell.
 - Gli sferociti ed i macrociti sono privi dell'area centrale pallida a causa del maggiore spessore cellulare.
- I GR possono contenere inclusioni come residui di materiale nucleare, (corpi di Howell-Jolly bodies), residui di mitocondri o siderosomi (corpi di Pappenheimer), o agenti infettivi (parassiti malarici).

GR patologici nello striscio di sangue periferico			
Tipo di GR	descrizione	Modificazione sottostante	Condizioni patologiche associate
Acanthocyte (spur cell)	Irregularly spiculated red cells with projections of varying length and dense center	Altered cell membrane lipids	Abetalipoproteinemia, parenchymal liver disease, postsplenectomy.
Basophilic stippling	Punctuate basophilic inclusions	Precipitated ribosomes (RNA)	Coarse stippling: lead intoxication, thalassemia. Fine stippling: a variety of anemias.
Bite cell (degmactyte)	Smooth semicircle taken from one edge	Heinz body pitting by spleen	Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, drug-induced oxidant hemolysis.
Burr cell (echinocyte) or crenated red cell	Red cells with short, evenly spaced spicules and preserved central pallor	May be associated with altered membrane lipids	Usually artifactual. Seen in uremia, bleeding ulcers, gastric carcinoma.
Cabot's rings	Circular, blue, threadlike inclusion with dots	Nuclear remnant	Postsplenectomy, hemolytic anemia, megaloblastic anemia.
Ovalocyte (elliptocyte)	Elliptically shaped cell	Abnormal cytoskeletal proteins	Hereditary elliptocytosis.
Howell-Jolly bodies	Small, discrete, basophilic, dense inclusions; usually single	Nuclear remnant (DNA)	Postsplenectomy, hemolytic anemia, megaloblastic anemia.
Hypochromic red cell	Prominent central pallor	Diminished hemoglobin synthesis	Iron deficiency anemia, thalassemia, sideroblastic anemia.
Adapted from k	Kjeldsberg C, ed. Practical diagnos	sis of hematologic disorders, 3rd ed	. Chicago: ASCP Press, 2000.

GR patologici nello striscio di sangue periferico

Tipo di GR	descrizione	Modificazione sottostante	Condizioni patologiche associate
Leptocyte	Flat, waferlike, thin, hypochromic cell	_	Obstructive liver disease, thalassemia.
Macrocyte	Red cells larger than normal (>8.5 µm), well-filled with hemoglobin	Young red cells, abnormal red cell maturation	Increased erythropoiesis. Oval macrocytes in megaloblastic anemia. Round macrocytes in liver disease.
Microcyte	Red cells smaller than normal (<7.0 µm)	_	Hypochromic red cell (see Chapter 27)
Pappenheimer bodies	Small, dense, basophilic granules	Iron-containing siderosome or mitochondrial remnant	Sideroblastic anemia, postsplenectomy.
Polychromatop hilia	Grayish or blue hue often seen in macrocytes	Ribosomal material	Reticulocytosis, premature marrow release of red cells.
Rouleaux	Red cell aggregates resembling stack of coins	Red cell clumping by circulating paraprotein	Paraproteinemia.
Schistocyte (helmet cell)	Distorted, fragmented cell; two or three pointed ends	Mechanical distortion in microvasculature by fibrin strands, disruption by prosthetic heart valve	Microangiopathic hemolytic anemia (disseminated intravascular coagulation, thrombotic thrombocytopenic purpura), prosthetic heart valves, severe burns).
Sickle cell (drepanocyte)	Bipolar, spiculated forms, sickle- shaped, pointed at both ends	Molecular aggregation of HbS	Sickle cell disorders, not including S trait.
Spherocyte	Spherical cell with dense appearance and absent central pallor, usually decreased diameter	Decreased membrane redundancy	Hereditary spherocytosis, immunohemolytic anemia.
Stomatocyte	Mouth or cuplike deformity	Membrane defect with abnormal cation permeability	Hereditary stomatocytosis, immunohemolytic anemia.
Target cell (codocyte)	Targetlike appearance, often hypochromic	Increased redundancy of cell membrane	Liver disease, postsplenectomy, thalassemia, hemoglobin disease.
Teardrop cell (dacryocyte)	Distorted, drop-shaped cell	_	Myelofibrosis, myelophthisic anemia.



