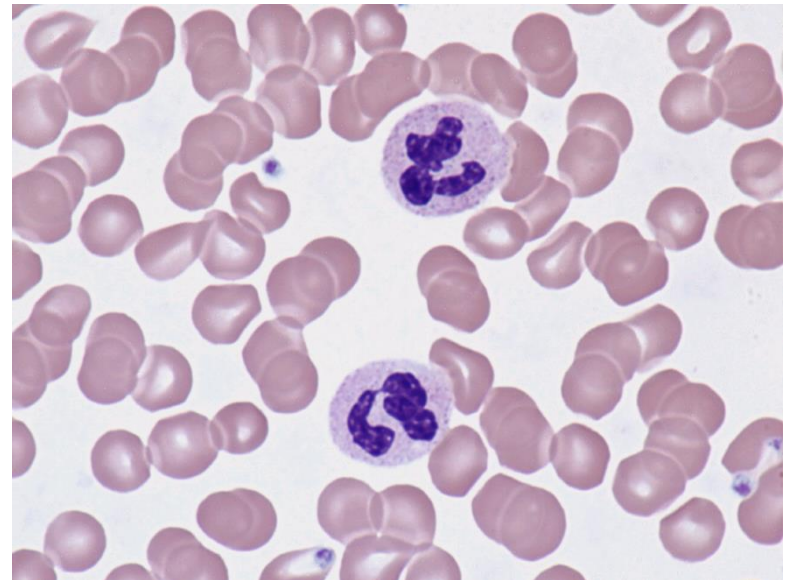


Tecniche di laboratorio di ematologia

Prof. Gian Matteo Rigolin
Ematologia



Paziente con quesito diagnostico

- Valutazione medica
 - Anamnesi
 - Visita
- Ipotesi diagnostica
 - Esami di laboratorio
 - Esami strumentali
- Accertamenti
 - Di urgenza
 - Di primo livello
 - Di secondo livello (approfondimento specialistico)

Indagini di laboratorio

- Scopo
 - individuare le persone malate per
 - giungere ad una corretta diagnosi
 - impostare adeguata terapia
 - seguire e sorvegliare i trattamenti
- Apportare conoscenze aggiuntive
- **MAI sopravvalutare un singolo dato di laboratorio o strumentale (senso critico)**

Indagini di laboratorio: limiti

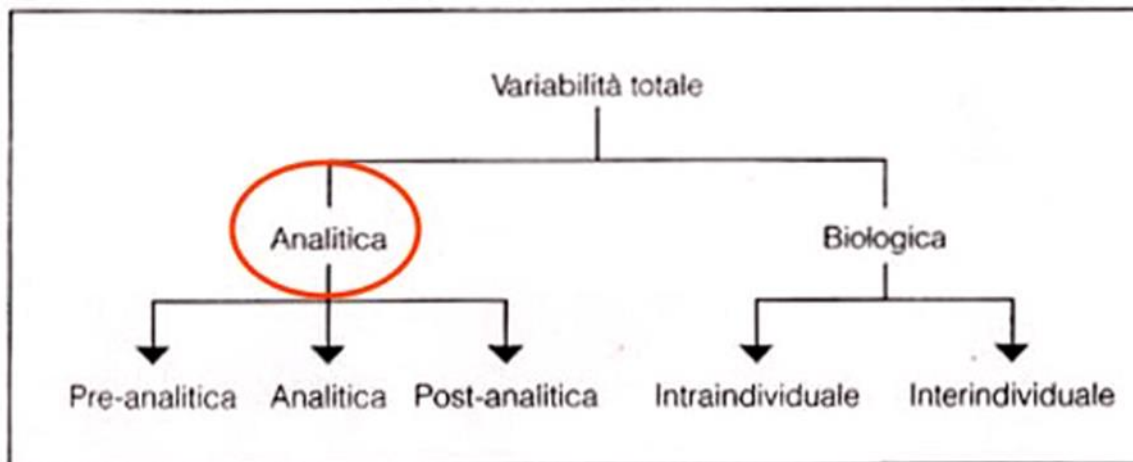
- Variabilità del risultato:
 - biologica
 - analitica
- Risultato relativamente ai range di riferimento
- Rilevanza clinica del dato:
 - sensibilità
 - specificità
 - valore predittivo (negativo o positivo)

Variabilità dei risultati

- Variabilità del risultato quando si ripete una certa determinazione più volte
 - su uno stesso campione
 - in successione ravvicinata di tempo,
 - in tempi diversi nello stesso soggetto
 - in diversi soggetti
 - nello stesso tempo
 - in tempi diversi.

Variabilità

1. Variabilità biologica
 2. Variabilità analitica
- Variabilità totale del risultato = 1 + 2



Variabilità biologica

- La variabilità biologica è dovuta alla diversità delle influenze biologiche
 - Intra-individuale:
 - a carico dello stesso individuo
 - Inter-individuale:
 - dovuta alle diversità fra diversi individui

Fonti di variabilità biologica (1 di 2)

- Ritmi circadiani: mattino, sera, stress, ansia, digestione di cibo, etc
- Variazioni stagionali: variazione di alcuni costituenti in rapporto alla dieta, attività fisica, etc.
- Ciclo mestruale: ormoni, etc
- Dieta: apporto calorico, glucidico, lipidico, etc.
- Gravidanza
- Sesso: ormoni, massa muscolare, emoglobina, etc.
- Razza
- Massa corporea
- Età

Fonti di variabilità biologica (2 di 2)

- Attività lavorativa, classe sociale
- Fumo
- Ingestione recente di cibo o digiuno
- Postura: dalla posizione supina a seduti od in piedi il volume di sangue circolante si riduce di 600-800 ml ed aumentano le proteine, ma anche ormoni come norepinefrina, aldosterone, angiotensina II, renina, ADH
- Disturbi del sonno, stati d'ansia
- Affaticamento fisico, immobilizzazione forzata

Variabilità analitica

- Variabilità dei risultati di laboratorio attribuibile ai procedimenti utilizzati per ottenerli
- È possibile suddividere la variabilità analitica a seconda delle fasi che caratterizzano una determinazione e cioè
 - la fase pre-analitica o preparativa
 - la fase analitica propriamente detta
 - la fase post-analitica od interpretativa

Errori e Fonti di errore

- Errori:
 - Grossolani
 - Sistematici
 - Casuali
- Pre-analitiche:
 - preparazione del paziente,
 - raccolta e trattamento del campione, etc.
- Analitiche:
 - scelta del metodo di analisi, strumentazioni
 - mantenimento della loro efficienza,
 - controllo del processo, etc.
- Post-analitiche:
 - tipo di risposta,
 - refertazione, etc.

Rilevanza clinica dei dati di laboratorio

- Per avere rilevanza clinica nella diagnosi della malattia e nella cura del paziente un test di laboratorio deve fornire risultati che siano:
 - Informativi
 - Non altrimenti reperibili allo stesso rischio e costo
 - Correlati al massimo grado con la malattia indagata e solo in minima parte con altre forme morbose

Qualità del dato di laboratorio

- Un test di laboratorio deve essere efficace ed affidabile
 - Standardizzazione delle procedure di raccolta, analisi e refertazione del campione
 - Sistemi che cercano di identificare gli errori la cui responsabilità ricade sul laboratorio
 - Procedure utilizzabili per identificarli e minimizzarli
 - Controlli di qualità

Qualità dei dati di laboratorio

- Componenti della qualità dei dati di laboratorio:
 1. necessità dell'esame
 2. richiesta dell'esame
 3. preparazione del paziente
 4. acquisizione del campione
 5. trattamento del campione
 6. analisi del campione
 7. produzione del risultato
 8. registrazione del risultato
 9. interpretazione del risultato

Intervalli di riferimento

- I risultati delle indagini di laboratorio devono essere valutati per comparazione con altri dati stabiliti a priori su popolazione normale di soggetti sani.
- intervalli di riferimento (range di normalità).
 - Generalmente media $\pm 2sd$ (5% al di fuori pur essendo normale)
 - i valori di normalità possono variare a seconda:
 - dell'età
 - Sesso
 - popolazione in esame
 - stati fisiologici (gravidanza, attività fisica, etc)
 - bioritmi (ritmi circadiani)
 - conoscenze scientifiche

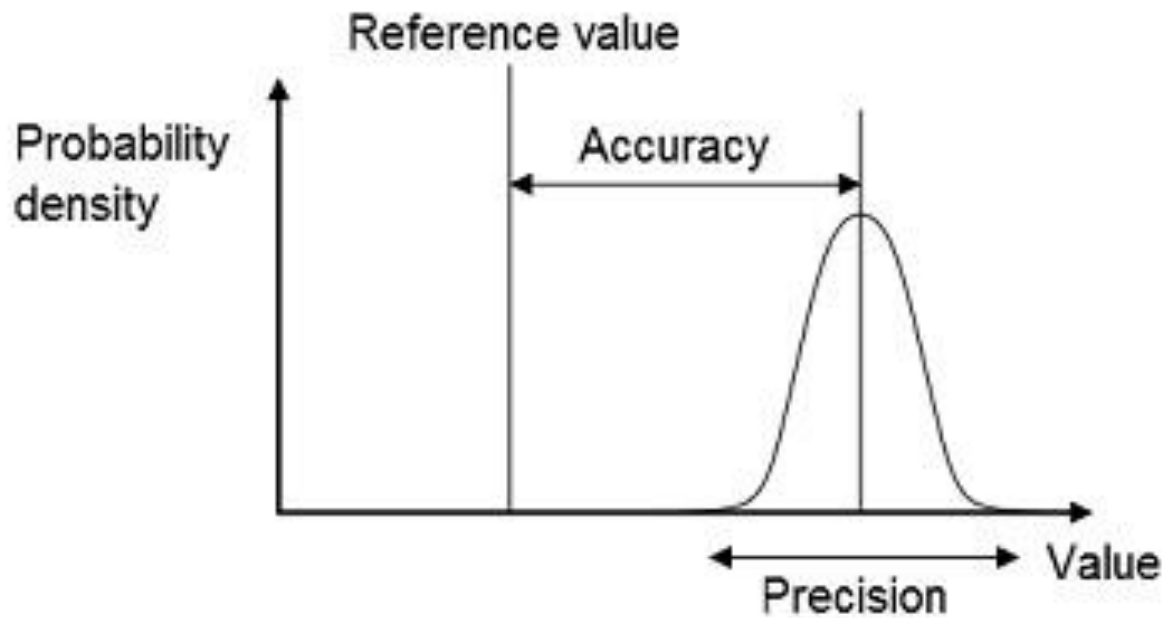
Rilevanza del dato di laboratorio

- Sensibilità
 - Probabilità che un soggetto malato presenti un test positivo:
 - $VP / (VP + FN) \times 100$
- Specificità
 - Probabilità che un soggetto sano presenti un test negativo:
 - $VN / (VN + FP) \times 100$
- Valore predittivo
 - Positivo: percentuale di positivi che sono veri positivi:
 - $VP / (VP + FP) \times 100$
 - Negativo: percentuale di negativo che sono veri negativi:
 - $VN / (VN + FN) \times 100$

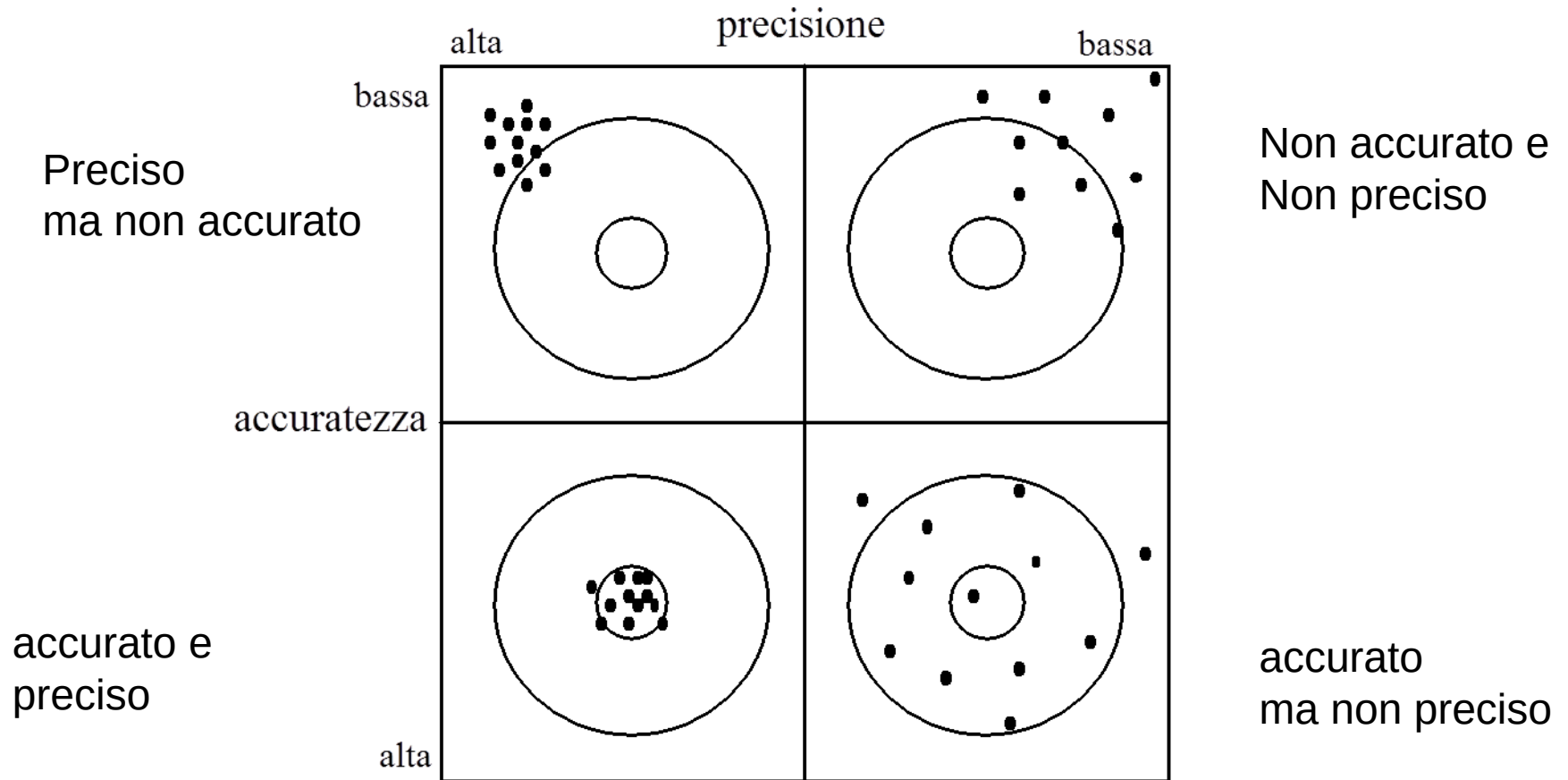
Precisione e accuratezza

- In aggiunta alla adeguata raccolta dei campioni, per una affidabilità dei dati sono richieste la **precisione** e la **accuratezza** dei metodi di analisi.
- la **precisione** è il grado di "dispersione" di dati rilevati individualmente (campione) rispetto al valore medio della serie cui appartengono
- Sia le indagini di tipo manuale che quelle automatizzate devono essere interpretate considerando la **precisione** del test.
 - Questo è importante per valutare il significato di piccole variazioni nei risultati.
- **Le stime di precisione sono basate sulla deviazione standard rispetto alla media campionaria.**
- Tutte le indagini di laboratorio vanno valutate anche rispetto alla **accuratezza** ed alla riproducibilità.
- **Accuratezza è la differenza tra il valore misurato e quello reale** e sono basate sulla media campionaria.

Accuratezza e precisione



Rappresentazione grafica dei concetti di precisione e accuratezza



Raccolta del campione

- Prima di richiedere un campione biologico, è necessario riflettere attentamente su quale materiale sia più idoneo per il risultato che si vuole ottenere, per evitare la raccolta di campioni inutili od inadeguati.
- È anche necessaria una collaborazione tra clinici e ed il personale di laboratorio che analizzerà il campione al fine di processare il campione in modo adeguato per il test che viene richiesto.
- Per ottenere dati di laboratorio affidabili ed accurati è innanzitutto necessaria una corretta raccolta del campione biologico.

anticoagulanti

- Nella maggior parte dei casi i campioni ematici sono raccolti mediante prelievo in provette contenenti o meno anticoagulante.
- I tre anticoagulanti più usati sono:
 - I sali di tripotassio o disodico dell'acido etilenediaminotetra-acetico (EDTA),
 - Il trisodio citrato
 - L'eparina.

anticoagulanti

- EDTA ed il citrato di sodio **rimuovono il calcio**, essenziale per la coagulazione del sangue.
- L'eparina agisce formando un complesso con l'antitrombina III nel plasma **prevenendo la formazione della trombina**.
- L'EDTA è l'anticoagulante preferito per i conteggi cellulari (emocromo) perchè produce una anticoagulazione completa con minime modificazioni morfologiche a livello cellulare.
- L'eparina causa invece una colorazione bluastra del fondo dopo colorazione MGG ma non modifica la forma e le dimensioni cellulari.
- L'eparina è più spesso usata per prevenire l'emolisi dei globuli rossi, per i test di fragilità osmotica, per test funzionali e le analisi immunologiche a carico dei leucociti.
- L'eparina non inibisce in modo completo il clumping dei leucociti e delle piastrine.
- Il sodio citrato è l'anticoagulante preferito per i test coagulativi e per gli studi sulle piastrine.

anticoagulante

- La concentrazione dell'anticoagulante può alterare i conteggi cellulari o le determinazioni se è alterato il rapporto anticoagulante sangue e può anche alterarne la morfologia cellulare.
- oggi, il sangue viene prelevato utilizzando provette con pressione negativa (a es. Vacutainer tubes; BD), che contengono la corretta concentrazione di anticoagulante quando riempite in modo corretto.
- Il sangue anticoagulato può essere conservato fino a 24 ore a 4°C senza alterare in modo significativo i conteggi e la morfologia cellulare
- È tuttavia preferibile analizzarlo il prima possibile dopo il prelievo

prelievo





Provetta CON TAPPO LILLA



- **Contiene:** Anticoagulante EDTA
- **Si ottiene:** SANGUE INTERO PLASMA EDTA

- | | | |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| • Impiego: | Emocromo | formula leucocitaria |
| • | Differenziazione Leucociti | |
| • | Indici: MCV, MCH, MCHC | |
| • | Reticolociti | Glucosio-6P-deidrogenasi |
| • | Hb-glicosilata | Elettroforesi Hb |
| • | Test di coombs | Valutazione linfociti T |
| • | Malaria (test diretto) | Piombo |
| • | Cadmio,Bismuto,Cromo | Ciclosporine |
| • | Mercurio, Arsenico | CO-emoglobina |
| • | Viremie epatite B,C (pcr) | HIV (pcr) |
| • | Parathormone intatto | Fattore V |
| • | Emocromatosi | Magnesio Ec |
| • | | Ac.folico negli Ec |

Provetta CON TAPPO AZZURRO



- Contiene: Anticoagulante Na-Citrato 1:10
- Si ottiene: PLASMA
- Impiego: Quick, PTT, Fibrinogeno, Antitrombina III e tutti i test della
- coagulazione.
- Per richieste speciali coagulazione interpellare il laboratorio!

Provetta CON TAPPO VERDE

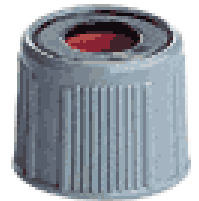


- Contiene: Li-Heparin
- Si ottiene: PLASMA

- Impiego: Alcool
- Ammoniaca (NH₃)
- Troponina - CK MB massa - Mioglobina

- Oss.: Recapitare la provetta in laboratorio **entro 2 ore per l'NH₃**, e **non aprire la provetta!!**

Provetta CON TAPPO GRIGIO



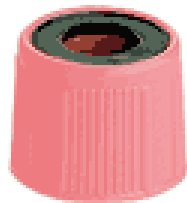
- Contiene: Anticoagulante Li-Jodacetat,
-
- Si ottiene: PLASMA Li-Heparin
- Impiego: Glucosio
- Acido lattico: mescolare bene subito e recapitare la provetta al laboratorio senza aprirla.

Provetta CON TAPPO ROSSO



- Contiene: Gel di separazione Si ottiene: SIERO
- Impiego: Chimica Sierologia
- Medicamenti Endocrinologia
- Allergie Marcatori tumorali
- Immunologia Virologia
- Calcio ionizzato*
- * centrifugare e recapitare al laboratorio **senza aprire la provetta!**

Altre provette



Conteggi cellulari

- I conteggi cellulari sono importanti parametri in ematologia.
- I conteggi cellulari possono essere determinati manualmente od in modo automatizzato con gli analizzatori cellulari (emocitometri).
- Sia nel caso del conteggio manuale che in quello automatizzato, l'accuratezza e la precisione dipendono dalla adeguata diluizione del campione di sangue e dalla precisa misurazione.
- Il sangue deve essere aliquotato in modo preciso e diluito in modo che le cellule sia ben distribuite nel campione da analizzare.
- Poiché il sangue contiene grandi quantità di cellule la diluizione del campione è necessaria per una analisi accurata.

Diluizione del campione

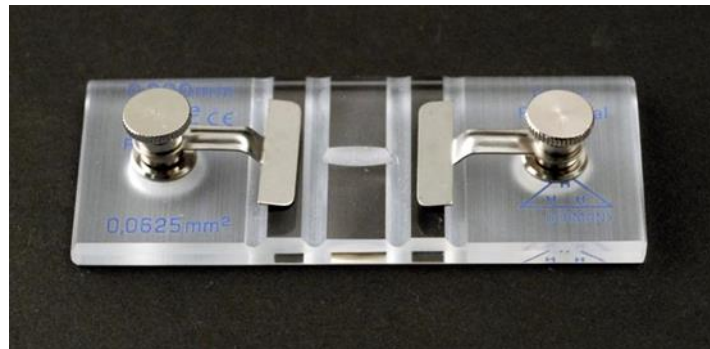
- Il tipo di diluente dipende dal tipo cellulare da contare.
 - globuli rossi richiedono un mezzo isotonico
 - Per i globuli bianchi e delle piastrine, per semplificare il conteggio si usa spesso un diluente che lisa i più numerosi globuli rossi.
- L'entità della diluizione dipende anche dal tipo cellulare.
 - Il conteggio dei globuli rossi richiede una maggiore diluizione rispetto ai globuli bianchi
- Gli errori nei conteggi cellulari sono determinati per lo più da errori nella misurazione del campione, diluizione, o conteggio cellulare.
 - La maggiore precisione si ha quando possono essere valutati numeri di cellule molto elevati
 - I metodi automatizzati chiaramente sono superiori a quelli manuali nel conteggio di grandi numeri di cellule e minimizzano l'errore statistico.

Riproducibilità delle procedure di conteggio cellulare del sangue

	Coefficienti di variazione	
Tipo cellulare contato	Emocitometro manuale (%)	Automated Hematology Analyzer (%)
Globuli rossi	±11.0	±1.0
Globuli bianchi	±16.0	±1.5
Piastrine ^b	±22.0	±2.0
Reticolociti	±33.9	±5.0
^a Minimum error. Usual error.		
^b Error may be greater with low ($<35 \times 10^9/L$) or very high ($>450 \times 10^9/L$) platelet counts.		
Data derived from Bentley S, Johnson A, Bishop C. A parallel evaluation of four automated hematology analyzers. Am J Clin Pathol 1993;100:626-632; and Wintrobe M. A simple and accurate hematocrit. J Lab Clin Med 1929;15:287-289.		

Conteggi cellulari

- I conteggi manuali sono effettuati dopo una adeguata diluizione del campione con un *emocitometro*, una camera specificamente costruita per contenere determinati volumi.
- Le cellule sono quindi contate con un microscopio.
 - Si possono contare GR, GB e PLT.
- A causa della imprecisione del conteggio manuale e del tempo richiesto, la maggior parte dei conteggi cellulari sono oggi effettuati con metodiche automatizzate.



CONTEGGIO DELLE CELLULE CON LA CAMERA DI BURKER

Per contare le cellule con la camera di Burkner, si agita bene la sospensione cellulare usando una pipetta di plastica sterile da 2 o 5 mL, evitando la formazione di bolle e schiuma. Quindi si prelevano circa 0.2 mL di sospensione che vengono messi in una provetta Eppendorf non sterile. A questo punto la provetta Eppendorf viene portata fuori dalla cappa sterile e le cellule vengono contaminate.

Per valutare la mortalità cellulare, le cellule sono colorate diluendo il campione 1:1 con una soluzione di Trypan blue allo 0.5% (p/v) in PBS. Il colorante diffonde solo nelle cellule la cui permeabilità di membrana è fortemente danneggiata, il che implica che le cellule che appariranno colorate in blue sono le cellule da considerare morte.

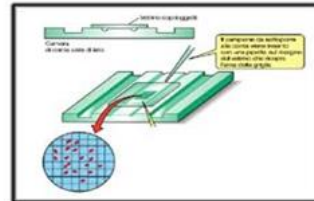
Il Trypan Blue ha un effetto tossico, quindi il colorante va aggiunto solo poco prima di effettuare la conta con il microscopio ottico.

Si deve preparare la diluizione con il Trypan Blue con precisione perché è necessario conoscere esattamente il fattore di diluizione per risalire poi alla concentrazione di cellule presente nel campione analizzato.

PROCEDIMENTO

- Controllare che la Burkner sia pulita e montata correttamente, cercando di osservare gli anelli di Newton.
- Prelevare una piccola quantità del campione da contare e appoggiare la punta della pipetta contro il bordo del vetrino coprioggetto. Lasciare fuoriuscire una goccia del campione che per capillarità si diffonderà nella camera di Burkner.
- Contare le cellule contenute nei quadrati disposti sulle diagonali della camera e calcolare il numero medio di cellule per quadratino. La camera di Burke ha due settori, uno in alto e uno in basso; ciascun settore è costituito da $12 \times 12 = 144$ quadratini da $1/250 \mu\text{L}$. Se si contano le cellule contenute nei quadratini lungo le diagonali della camera di Burkner si contano 48 quadratini, ovvero 24 quadratini per ciascun settore.

1												13
	2											14
		3										15
			4									16
				5								17
					6	18						18
					19	7						19
							8					20
				21				9				21
			22						10			22
		23								11		23
24												12



Schema di un settore della camera di Burkner

- Sapendo che ogni quadratino corrisponde ad $1/250 \mu\text{L}$ e che si sono diluite le cellule 2 volte con il Trypan Blue, il n. medio di cellule per quadrato (N) va moltiplicato per 250 (in modo da avere le cellule in $1 \mu\text{L}$ nella sospensione diluita con il colorante), per due (per avere le cellule per μL della sospensione originale) ed infine per mille in modo da ottenere le cellule in 1 mL della sospensione originale.

$$\text{Numero di cellule in 1 mL} = N/48 \times 250 \times 2 \times 1000$$

dove:

N è il numero di cellule che si contano all'interno dei quadrati lungo le 4 diagonali della camera di Burkner

48 sono i quadrati che costituiscono le 4 diagonali della camera di Burkner

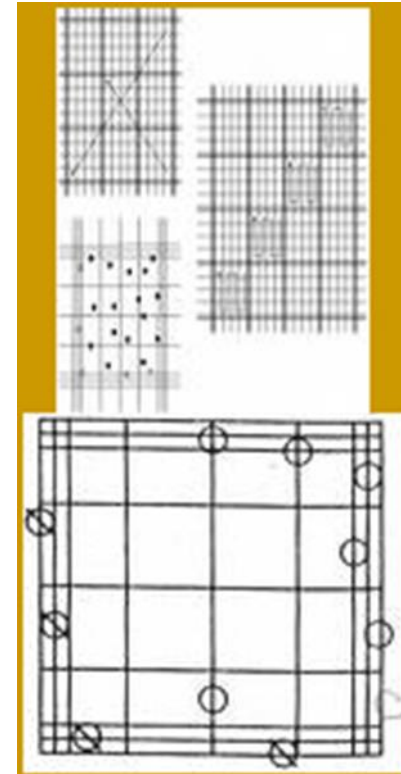
250 è il fattore che considera il volume di ciascun quadratino della camera di Burkner

2 è il fattore di diluizione (dipende dal volume di Trypan Blue aggiunto)

1000 è il fattore di conversione da μL a mL.

Se si vuole calcolare il numero di cellule totali contenute nella fiasca si moltiplica il numero di cellule in 1 mL per il volume totale della sospensione cellulare in mL.

Camera di Burkner



Conteggio cellulare automatizzato

- I contatori automatizzati aumentano l'accuratezza e la velocità di analisi, sptt nella fase di accettazione, campionamento, diluizione del campione, e le analisi sono incorporate in un unico sistema con minima manipolazione da parte dell'operatore
- Con i livelli di automazione sempre maggiori, alcuni analizzatori sono oggi completamente automatizzati ed inseriti in linea con altre strumentazioni di analisi che utilizzano la stessa provetta.
- Ci sono numerosi e diversi sistemi automatizzati per l'ematologia a seconda delle diverse esigenze.

Contatori automatici

- La maggior parte dei contatori automatizzati effettuano tutta una varietà di analisi includenti il dosaggio dell'emoglobina, il conteggio dei GR, delle piastrine e dei GB con la formula differenziale, il conteggio dei reticolociti.
- I metodi automatici per la determinazione della formula leucocitaria usano diverse tecnologie, tra cui le più importanti sono basate sulla misura della variazione nelle impedenza elettrica e sull'uso della differenza nella scatterizzazione della luce o delle proprietà ottiche, sia da soli che in combinazione.

