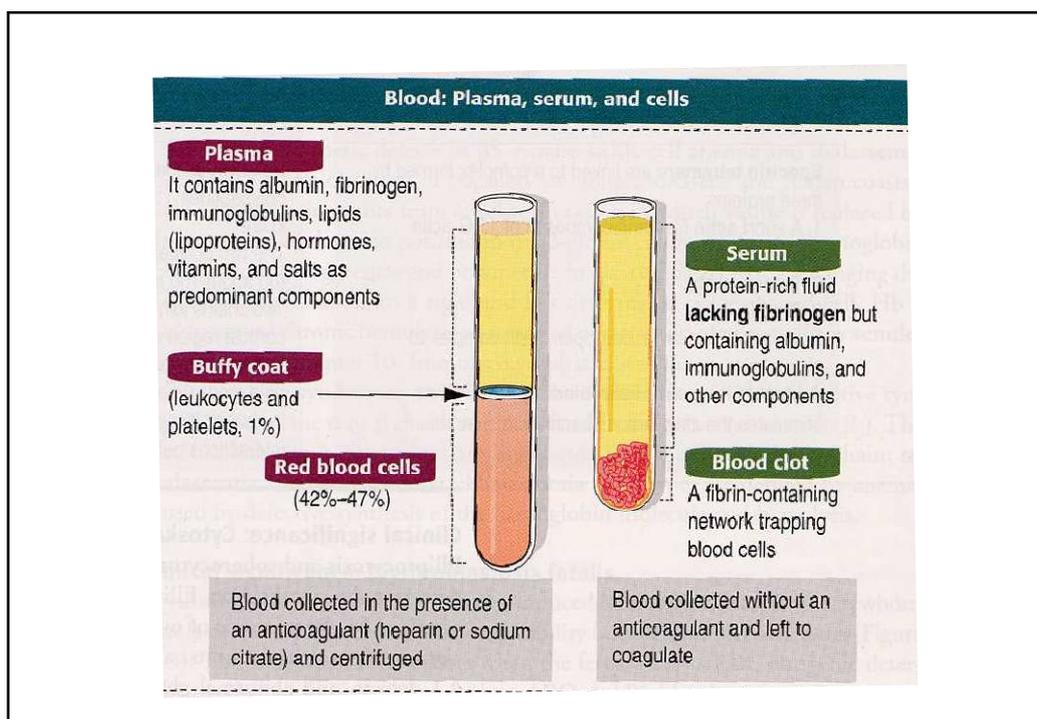


# L'Esame Emocromocitometrico

## Introduzione

- Il **sangue** è un tessuto connettivale di consistenza liquida di colore rosso caratteristico
- Il **sangue** è formato da **elementi figurati** (eritrociti, leucociti e piastrine) e da una sostanza intercellulare liquida di colore giallo pallido, denominata **plasma**
- Il **plasma** è la componente fluida del sangue, cioè il sangue deprivato degli elementi figurati, ma che contiene i fattori della coagulazione
- Il **siero** identifica quel liquido normalmente chiaro che si separa dal sangue quando questo viene lasciato coagulare. Quindi il **siero** è la componente liquida del sangue che rimane dopo la rimozione degli elementi figurati e del coagulo di fibrina
- Il sangue può essere prelevato dalle arterie, dalle vene o dai capillari. Il **sangue venoso** (o il sangue capillare) è di scelta per le indagini chimico-cliniche di routine. Il **sangue arterioso** è standard per lo studio degli equilibri acido-base e dei gas del sangue.



## L'esame emocromocitometrico

- La valutazione ematologica completa o esame emocromocitometrico di un campione di sangue periferico può fornire importanti indicazioni cliniche e diagnostiche delle tre principali componenti: eritrociti o globuli rossi, leucociti o globuli bianchi, e le piastrine
- L'analisi ematologica comprende 4 fasi principali
  - ÷ Raccolta e preparazione del campione di sangue periferico
  - ÷ Determinazione della conta ematica completa
  - ÷ Definizione della conta differenziale dei leucociti
  - ÷ Striscio su vetrino per potenziali anomalie morfologiche
- Il campione di sangue venoso periferico viene raccolto in una provetta con **anticoagulante EDTA** (*trisodio citrato* o *eparina*)
- **Esame di routine** e **Esame di follow-up**: popolazione generale o selezionata

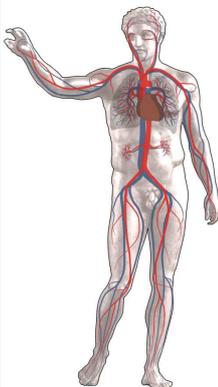
## Il sangue

Sangue intero reso incoagulabile con EDTA.  
Eeguire l'esame il più rapidamente possibile o almeno:

- entro 1 ora  $\implies$  striscio di sangue  
(poi conservato a t° ambiente e colorato entro alcuni giorni).  
Le cellule che più risentono della conservazione sono i leucociti che possono degenerare.
- entro 6 ore  $\implies$  VES  
conteggio piastrine
- entro 24 ore se il sangue è conservato a 4°C  
conteggi eritrociti e leucociti  
 $\implies$  ematocrito  
emoglobina

## Il sangue

- Il sangue è un tessuto formato da una sospensione di cellule (~45%) in un liquido chiamato plasma (~55%)
- costituisce circa 1/12 del peso corporeo, circa quindi 5-6 litri
- Il sangue svolge numerose ed importanti funzioni:



- ÷ **Respiratoria:** per mezzo dell'emoglobina contenuta negli eritrociti, porta l'ossigeno ai vari tessuti e ne preleva l'anidride carbonica (CO<sub>2</sub>)
- ÷ **Nutritiva ed escretrice:** trasporta sostanze nutritive (amminoacidi, zuccheri, sali minerali) e raccoglie quelle escrete dai vari apparati che verranno eliminate attraverso il filtro renale od elaborate dal fegato
- ÷ **Regolazione:** Il sangue trasporta inoltre ormoni, enzimi e vitamine
- ÷ **Difesa:** Presiede anche alla difesa dell'organismo attraverso l'azione svolta dai globuli bianchi
- ÷ **Termoregolatrice**
- ÷ **Mantenimento del tasso idrico**
- ÷ **Regolazione dell'emostasi**
- ÷ **Mantenimento della pressione osmotica (minerali) e oncologica (proteine)**

## Il plasma

- Il plasma è un fluido leggermente alcalino (**pH 7,4**), con caratteristico colore giallino, costituito per il **90%** da **acqua** e per il **10%** da **sostanza secca**
- La **sostanza secca** è formata al **90%** da **sostanze organiche**
  - ÷ glucidi (glucosio)
  - ÷ lipidi (colesterolo, trigliceridi, fosfolipidi, lecitina, grassi), proteine (globuline, albumine, fibrinogeno)
  - ÷ glicoproteine
  - ÷ ormoni (gonadotropine, eritropoietina, trombopoietina)
  - ÷ amminoacidi
  - ÷ vitamine
- mentre il **10%** è costituita da **minerali**, dissolti sotto forma ionica, cioè dissociati in ioni positivi e negativi
- Il plasma contribuisce al mantenimento del volume del sangue (**volemia**) – in diverse condizioni fisiologiche (invecchiamento, gravidanza, posizione del corpo, ecc.) o patologiche (ustioni, epatopatie, nefropatie, malattie del metabolismo, ecc.) si possono riscontrare variazioni del volume plasmatico:
  - *Normovolemia*
  - *Ipovolemia o oligoemia*
  - *Pletora o ipervolemia*



## Conta Ematica Completa

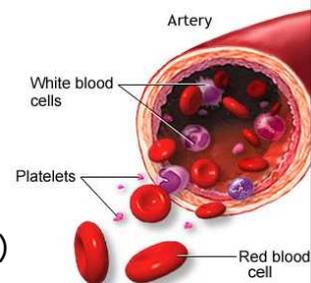
- È il cardine di ogni esame emocromocitometrico e fornisce indicazioni sullo **stato funzionale del midollo osseo** (e degli altri organi ematopoietici, quali milza e tessuti linfatici dei vari animali) – determina le caratteristiche:

- **ERITROCITI**

- ÷ Numero totale: RBC
- ÷ Indici di Wintrobe: MCV, MCHC, MCH
- ÷ Ampiezza di distribuzione: RDW

- **LEUCOCITI** (conta differenziale)

- **PIASTRINE** (conta e volume piastrinico medio MPV)



Alterazioni nel numero:

- *-penia*: deficienza del componente cellulare ematico (deficit di produzione o aumentata distruzione)
- *-citosi*: aumento del componente cellulare ematico (risposta fisiologica ad uno stimolo periferico o proliferazione incontrollata)