Sysmex DI-60

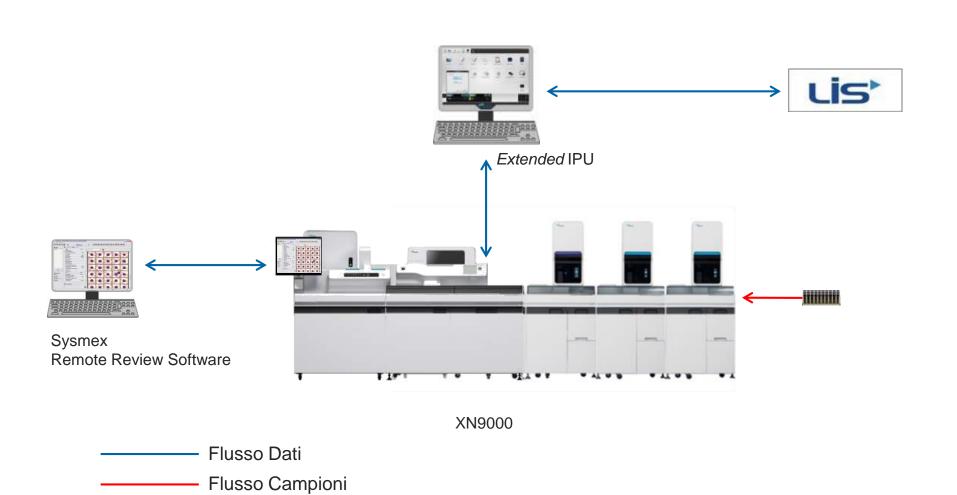


Digital Imaging

 DI-60 digitalizza le immagini dello striscio periferico attraverso un processo automatizzato tramite il quale le cellule vengono preclassificate, archiviate ed inviate per conferma e/o revisione al personale laureato.

- Questa tecnologia consente di migliorare notevolmente l'efficienza e la standardizzazione della revisione microscopica.
- DI-60 è pensato per ottimizzare il flusso di lavoro in laboratorio, in particolare lo "smear workflow" (gestione dello striscio)