Contatori automatici

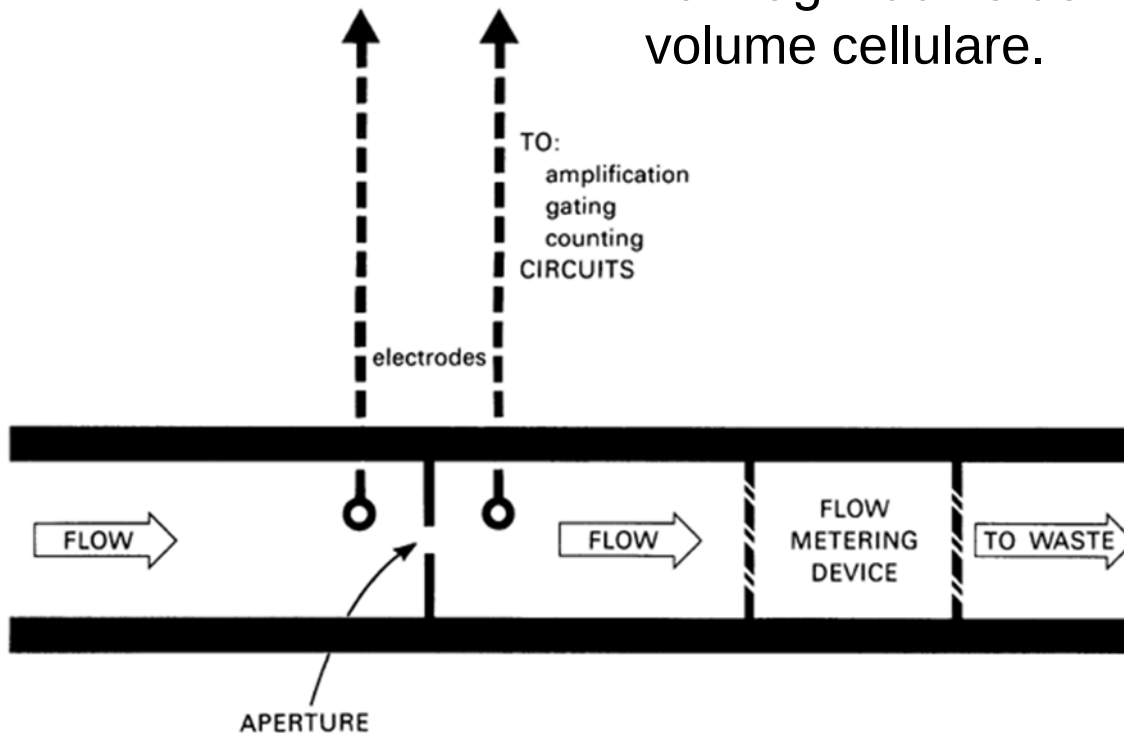
- Avanzamenti tecnologici
 1. strisciatori automatici di sangue periferico con sistemi di acquisizione digitale delle immagini delle cellule ematiche e elaborazione di formule in modo automatico
 2. Possibilità di incorporare un laser ad argon negli analizzatori automatici, cosicché si possono utilizzare anche alcuni dati citofluorimetrici con specifici anticopri monoclonale per riconoscere alcune specifiche popolazioni cellulari quali i linfociti T CD4 e CD8 o le cellule staminali CD34+.

Contatori Apertura-Impedenza

- Questo tipo di analizzatori.
 - contano le cellule in una piccola apertura misurando le **modificazioni nella resistenza elettrica** mentre la cellula passa attraverso l'orifizio.
 - Una corrente costante passa tra 2 elettrodi di platino su entrambe le parti dell'orifizio.
 - Il diluente che risospende le cellule è maggiormente elettricamente conduttivo delle cellule.
 - Pertanto, al passaggio delle cellule attraverso l'orifizio, c'è una momentanea **riduzione nella conduttanza elettrica** cosicché viene generato un impulso elettrico che viene registrato elettronicamente.
 - **La riduzione in voltaggio è proporzionale alla dimensione cellulare**, permettendo in tal modo la determinazione contemporanea che della dimensione cellulare media.

Analizzatori ematologici automatica basati sull'impedenza

Il passaggio della cellula attraverso l'apertura,
altera il flusso di corrente tra gli elettrodi,
generando un impulso elettrico.
Ciascun impulso è registrato elettronicamente.
La magnitudine dell'impulso è proporzionale al
volume cellulare.



Contatori automatici

- Gli strumenti che utilizzano la tecnologia apertura impedenza **necessitano di sospensioni cellulari che determino il passaggio di singole cellule** attraverso la corrente elettrica.
- Quando le cellule non passano attraverso il centro dell'apertura o quando passano più di una alla volta vi sono **distorsioni dell'impulso elettrico**.
- I dati possono essere **corretti elettronicamente** allo scopo di escludere i picchi distorti, e possono essere posti limiti superiori ed inferiori al volume cellulare per escludere aggregati e frammenti cellulari
- Utilizzando poi **parametri di limiti in dimensione**, lo strumento può essere utilizzato per contare cellule di diverse dimensioni.
- La maggior parte delle moderne strumentazioni può essere inoltre settata in modo **da segnalare allarmi o risultati sospetti che richiedono una valutazione manuale**.

Contatori con metodica ottica

- L'altra tecnologia comunemente utilizzata nei contatori cellulari automatici si basa sulle proprietà di scatterizzazione della luce (light scatter) da parte delle cellule ematiche.
- In questi sistemi, il sangue diluito passa attraverso un rilevatore del flusso cellulare posizionato nel percorso di un raggio di luce generalmente laser.
- Quando le cellule passano attraverso la camera di conteggio, **interrompono o alterano il raggio di luce**, generando così un impulso elettrico che viene registrato.

Contatori con metodica ottica

- **Le caratteristiche di light scattering** utilizzando diversi angoli di rilevazione vengono quindi utilizzate per determinare **la dimensione, il volume e la forma cellulare, e la complessità citoplasmatica.**
- I sistemi ottici contano i globuli rossi, i globuli bianchi e le piastrine con una precisione equivalente a quella osservata negli strumenti con metodo impedenzometrico.
- Come per gli strumenti impedenzometrici, anche questi analizzatori possono essere processare più di cento campioni all'ora e hanno la capacità di fornire **segnali di allarme** per parametri anomali.

Metodo ottico

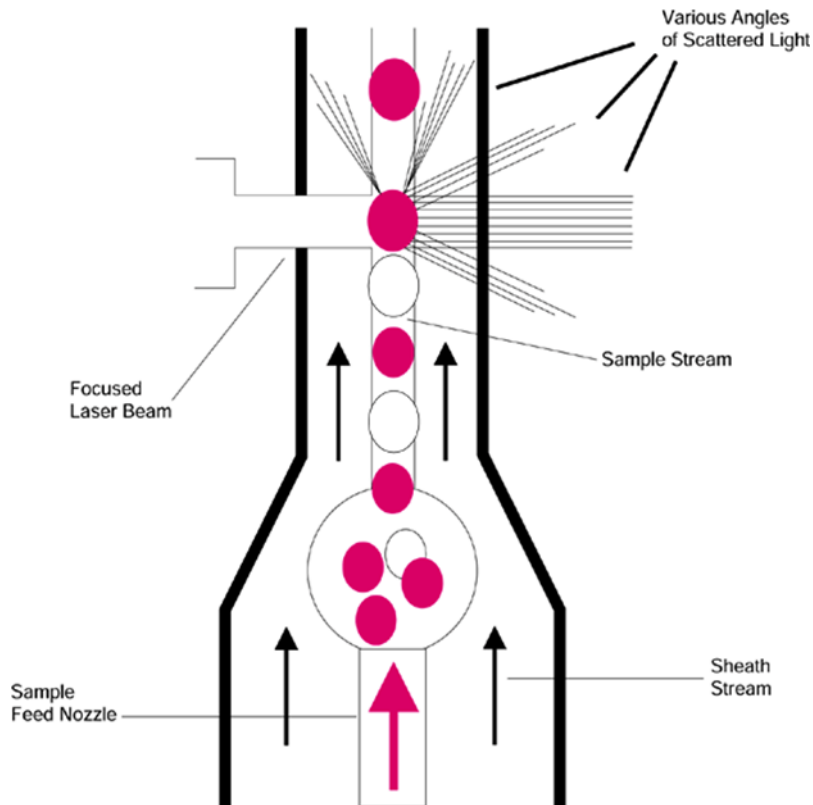
Analizzatore cellulare di tipo ottico.

Una sospensione di cellule passa attraverso una camera di flusso in un flusso unicellulare.

Le cellule intercettano un raggio di luce laser.

La luce scatterizzata a diversi angoli viene registrata, generando segnali che vengono convertiti in segnali elettronici che forniscono informazioni relativamente alla dimensione, struttura cellulare, e granularità.

(Adapted from Cell-Dyn 3500 Operator's Manual: Abbott Diagnostics)



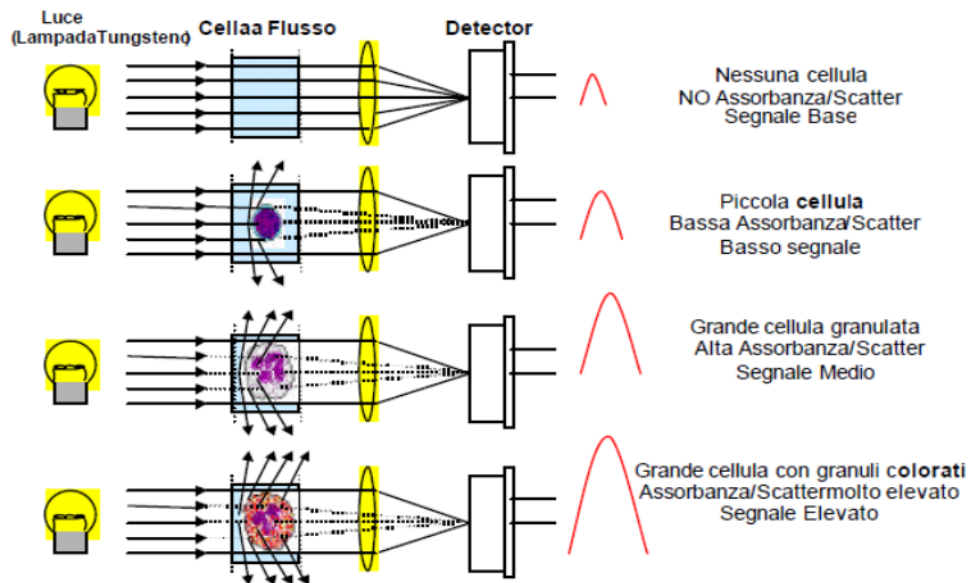


Figura 2. Analisi del segnale

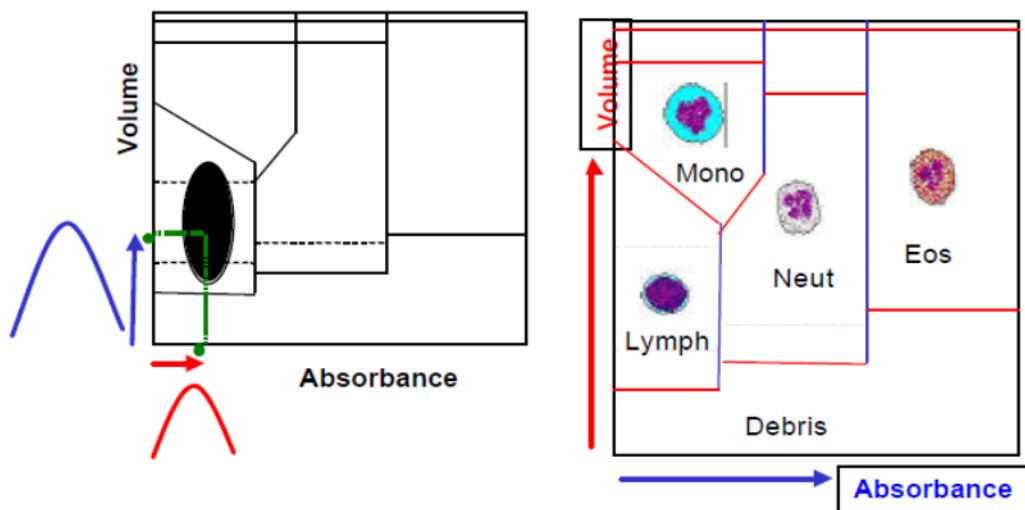


Figura 3. Correlazione tra segnali e popolazioni cellulari nel grafico DiffPlot

Contatori con metodo impedenzometrico ed ottico combinati

- Alcuni dei più nuovi contatori automatici combinano i metodi ad impedenza ed ottico nello stesso strumento, permettendo un uso ottimale e integrato dei dati generati da ciascun metodo.
- I dati generati includono conteggio differenziale dei leucociti in aggiunta al conteggio dei GR, GB, PLT, il conteggio dei reticolociti, Hb, l'ematocrito (Hct), il volume corpuscolare medio (MCV), l'emoglobina media corpuscolare, la concentrazione media corpuscolare di emoglobina (MCHC), l'ampiezza di distribuzione dei GR (RDW), ed il volume piastrinico medio (MPV).
- Questi strumenti possono analizzare più di 100 campioni all'ora, e forniscono segnali di allarme sia sulla popolazione dei GR che su quella dei GB, tra cui la presenza di cellule atipiche e/o blastiche.
- **Questi nuovi strumenti hanno anche una maggior precisione nella determinazione della formula leucocitaria riducendo il ricorso ad un intervento manuale.**

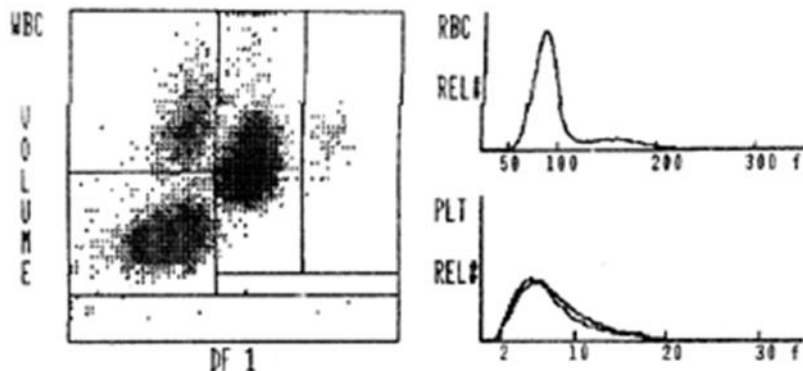
Cell Dyn Sapphire



COULTER® Ac-T™ 5diff AL (Autoloader)



Contatori automatici



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

Istogramma e referto generato dal Coulter STKR.

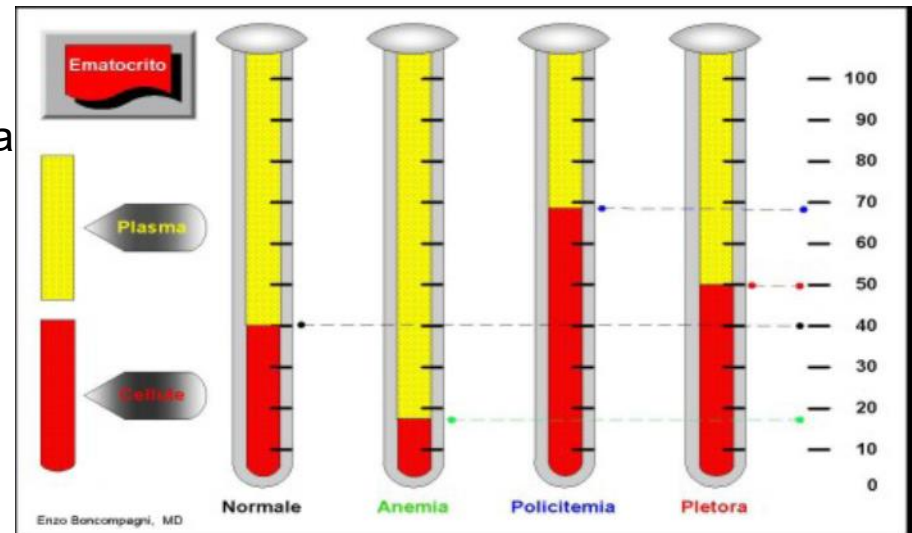
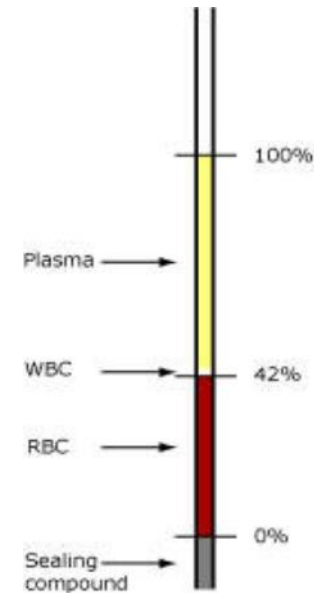
BA, basophil;
 EO, eosinophil;
 HCT, hematocrit;
 HGB, hemoglobin;
 LY, lymphocyte;
 MCH, mean corpuscular hemoglobin;
 MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration;
 MCV, mean corpuscular volume;
 MO, monocyte;
 MPV, mean platelet volume;
 NE, neutrophil;
 PLT, platelet;
 RBC, red blood cell;
 RDW, red cell distribution width; WBC, white blood cell.

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 come originariamente descritto da Wintrobe.
- 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.
- 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

- La determinazione manuale dell'Hct ha tipicamente una precisione [coefficiente di variazione (CV)] di circa il 2%.
- **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 usata come metodo di riferimento per quella automatica.
- 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

- L'emoglobina (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.

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

- I metodi manuali di conteggio dei GR si sono dimostrati essere inaccurati mentre molto più accurata è la metodica automatizzata.
- Sia i GR che i GB vengono contati dopo diluizione del sangue in un mezzo isotnico
- 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.
- Tuttavia, 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 osservata per il conteggio dei GR con gli analizzatori automatici è meno dell'1% (CV) a confronto di una precisione con i contatori manuali pari a circa l'11%.

Volume corpuscolare medio

- 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).
- Utilizzando metodi automatici, questo valore è derivato dividendo la somma dei volumi dei GR per il conteggio dei GR.
- 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

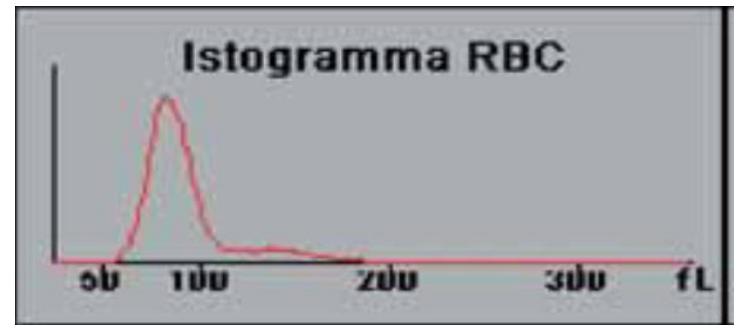
- *L'MCH* è una misura del contenuto emoglobinico medio per GR.
- Può essere determinato in modo manuale o automatico con la formula:
- **$MCH = Hb \text{ (g/dl)} / \text{conteggio dei GR (} 10^{12}/L)$**
- L'MCH è espresso in picogrammi (pg).
- L'MCH riflette la massa emoglobinica per GR.
- Nelle anemie nelle quali la sintesi dell'Hb è insufficiente (anemia ferro carenziale), la massa di 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 meno dell'1% per il metodo automatico e circa il 10% per quello manuale.

Concentrazione emoglobinica corpuscolare media

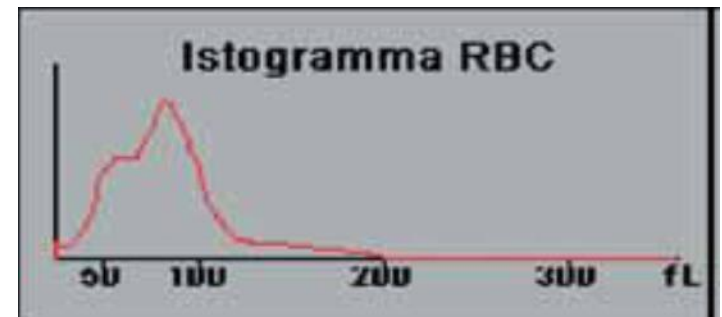
- MCHC è calcolata con la seguente formula:
- **$MCHC = Hb \text{ (g/dL)} / Hct$**
- L'MCHC è espresso in grammi di Hb per decilitro.
- Rappresenta la misura dell'Hb in relazione al volume del GR.
- Con l'eccezione della sferocitosi ereditaria ed alcuni casi di anemia a cellule falciformi o emoglobina 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

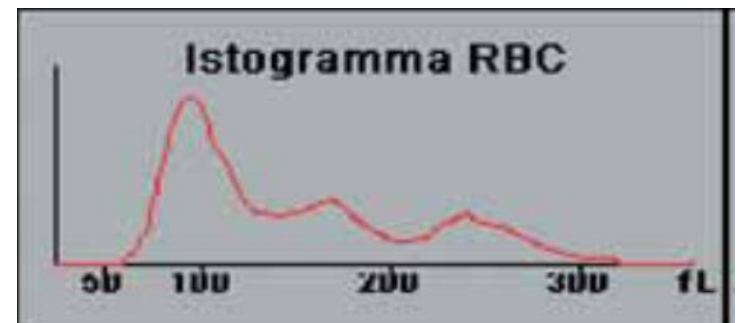
- MCV, MCH, e MCHC riflettono valori medi e possono non descrivere in modo adeguato il campione in esame sptt quando vi è una popolazione mista di GR.
- É pertanto importante valutare lo striscio di sangue periferico al microscopio ottico oltre che l'istogramma dei GR per evidenziare queste popolazioni 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

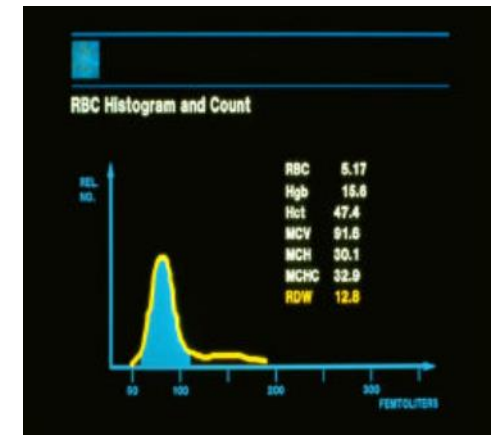
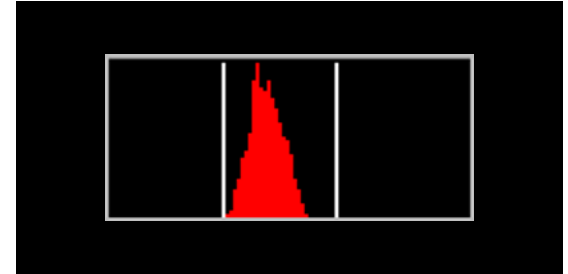


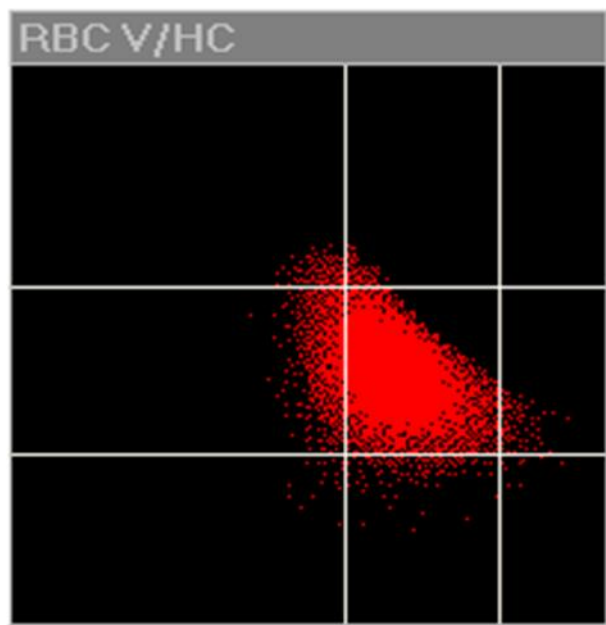
GR agglutinati

Ampiezza di distribuzione dei GR

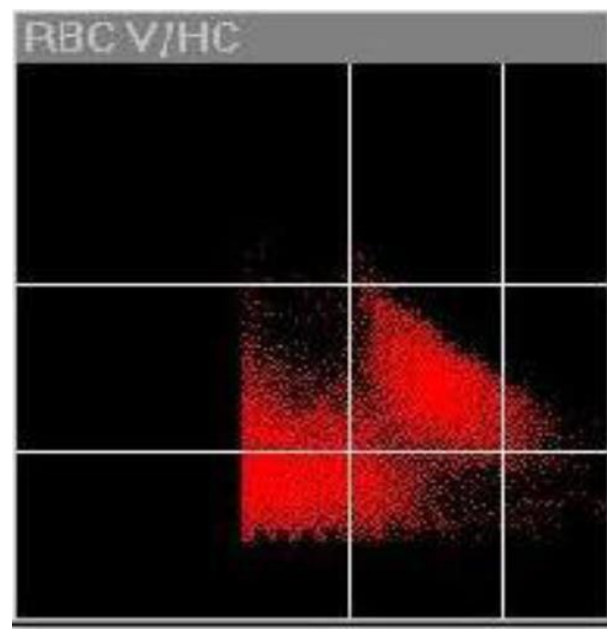
Red Cell Distribution Width

- 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 perchè 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 altri 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).





normale



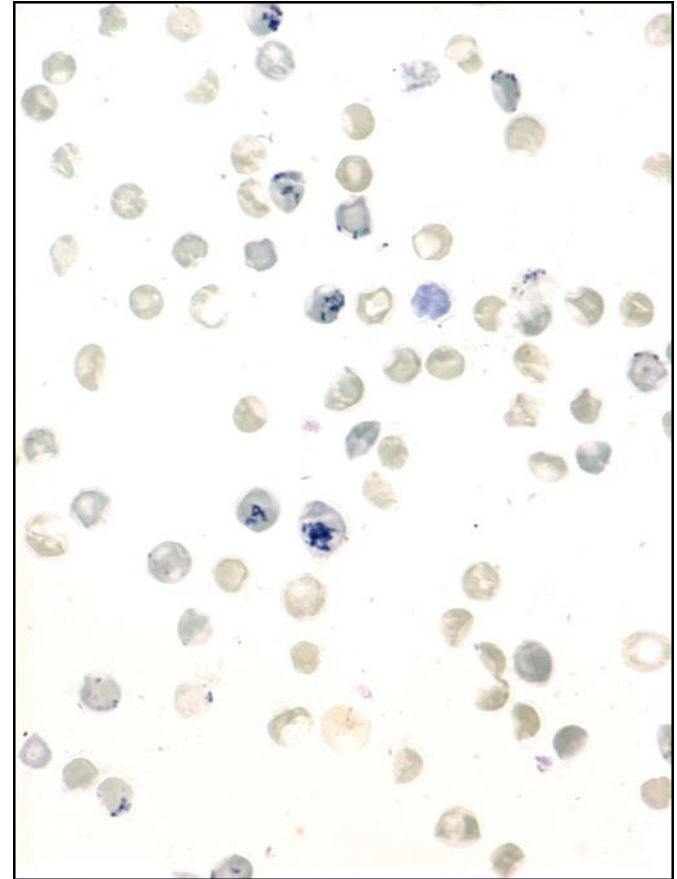
trasfuso

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 reticulociti

Il colorante penetra attraverso la membrana cellulare, colorando l'RNA nei reticulociti e il DNA/RNA nelle cellule nucleate.

I reticulociti sono separati dagli eritrociti maturi in funzione del differente contenuto di RNA e dalle cellule nucleate in funzione del differente contenuto di DNA/RNA.

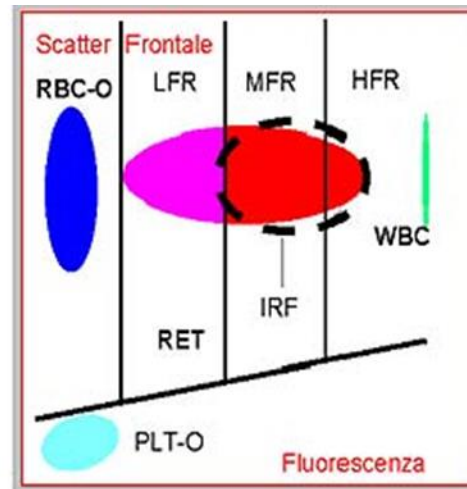
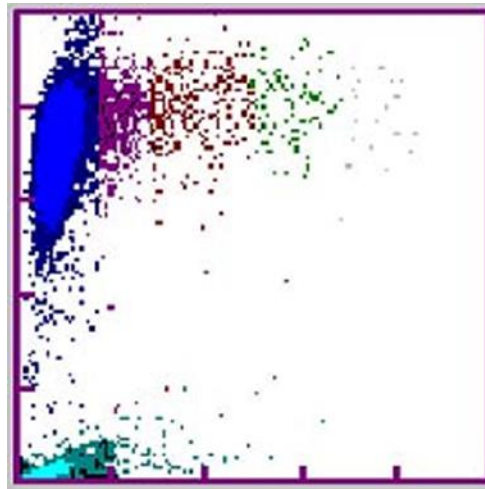
I reticulociti vengono identificati utilizzando il Forward Scatter ed il segnale di Side Fluorescence. Maggiore è il contenuto di acidi nucleici in una cellula e maggiore sarà il segnale di Side Fluorescence sull'asse X.

Maggiore è la dimensione di una cellula e maggiore sarà l'intensità del segnale di Forward Scatter sull'asse Y.

I reticulociti vengono suddivisi in 3 frazioni (HFR, MFR e LFR) in funzione della quantità di RNA.

I reticulociti sono chiaramente separati dai leucociti perchè, per le loro caratteristiche di fluorescenza e volume, i leucociti si collocano in un'area dello scattergrama RET nettamente distinta da quella dei reticulociti.

Il CV è compreso tra il 5-8%.