## Gli elementi corpuscolati del sangue



## Valori di Riferimento di Alcuni Parametri Ematici

- Ematocrito      **M:** 39 - 49 %  
                      **F:** 35 - 45 %
- Eritrociti      **M:**  $4.5 - 5.9 \times 10^6 / \mu\text{L}$   
                      **F:**  $4.5 - 5.1 \times 10^6 / \mu\text{L}$
- Reticolociti      0.50 - 1.50 %
- Leucociti       $4.5 - 11.0 \times 10^3 / \mu\text{L}$
- Piastrine       $150 - 350 \times 10^3 / \mu\text{L}$
- Emoglobina      **M:** 14.0 - 17.5 g/dl  
                      **F:** 12.0 - 15.5 g/dl

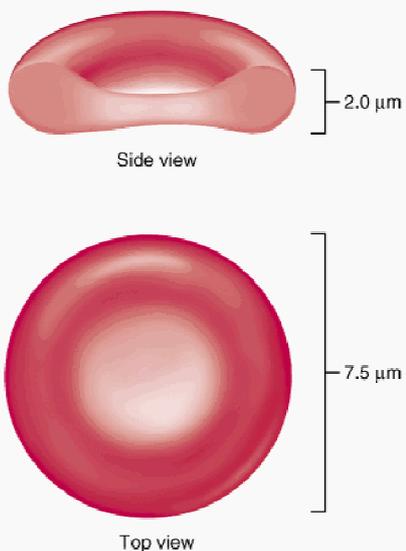
## Valori di Riferimento di Alcuni Parametri Ematici

Età	emoglobina g/dl		ematocrito %		emazie 10 <sup>12</sup> /l		MCV fl		MCH pg		MCHC g/dl	
	media	-2 DS	media	-2 DS	media	-2 DS	media	-2 DS	media	-2 DS	media	-2 DS
Nascita (cordone)	16,5	13,5	51	42	4,7	3,9	108	98	34	31	33	30
1-3 giorni (sangue capillare)	18,5	14,5	56	45	5,3	4,0	108	95	34	31	33	29
1 settimana	17,5	13,5	54	42	5,1	3,9	107	88	34	28	33	28
2 settimana	16,5	12,5	51	39	4,9	3,6	105	86	34	28	33	28
1 mese	14	10	43	31	4,2	3,0	104	85	34	28	33	29
2 mese	11,5	9	35	28	3,8	2,7	96	77	30	26	33	29
3-6 mesi	11,5	9,5	35	29	3,8	3,1	91	74	30	25	33	30
6 mesi-2 anni	12	10,5	36	33	4,5	3,7	78	70	27	23	33	30
2-6 anni	12,5	11,5	37	34	4,6	3,9	81	75	27	24	34	31
6-12 anni	13,5	11,5	40	35	4,6	4	86	77	29	25	34	31
12-18 anni												
femmine	14	12	41	36	4,6	4,1	90	78	30	25	34	31
maschi	14,5	13	43	37	4,9	4,5	88	78	30	25	34	31
18-49 anni												
femmine	14	12	41	36	4,6	4,0	90	80	30	26	34	31
maschi	15,5	13,5	47	41	5,2	5,2	90	80	30	26	34	31

## Valori di Riferimento di Alcuni Parametri Ematici

Età	Leucociti totali (x10 <sup>3</sup> /mmc)							
	neutrofilii		linfociti		monociti		eosinofili	
	media	range	media	%	media	%	media	%
nascita	18,1	9-30	11	61	5,5	31	6	2
24 ore	18,9	9,4-34	11,5	61	5,8	31	6	2
1 settimana	12,2	5-21	5,5	45	5	41	9	4
2 settimane	11,4	5-20	4,5	40	5,5	48	9	3
1 mese	10,8	5-19,5	3,8	35	6	56	7	3
6 mesi	11,9	6-17,5	3,8	32	7,3	61	5	3
1 anno	11,4	6-17,5	3,5	31	7	61	5	3
2 anni	10,6	6-17	3,5	33	6,3	59	5	3
4 anni	9,1	5,5-15,5	3,8	42	4,5	50	5	3
6 anni	8,5	5-14,5	4,3	51	3,5	42	5	3
10 anni	8,1	4,5-13,5	4,4	54	3,1	38	4	2
16 anni	7,8	4,5-13	4,4	57	2,8	35	5	3

## Gli Eritrociti o Globuli Rossi



- La grande maggioranza degli elementi figurati è rappresentata dagli eritrociti
- Questi sono cellule prive di nucleo ed organelli
- Hanno una superficie biconcava a forma di ciambella con diametro di 7 micron
- Non sono dotati di movimento ameboide ma sono provvisti di una notevole elasticità.
- All'interno dell'eritrocita si trova l'emoglobina, una cromoproteina tetramerica che ha il compito di trasportare  $\text{O}_2$  ai tessuti periferici e rimuovere  $\text{CO}_2$  dagli stessi
- L'energia per tale processo è ricavata dalla *glicolisi anaerobia* perché le emazie sono sprovviste di mitocondri

## La membrana dell'eritrocita

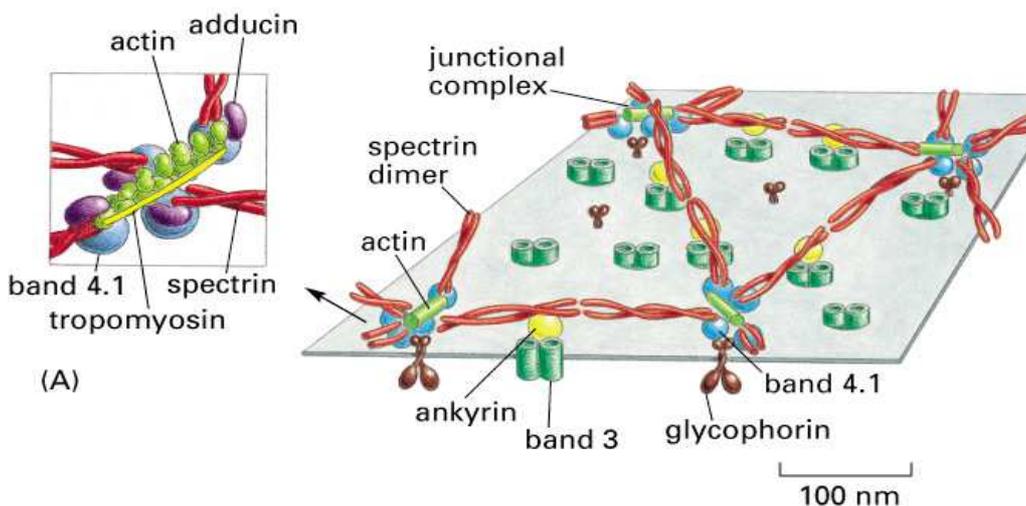
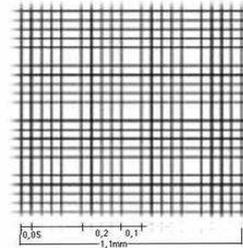
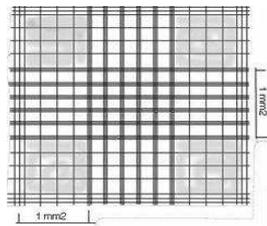


Figure 10-31 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

## Le camera contaglobuli

- Dispositivo per il conteggio visivo delle cellule presenti in un campione. Consiste in un vetrino portaoggetti fornito di una o due depressioni sulla superficie superiore, nel cui fondo è incisa una minutissima quadrettatura. La sovrapposizione del vetrino coprioggetti viene a delimitare una o due minuscole camere a volume noto.
- L'osservazione al microscopio ottico di una sospensione di cellule (per esempio sangue opportunamente diluito) contenuta entro la camera permette di determinare la concentrazione delle cellule, generalmente espressa come numero di elementi per  $\text{mm}^3$ . La camera contaglobuli viene utilizzata soprattutto per la conta di eritrociti, leucociti e piastrine nel sangue. I tipi di camere contaglobuli più comuni sono la camera di Bürker e la camera di Thoma-Zeiss



## Citofluorimetria: definizione



**Tecnica multiparametrica che misura le caratteristiche fisiche e/o chimiche di cellule in sospensione all'interno di un fluido di trasporto**

**Tre componenti:**

- 1. Fluida**
- 2. Ottica**
- 3. Elettronica**



## Citofluorimetria: principi base

Nel citofluorimetro, singole cellule passano allineate attraverso un sistema di rilevazione ottico/elettronico.