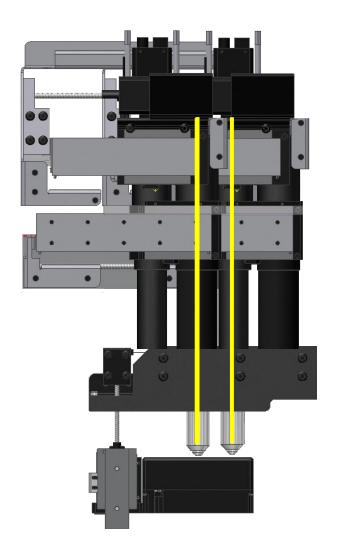
DI-60 nel workflow del laboratorio



Sysmex DI-60



Principi di lettura cellulare



Lente 10 x, ingrandimento 10 x

- panoramica generale
- identificazione cellule nucleate

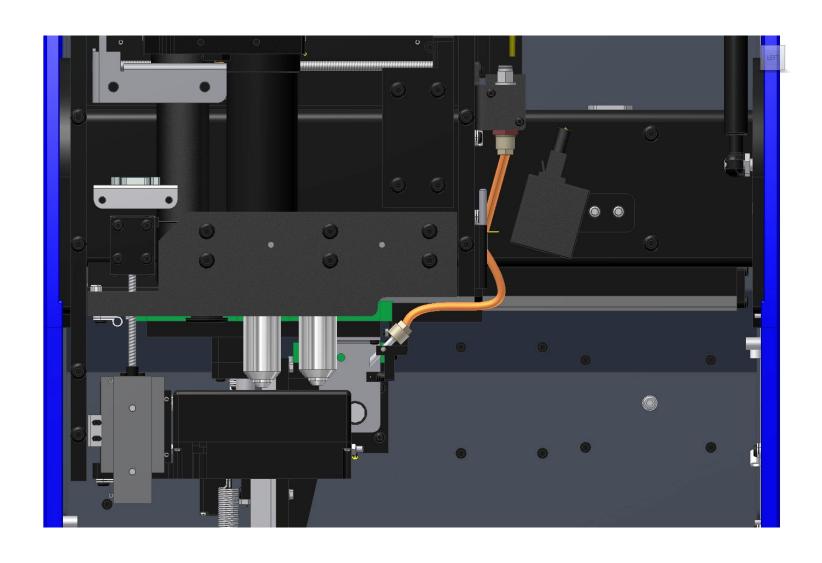
Lente 100 x , ingrandimento 50 x

- panoramica di ricerca RBC
- caratterizzazione morfologica RBC

Lente 100 x, ingrandimento 100 x

 Pre-classificazione delle cellule nucleate in 18 classi cellulari

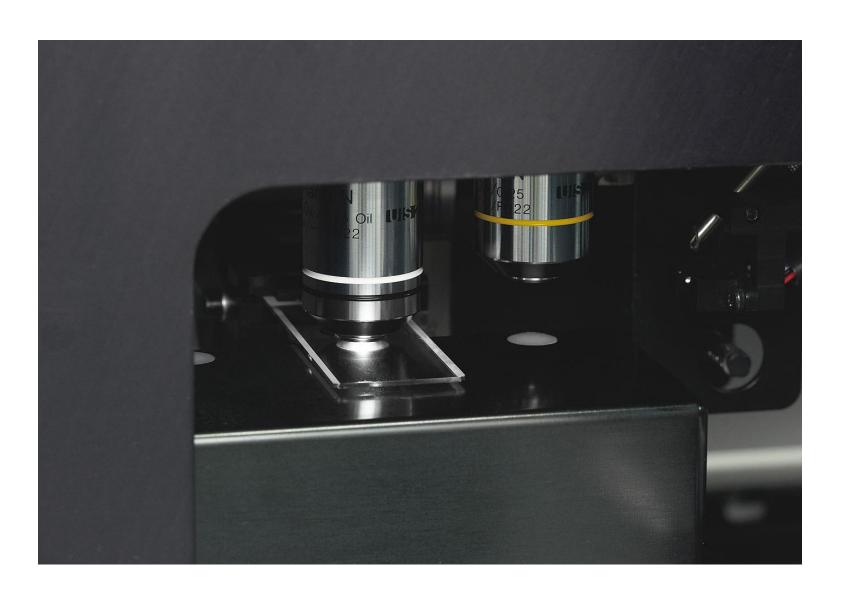
Dispositivo dispensazione olio



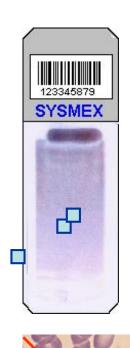
Sysmex DI-60 lente 10 x



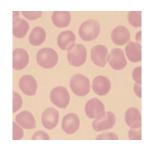
Sysmex DI-60 lente 100 x

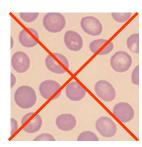


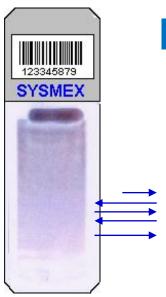
Identificazione della porzione ottimale di lettura



- 1. DI-60 inizia la fase di scansione partendo da un punto prefissato del vetrino
- 2. L'obiettivo10x si muove attraverso la parte più sottile dello striscio catturando immagini di continuo
- 3. Sulla base dei contorni e delle dimensioni dei RBC, vengono determinati i punti di inizio e fine della zona di scansione per la lettura WBC

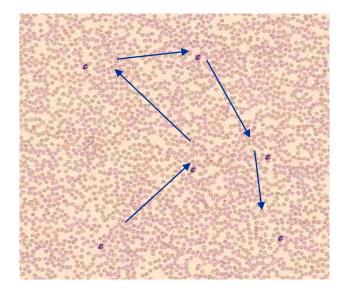






Identificazione cellulare per la preclassificazione

 Lo striscio viene scansionata (10x) avanzando a "serpentina" (zig zag) e memorizzando le coordinate. La direzione va dalla zona a spessore maggiore a quella più sottile.