Analisi dei leucociti

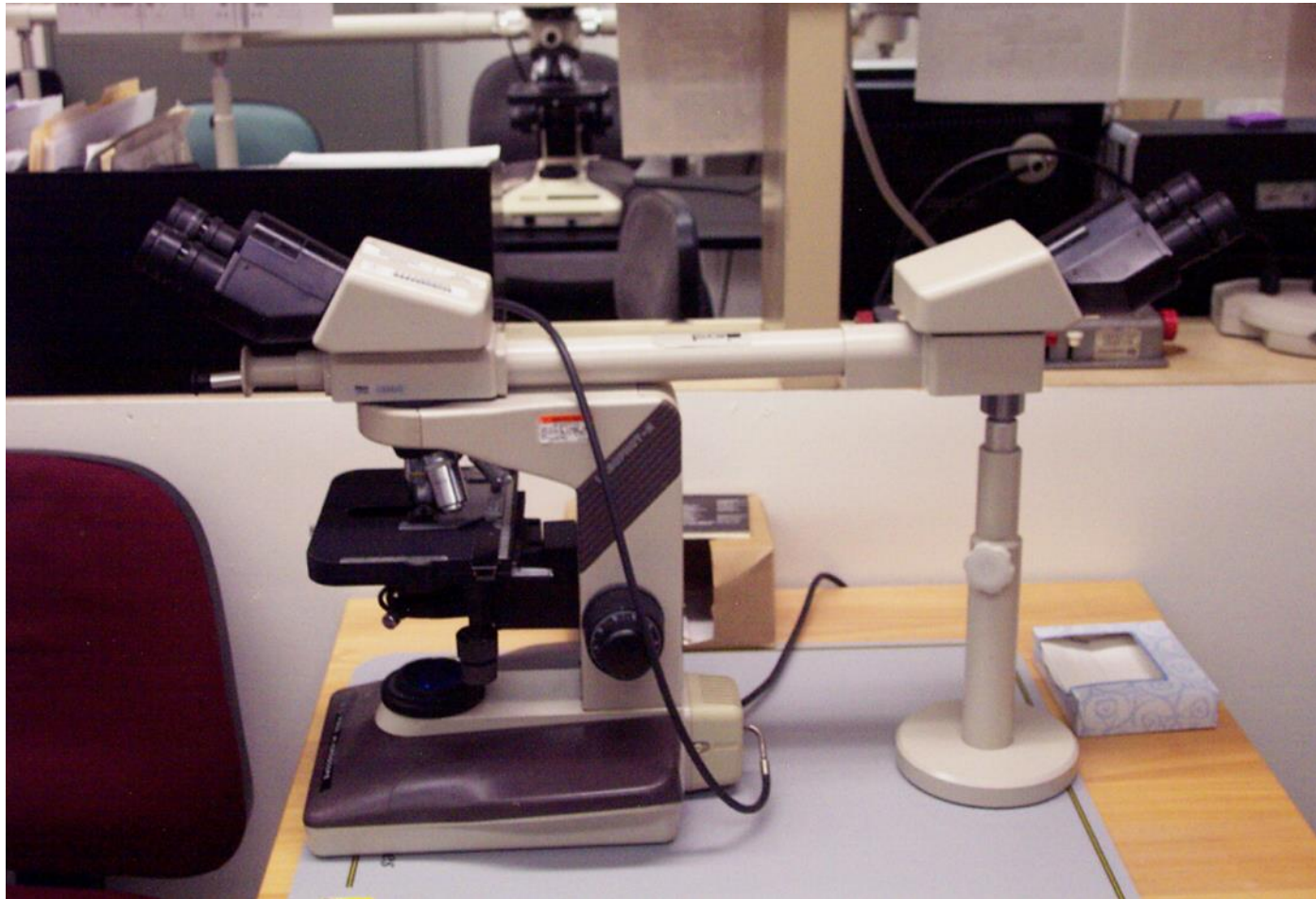
Conteggio dei globuli bianchi

- 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.

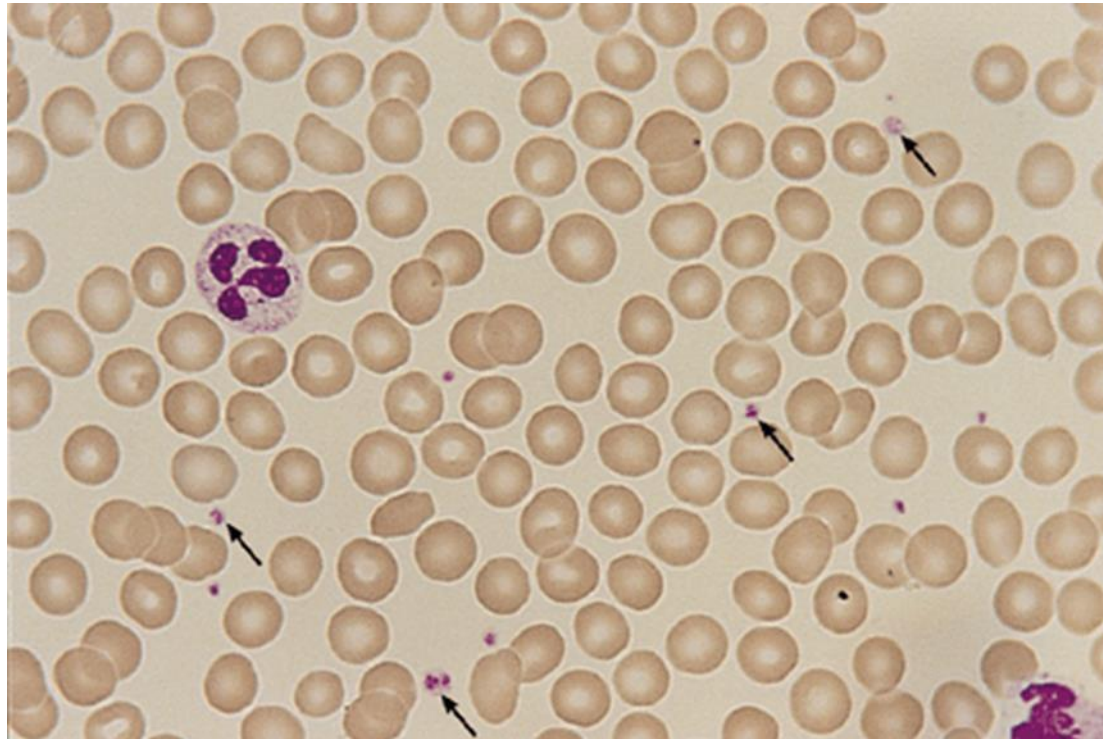
Conteggio differenziale dei leucociti

- La valutazione della formula leucocitaria (percentuale delle diverse popolazioni leucocitarie), fornisce importanti informazioni nella valutazione dei pazienti.
- Per il conteggio differenziale manuale dei leucociti (al microscopio ottico su strisci di sangue periferico) sono stati stabiliti degli standards di analisi proposti dal National Committee for Clinical Laboratory Standards allo scopo di consentire la riproducibilità dei risultati tra diversi laboratori.
- 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.

microscopio



Striscio di sangue periferico

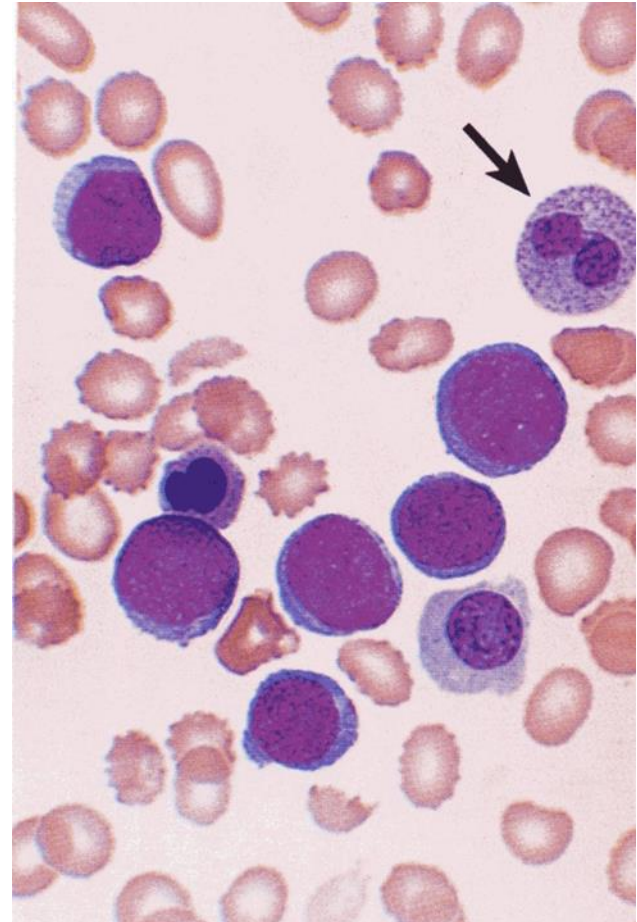


Conteggio differenziale manuale

- 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 perchè effettuano conteggi su un numero di cellule maggiore ed hanno un CV del 3-5%.

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

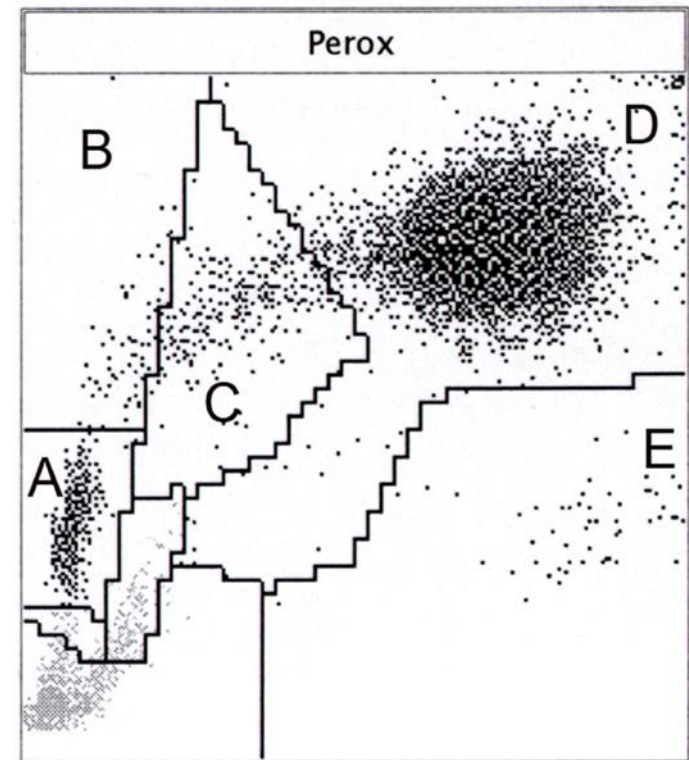
- I metodi di flusso consentono di analizzare grandi numeri di GB con elevati livelli di precisione rispetto ai metodi manuali.
- La determinazione dei GB si basa
 - o sulle dimensioni cellulari e le caratteristiche di colorazione citochimica)
 - o sul volume cellulare e la complessità interna misurata 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 una differenziazione in 6 popolazioni (neutrofili, linfociti, monociti, eosinofili, basofili, e LUC [large unstained cells]).

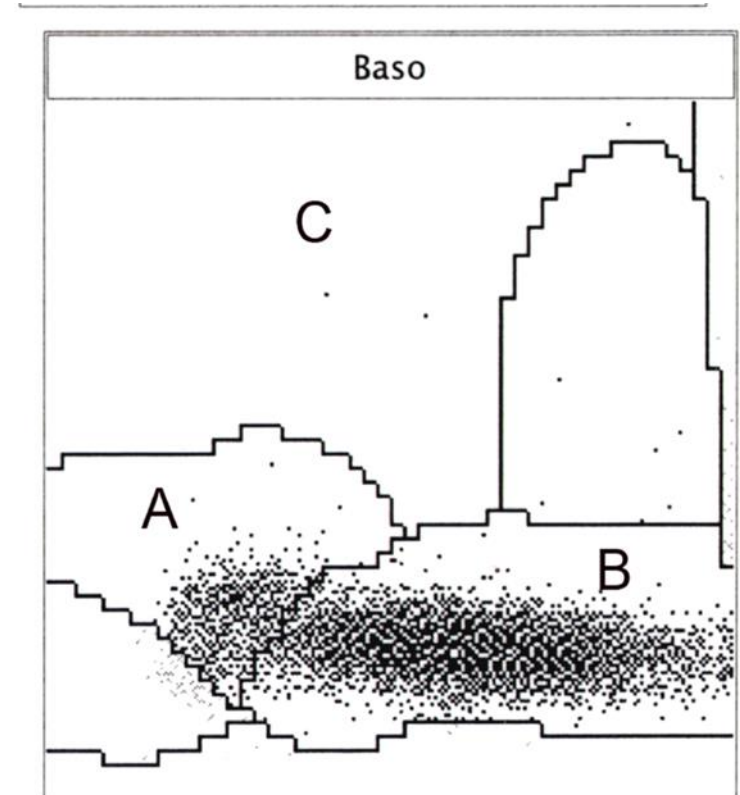
Conteggio differenziale automatico

- 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'area tra i neutrofili e le LUC.
- Il sistema utilizza soglie di MPO variabili per adattarsi alle differenze individuali di MPO.



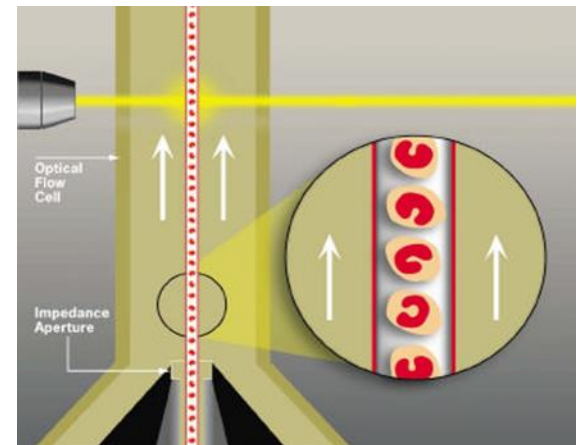
Conteggio differenziale automatico

- 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.

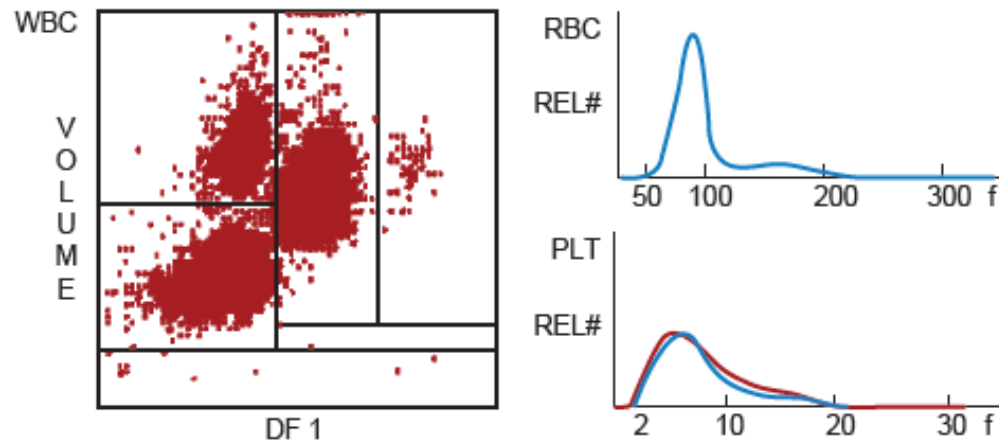


Conteggio differenziale automatico

- 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
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					

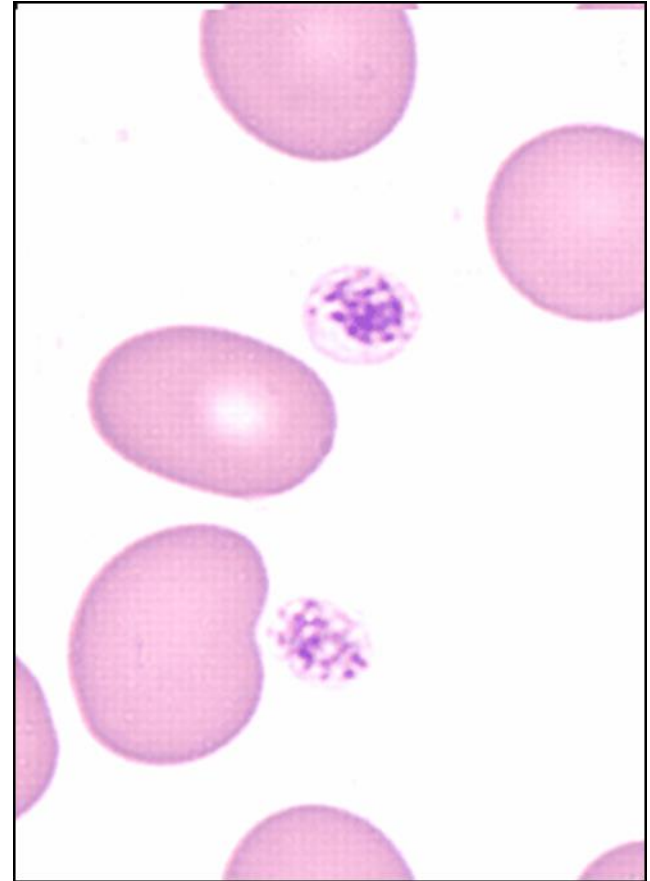
FIGURE 1.2. Histograms and printout generated by the Coulter automated hematology analyzer utilizing light scatter and electrical impedance. BA, basophil; EO, eosinophil; HCT, hematocrit; HGB, hemoglobin; LY, lymphocyte; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; 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

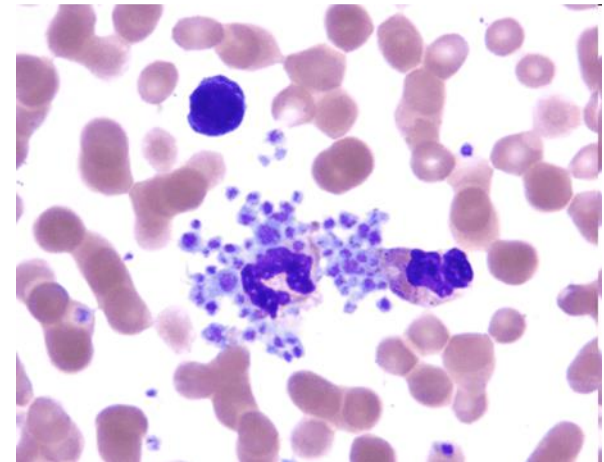
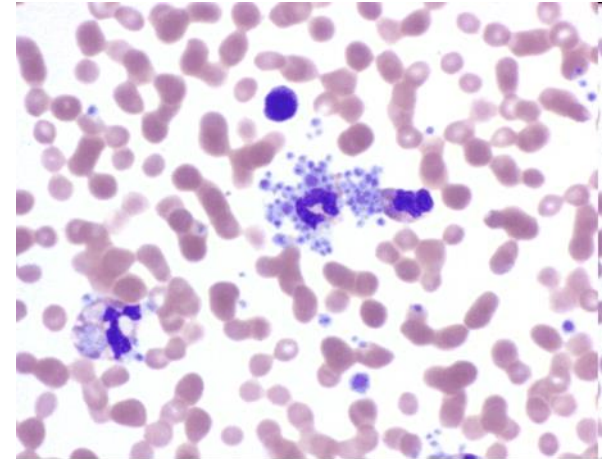
- Nei contatori automatici le piastrine sono conteggiate dopo rimozione dei globuli rossi per sedimentazione o centrifugazione o usando sangue intero.
- Le piastrine sono quindi identificate sulla base delle caratteristiche di impedenza, di scatterizzazione della luce od entrambe.
- In questo modo si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

- Pseudopiastrinopenia da EDTA
- 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 gli anticoagulanti 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

- Per esempio:
 - Ridotti livelli di GR, macrocitosi e valori molto alti di MCHC si possono osservare in pazienti con malattia da agglutinine fredde ed in alcuni pazienti con elevata viscosità serica.
 - Alti livelli di paraproteine possono dare valori falsamente alti di Hb pertanto 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

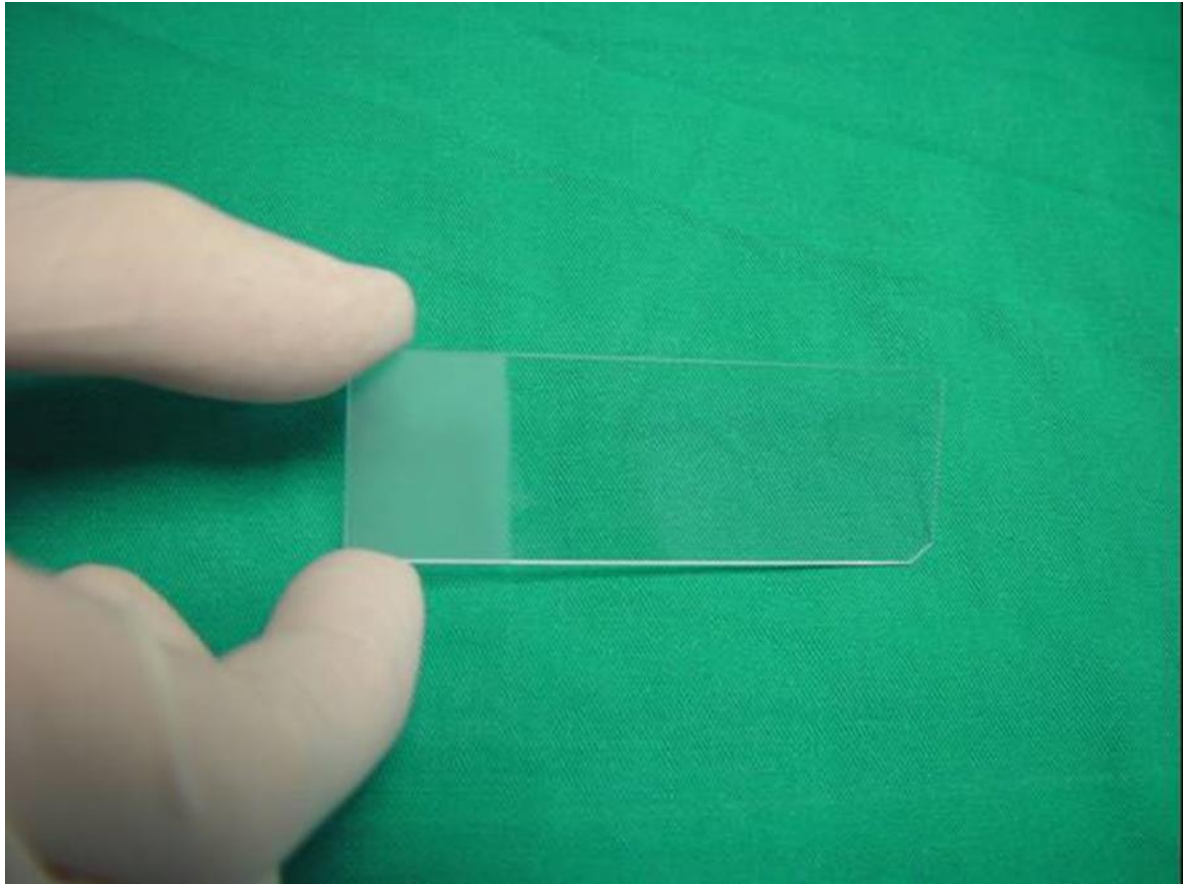
- Nonostante l'alto livello di accuratezza e precisione, i contatori automatici danno frequentemente allarmi falsamente positivi (fino al 10-25%), che richiedono una valutazione manuale dello striscio di sangue periferico.
- L'esame dello striscio di sangue periferico ha ancora un significato importante 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.

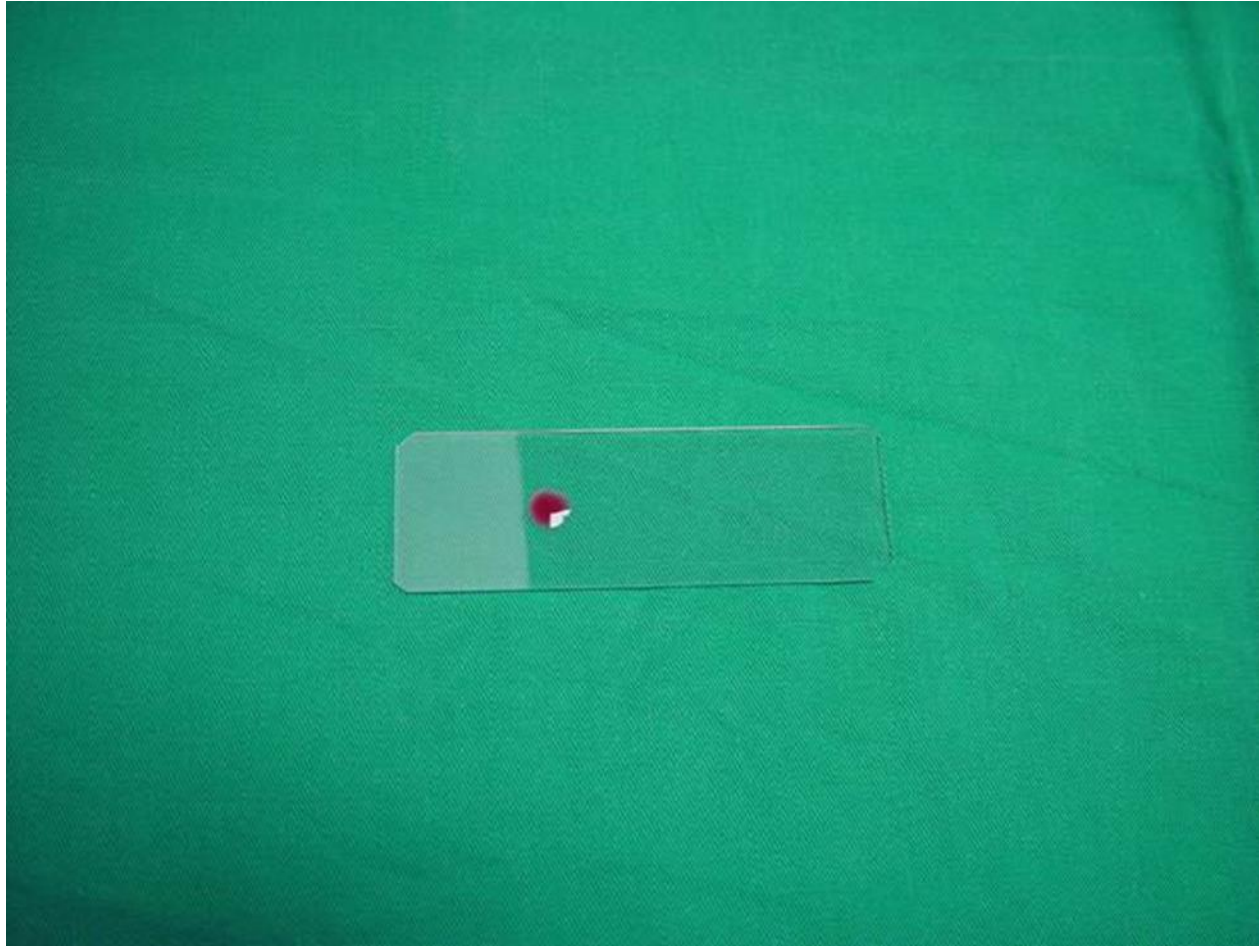
Analisi morfologica delle cellule del sangue

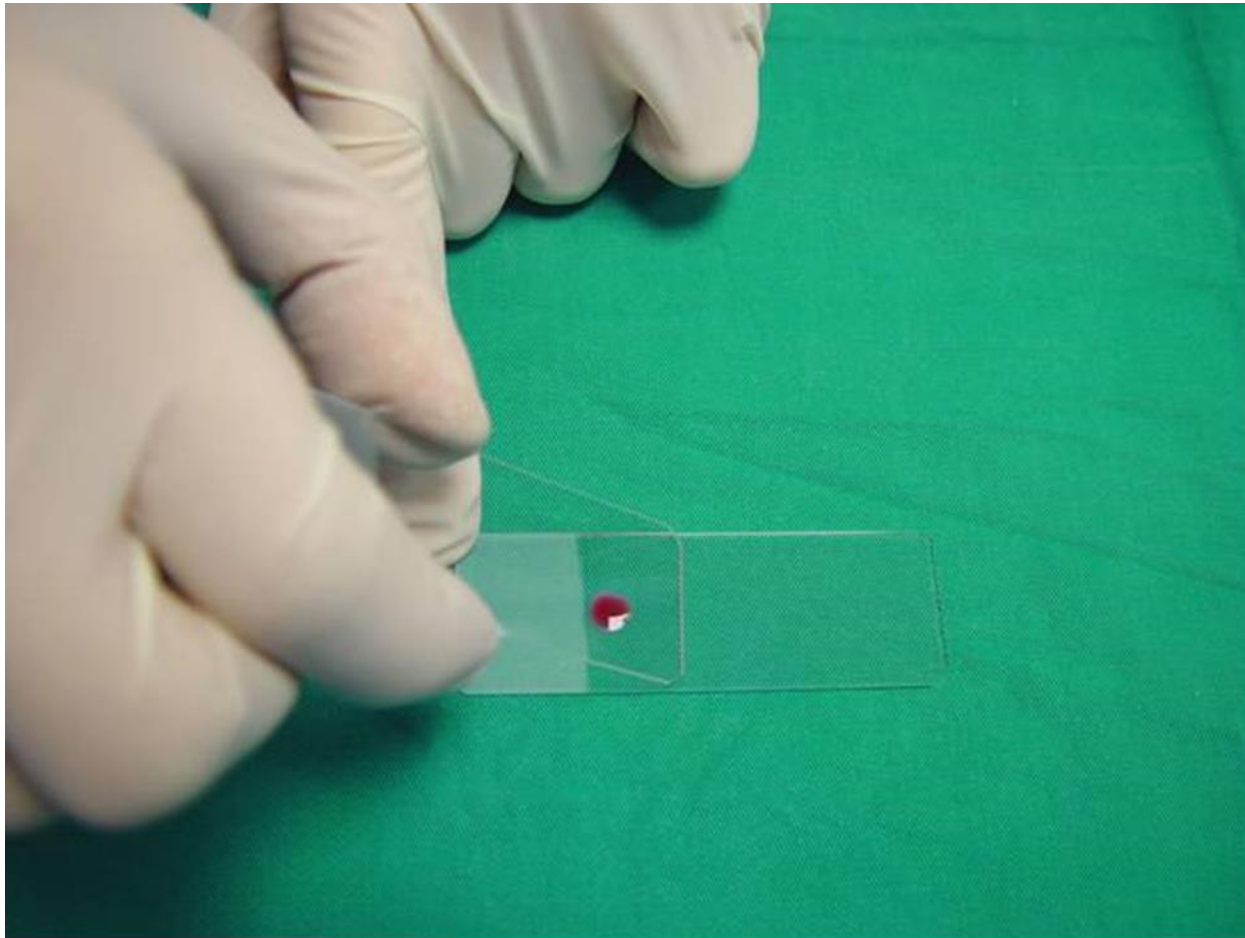
- Una attenta valutazione di preparati citologici ben allestiti è una tappa essenziale nella valutazione delle malattie ematologiche.
- Sebbene la diagnosi in alcune malattie possa essere suggerita già dallo strumento, molte malattie possono avere normali conteggi cellulari ma anomala morfologia cellulare.
- 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.