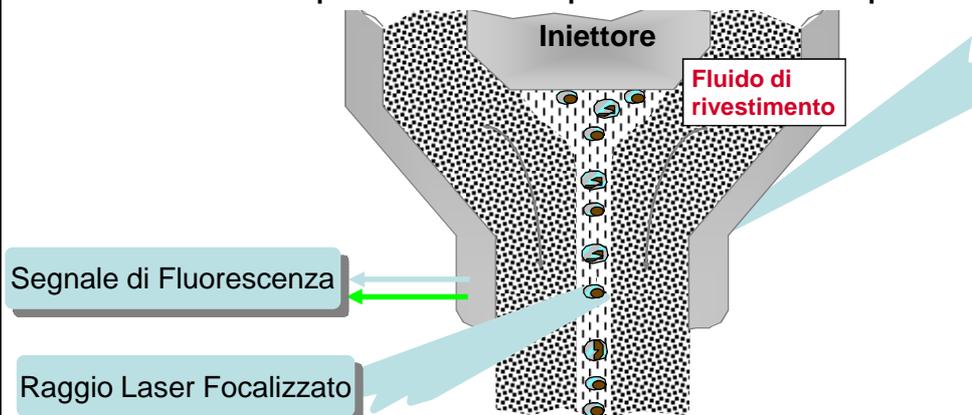
Parametri misurati

scatter di luce

fluorescenza

## Camera di flusso (componente fluida)

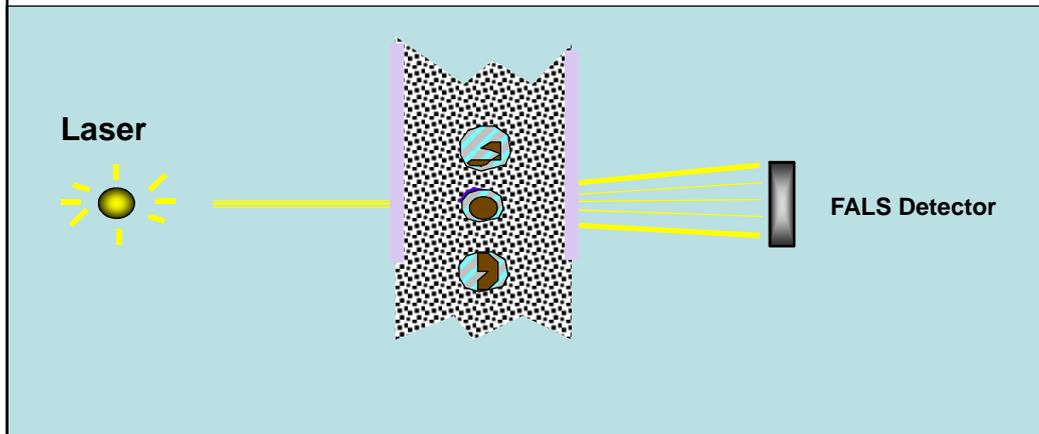
All'interno della camera di flusso, le particelle sono in fila grazie alla differenza di pressione tra il campione ed il fluido di trasporto



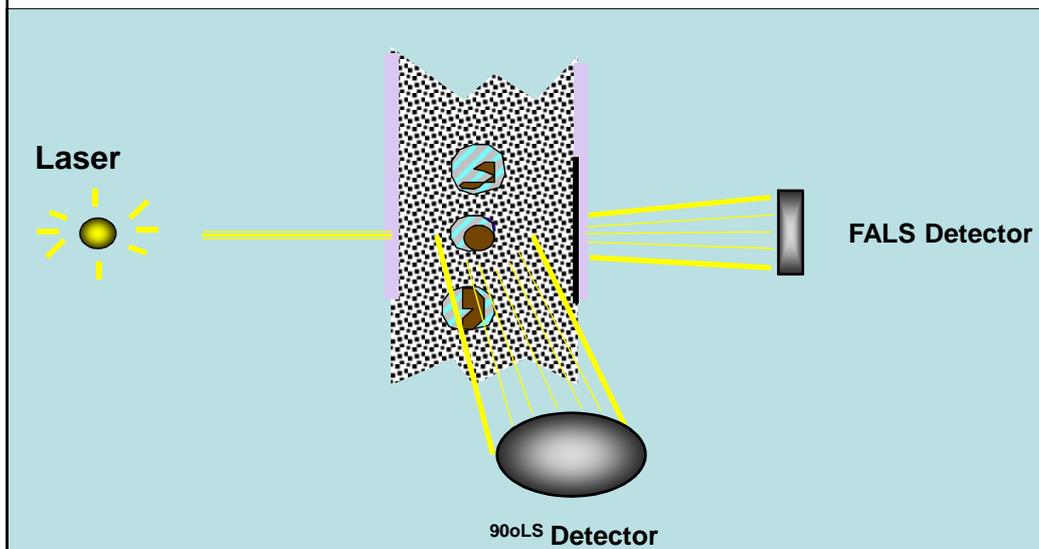
Il raggio laser, di forma ellittica, è focalizzato in modo da colpire le cellule  
Al centro del canale di trasporto=fluido di trasporto

Quando viene colpita dal fascio di luce emesso dal laser, la cellula emette segnali di luce diffusa in base alle proprie caratteristiche fisiche e morfologiche, per fenomeni di rifrazione, riflessione, e diffrazione.

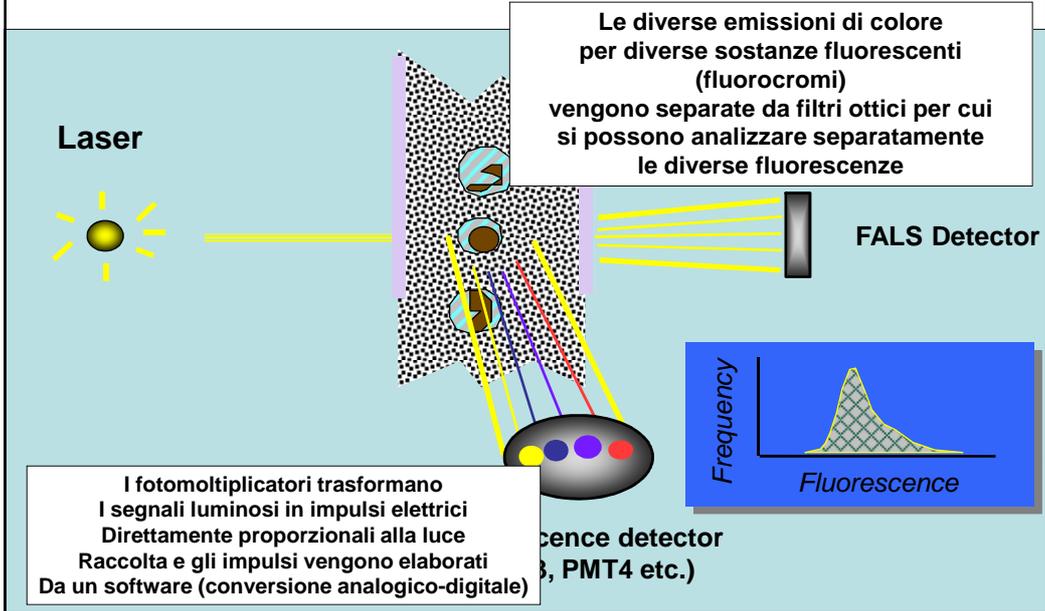
**Forward scatter** = indicatore relativo delle dimensioni cellulari



**Side (90°) scatter** = cambia in relazione a parametri di morfologia cellulare, come la granulosità del citoplasma, il rapporto nucleo/citoplasma e la rugosità di superficie.