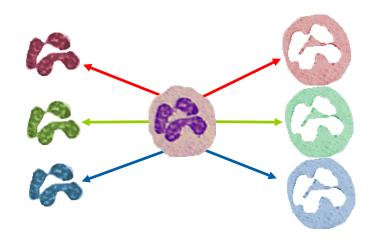


One 10x Image

- Si passa quindi ad una scansione a 100x utilizzando le coordinate di lettura determinate dal passaggio precedente per catturare le immagini
- Quando viene raggiunto il numero di cellule prefissate per la classificazione, la scansione si arresta

Principi di analisi Estrapolazione delle caratteristiche cellulari

- I segnali rosso, verde e blu sono generati dal colore delle cellule
- Questi segnali vengono utilizzati come parametri per determinare le caratteristiche di nucleo e citoplasma
- Vengono determinati oltre 300 parametri di caratterizzazione per ciascuna cellula

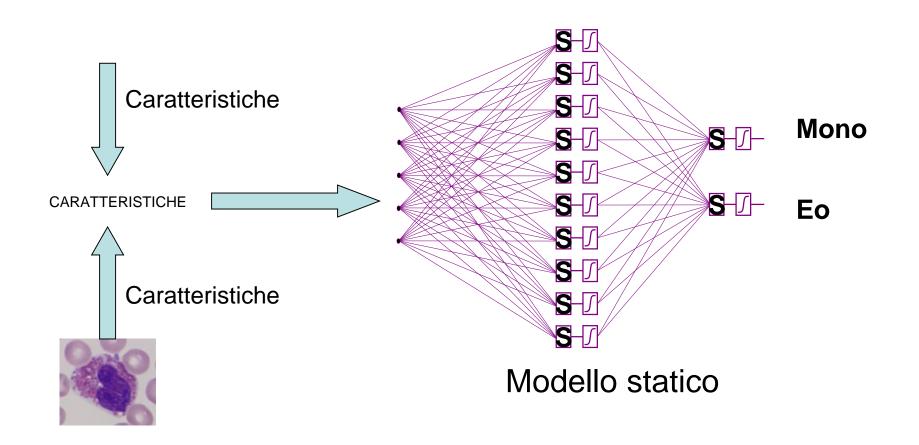


Rete Neurale Artificiale

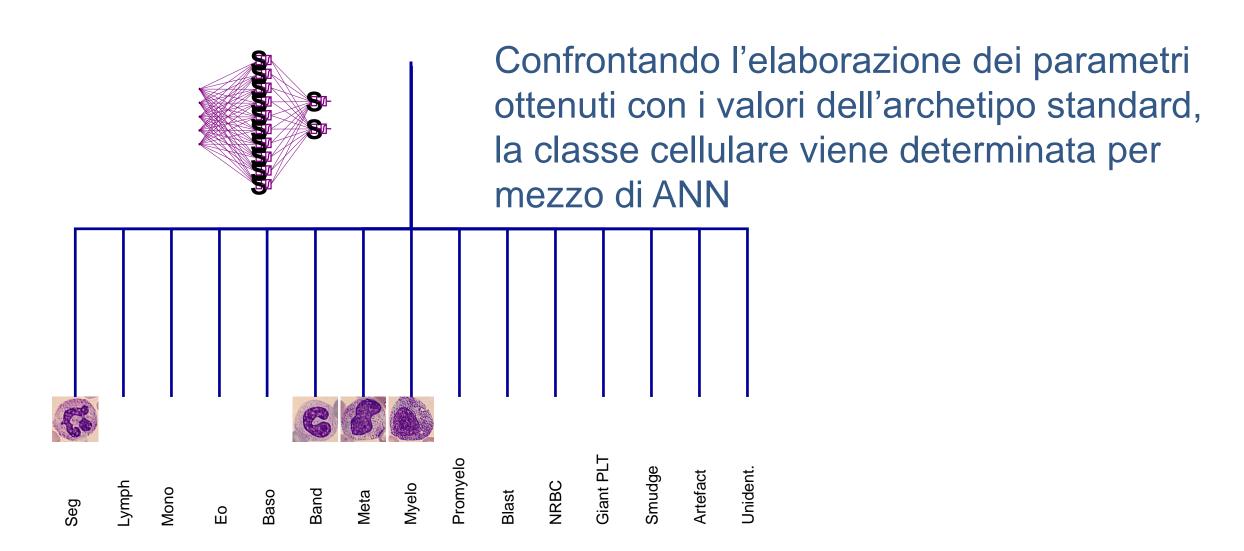
 DI-60 usa la Rete Neurale Artificiale (ANN) per effettuare la preclassificazione