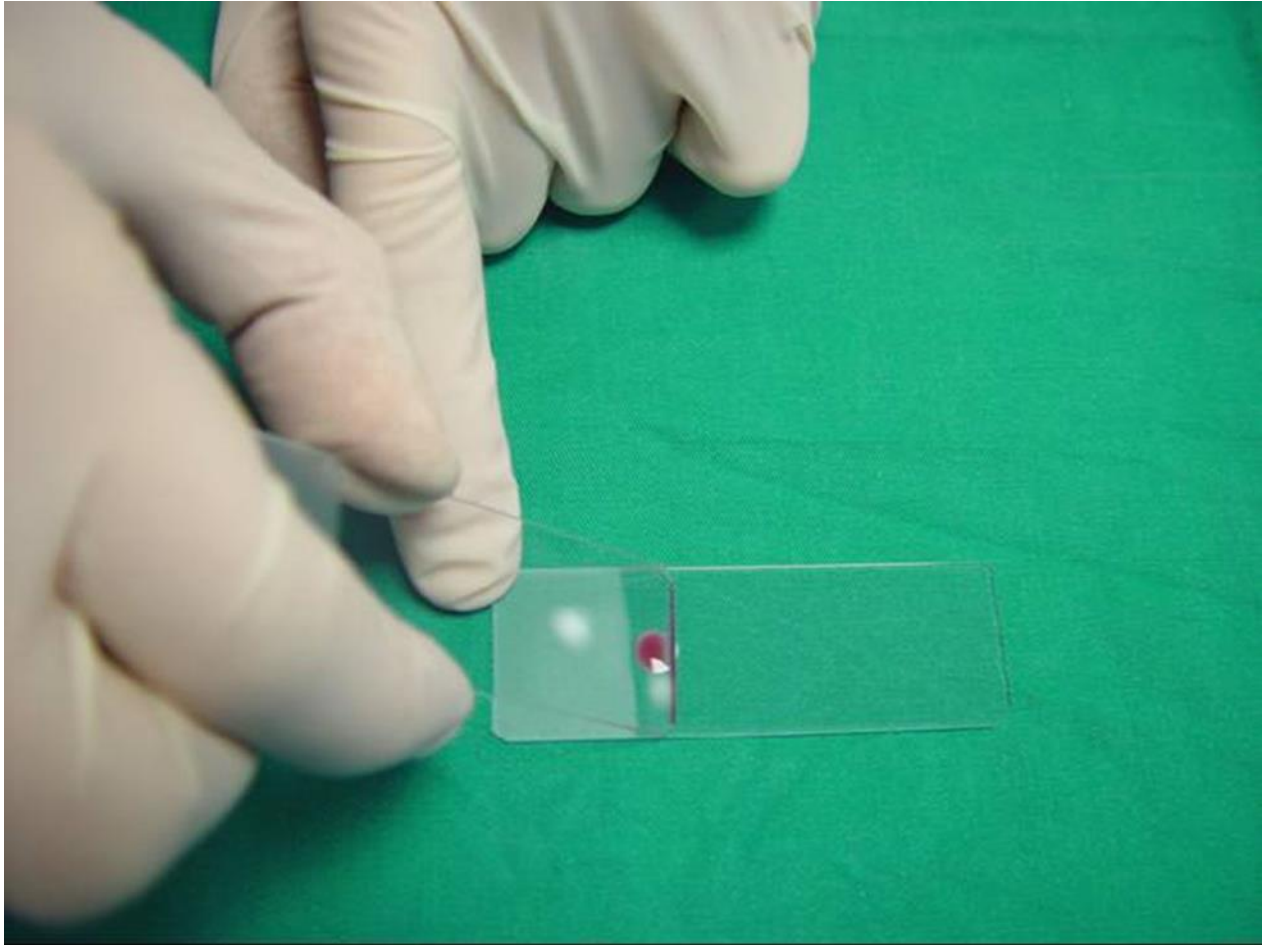
Preparazione degli strisci di sangue periferico

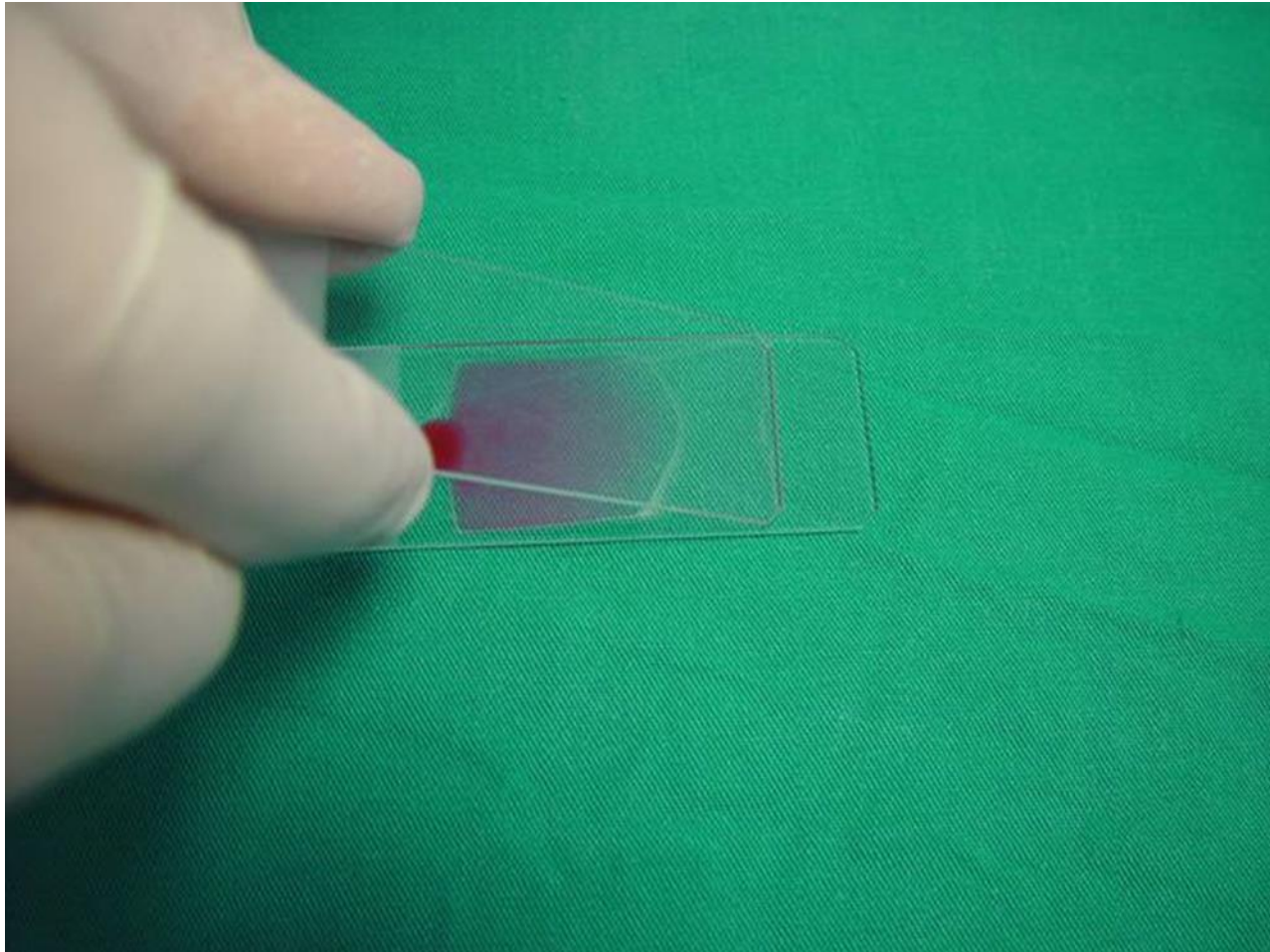
- Gli strisci di sangue periferico sono allestiti vetrini di vetro generalmente utilizzando sangue anticoagulato ottenuto dalla provetta utilizzata per il conteggio cellulare .
- Tuttavia l'anticoagulante può indurre la formazione di artefatti nella morfologia cellulare.
- La valutazione ottimale della 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.

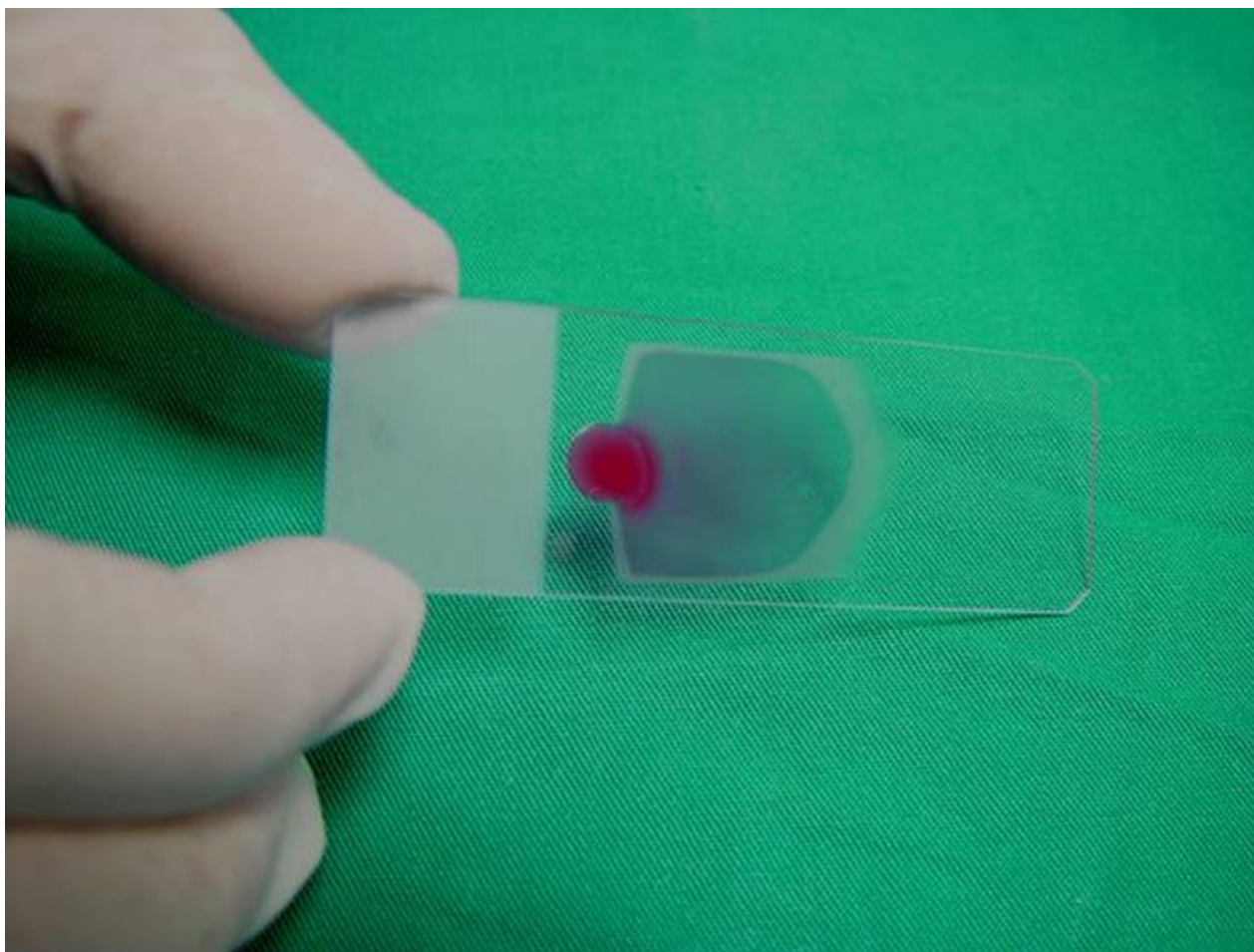












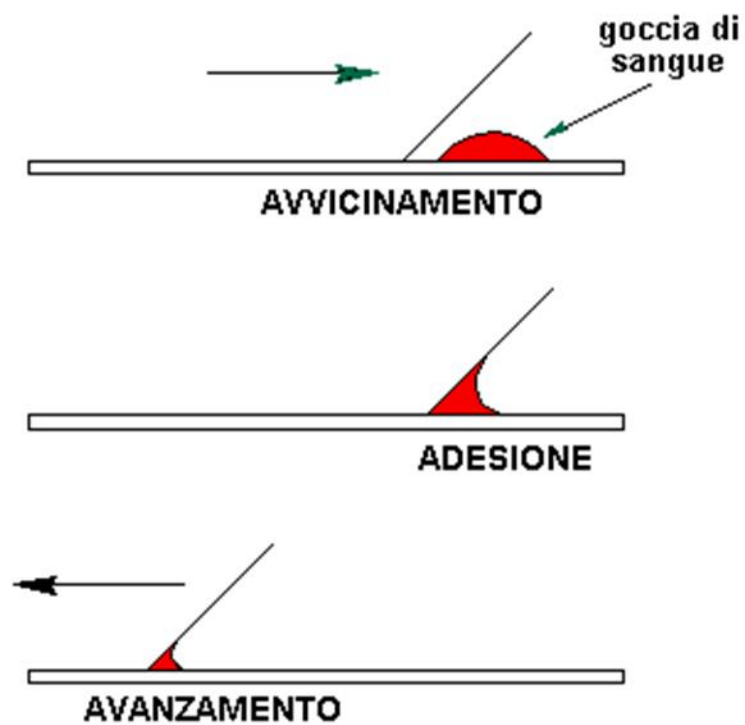
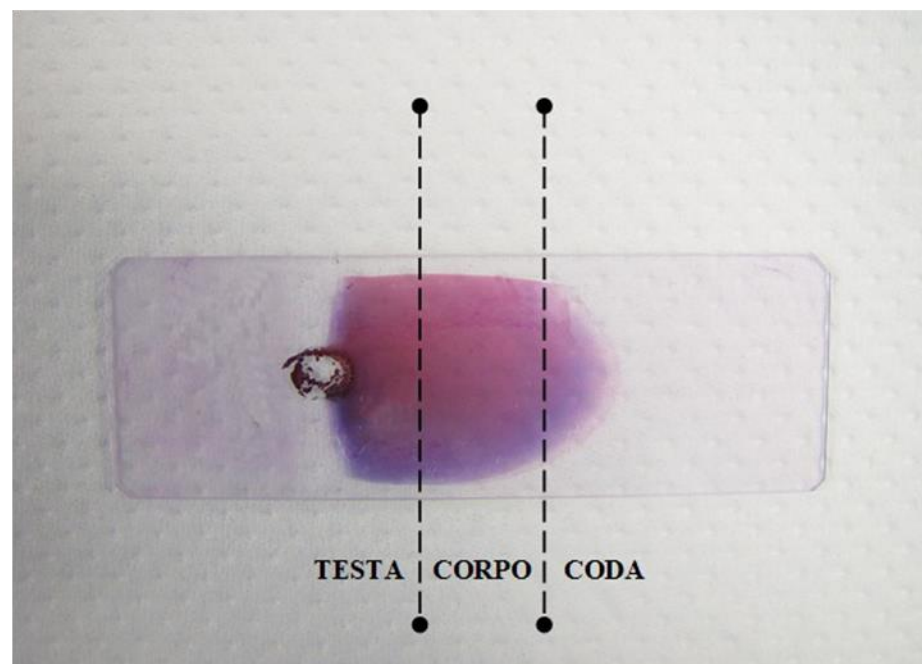


Fig. 7 - Come preparare uno striscio di sangue



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 viola-blu.
- I granuli dei neutrofili sono leggermente basici e si colorano debolmente con il componente 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

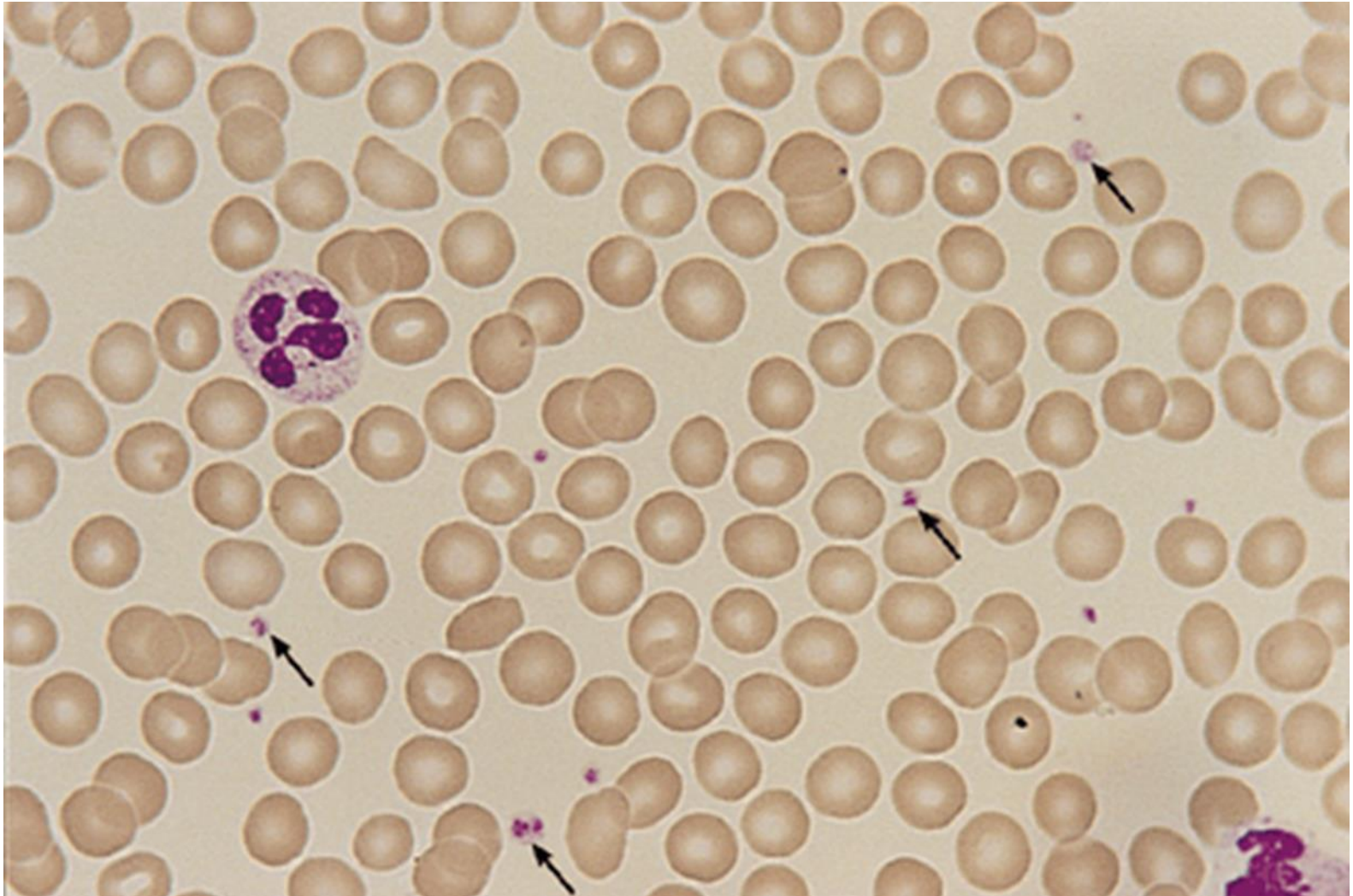
COLOUR RESPONSES OF BLOOD CELLS TO ROMANOWSKY STAINING

Cellular Component	Colour
Nuclei	
Chromatin	Purple
Nucleoli	Light blue
Cytoplasm	
Erythroblast	Dark blue
Erythrocyte	Dark pink
Reticulocyte	Grey-blue
Lymphocyte	Blue
Metamyelocyte	Pink
Monocyte	Grey-blue
Myelocyte	Pink
Neutrophil	Pink/orange
Promyelocyte	Blue
Basophil	Blue
Granules	
Promyelocyte (primary granules)	Red or purple
Basophil	Purple-black
Eosinophil	Red-orange
Neutrophil	Purple
Toxic granules	Dark purple
Platelet	Purple
Other Inclusions	
Auer body	Purple
Cabot ring	Purple
Howell-Jolly body	Purple
Döhle body	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
Too pink	Inadequate time in buffer solution Incorrect azure B:eosin Y ratio Impure dyes Buffer pH too low Excessive washing in buffer solution
Pale staining	Old staining solution Overused staining solution Incorrect preparation of stock Impure dyes, especially azure A and/or C High ambient temperature Insufficient azure B
Neutrophil granules not stained	
Neutrophil granules dark blue/black (pseudotoxic)	Excess azure B
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 anticoagulant

Striscio di sangue periferico



emocromo

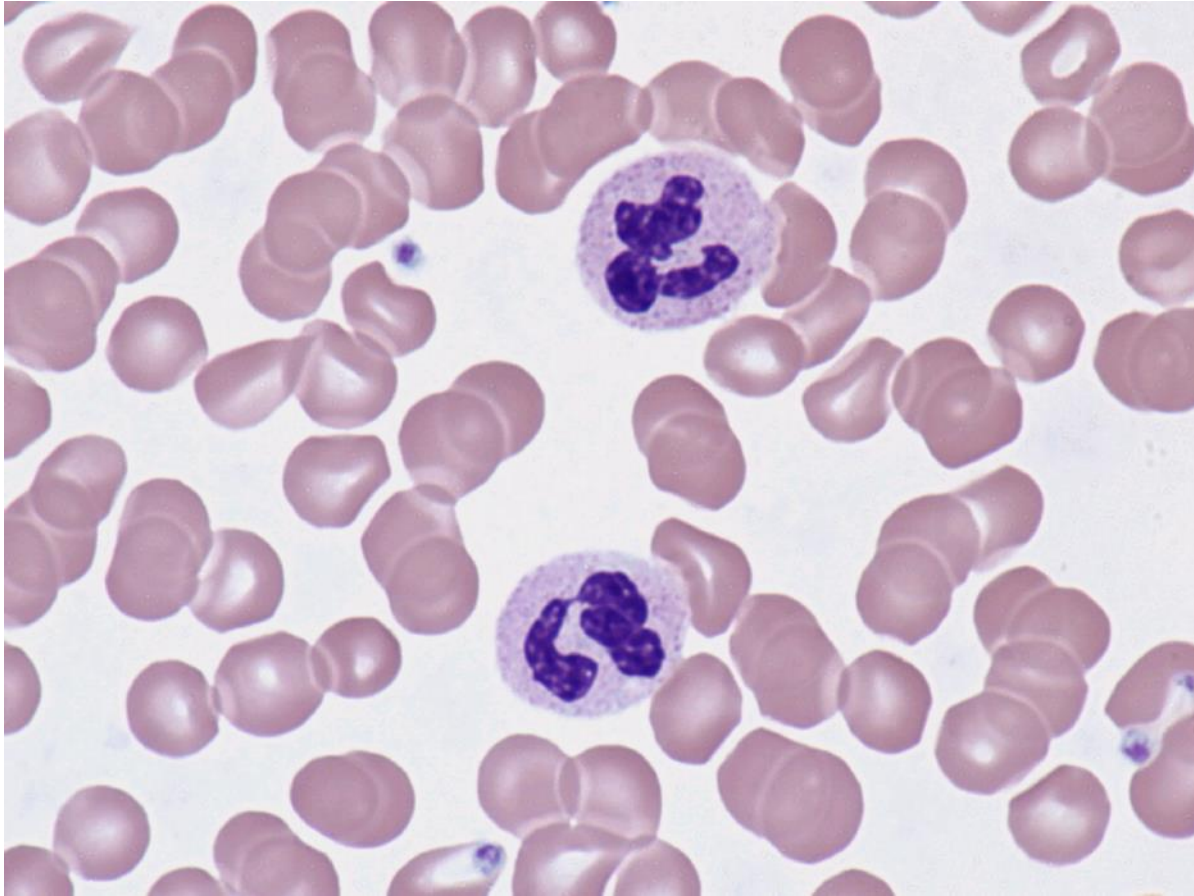
Emocromo

Globuli Bianchi	3.16	x10³/μl	5.20 - 12.40
Globuli Rossi	2.97	x10⁶/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	x10³/μl	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	x10³/μl	1.90 - 8.00
Linfociti	0.30	x10³/μl	0.90 - 5.20
Monociti	0.08	x10³/μl	0.16 - 1.00
Eosinofili	0.04	x10³/μl	0.00 - 0.80
Basofili	0.01	x10³/μl	0.00 - 0.20
LUC	0.29	x10³/μl	0.00 - 0.40

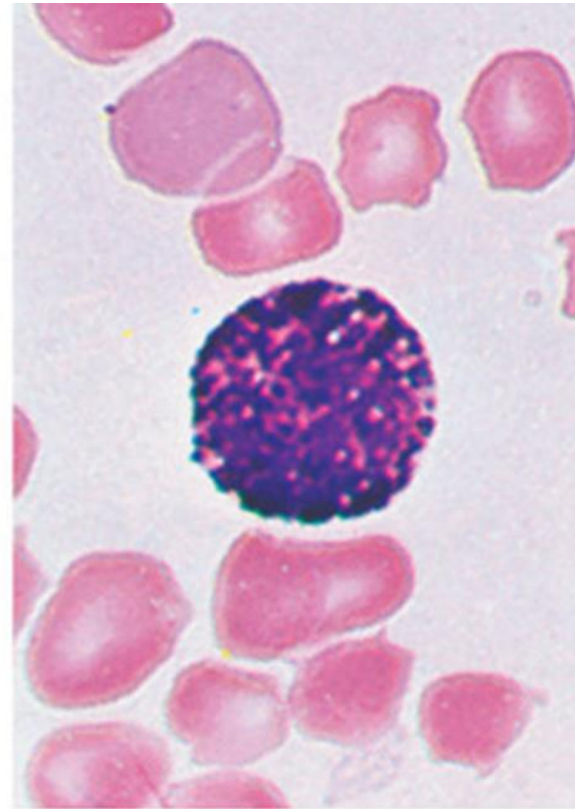
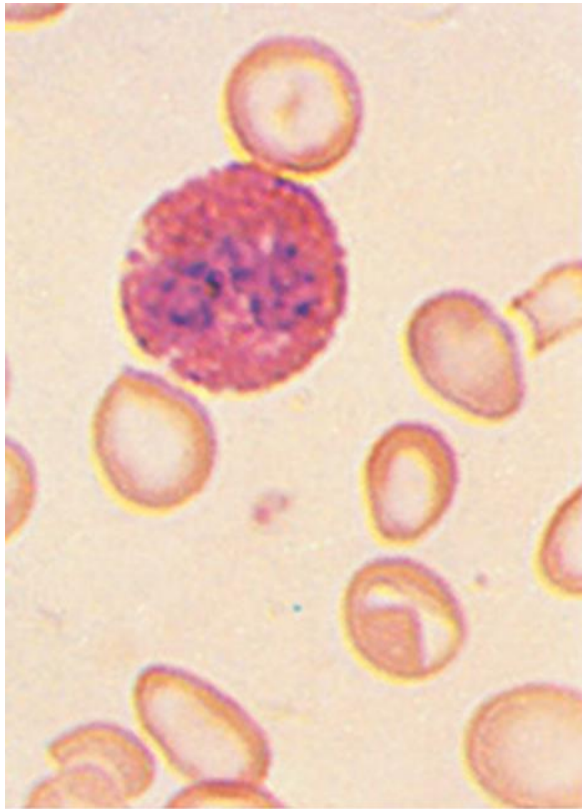
Esame degli strisci di sangue periferico

- Lo striscio di sangue dovrebbe essere dapprima esaminato a **piccolo intermedio ingrandimento** 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



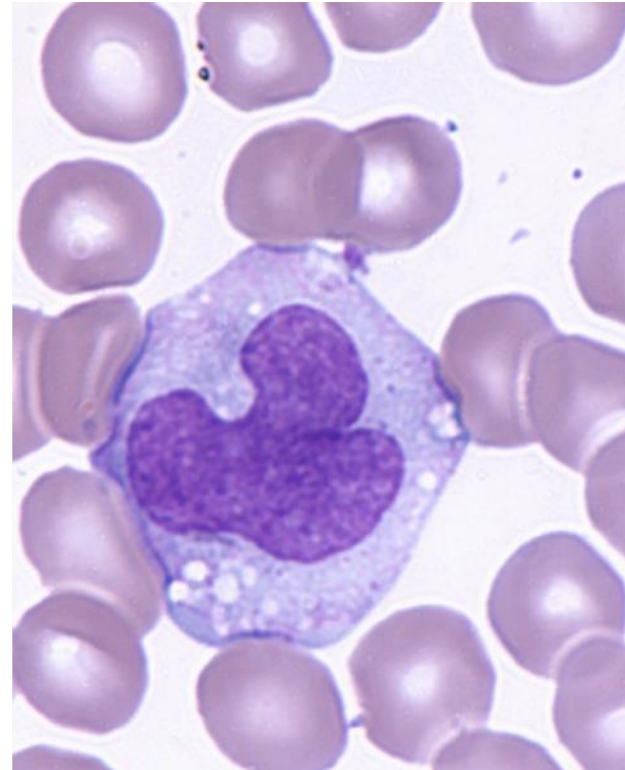
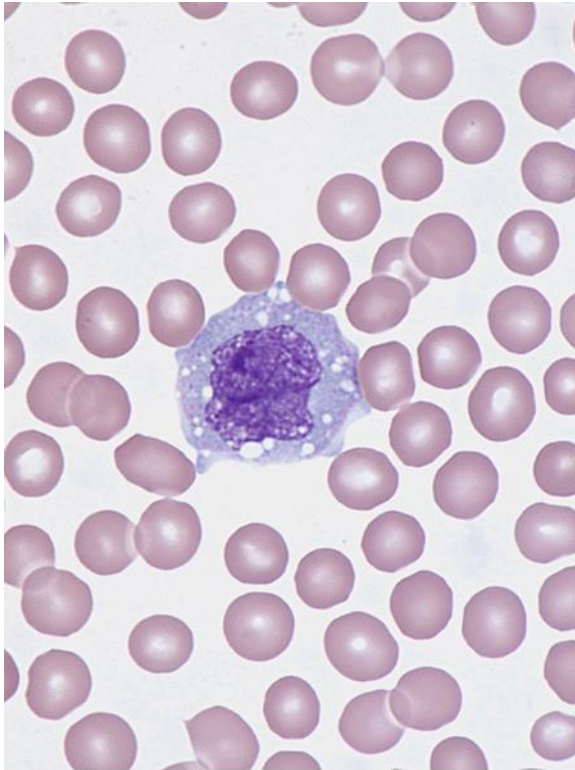
Eosinofilo e basofilo