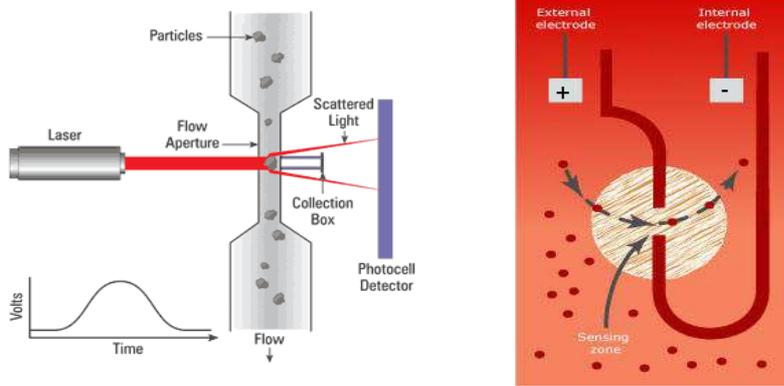


## Misura della fluorescenza



## Conta Ematica Completa

- La conta totale degli eritrociti avviene per metodi automatizzati di impedenza elettrica (le cellule attraversano un'apertura attraverso cui passa la corrente: viene misurata la variazione nella resistenza elettrica che è proporzionale alla dimensione cellulare –principio di Coulter) o per metodi di diffusione laser (tubi fotomoltiplicatori che individuano cambiamenti nella diffusione della luce da un flusso di cellule)

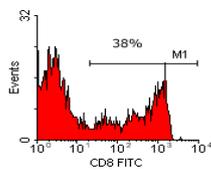


# Citofluorimetria: analisi e output dei dati

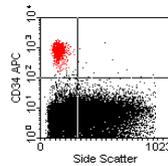
I segnali luminosi, trasformati in impulsi elettrici, vengono processati da un sistema di conversione analogico-digitale



Plot degli eventi in scala grafica



**Istogramma one-parameter**



**Dot-plots a due dimensioni**

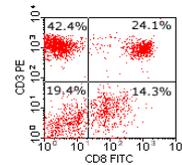
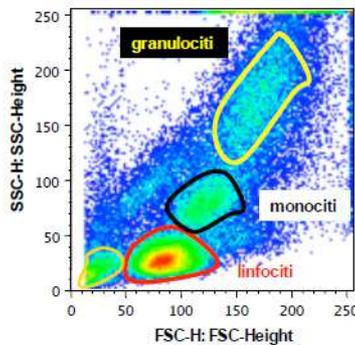
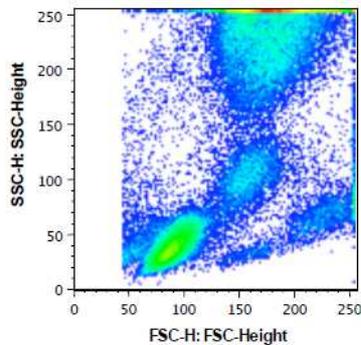


Diagramma bidimensionale ottenuto dalla combinazione del forward (dimensioni) e del side (granulosita') scatter. Permette di discriminare tra diverse popolazioni cellulari basandosi sulle loro caratteristiche fisiche.

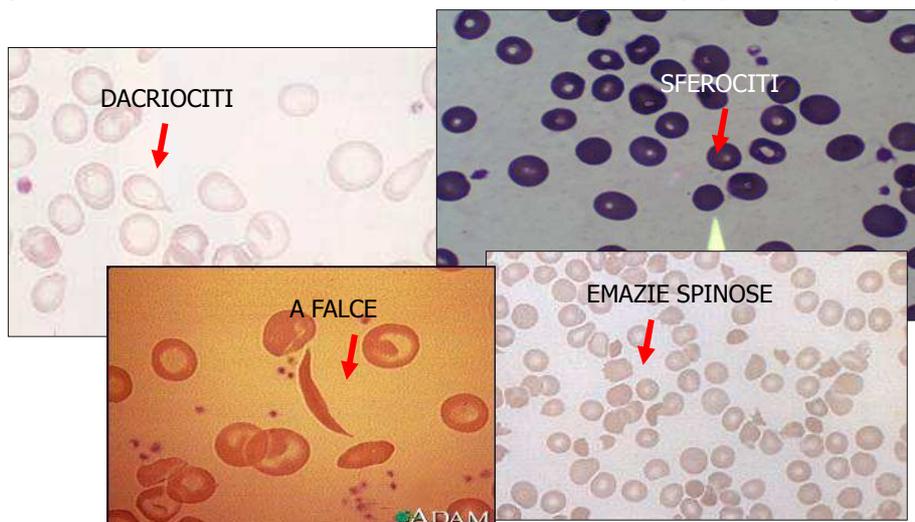


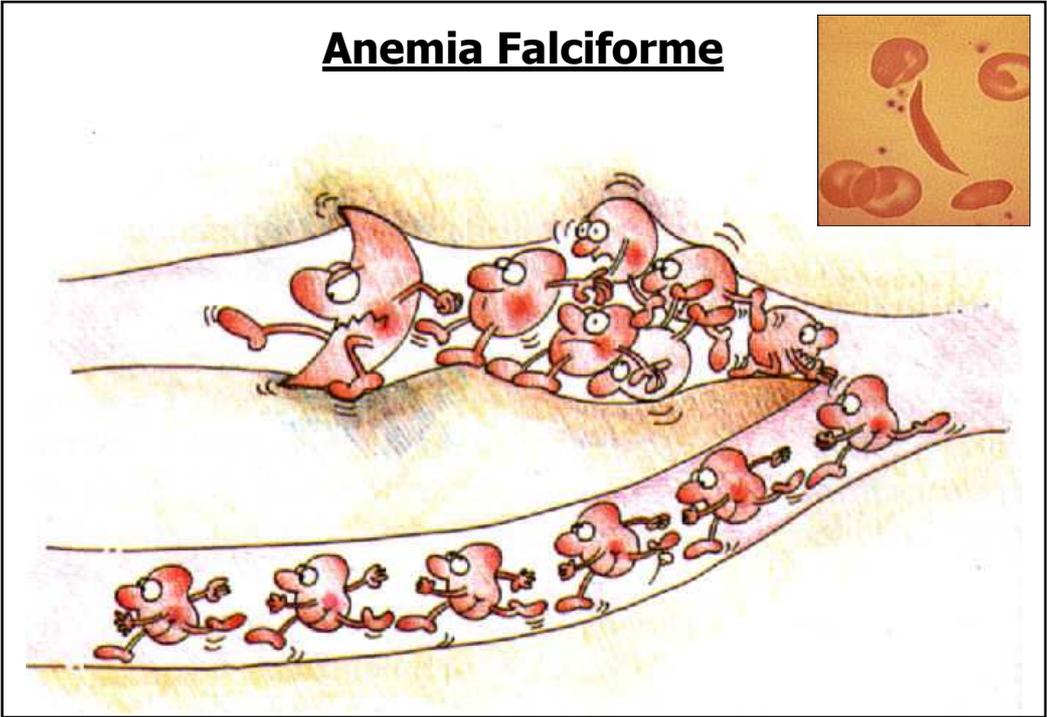
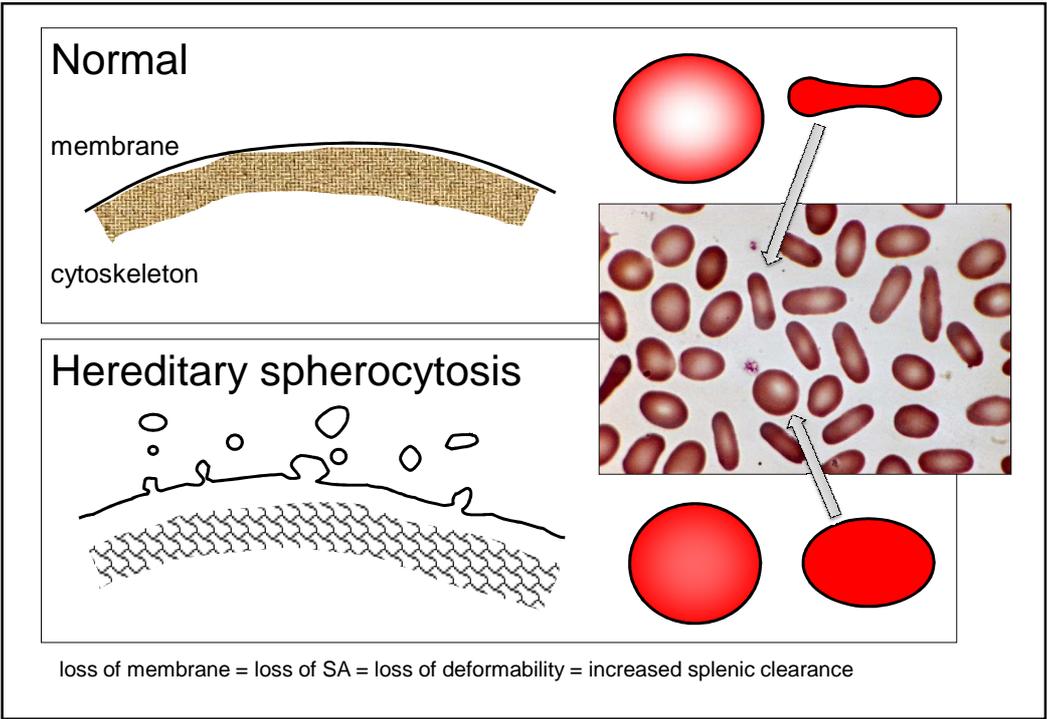
## Indici eritrocitari