- La ANNs viene "istruita" attraverso migliaia di immagini cellulari ciascuna classificata da un gruppo di esperti
- Oltre 300 caratteristiche (es: forma, colore, grandezza, rapporto nucleo/citoplasma, ecc.) vengono utilizzate ed identificate per ogni cellula per determinarne il tipo ed incasellarla in una particolare tipologia

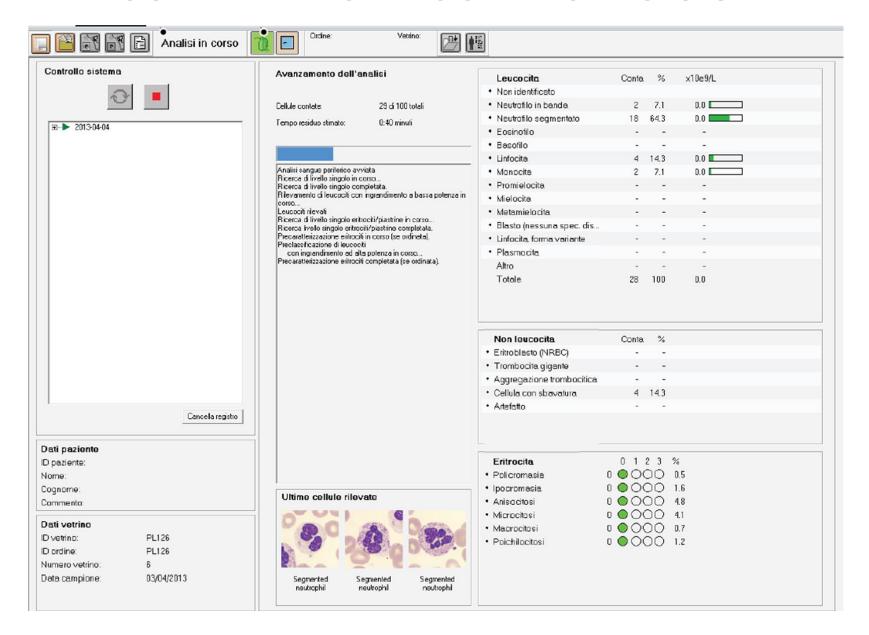
Funzione di ANN (Artificial Neural Network - Rete Neurale Artificiale)