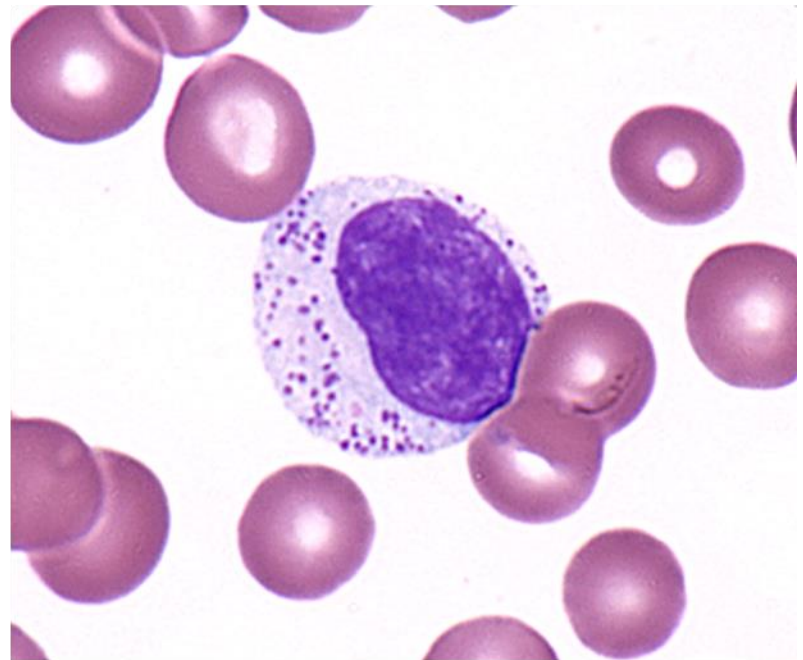
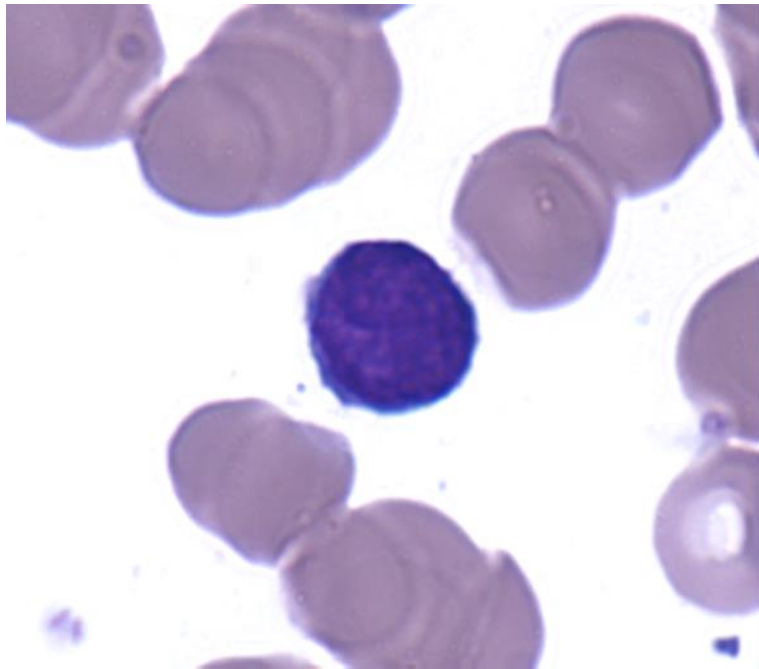
Source: Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition: <http://www.accessmedicine.com>

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

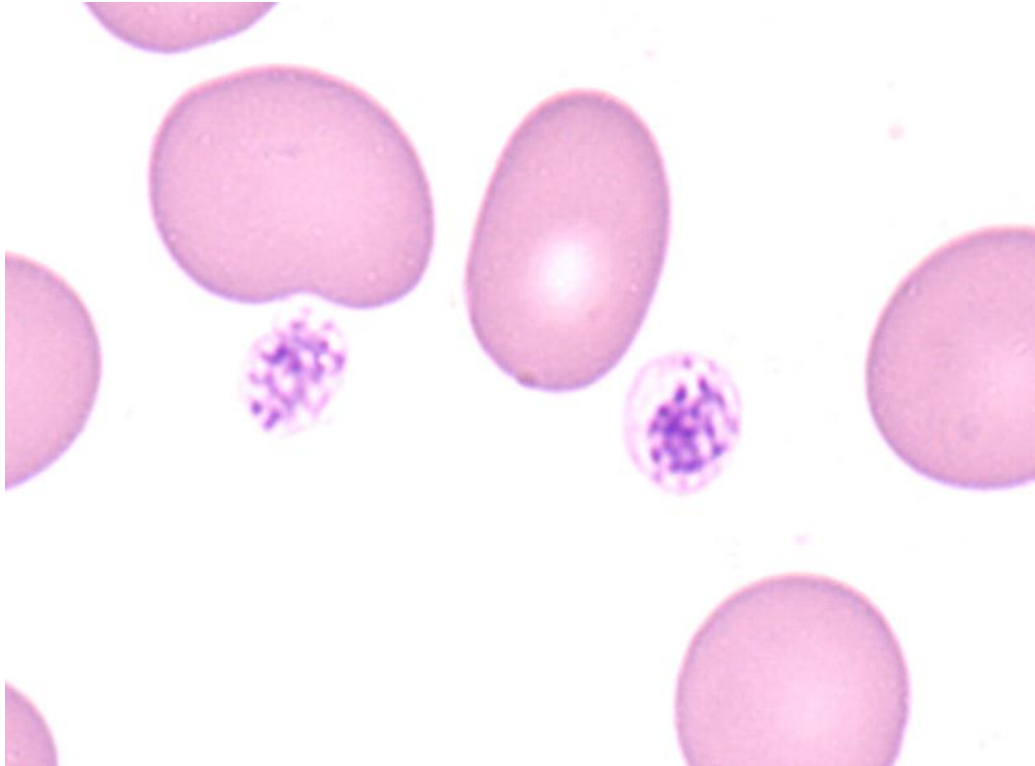
monociti



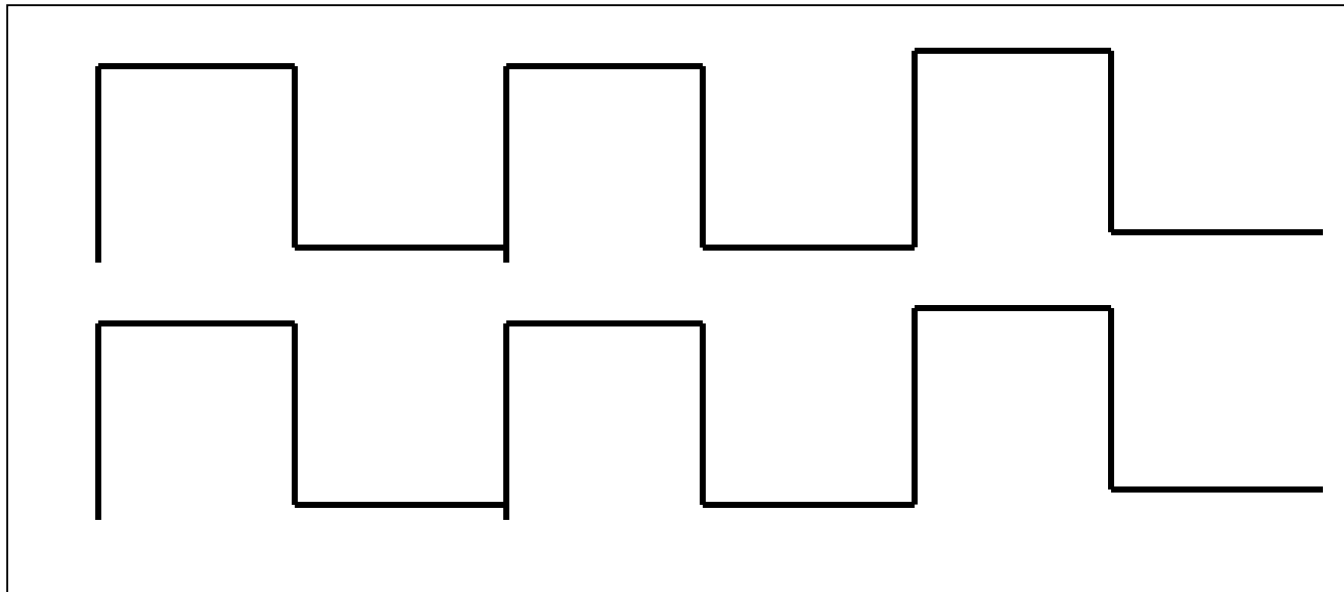
linfociti



piastrine



Lettura striscio



Esame degli strisci di sangue periferico

- 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.

Esame degli strisci di sangue periferico

- 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 *macroцитi*.
 - 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 microцитi sono GR del diametro inferiore a 6 μm .*
- I GR normali sono rotondi

Esame degli strisci di sangue periferico

- Variazioni nella **forma** prendono il nome di **poichilocitosi**.
 - i GR devono avere un'area pallida centrale con una rima periferica rossa-arancio 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).

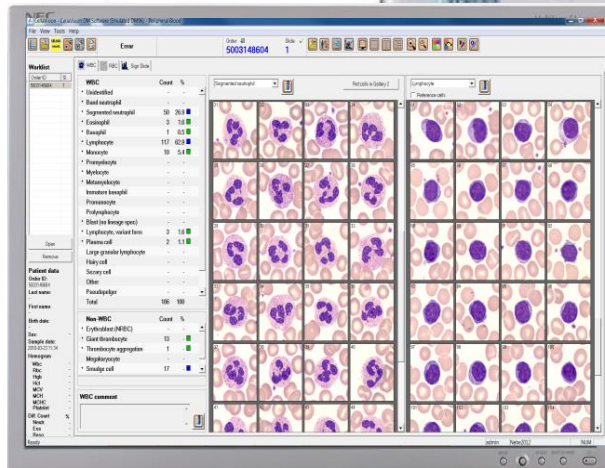
GR patologici nello striscio di sangue periferico

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 (degmacyte)	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 Kjeldsberg C, ed. Practical diagnosis 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.
Polychromatophilic	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.
Adapted from Kjeldsberg C, ed. Practical diagnosis of hematologic disorders, 3rd ed. Chicago: ASCP Press, 2000.			

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)

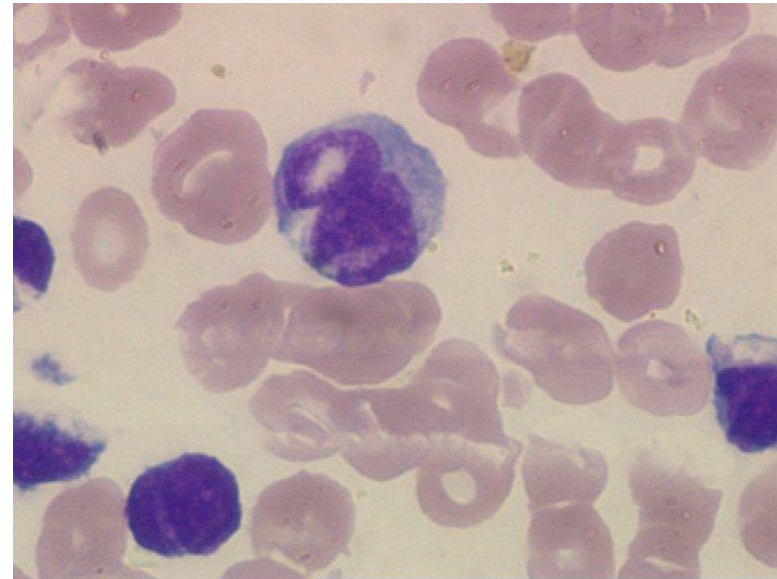
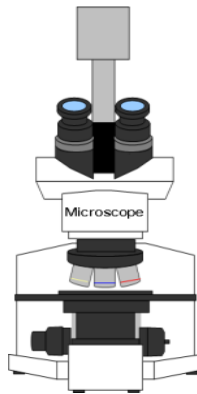
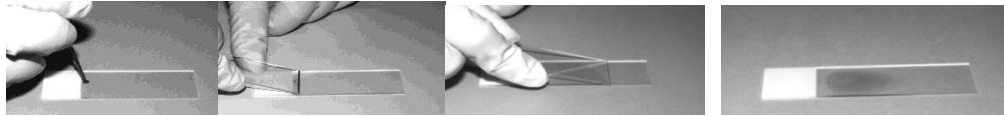
La valutazione dello striscio di sangue periferico

- La richiesta di striscio per approfondimento e conteggio cellulare genera da regole fondate su considerazioni clinico/diagnostiche
- La valutazione dello striscio rimane uno step fondamentale nel percorso diagnostico
- L'esame dello striscio dovrebbe essere eseguito da personale esperto

Lo striscio di sangue periferico

- Lo striscio periferico su vetrino è uno dei test più diffusi al mondo
- La preparazione del vetrino è una procedura relativamente semplice ma per molte ragioni spesso la riuscita non è ottimale
- La qualità dello striscio è direttamente correlata alla qualità del suo esame

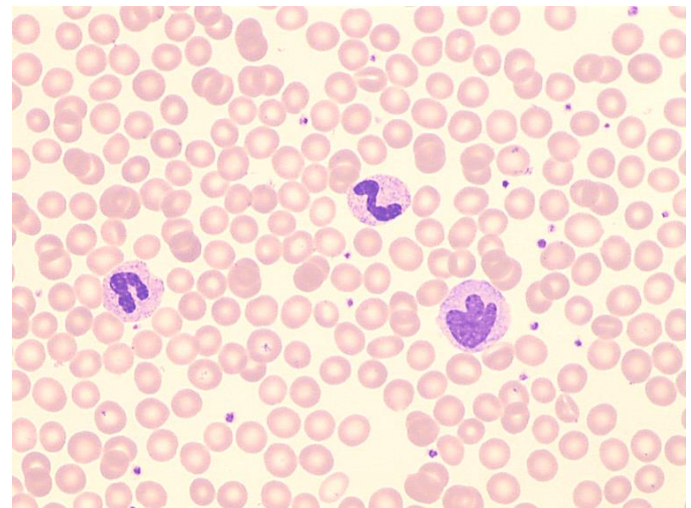
Qualità dello striscio



PER OTTENERE UNA BUONA QUALITA'

- E' necessaria una buona distribuzione cellulare (WBC, RBC, PLT)
- Le cellule devono mantenere il più possibile le loro caratteristiche, se pur su monostrato
- Non devono esserci artefatti (più comuni nel trattamento manuale)

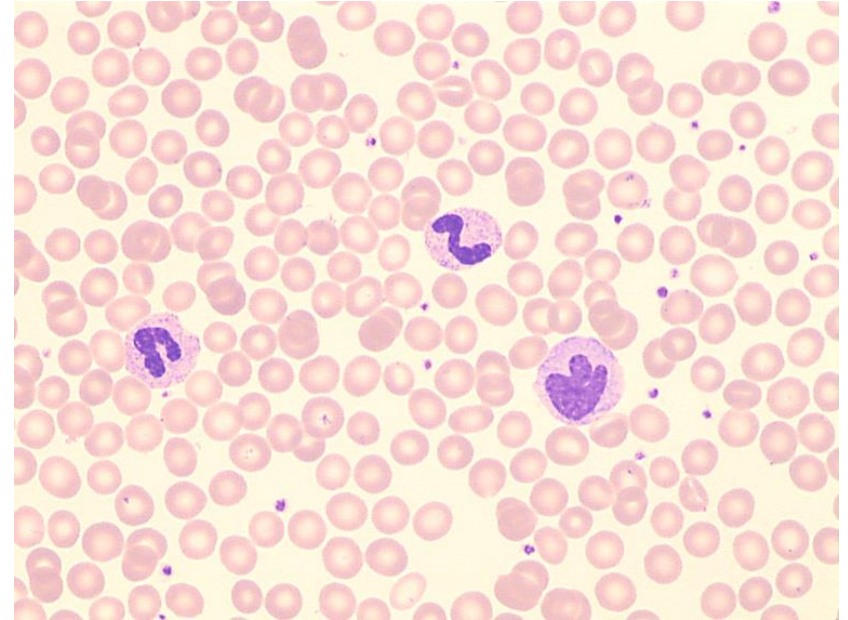
Distribuzione ottimale



Le differenze.....

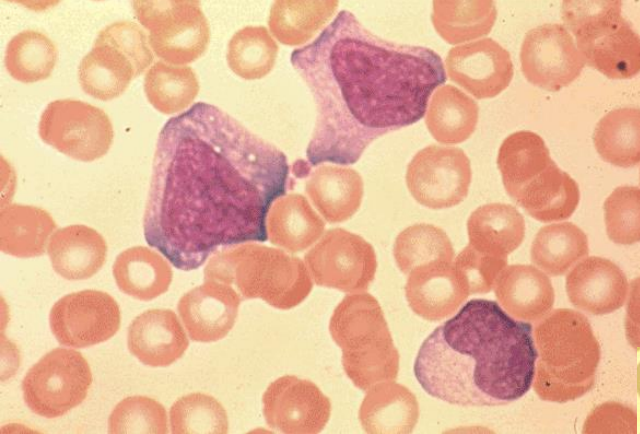
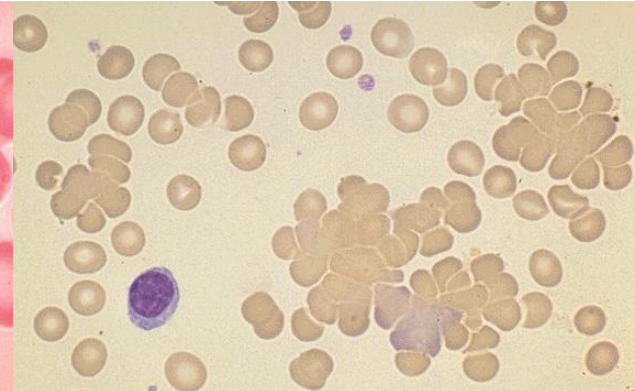
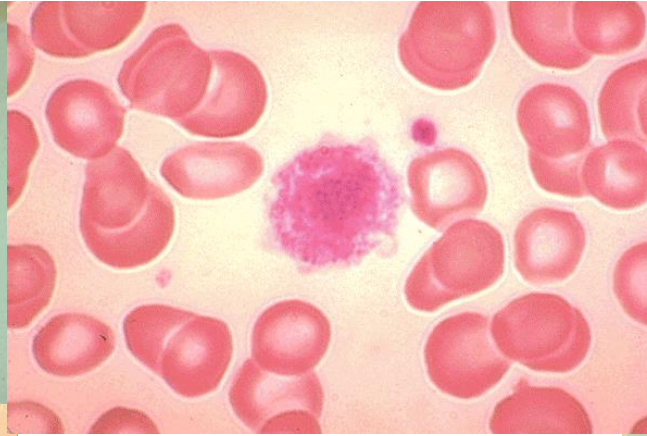
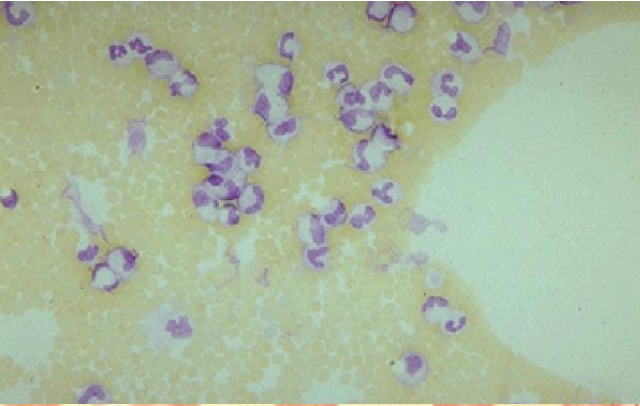


Non ottimale

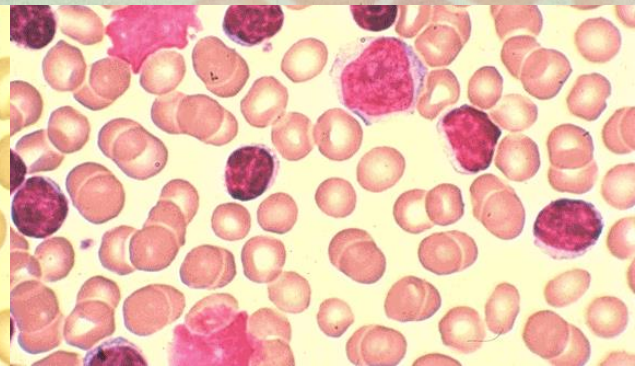
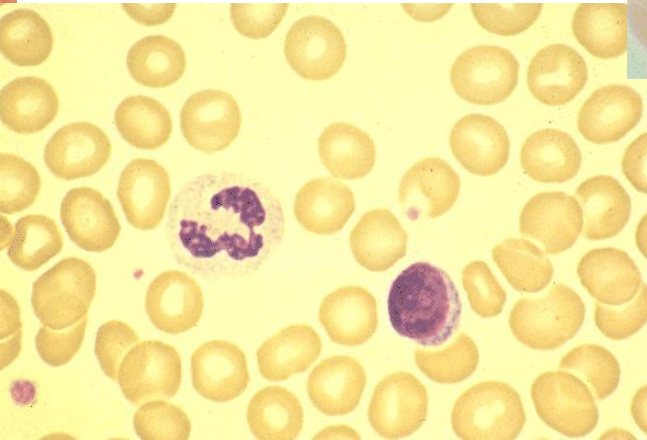
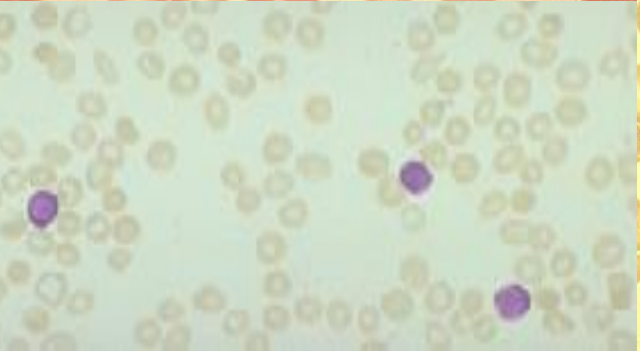


Ben fatto!