- **Volume Corpuscolare Medio** – VCM o MCV ♀ 80.8-100/♂ 80.5-99.7 fl
  - È importante nel classificare le anemie come: normocitiche, microcitiche, macrocitiche
  - Viene calcolato sulla distribuzione dell'istogramma di distribuzione degli eritrociti
- 
- **Ampiezza di distribuzione** – RDW ♀/♂ <15%
  - Fornisce informazioni sulla variazione delle dimensioni eritrocitarie, o *anisocitosi*
  - Viene calcolato sulla distribuzione dell'istogramma di distribuzione degli eritrociti e rappresenta il coefficiente di variazione (deviazione standard)

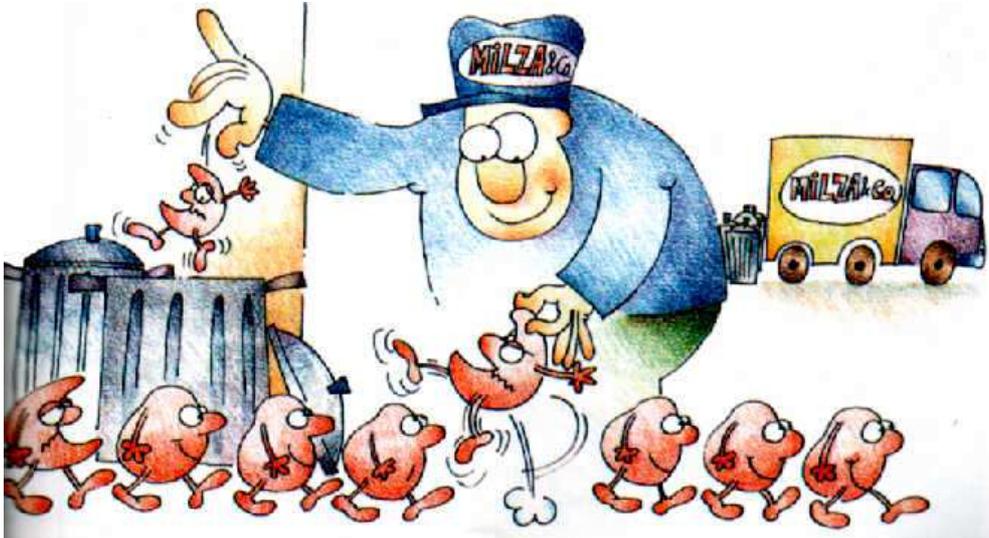
## Indici eritrocitari

- Se invece le variazioni riflettono la forma degli eritrociti, si parla di *poichilocitosi* (da non confondere con alterazioni dovute ad artefatti di preparazione)





## Anemia Falciforme



## Indici eritrocitari

ALTERAZIONE	NOME	ASPETTO MORFOLOGICO	SITUAZIONI PATOLOGICHE
FORMA	ACANTOCITA DACRIOCITO DREPANOCITO ELLISSOCITO CHERATOCITO MEGALOCITO SCHIZOCITO STOMATOCITO	ACULEO LACRIMA FALCE OVALE CORNO GIGANTE TAGLIO BOCCA	Anemie diseritropoietiche, Anemie emolitiche acquisite, Talassemie, Anemia degli stati leucemici e preleucemici, Ellissocitosi, Drepanocitosi, Sferocitosi
VOLUME	MICROCITA MEGALOCITA RETICOLOCITA		Anemie siderocarenziali, Anemia degli stati leucemici e preleucemici, deficit vit. B 12
CROMIA	IPOCROMIA IPERCROMIA		Anemie siderocarenziali, Anemia degli stati leucemici e preleucemici, deficit vit. B 12

## Emoglobina

L'emoglobina è una proteina composta (cromoproteina) da quattro subunità e da una porzione prostetica **eme**

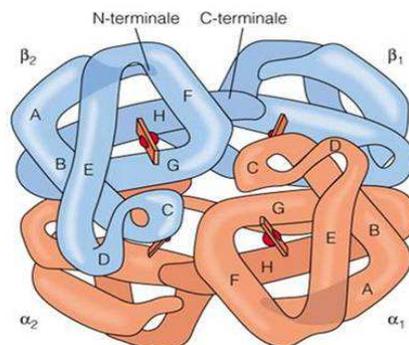
L'eme è costituito da quattro anelli pirrolici contenenti al centro un atomo di  $Fe^{2+}$  che può legare  $O_2$  in modo reversibile

La funzione dell'Hb è quella di assumere  $O_2$  a livello degli alveoli polmonari e distribuirli a livello dei tessuti

Nell'ontogenesi dell'Hb l'inserimento dell'atomo di  $Fe^{++}$  avviene nei mitocondri dell'eritroblasto dove avviene pure la sintesi e l'attacco delle catene globiniche. Queste ultime sono sette:

2 catene a-simili: catene  $\alpha$ , catene  $\zeta$

5 catene b-simili: catene  $\beta$ , catene  $\gamma$  (Hb Gowers dell'embrione, catene  $A$ - $\gamma$  (Hb fetale), catene  $\delta$  (Hb  $A_2$ ), catene  $\epsilon$



## Emoglobina

Esistono diversi tipi di Hb a seconda dello stadio evolutivo dell'essere umano

Durante la vita intrauterina :

Hb Gower1      2 $\zeta$  2 $\epsilon$

Hb Gower2      2 $\alpha$  2 $\epsilon$

Hb Portland     2 $\zeta$  2 $\epsilon$

Durante il periodo neonatale :

Hb fetale        2 $\alpha$  2 $\gamma$     80%

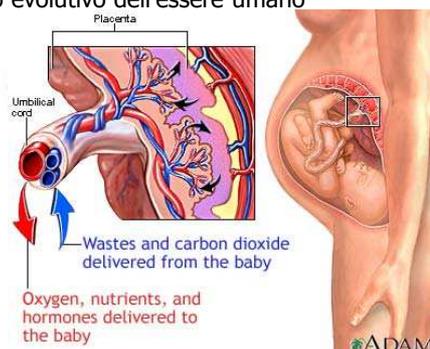
Hb A             2 $\alpha$  2 $\beta$      20%

Durante il periodo post-neonatale (adulto) :

Hb F             2 $\alpha$  2 $\gamma$     0.5%

Hb A             2 $\alpha$  2 $\beta$      99%

Hb A2            2 $\alpha$  2 $\delta$     0.5%



L'Hb A è in grado di legare glucidi sulla Valina N-terminale dando luogo ad emoglobina glicosilata di cui la più importante è l'Hb-A1c che lega carboidrati irreversibilmente. Rappresenta un indice della glicemia media di periodi pregressi. E' elevata nei diabetici.

L'Hb F ha un'affinità maggiore per l' $O_2$  rispetto alla Hb A. Ciò le permette di ricevere ossigeno dall'emoglobina materna nella circolazione placentare.

## **Emoglobina**

Si esprime in g/100 mL

Si misura con il **Metodo della Cianmetaemoglobina:**

È il classico *metodo fotometrico di Drabkin* per la determinazione dell'emoglobina utilizzato sia manualmente sia dagli strumenti automatici.

L'emoglobina viene trasformata dal reattivo in cianmetaemoglobina, pigmento molto stabile utilizzato per l'analisi fotometrica. La quantità di pigmento sviluppato, direttamente proporzionale all'emoglobina, viene determinata leggendo l'estinzione in fotometro a 540 nm di lunghezza d'onda

20 ml di sangue + 5 ml di Soluzione di DRABKIN (ferricianuro + cianuro di potassio)

## **Emoglobina**

• **Contenuto emoglobinico medio – MCH** ♀26.5-34 / ♂26.6-33.8 pg

- È la quantità di emoglobina contenuta in media in un globulo rosso

$$MCH(\text{pg} / \text{cell}) = \frac{Hb(\text{g} / \text{L})}{RBC(\text{cell} / \text{L})}$$

• **Concentrazione emoglobinica globulare media – MCHC** ♀31.4-35.8 / ♂31.5-36.3 %

- Indica la percentuale di emoglobina contenuta negli eritrociti a seconda della loro grandezza

- Valori inferiori si riscontrano nelle anemie ipocromiche, valori superiori negli stati emolitici (configurazione sferocitica dei globuli)

$$MCHC(\text{g} / \text{dL}) = \frac{Hb(\text{g} / \text{dL})}{Htc(\text{L} / \text{L})}$$