Principi di analisi Riconoscimento pattern cellulare



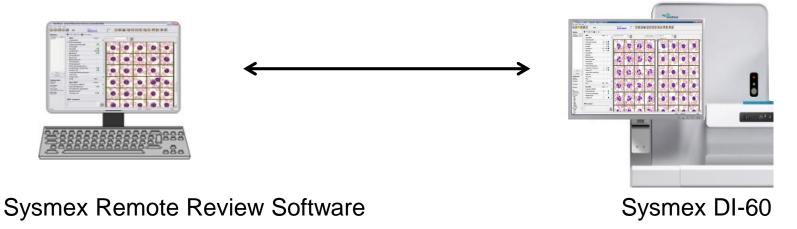
VISUALIZZAZIONE CONTROLLO SISTEMA



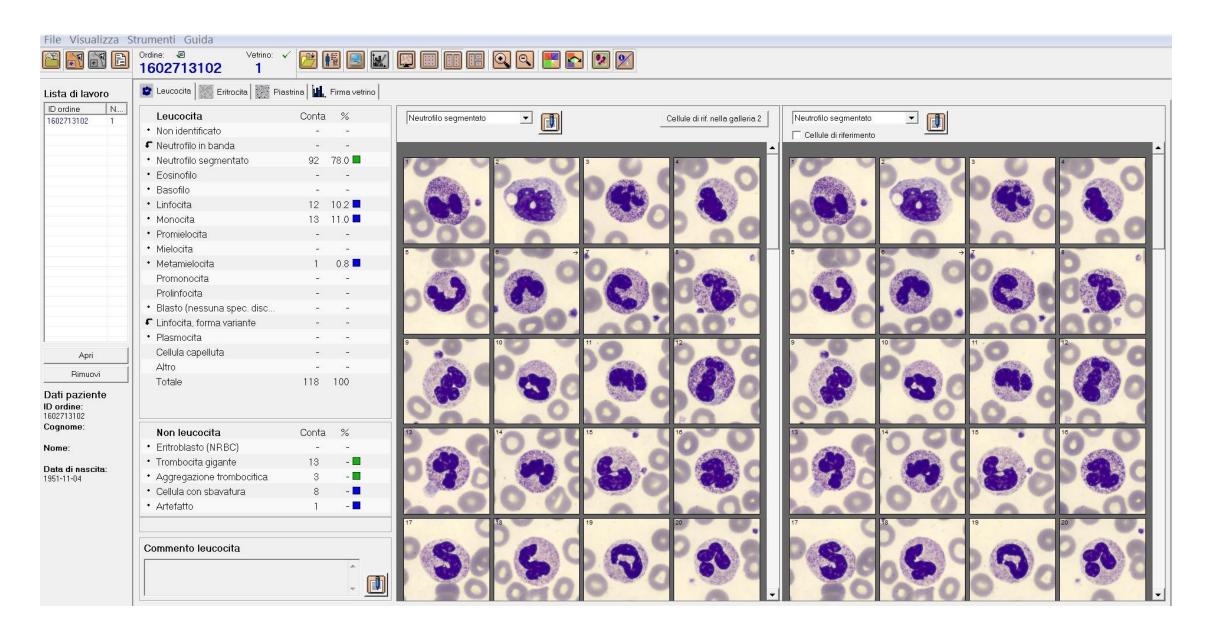
Sysmex Remote Review Software

Fornisce accesso diretto al database di Sysmex DI-60

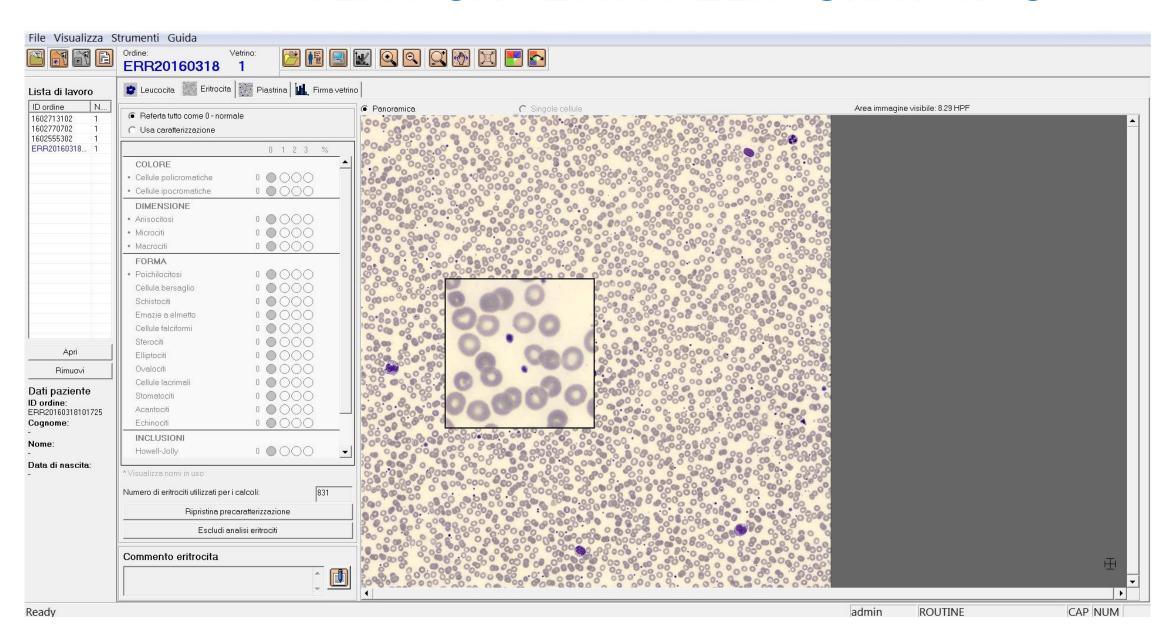
- Permette di rivedere dati ed immagini
- Permette di riclassificare (o confermare) le classi cellulari e validare i risultati



VERIFICA VETRINI ELABORATI WBC



VERIFICA VETRINI ELABORATI RBC



VERIFICA VETRINI ELABORATI PLT