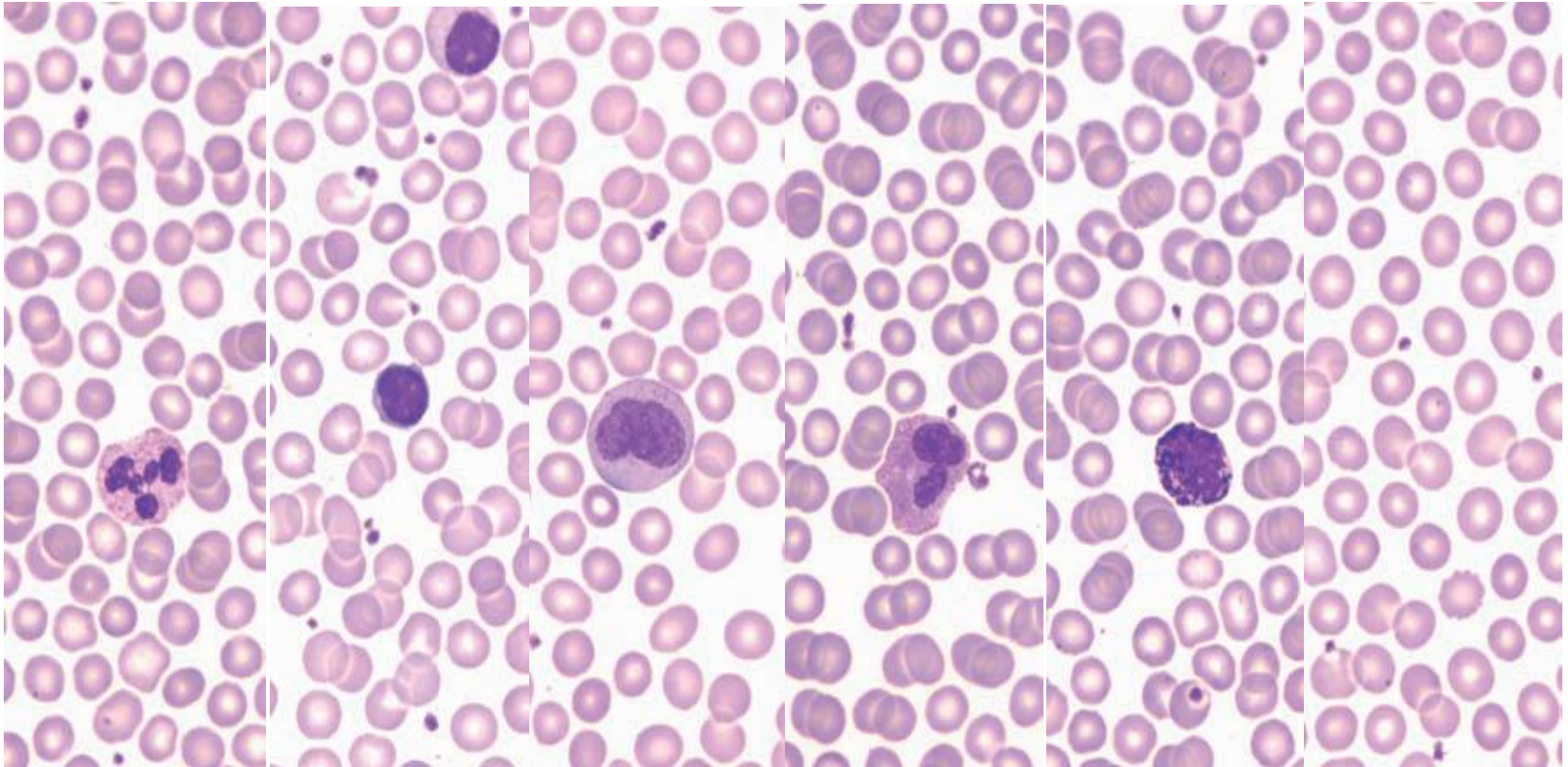
Importanza della colorazione



Ulteriore step
FONDAMENTALE



Una buona colorazione permette una corretta classificazione



Neutrophil

Lympho

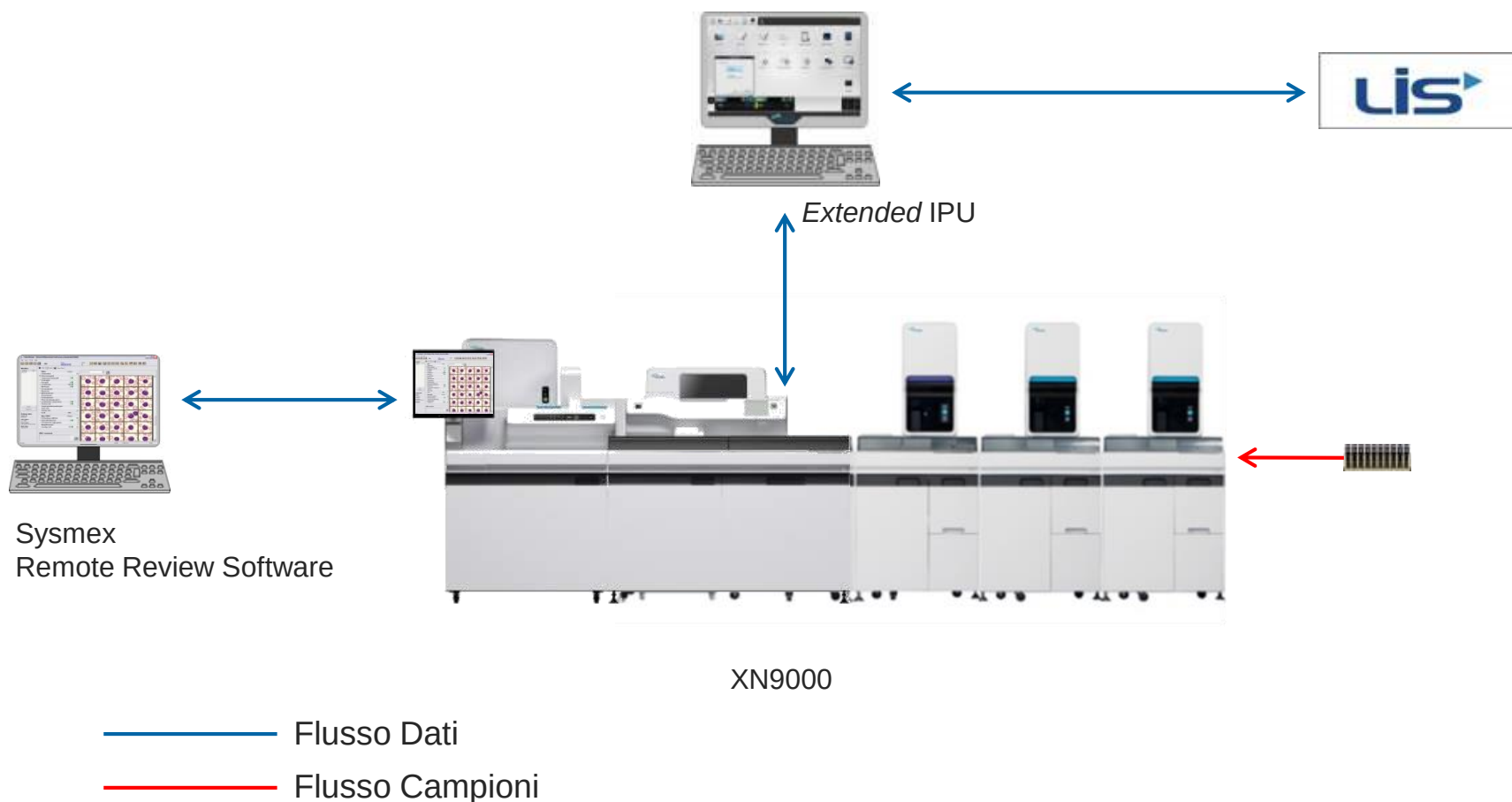
Mono

EO

Baso

RBC

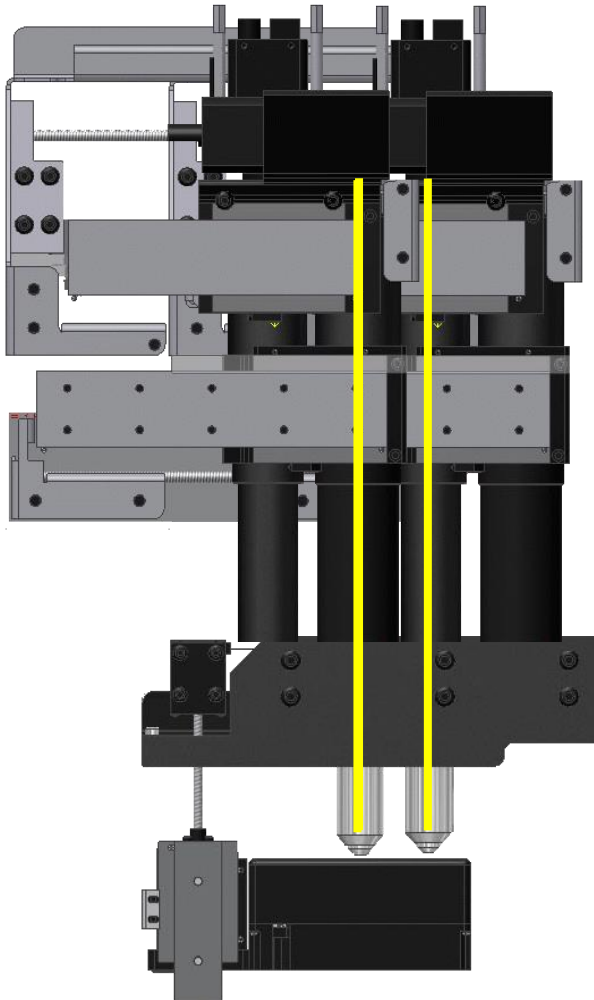
DI-60 nel workflow del laboratorio



Sysmex DI-60



Principi di lettura cellulare



Lente 10 x, ingrandimento 10 x

- panoramica generale
- identificazione cellule nucleate

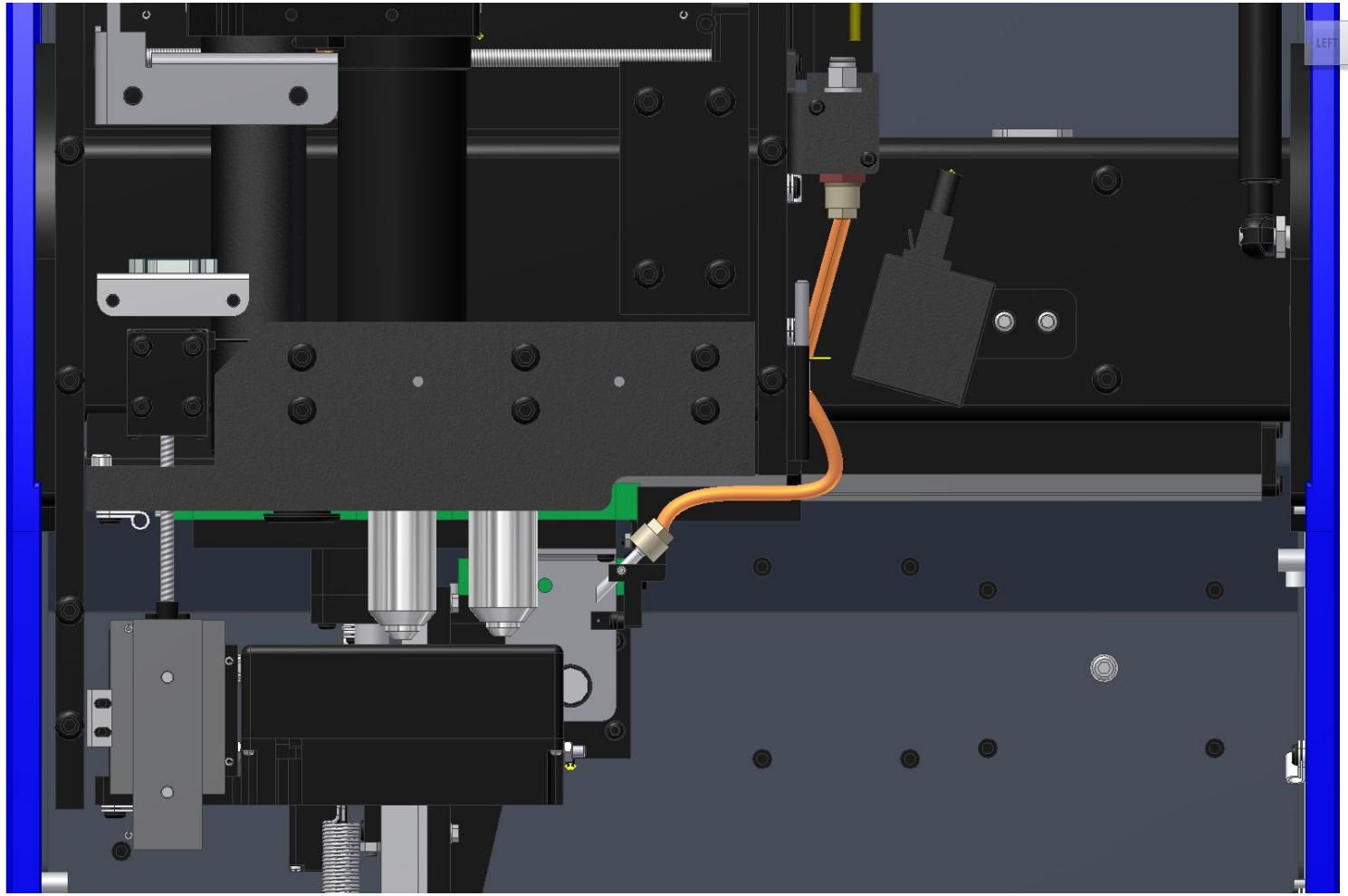
Lente 100 x , ingrandimento 50 x

- panoramica di ricerca RBC
- caratterizzazione morfologica RBC

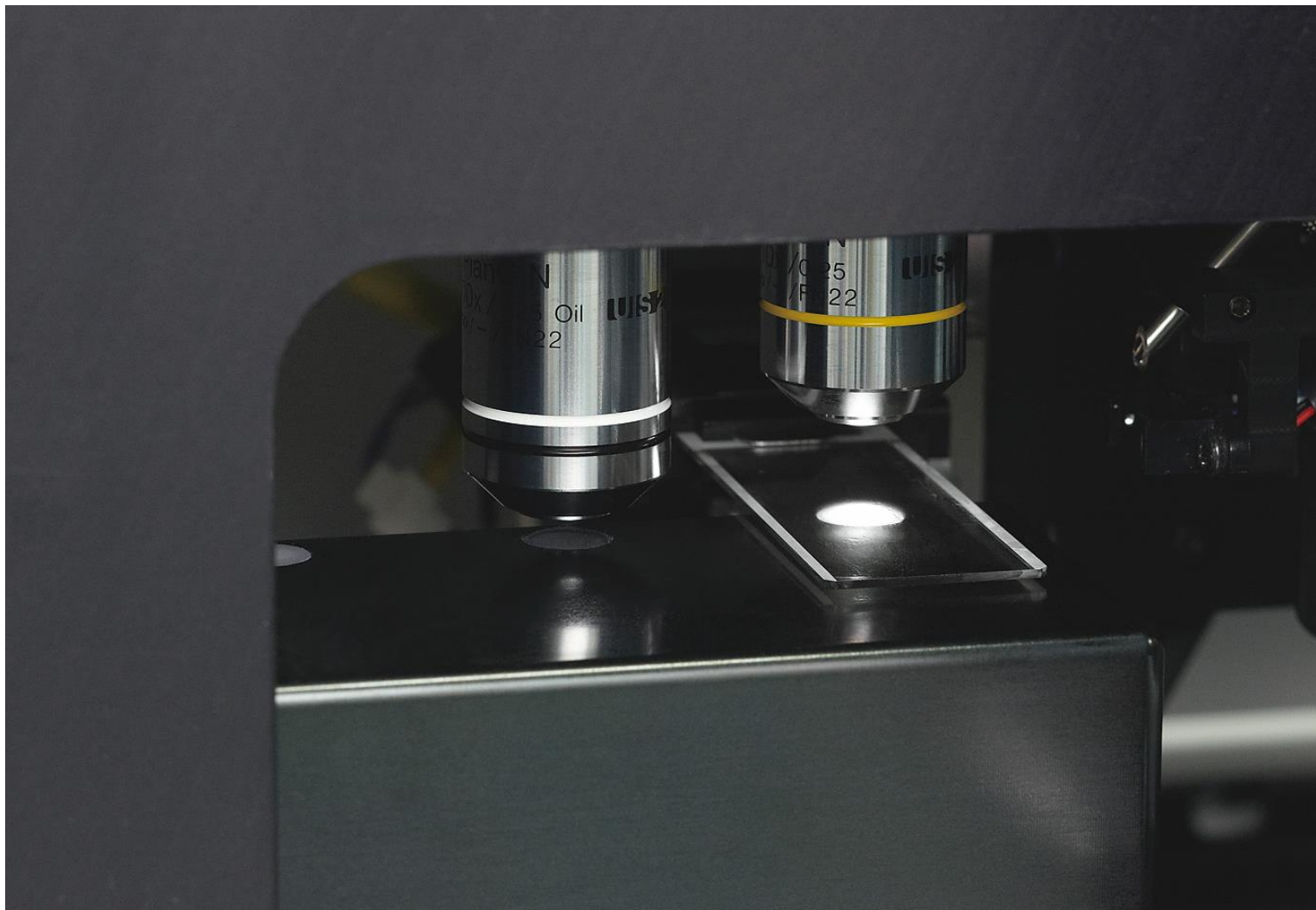
Lente 100 x, ingrandimento 100 x

- Pre-classificazione delle cellule nucleate in 18 classi cellulari

Dispositivo dispensazione olio



Sysmex DI-60 lente 10 x



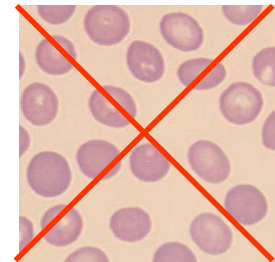
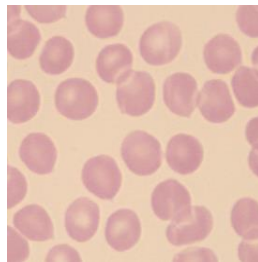
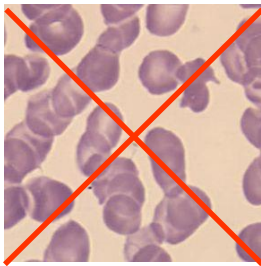
Sysmex DI-60 lente 100 x

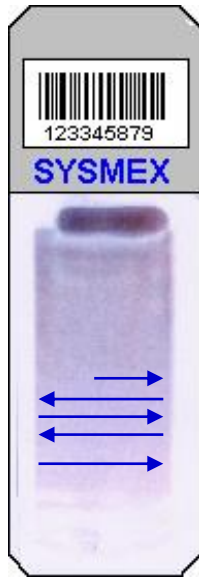


Identificazione della porzione ottimale di lettura



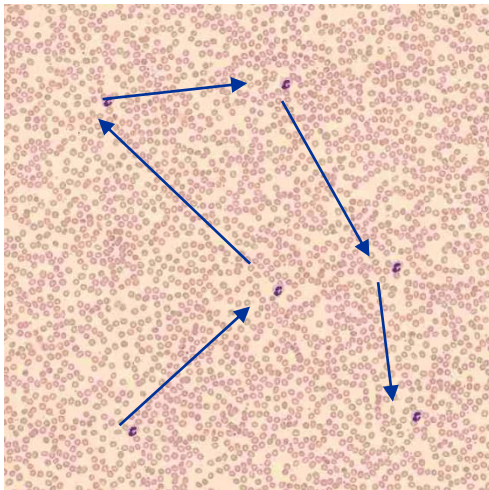
1. DI-60 inizia la fase di scansione partendo da un punto prefissato del vetrino
2. L'obiettivo 10x si muove attraverso la parte più sottile dello striscio catturando immagini di continuo
3. Sulla base dei contorni e delle dimensioni dei RBC, vengono determinati i punti di inizio e fine della zona di scansione per la lettura WBC





Identificazione cellulare per la preclassificazione

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

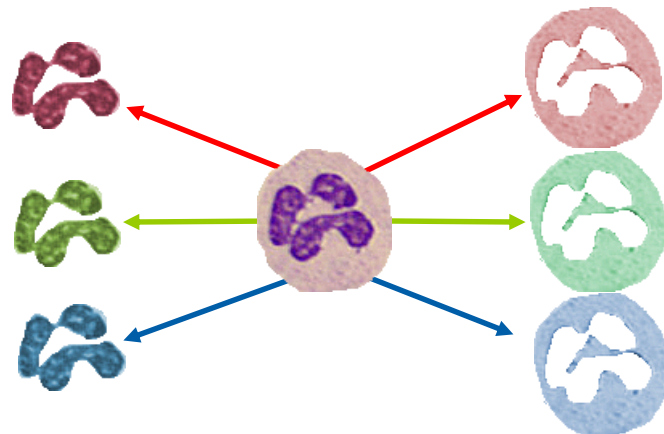


One 10x Image

Principi di analisi

Estrapolazione delle caratteristiche cellulari

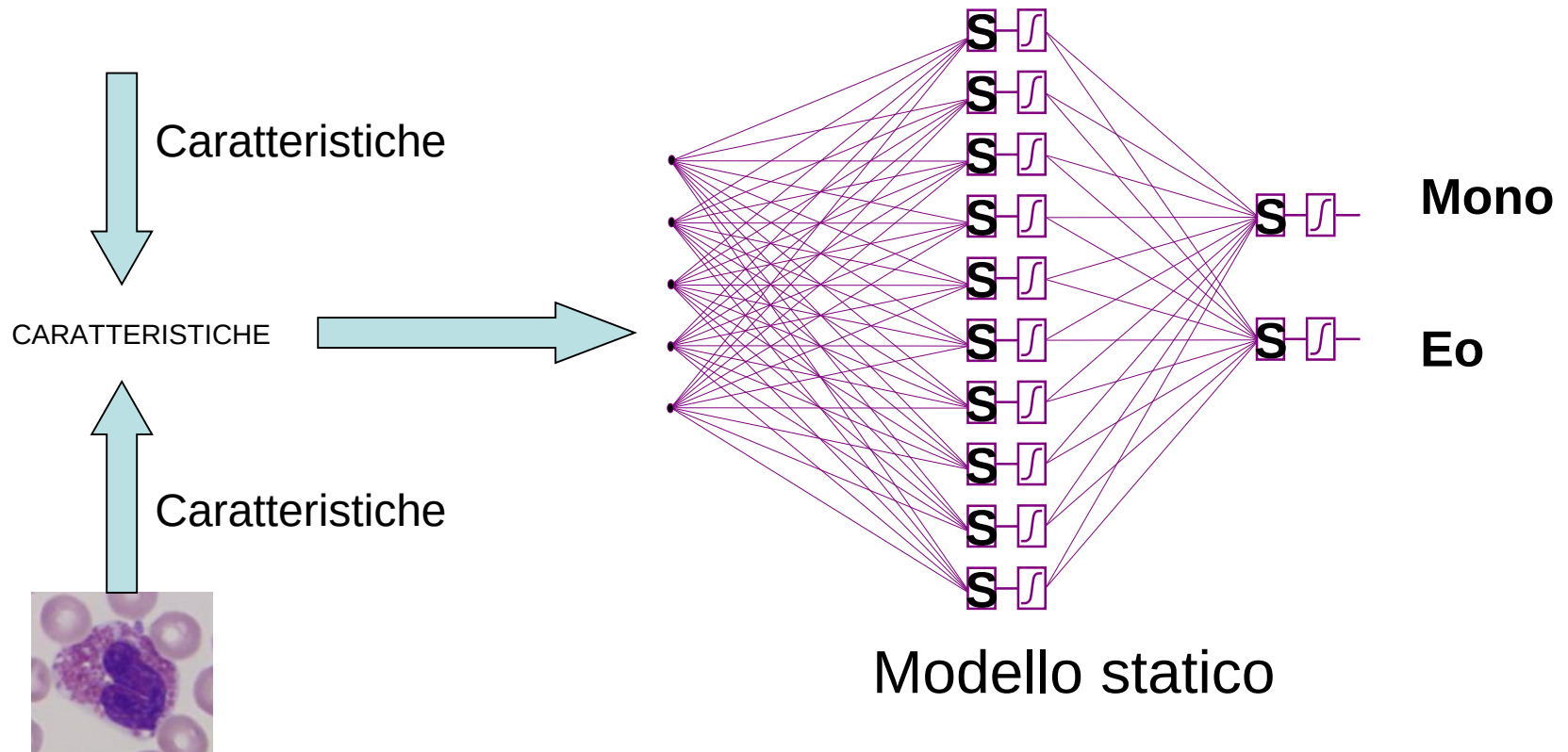
- I segnali rosso, verde e blu sono generati dal colore delle cellule
- Questi segnali vengono utilizzati come parametri per determinare le caratteristiche di nucleo e citoplasma
- Vengono determinati oltre 300 parametri di caratterizzazione per ciascuna cellula



Rete Neurale Artificiale

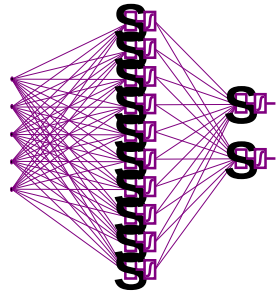
- DI-60 usa la Rete Neurale Artificiale (ANN) per effettuare la preclassificazione
- La ANNs viene “istruita” attraverso migliaia di immagini cellulari ciascuna classificata da un gruppo di esperti
- Oltre 300 caratteristiche (es: forma, colore, grandezza, rapporto nucleo/citoplasma, ecc.) vengono utilizzate ed identificate per ogni cellula per determinarne il tipo ed incasellarla in una particolare tipologia

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

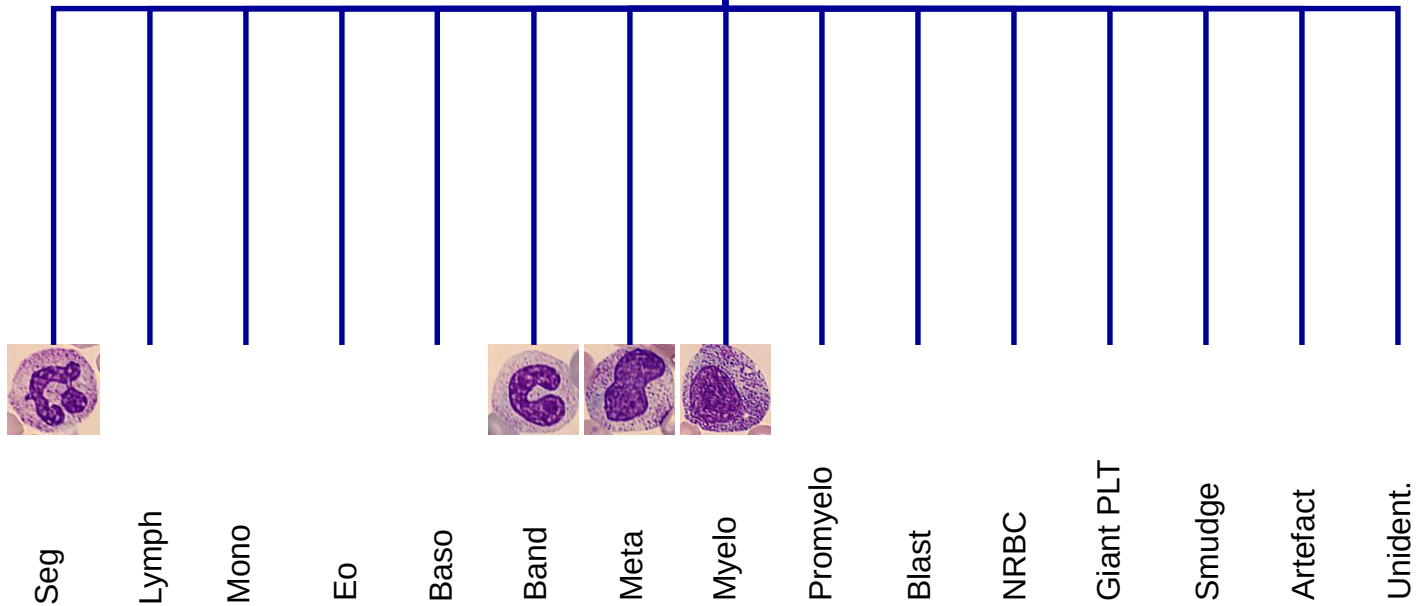


Principi di analisi

Riconoscimento pattern cellulare



Confrontando l'elaborazione dei parametri ottenuti con i valori dell'archetipo standard, la classe cellulare viene determinata per mezzo di ANN



VISUALIZZAZIONE CONTROLLO SISTEMA







Analisi in corso




Ordine:

Verino:




Controllo sistema




▶ 2013-04-04

Cancello registro

Avanzamento dell'analisi

Cellule contate:

29 di 100 totali

Tempo residuo stimato:

0:40 minuti

Analisi sangue periferico avviata

Ricerca di livello singolo in corso...

Ricerca di livello singolo completata.

Rilevamento di leucociti con ingrandimento a bassa potenza in corso.

Leucociti rilevati

Ricerca di livello singolo eritrociti/pastine in corso...

Ricerca livello singolo eritrociti/pastine completata.

Preclassificazione eritrociti in corso (se ordinata).

Preclassificazione di leucociti

con ingrandimento ad alta potenza in corso...

Preclassificazione eritrociti completata (se ordinata).

Leucocita

	Conta	%	x10e9/L
• Non identificato			
• Neutrofilo in banda	2	7.1	0.0
• Neutrofilo segmentato	18	64.3	0.0
• Eosinofilo	-	-	-
• Basofilo	-	-	-
• Linfocita	4	14.3	0.0
• Monocita	2	7.1	0.0
• Promielocita	-	-	-
• Mielocita	-	-	-
• Metamielocita	-	-	-
• Blasto (nessuna spec. dis.)	-	-	-
• Linfocita, forma variante	-	-	-
• Plasmacita	-	-	-
Altro	-	-	-
Totale	28	100	0.0

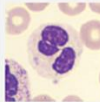
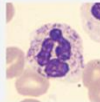
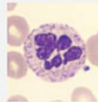
Non leucocita

	Conta	%
• Eritroblasto (NREC)	-	-
• Trombocita gigante	-	-
• Aggregazione trombocitica	-	-
• Cellula con sbavatura	4	14.3
• Artefatto	-	-

Eritrocita

	0	1	2	3	%
• Policromasia	0				0.5
• Ipo Cromasia	0				1.6
• Anisocitosi	0				4.8
• Microcitosi	0				4.1
• Macroцитоси	0				0.7
• Poichilocitosi	0				1.2

Ultime cellule rilevate

Segmented neutrophil

Segmented neutrophil

Segmented neutrophil

Dati paziente

ID paziente:

Nome:

Cognome:

Commento:

Dati vetrino

ID vetrino:

ID ordine:

Numero vetrino:

Data campione:

PL126

PL126

6

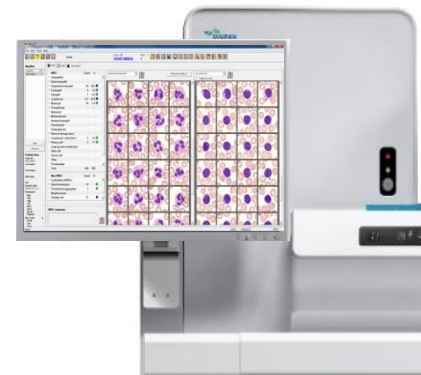
03/04/2013

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



Sysmex Remote Review Software



Sysmex DI-60

VERIFICA VETRINI ELABORATI WBC

File Visualizza Strumenti Guida

Ordine: 1602713102 Vetrino: 1

Lista di lavoro

ID ordine	N...
1602713102	1

Leucocita

Conta %

- Non identificato - -
- Neutrofilo in banda - -
- Neutrofilo segmentato 92 78.0
- Eosinofilo - -
- Basofilo - -
- Linfocita 12 10.2
- Monocita 13 11.0
- Promielocita - -
- Mielocita - -
- Metamielocita 1 0.8
- Promonocita - -
- Prolinfocita - -
- Blasto (nessuna spec. disc...) - -
- Linfocita, forma variante - -
- Plasmocita - -
- Cellula capelluta - -
- Altro - -
- Totale 118 100

Non leucocita

Conta %

- Eritroblasto (NRBC) - -
- Trombocita gigante 13 -
- Aggregazione trombocitica 3 -
- Cellula con sbavatura 8 -
- Artefatto 1 -

Commento leucocita

Neutrofilo segmentato

Cellule di rif. nella galleria 2

Neutrofilo segmentato

Cellule di riferimento

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

VERIFICA VETRINI ELABORATI RBC

File Visualizza Strumenti Guida

Ordine: ERR20160318 Vetrino: 1

Lista di lavoro

ID ordine	N...
1602713102	1
1602770702	1
1602555302	1
ERR20160318...	1

Apri

Rimuovi

Dati paziente

ID ordine:
ERR20160318101725
Cognome:

Nome:

Data di nascita:

Leucocita Eritrocita Piastrina Firma vetrino

☒ Referita tutto come 0 - normale
☐ Usa caratterizzazione

0 1 2 3 %

COLORE

• Cellule policromatiche 0 ● ○ ○ ○ ○
• Cellule ipocromatiche 0 ● ○ ○ ○ ○

DIMENSIONE

• Anisocitosi 0 ● ○ ○ ○ ○
• Microciti 0 ● ○ ○ ○ ○
• Macroцити 0 ● ○ ○ ○ ○

FORMA

• Poichilocitosi 0 ● ○ ○ ○ ○
Cellula bersaglio 0 ● ○ ○ ○ ○
Schistociti 0 ● ○ ○ ○ ○
Emazie a elmetto 0 ● ○ ○ ○ ○
Cellule falciformi 0 ● ○ ○ ○ ○
Sferociti 0 ● ○ ○ ○ ○
Elliptociti 0 ● ○ ○ ○ ○
Ovalociti 0 ● ○ ○ ○ ○
Cellule lacrimali 0 ● ○ ○ ○ ○
Stomatociti 0 ● ○ ○ ○ ○
Acentociti 0 ● ○ ○ ○ ○
Echinociti 0 ● ○ ○ ○ ○

INCLUSIONI

Howell-Jolly 0 ● ○ ○ ○ ○

* Visualizza nomi in uso

Numero di eritrociti utilizzati per i calcoli: 831

Ripristina precaratterizzazione

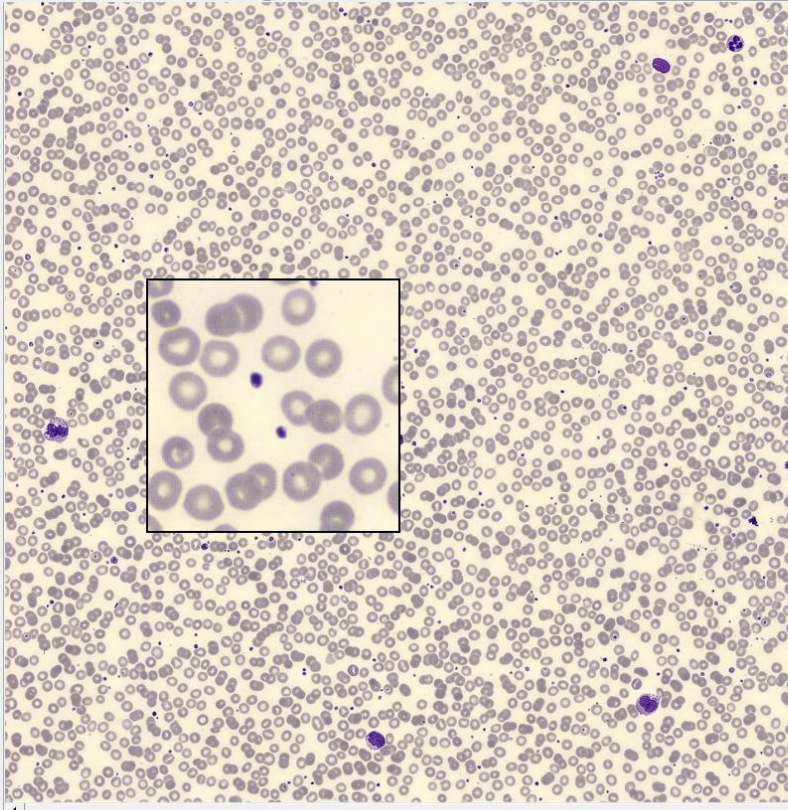
Escludi analisi eritrociti

Commento eritrocita

Panoramica

Singole cellule

Area immagine visibile: 8.29 HPF



Ready

admin

ROUTINE

CAP NUM

VERIFICA VETRINI ELABORATI PLT

File Visualizza Strumenti Guida

Ordine: ERR20160318 1 Vetrino:        

Lista di lavoro

ID ordine	N...
1602713102	1
1602770702	1

☒ Leucocita ☐ Eritrocita ☐ Piastrina  Firma vetrino

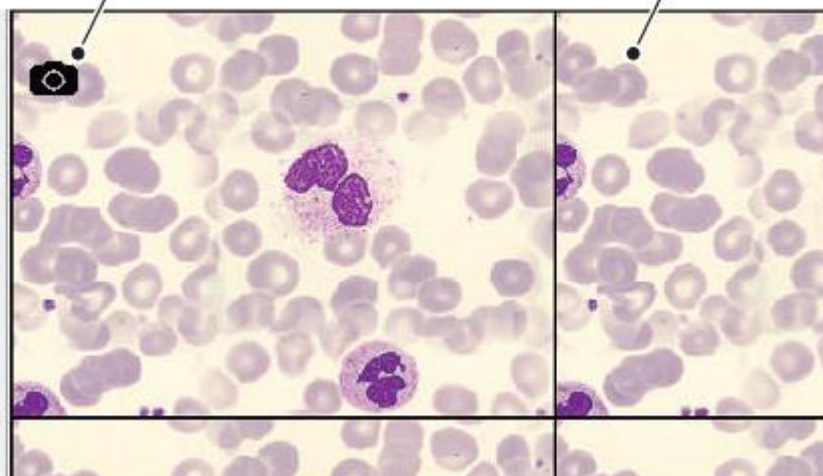
Conteggio piastrine

Dimensioni griglia: 3 x 3 (0.89 HPF/square)

Conteggio piastrine

Livello di concentrazione:

Non impostato



Nome:

Data di nascita:

Conteggio piastrine

Dimensioni griglia: 3 x 3 (0.89 HPF/square)

☒ Conta piastrine per riquadro griglia

☐ Approssima piastrine per riq. griglia:

Calcola risultato piastrine

Conteggio delle piastrine nell'immagine panoramica

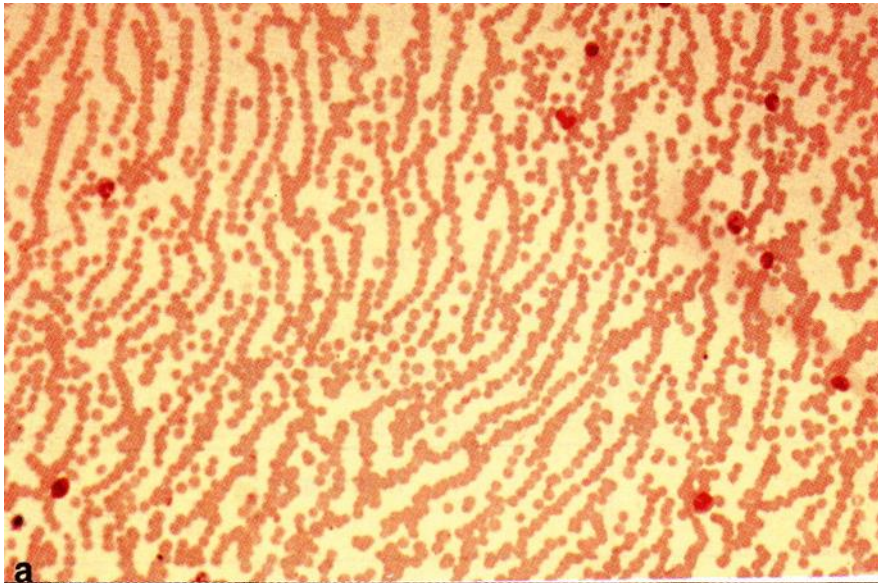
Conta piastrine:

La stima della concentrazione piastrinica è basata sul numero di piastrine che devono essere contate manualmente. È possibile decidere di contare il numero di piastrine in ogni quadrato della griglia o di specificare un numero approssimativo di piastrine per quadrato della griglia.