## Velocità di eritrosedimentazione (VES)

- La VES è un test tradizionale – in laboratorio, la VES misura la velocità di sedimentazione degli eritrociti nel plasma in cui sono sospesi, o meglio misura la *distanza percorsa da un eritrocita in una provetta verticale in un determinato intervallo di tempo*
- Il principio dietro questo processo è l'aumento di cariche negative che le varie proteine infiammatorie (fibrinogeno, α-β- e γ-globuline) esercitano sugli eritrociti – queste promuovono la separazione delle cellule e quindi una più rapida caduta
- Si basa sulla legge di Stokes:

$$V = \frac{2r^2(d_1 - d_2)g}{9\eta}$$

V= velocità di sedimentazione  
r= raggio delle particelle sferiche  
d1=densità delle particelle sferiche - emazie 1,10  
d2=densità del fluido di sospensione - plasma 1,02  
g=accelerazione di gravità  
h=viscosità del liquido



## Velocità di eritrosedimentazione (VES)

- Il metodo attuale di riferimento è il **Westergren**: campione di sangue con sodio citrato in una provetta di vetro lunga 30cm e θ=2.5mm
- Nuovi **metodi di fotometria capillare quantitativa** - il valore della VES non è più rilevato con un'unica lettura dopo un intervallo di tempo, ma risulta dalla misurazione dinamica del processo di formazione degli agglomerati di eritrociti. Questo processo risente della spinta delle proteine, specie della fase acuta, ma non viene influenzato dal grado di anemia, dalla poliglobulia, dalla presenza di crioglobuline o paraproteine e permette di analizzare campioni con volume scarso (bambini) e fornisce risultati in tempi brevi
- Indice di sedimentazione o **indice di Katz**= [VES(1a ora)+VES(2a ora)/2]/2
- Risulta essere aumentata in patologie infiammatorie e infettive, ma la specificità è bassa - nel 3% dei casi è aumentata in assenza di malattia rilevabile
- Le sue variazioni sono più significative del rilievo di un singolo valore elevato
- Può permettere l'identificazione di malattie nascoste o il monitoraggio del decorso o della risposta alla terapia di certe malattie

## Velocità di eritrosedimentazione (VES)

**Tab. 1** Reference limits, 2.5th and 97.5th percentiles and their 95% confidence intervals (CI) for LSRB in undiluted EDTA-anticoagulated blood. Variation with age and sex.

Age (year)	n	Sex	2.5th percentile and 95% CI	97.5th percentile and 95% CI
0-14	80	W and M	2 (2-2)	34 (26-41)
15-50	190	Women	2 (2-2)	37 (36-39)
15-50	150	Men	2 (2-2)	28 (20-30)
51-70	120	Women	2 (2-3)	39 (38-45)
51-70	130	Men	2 (2-2)	37 (31-44)
>70	170	W and M	3 (3-3)	46 (45-55)

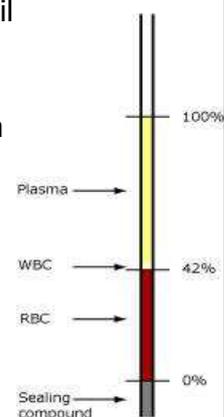
W: women; M: men.

## Ematocrito

- È semplicemente il rapporto tra il volume degli eritrociti e il volume plasmatico
- Sebbene possa essere determinato con la semplice centrifugazione (ematocrito spurio – con pipette capillari a 15000g), ma viene di norma calcolato come:

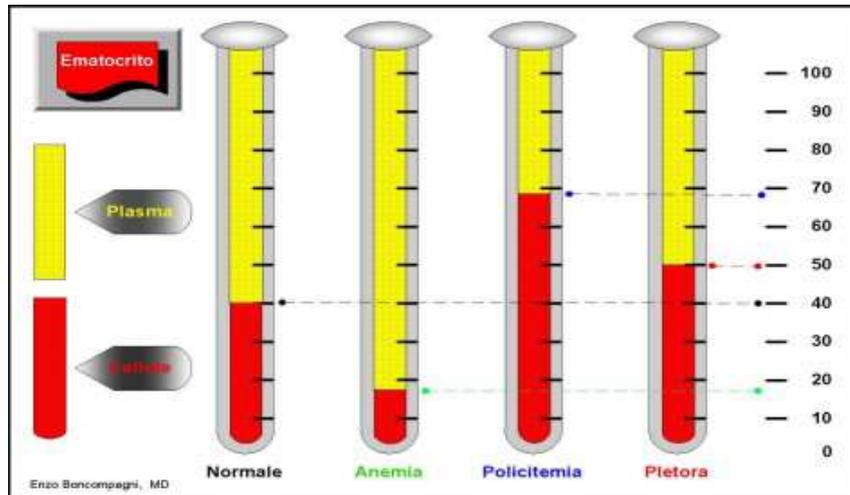
$$\text{Ematocrito \%} = \text{MCV (litro/cellule)} \times \text{RBC (cellule/litro)}$$

- Risultati erronei dell'ematocrito possono derivare in condizioni di policitemia, macrocitosi, sferocitosi, anemie ipocromiche, alterazioni morfologiche degli eritrociti
- Risulta essere **ridotto** per diminuzione dei globuli rossi o per riduzione del loro volume



## Ematocrito

Valori normali simili in tutte le specie:  
dal 30 al 45% della massa sanguigna totale è  
rappresentata dai globuli rossi.



## Approccio diagnostico alle anemie



Definizione: una riduzione nella concentrazione di emoglobina al di sotto dei valori normali per età e sesso

criteri WHO:

Maschio < 13g/dL

Femmina < 12g/dL

Femmina in gravidanza < 11g/dL

- Anamnesi, esame fisico e valutazione bioclinica

### Esami di prima scelta

- Emocromo: Hb, Hcrit, indici eritrocitari, conta cellulare e dei reticulociti
- Esame morfologico
- Biochimica: L-ADM con LDH

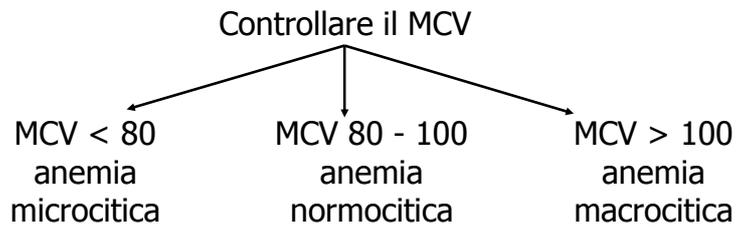
### Esami di seconda scelta

- Sideremia/TIBC/Ferritina
- Biochimica epatica e renale, ormonale

## Approccio diagnostico alle anemie

- 1. Anemia soltanto o no?** Bicitopenia o Pancitopenia
- anemia aplastica
  - MDS (mielodisplasia)
  - leucemia acuta
  - ipersplenismo/malattia autoimmune
  - anemia megaloblastica (non sempre)

**2. Microcitica, Normocitica, o Macrocitica ?**



## Classificazione Morfologica

### ANEMIA MACROCITICA

- **Transitoria o pseudomacrocitica (ipocromica) – durante la fase di rigenerazione conseguente a:**
  - Perdita acuta di sangue
  - Anemia emolitica acuta
- **Macrocitica vera (normocromica)**
  - Da disordini mieloproliferativi
  - Da carenza di vitB12 (anemia megaloblastica)

### ANEMIA MICROCITICA (IPOCROMICA)

- **Da carenza di Ferro (valutare sideremia e ferritina)**
  - Dieta carente
  - Aumentata richiesta
  - Diminuito assorbimento
  - Emorragia
- **Da incapacità di utilizzare il Ferro (carenza Cu, vitB6)**

### ANEMIA NORMOCITICA NORMOCROMICA

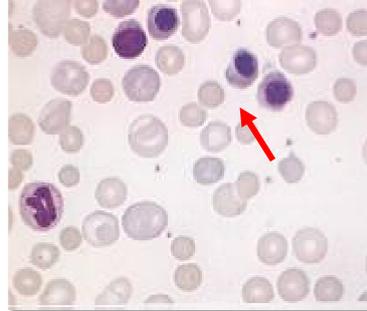
- **Da diminuita produzione (anemia aplastica o ↓ Epo)**
- **Fase iniziale di: anemia postemorragica o postemolitica**



## 4. Anomalie cellulari

- Eritrociti

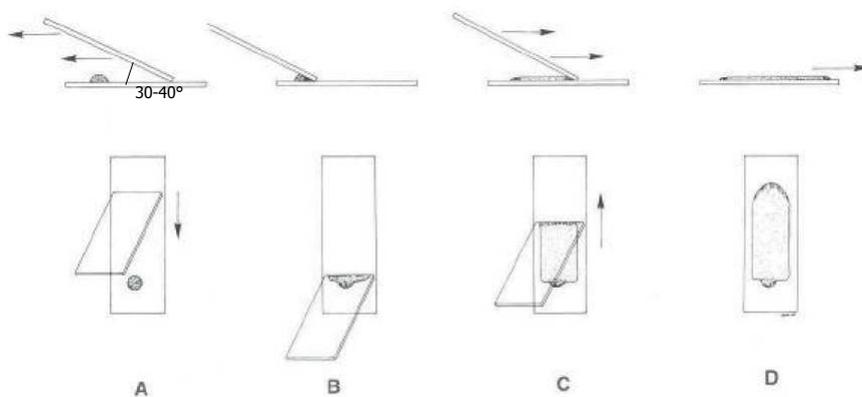
- microsferociti
- eritrociti frammentati
- Eritroblasti
- Dacriociti o a lacrima



- Leucociti

- Blasti: LLA, MDS
- Tutta la serie mieloide: LMC
- Neutrofili ipersegmentati: anemia megalobastica
- Leucoeritroblastosi: Mieloftisica, altre cause

## Lo striscio di sangue



1. Raccolta del campione
2. Preparazione del vetrino
3. Fissaggio
4. Colorazione con Giemsa (blu di metilene ed eosina)
5. Montaggio e osservazione

## Patologie in cui la conta degli eritrociti può risultare normale ma l'esame dello striscio di sangue può identificare la malattia

Disease	Findings on blood film
Compensated acquired hemolytic anemia	Spherocytosis, polychromatophilia, erythrocyte agglutination
Hereditary spherocytosis	Spherocytosis, polychromatophilia
Hemoglobin C disease	Target cells
Elliptocytosis	Elliptocytes
Lead poisoning	Basophilic cells
Incipient pernicious anemia or folic acid deficiency	Macrocytosis, with oval macrocytes, hypersegmented neutrophils
Multiple myeloma, macroglobulinemia	Rouleaux formation
Malaria, babesiosis	Parasites in the erythrocytes
Consumptive coagulopathy	Schizocytes
Severe infection	Relative increase in neutrophils: increased band forms, left shift. Dohle bodies, neutrophil vacuoles*
Infectious mononucleosis	Atypical lymphocytes*
Agranulocytosis	Decreased neutrophils; relative increase in lymphocytes*
Allergic reactions	Eosinophilia*
Chronic lymphocytic leukemia (early)	Relative lymphocytosis*
Acute leukemia (early)	Blast forms*

## 5. Biochimica clinica

Globuline: mieloma multiplo

LDH: leucemia, anemia emolitica,  
mieloma multiplo, anemia megaloblastica

sGOT, Bilirubina: anemia emolitica,  
anemia megaloblastica, MDS

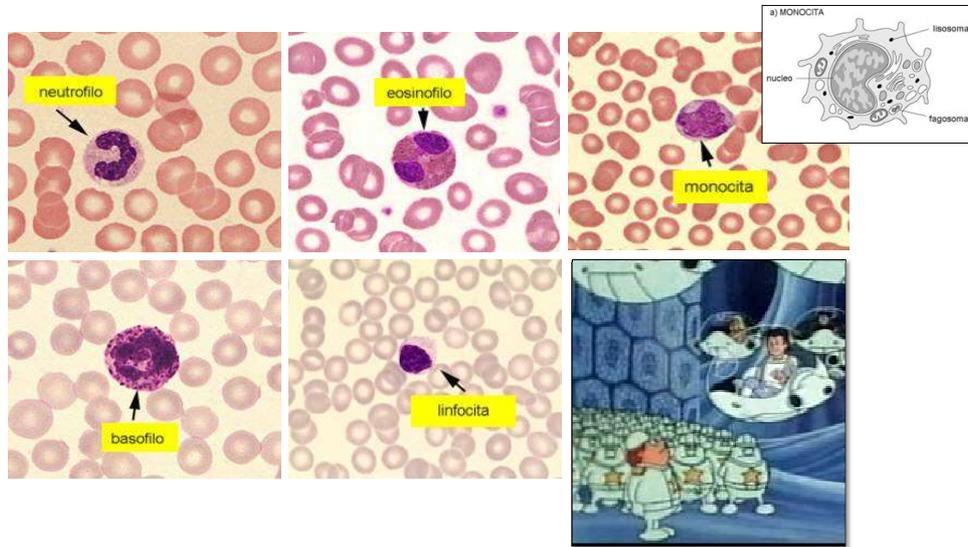
Calcio: mieloma multiplo

BUN/Creatininemia: mieloma multiplo,  
insufficienza renale cronica

acidi urici: leucemia



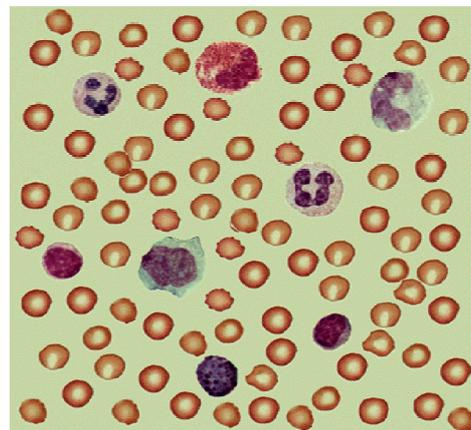
## I Leucociti o Globuli Bianchi



## Leucociti: conta differenziale

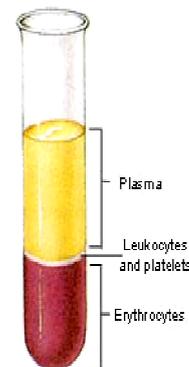
### Formula Leucocitaria

- Granulociti
  - Neutrofili (55-70%)
  - Eosinofili (2-3%)
  - Basofili (0,5-1%)
- Linfociti (20-30%)
- Monociti (3-8%)



## Leucociti

- Il loro numero globale varia da **5.000 a 9.000** per  $\text{mm}^3$  (ml) di sangue
- Sono detti così perché quando il sangue viene posto in una provetta a sedimentare si collocano in uno strato biancastro posto superiormente agli eritrociti
- Sono cellule che svolgono la loro funzione nel connettivo e perciò utilizzano il sangue per migrare dal midollo osseo ai tessuti
- Possono essere distinti a seconda della presenza o meno di *granulazioni citoplasmatiche* in:
  - granulari** (neutrofilo, basofilo, eosinofilo)
  - non granulari** (linfocito, monocito)



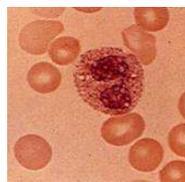
## GRANULOCITI

**Neutrofilo**



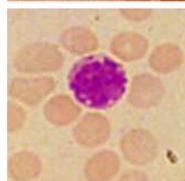
→ 55-70%

**Eosinofilo**



→ 2-3%

**Basofilo**



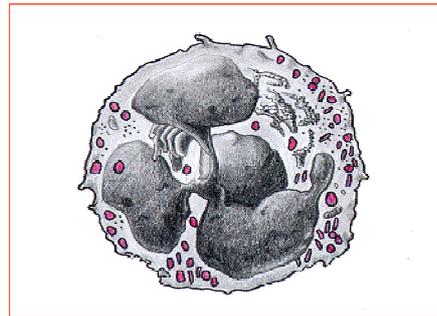
→ 0,5-1%

## **Granulociti Neutrofili o Polimorfonucleati (65%)**

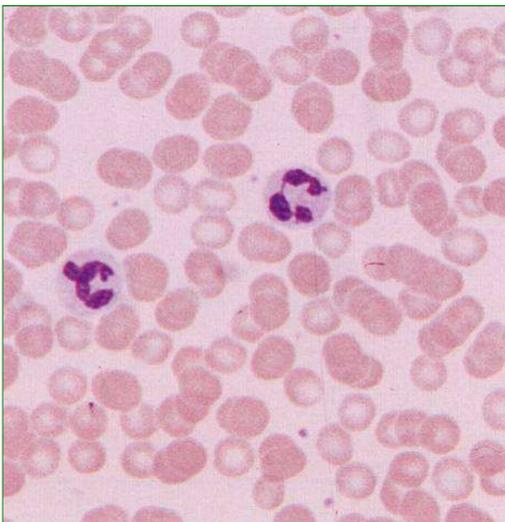
- Sono cellule molto mobili dotate di attività fagocitaria
- Intervengono nelle **fasi iniziali della risposta infiammatoria**
- Sono attratti (chemiotassi) da varie sostanze tissutali e batteriche (chemiotassine) nella sede dove devono esercitare la loro azione; una volta che hanno esercitato la loro azione, vanno incontro a distruzione costituendo il **pus**
- Sono simili in tutte le specie animali

### MORFOLOGIA

- Hanno un  $\varnothing$  di poco superiore a 15  $\mu$ m e presentano un citoplasma scarsamente colorato con **granuli** specifici non evidenziati dalle comuni colorazioni.
- Il nucleo ha la caratteristica forma plurilobata (2-5 lobi uniti tra loro da filamenti di cromatina)



## **Granulociti Neutrofili o Polimorfonucleati (65%)**



I **granuli** sono di diverso tipo e contengono enzimi idrolitici, perossidasi, enzimi capaci di degradare i mediatori dell'infiammazione e altre sostanze che permettono di esercitare attività fagocitaria ed antibatterica.