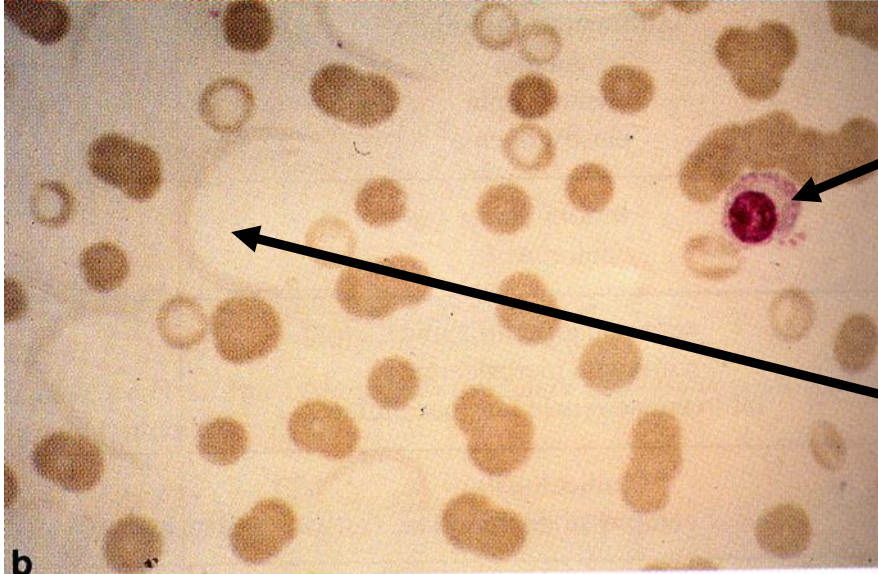
CAP NUM

QUADRI MORFOLOGICI

MIELOMA MULTIPLO: sangue periferico



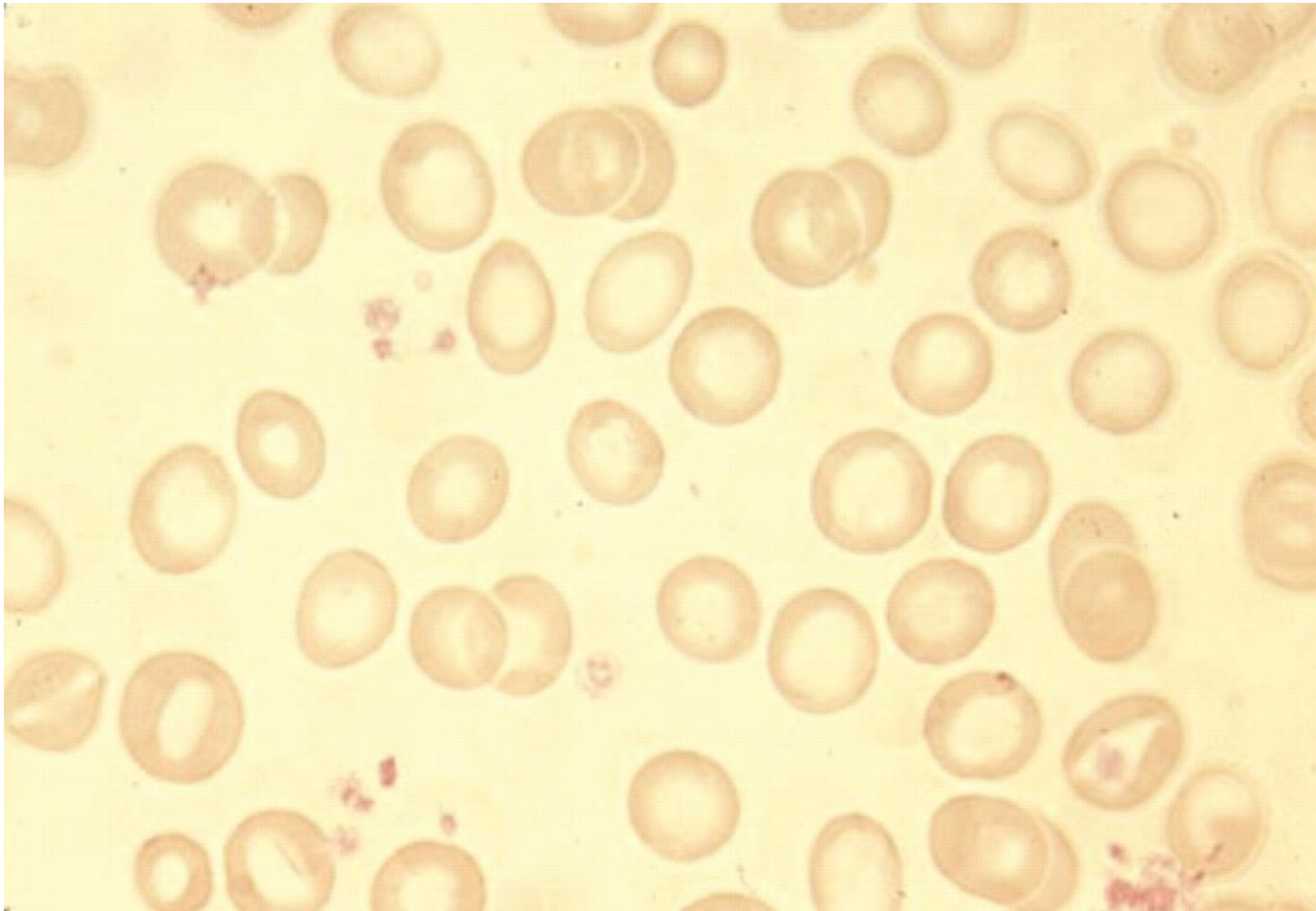
**Impilamento delle
emazie (“rouleaux”)**



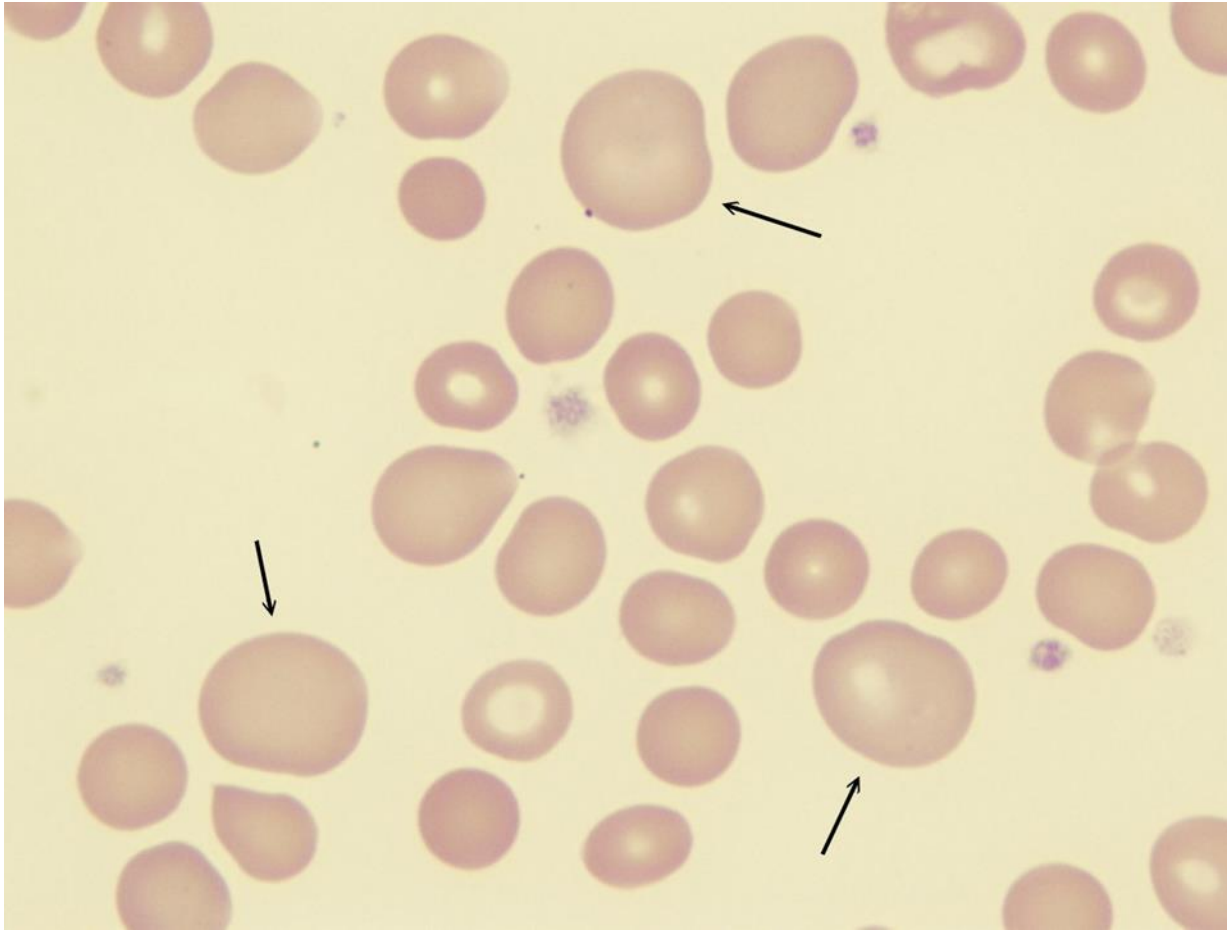
**Plasmacellula
circolante**

Archi di precipitazione

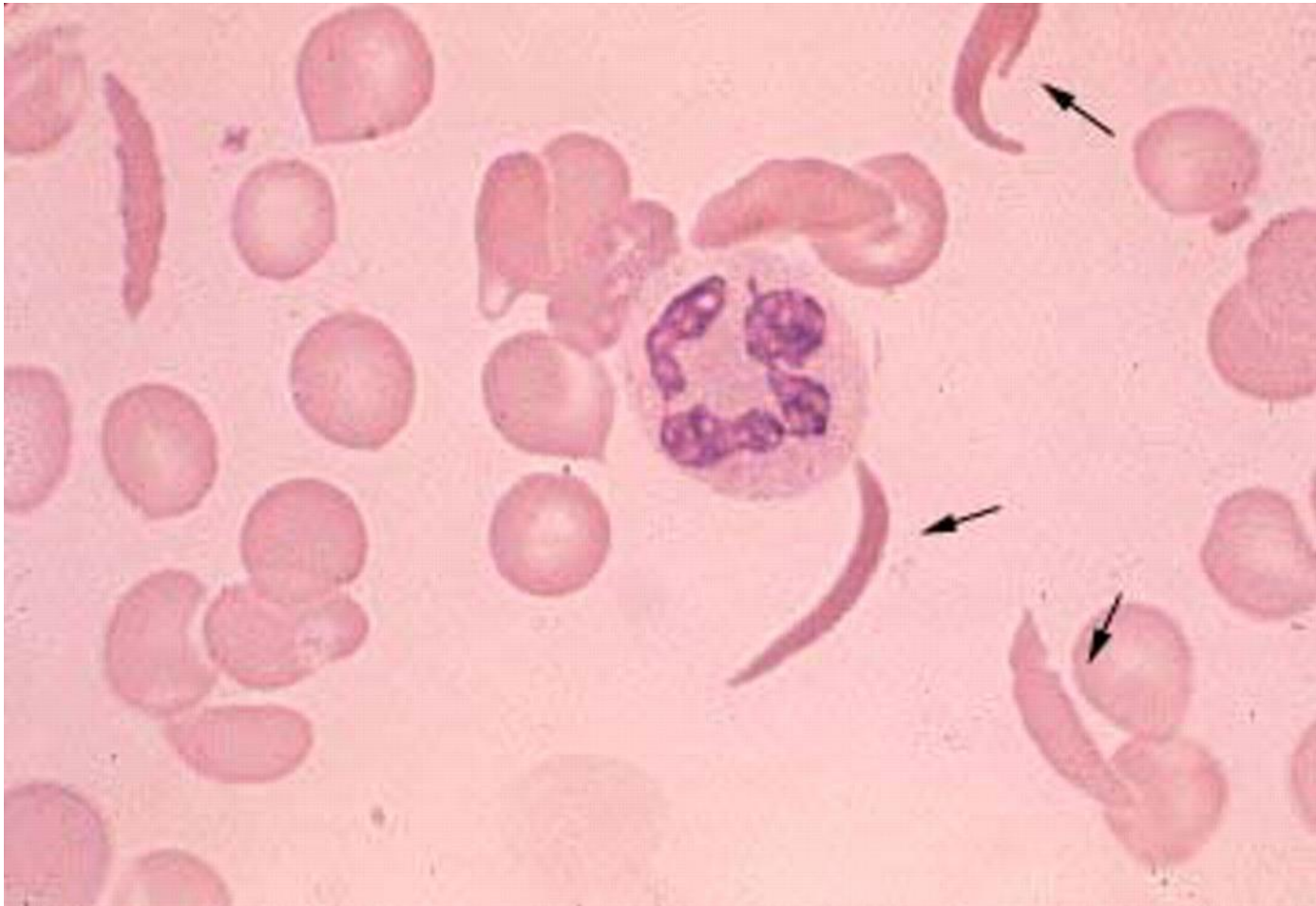
Anemia sideropenica: microciti



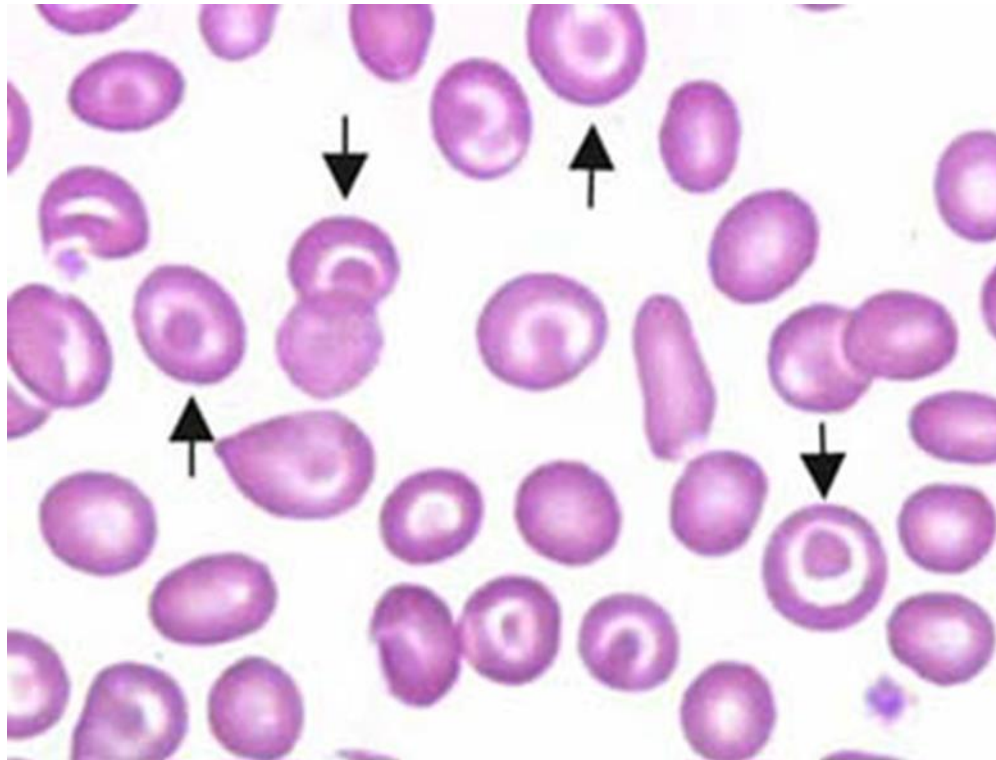
macrocyti



Anemia a cellule falciformi



Target cells



Corpi di Howell-Jolly



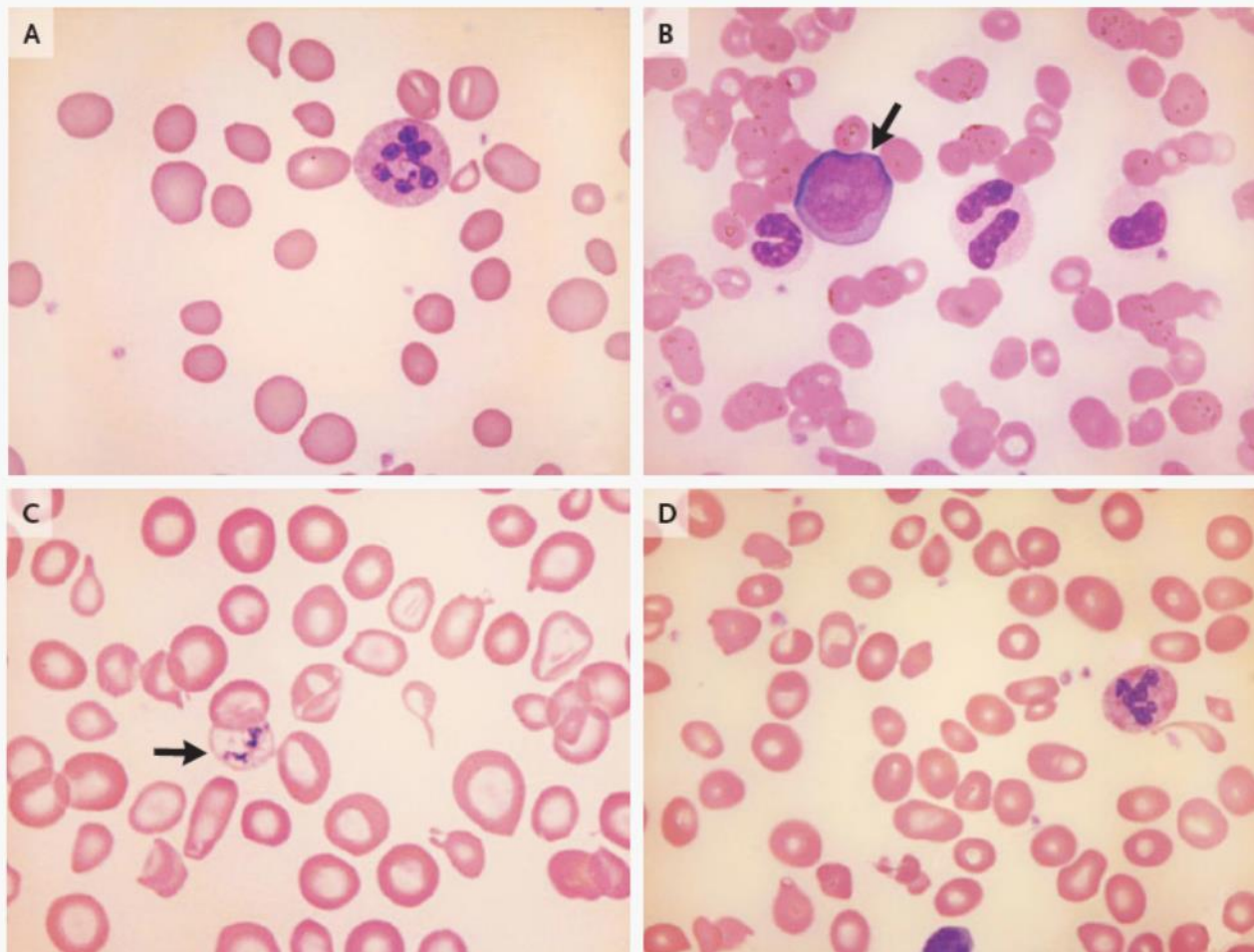


Figure 3. Red-Cell Changes in Various Types of Macrocytic Anemia.

Pernicious anemia is shown in the blood smear in Panel A, with anisocytosis, macrocytosis, and a hypersegmented neutrophil. Panel B shows myelodysplastic syndrome, with a blast cell (arrow) and two neutrophils that have hypolobulated nuclei, one of which is binucleated and the other hypogranular. Panel C shows myelodysplastic syndrome with anisocytosis, poikilocytosis, macrocytes, stomatocytes, and an erythrocyte with prominent Pappenheimer bodies (arrow); the smear is also dimorphic, showing both well-hemoglobinized macrocytes and hypochromic microcytes. Panel D depicts type 1 congenital dyserythropoietic anemia, with anisocytosis, poikilocytosis, and some macrocytes. All specimens were stained with May–Grünwald–Giemsa stain.

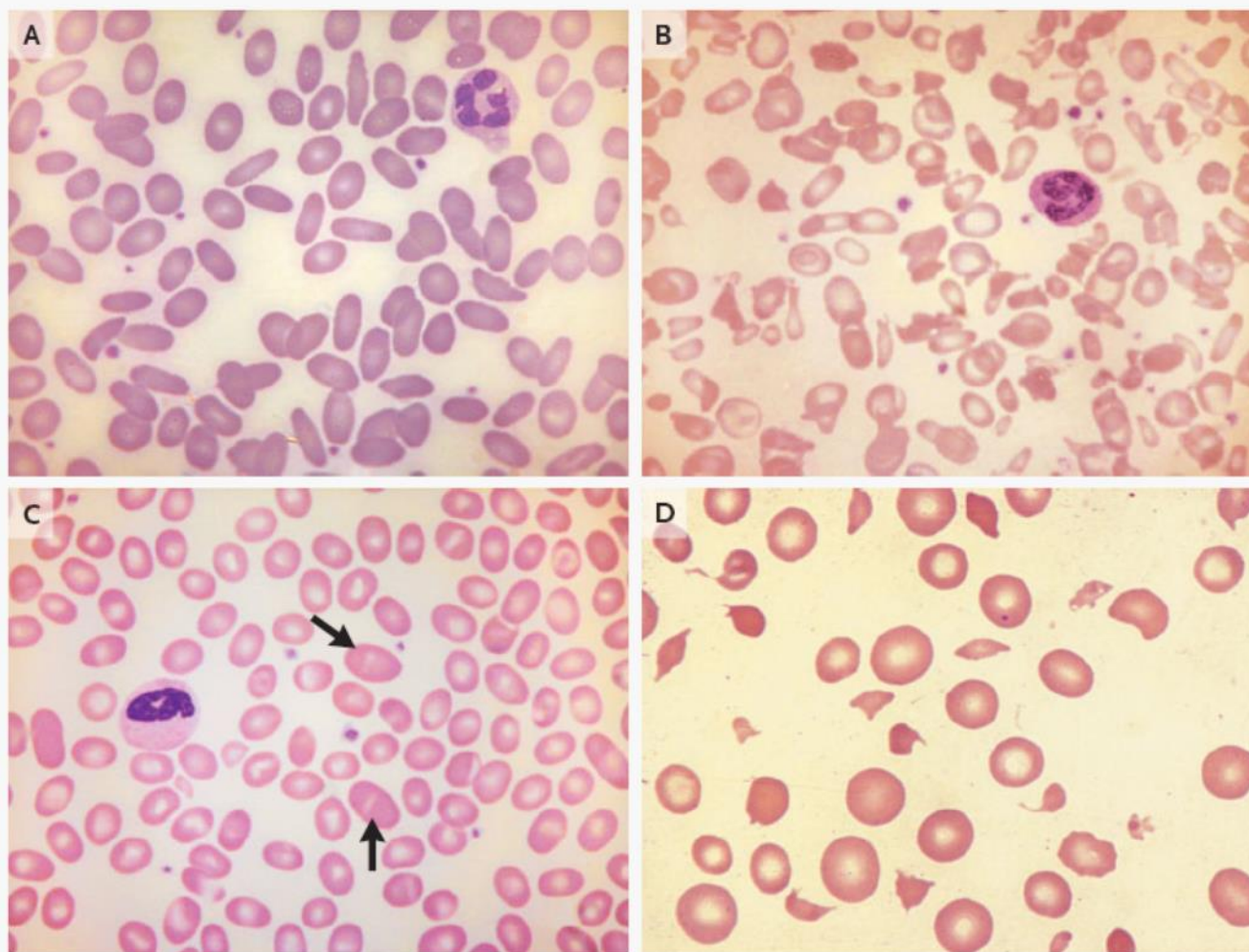


Figure 1. Hemolytic Anemias, Characterized by Different Types of Poikilocytes.

In Panel A, the blood smear shows hereditary elliptocytosis, with numerous elliptocytes and smaller numbers of ovalocytes. Panel B shows hereditary pyropoikilocytosis; there is striking poikilocytosis, with elliptocytes, ovalocytes, and fragments. In Panel C, Southeast Asian ovalocytosis shows moderate poikilocytosis, with the poikilocytes including several macro-ovalocytes (arrows). Panel D shows microangiopathic hemolytic anemia resulting from cyclosporine therapy, with numerous red-cell fragments. All specimens were stained with May–Grünwald–Giemsa stain.

Esame del midollo

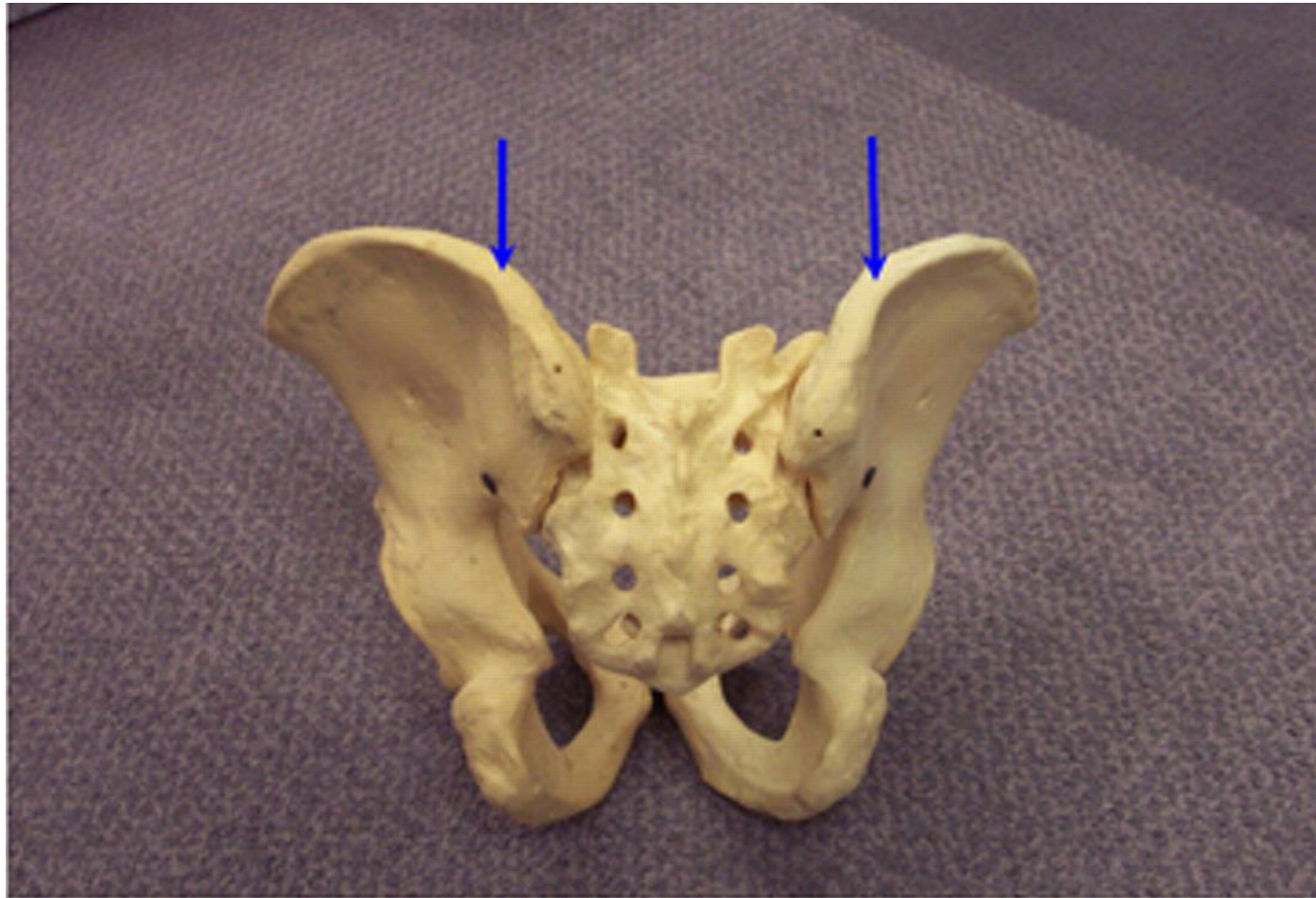
- La diagnosi ed il monitoraggio di molte malattie ematologiche richiede l'esame del midollo osseo che si basa su 2 modalità distinte ma correlate:
 - **Valutazione citologica** mediante agoaspirazione del sangue midollare e allestimento di uno striscio su vetrino permettendo una valutazione morfologica ottimale.
 - **Valutazione istologica** di un cilindro osseo che permette una ottimale valutazione della cellularità, fibrosi, infiltrazione midollare e processi infettivi.