**Granuli specifici:** piccolissimi e numerosi.  
Contengono: fagocitina, lisozima...

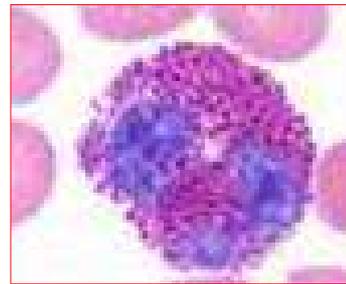
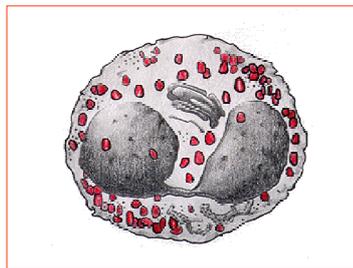
**Granuli azzurofilo:** più grandi e meno numerosi. Sono **lisosomi** che contengono gli enzimi lisosomiali.

**Granuli terziari:** gelatinasi...

### Granulociti Eosinofili (3%)

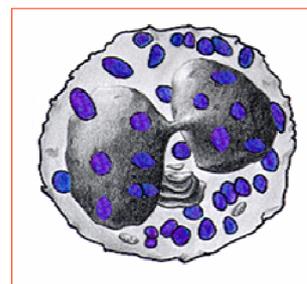
Il loro numero aumenta nei processi allergici e nelle infezioni parassitarie (istoflogistica). Sono in grado di degradare l'istamina.

- Hanno un diametro di 15 mm e presentano un citoplasma con **granuli specifici acidofili** (eosinofili) e il nucleo è bilobato (nucleo a bisaccia)
- Questi sono i granuli specifici: sono piuttosto grandi e contengono al centro un cristalloide denso circondato da una matrice meno densa (contengono proteine basiche (P.B.M.), enzimi idrolitici, perossidasi, istaminasi)
- Sopravvivono 8-12 giorni



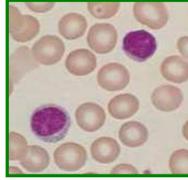
### Granulociti Basofili (<1%)

- Hanno un diametro di 15 mm e presentano un citoplasma con **granuli specifici basofili**
  - I granuli specifici sono grandi e contengono istamina ed eparina.
  - I granuli azzurrofilo sono lisosomi
  - Il nucleo può essere di varie forme (S,U,J.), ma negli strisci comuni è mascherato dai granuli
- 
- Svolgono la stessa funzione dei mastociti
  - Non sono i precursori dei mastociti tissutali



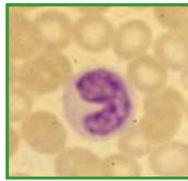
## AGRANULOCITI

Linfociti



20-30%

Monociti



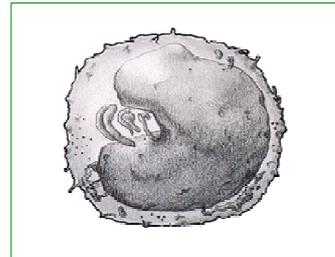
3-8%

### Monociti (2-8%)

Sono i precursori ematici dei macrofagi.

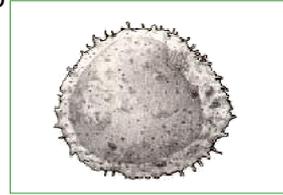
#### MORFOLOGIA

- Sono cellule piuttosto grandi con  $\varnothing$  di 20 mm.
- Il citoplasma è poco colorabile
- Il nucleo presenta spesso una profonda insenatura su di un lato (reniforme)



## Linfociti (25%)

- Sono piccole cellule ( $\varnothing$  di 7-15  $\mu$ m) con un grande nucleo rotondo e scarso citoplasma
- Piccoli linfociti  $\varnothing$  : 8-10  $\mu$ m
  - Nucleo rotondo, cromatina addensata, sottile orletto di citoplasma moderatamente basofilo (azzurro chiaro) –  
Prevalgono in cane, gatto e cavallo
- Grandi linfociti  $\varnothing$  : 10-15  $\mu$ m
  - Nucleo con cromatina meno addensata e citoplasma più abbondante. Prevalgono nei ruminanti
- Sono le cellule responsabili delle difese immunologiche
- Esistono diverse famiglie o sottopopolazioni di linfociti: **linfociti B** (25%), **linfociti T** (70%) e **cellule natural killer(NK)**(5%)
- I **linfociti B** sono le cellule che si trasformano in plasmacellule e provvedono a produrre anticorpi circolanti (risposta umorale);
- I **linfociti T** presentano sulla loro superficie TCR. Sono responsabili della risposta immunitaria mediata da cellule.
- Le **cellule NK** distruggono le cellule estranee o trasformate senza l'intervento di cellule T

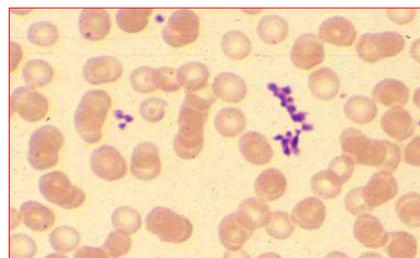
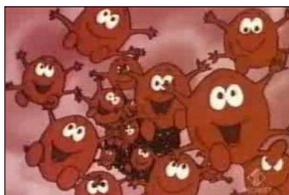


## Le Piastrine o Trombociti

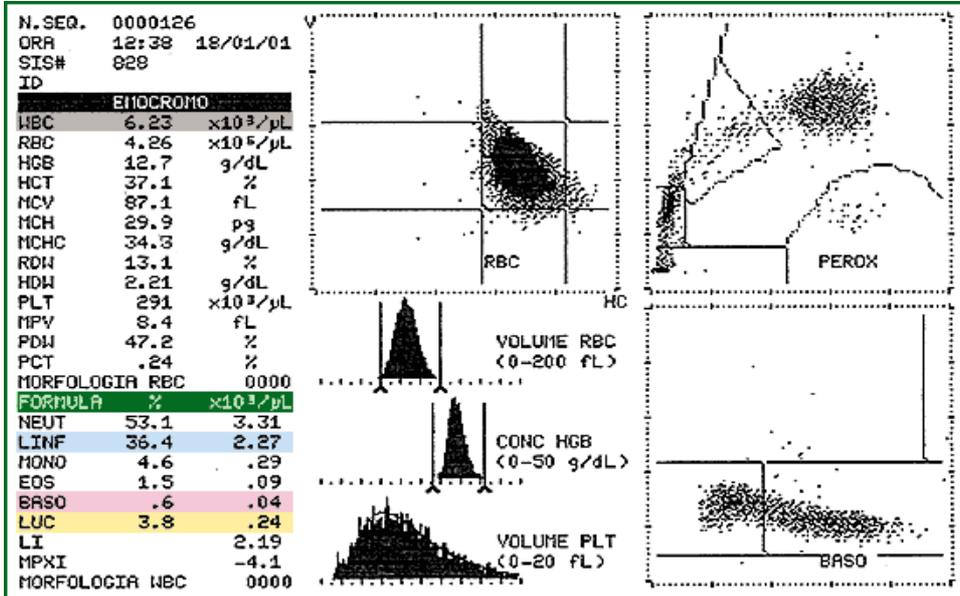
- Normalmente sono in numero di 300.000 circa per  $\text{mm}^3$  di sangue.
- Sono piccole porzioni cellulari anucleate che derivano dalla frammentazione del citoplasma di grandi cellule del midollo osseo dette **megacariociti**.

### MORFOLOGIA

- Hanno forma biconvessa e una lunghezza di 1-3  $\mu$ m.



## Indici eritrocitari (soggetto sano)



## Indici eritrocitari (con LLA)