Indicazioni all'esecuzione della agobiopsia midollare

-
1. diagnosi ed inquadramento di patologie ematologiche
 - leucosi acute e croniche
 - sindromi mieloproliferative
 - sindromi mielodisplastiche
 - anemie ad eziologia non ben definita
 - citopenie
 - gammopatie monoclonali
 - linfomi non Hodgkin ed Hodgkin (interessamento midollare)
 2. follow up di pazienti ematologici
 - vedi sopra
 3. patologie non ematologiche
 - stadiazione di processi neoplastici (metastasi)
 - difetti congeniti del metabolismo lipidico
 4. citopenie periferiche
 - di qualsiasi natura si sospetti l'origine
 5. altre
 - processi infettivi (esami colturali e ricerca antigeni)
-

Sede del prelievo

- Le sedi elettive per il prelievo di midollo osseo mediante agoaspirazione sono nell'adulto la spina iliaca postero-superiore e antero-superiore e lo sterno, nel bambino la protuberanza tibiale.
 - **Spina iliaca postero superiore.** È la sede preferita per la rarità delle complicanze, la facilità di repere ed il ridotto impatto traumatico sul paziente.
 - Possibili complicanze sono oltre ad infezioni (rare) ed ematomi, le rarissime emorragie retroperitoneali qualora si perfori l'osso iliaco.
 - **Sterno.** La sede ottimale a livello sternale è localizzata a livello del manubrio o della prima o seconda parte del corpo dello sterno. La regione sternale viene utilizzata in casi di insuccesso nel prelievo in sede iliaca.
 - Complicanze legate alla aspirazione in sede sternale sono il tamponamento cardiaco, se viene sfondato il corpo sternale, emorragie od ematomi.
 - Altre sedi. Nel bambino sedi preferenziali sono la **puntura tibiale** se l'età è inferiore ai 2 anni: in caso contrario si ricorre alla cresta iliaca.



Biopsia midollare



H70595

889279

RCV:10/04/01

BMD



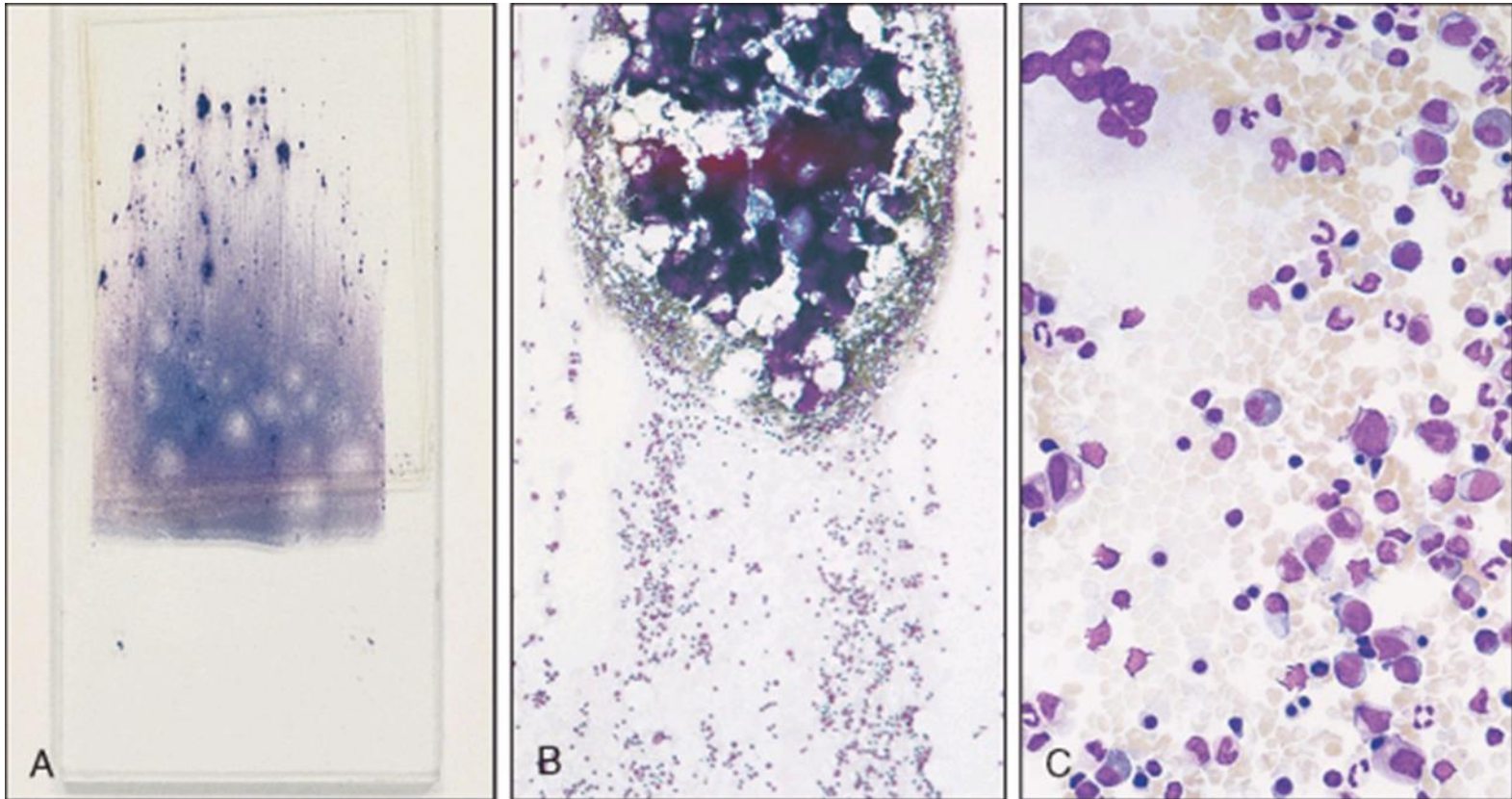
Indagine che possono essere condotte su materiale ottenuto da biopsia midollare

-
- esame citologico in microscopia ottica (Colorazione May Grünwald Giemsa)
 - esame citochimico
 - valutazione immunofenotipica (immunofluorescenza ed immunoenzimatica)
 - valutazione citogenetica
 - indagini molecolari
 - valutazione della crescita colturale
 - microscopia elettronica
 - separazione di frustoli per esame istologico
-

Esame aspirato midollare

- L'esame dell'aspirato midollare inizia con la valutazione della **consistenza della teca ossa** perforata che potrà essere diminuita in caso di osteoporosi avanzata o di mieloma, o aumentata in situazioni di osteopetrosi e mielofibrosi.
- Si procede quindi con **l'esame fisico del materiale estratto** definendo la ricchezza o meno del materiale estratto, la presenza di frustoli, la loro numerosità, il colore (da rosso acceso a biancastro), le dimensioni.
- L'esame quindi procede con la dopo fissazione ed opportuna colorazione del preparato allestito.
- Le **colorazioni di routine** per l'analisi morfologica del midollo sono quella panottica di May-Grünwald-Giemsa e quella di Perls (blu di Prussia) per la valutazione dei depositi di ferro.
- Di secondo livello per valutare aspetti morfo-funzionali sono le **colorazioni citochimiche** (PAS, Sudan Black B, esterasi specifiche e non, fosfatasi alcalina, fosfatasi acida, fosfatasi acida tartrato resistente, mieloperossidasi) mentre le tecniche **immunoenzimatiche** (APAAP) e quelle di immunofluorescenza vengono applicate nello studio dell'immunofenotipo.

Aspirato midollare



Esame dell'aspirato midollare

- L'esame microscopico inizia con la valutazione complessiva a piccolo ingrandimento (10x) al fine di definire:
 1. il **grado di cellularità** (normale, ridotta, aumentata): consiste nella determinazione quantitativa della componente cellulare secondo una valutazione soggettiva empirica in base alla quale il midollo è ipoplasico se la componente emopoietica di un frustolo è inferiore al 25% e viceversa iperplasico se maggiore del 75-80%. La cellularità varia poi in rapporto all'età del paziente (nel bambino la componente emopoietica è più ricca rappresentando mediamente circa l'80% mentre nell'anziano il valore medio si aggira sul 30% a livello dello sterno).
 2. la presenza di **monomorfismo** cellulare che si realizza nel corso di leucosi acute mieloidi o linfoidi, nelle sostituzioni midollari in corso di leucemie linfatica cronica o di processi linfomatosi coinvolgenti il midollo, nel mieloma multiplo.
 3. definizione quantitativa della **componente megacariocitaria**, in considerazione della facilità di individuare facilmente, per le loro maggiori dimensioni,
 4. la presenza di **aggregati di elementi linfoidi con aspetto monomorfo**, espressione di un coinvolgimento midollare in corso di processi linfoproliferativi.
 5. la **presenza di cellule non midollari** (es. metastasi), che generalmente si presentano come isolotti di elementi basofili in strutture simil-sinciziali talvolta con atteggiamento pseudo-acinare e secernente.

Esame dell'aspirato midollare

- **L'esame a piccolo ingrandimento** consente anche di individuare le zone ottimali per la valutazione morfologica che viene effettuata a maggiore ingrandimento: generalmente vengono prescelte regioni marginali dove il tessuto midollare è **ben disteso** e le cellule non sono addossate le une alle altre, in modo tale da poter riconoscere con precisione i dettagli morfologici.
- La zona prescelta deve inoltre essere rappresentativa del tessuto midollare cioè deve risultare minimamente contaminata da sangue midollare ed essere costituita per lo più da elementi nucleati midollari disposti in un unico strato e non troppo dispersi.

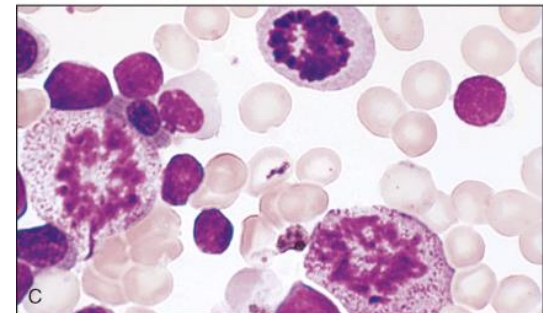
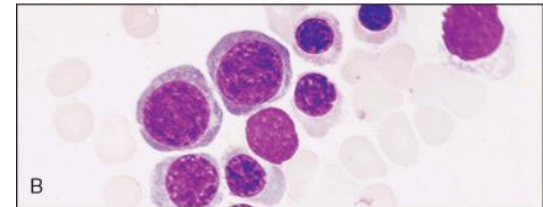
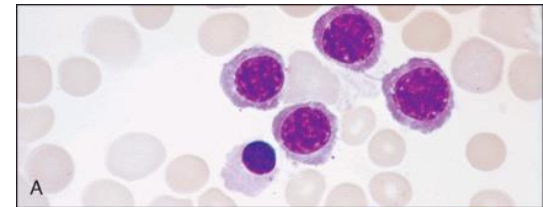
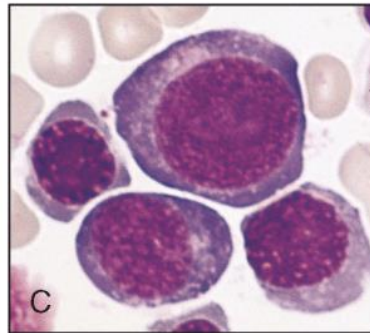
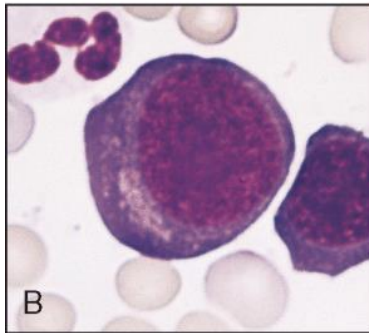
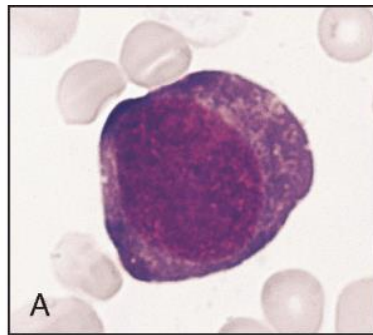
Esame dell'aspirato midollare

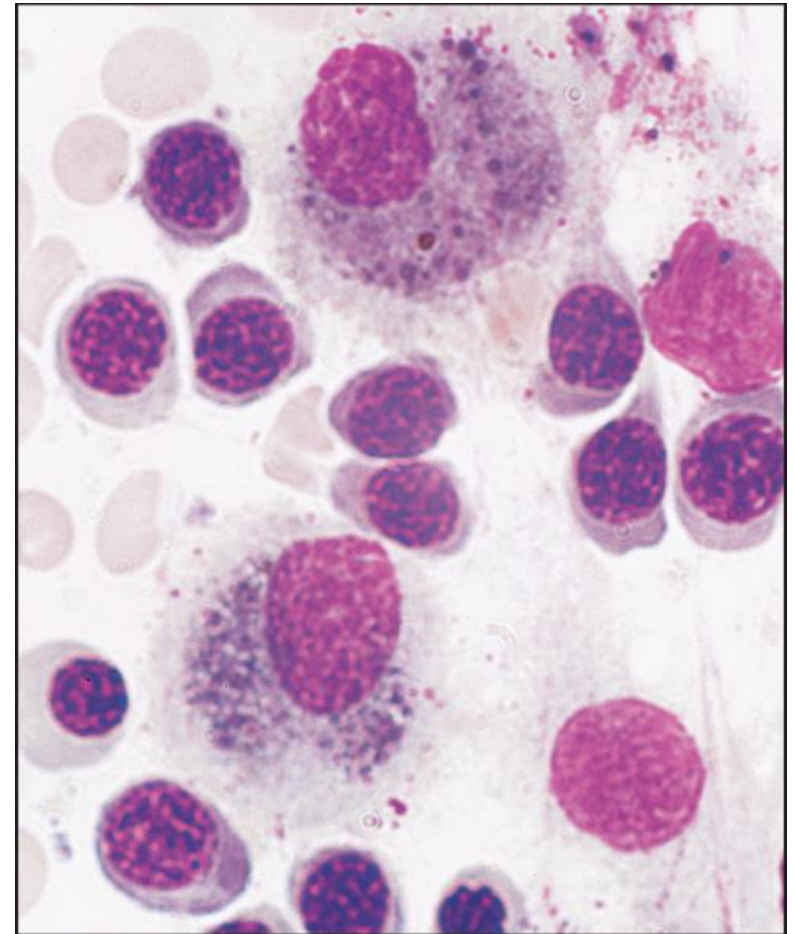
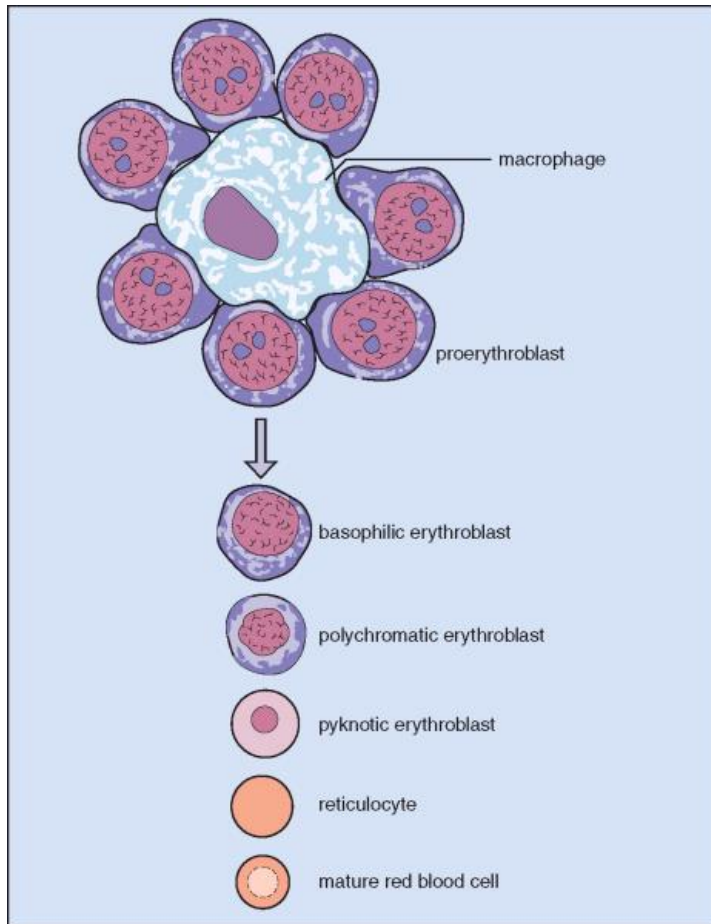
- L'analisi procede quindi con il **conteggio differenziale** e con le **valutazioni morfologiche qualitative**: tale valutazione viene condotta ad un ingrandimento di 40x e 100x (ad **immersione**).
 - In termini rigorosi il conteggio differenziale più corretto da un punto di vista numerico è sicuramente quello ottenuto da sezioni di biopsia ossea nelle quali non vi è la contaminazione da parte del sangue midollare e nelle quali si possono osservare, se presenti, elementi midollari non ottenuti nell'aspirato per una loro maggiore adesione al tessuto midollare.
- D'altra parte la valutazione in sezioni di biopsia spesso rende difficilmente identificabili gli elementi midollari con impossibilità quindi di effettuare, a causa dei processi di fissazione, decalcificazione ed inclusione, una corretta attribuzione.
- Si preferisce quindi, per questa ultima considerazione, effettuare il conteggio su materiale ottenuto mediante aspirazione con le avvertenze sopra menzionate.

Esame dell'aspirato midollare

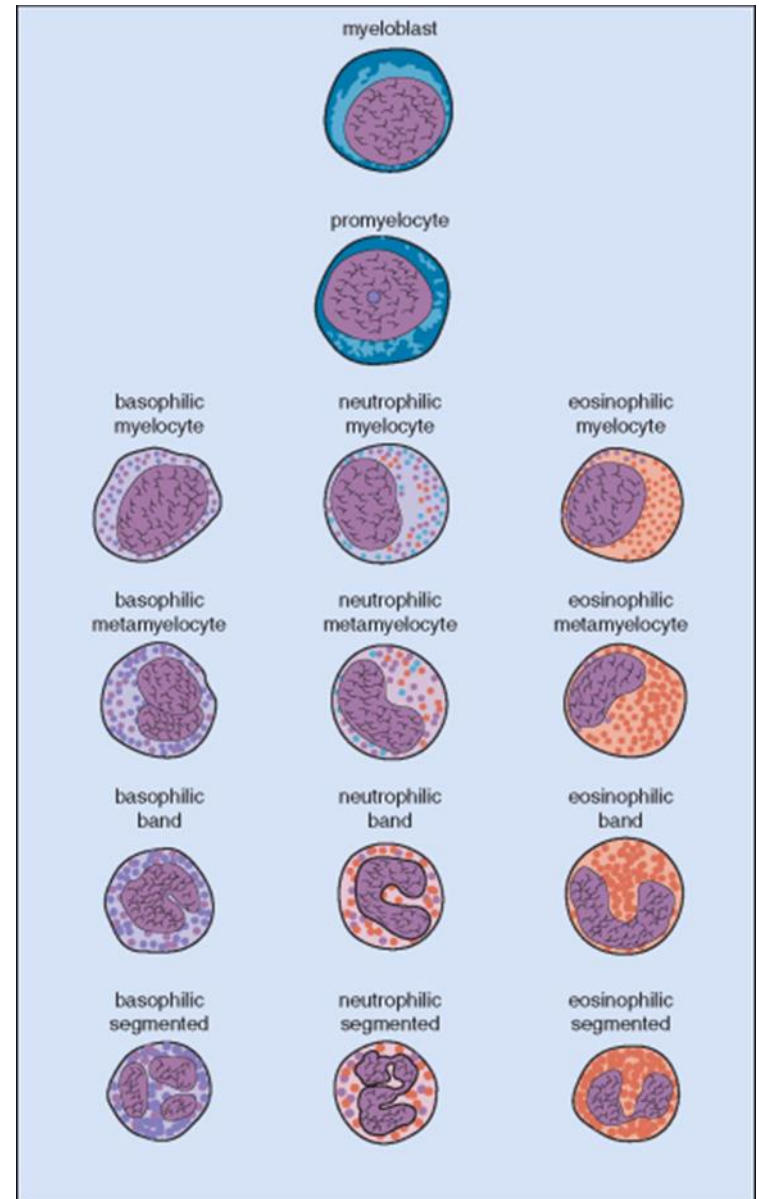
- Primo passo nell'analisi di un aspirato midollare è la valutazione dei **rapporti tra i diversi elementi cellulari**.
 - La conta differenziale determina il rapporto mielo-eritroide vale a dire il rapporto tra la componente mieloide e quella eritroide valutato su 200-500 cellule.
 - In condizioni di normalità esso si aggira tra 2:1 e 4:1. In alternativa si può valutare il rapporto tra gli elementi mieloidi senza i leucociti maturi e quelli eritroidi (rapporto leuco-eritrogenico v.n. 0,6-2,7) ed il rapporto mielo-linfoide (1-17) e linfo-eritroide (0,2-4,1).
 - Valutazione dei **rapporti tra gli elementi maturanti di ciascuna serie emopoietica come pure degli elementi non emopoietici e determinazione del mielogramma**.
 - La determinazione del mielogramma secondo alcuni autori non sarebbe in realtà così precisa come si potrebbe pensare: il tessuto midollare in esame inevitabilmente subisce fenomeni di diluizione e di contaminazione ad opera del sangue midollare e le modificazioni legate alla tecnica di striscio e di colorazione del preparato.
 - Si ritiene quindi, da parte di questi autori, che il conteggio differenziale debba tenere conto anche di **una valutazione complessiva d'insieme**.

Serie eritroide

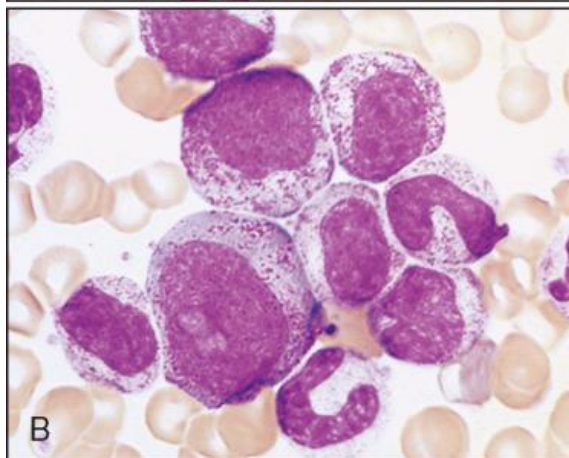
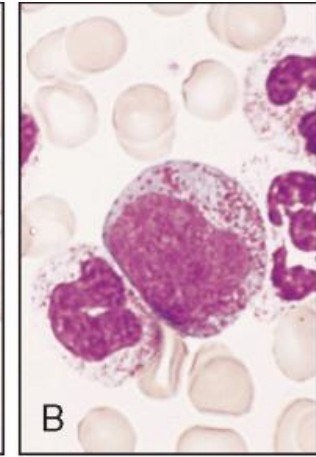
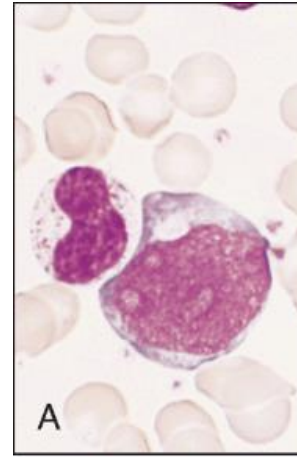
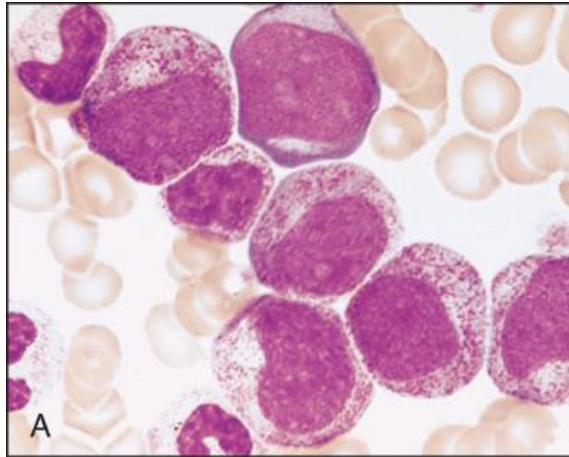




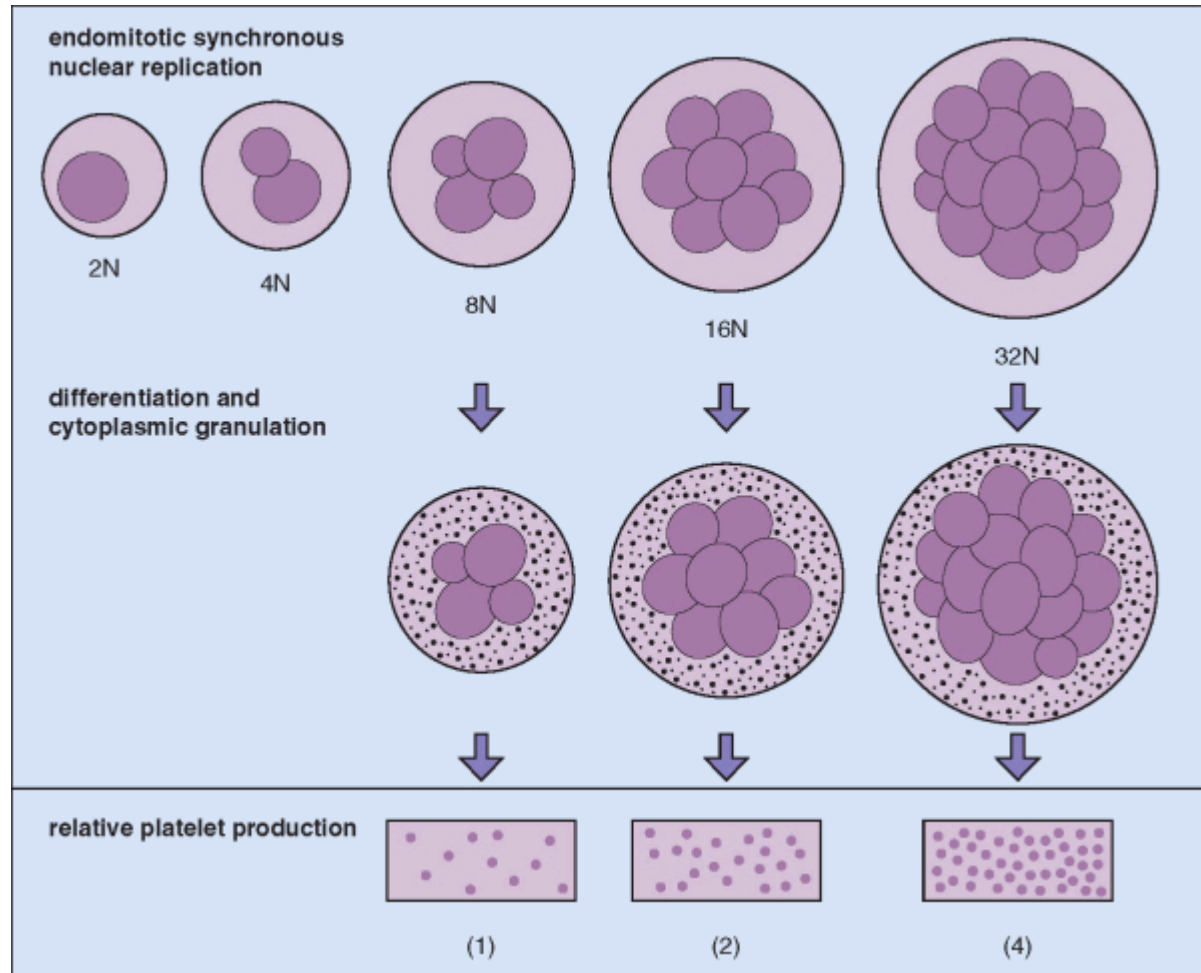
Serie mieloide



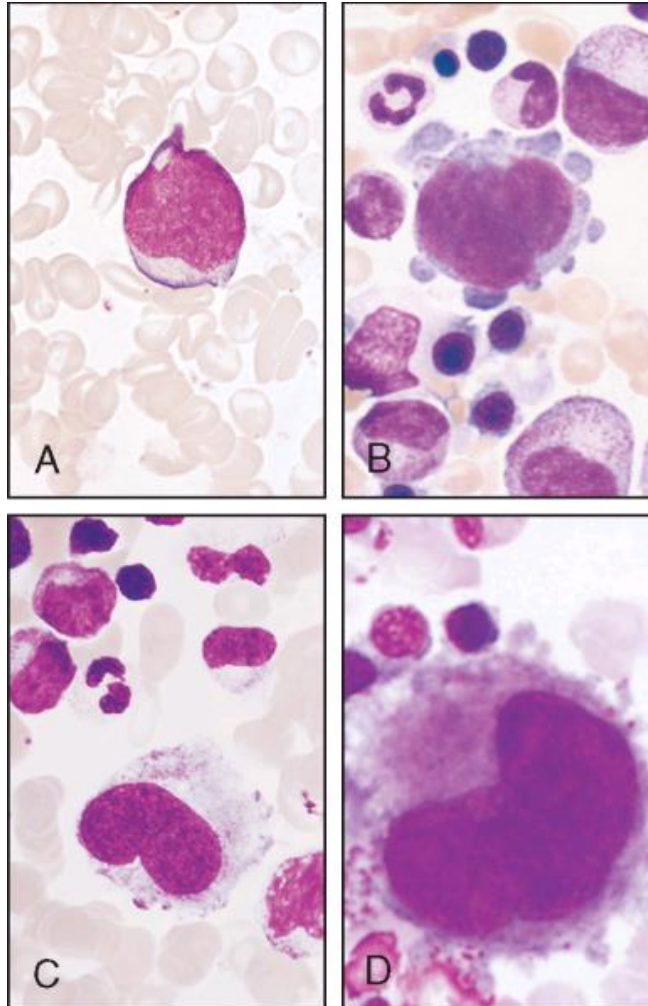
Serie mieloide

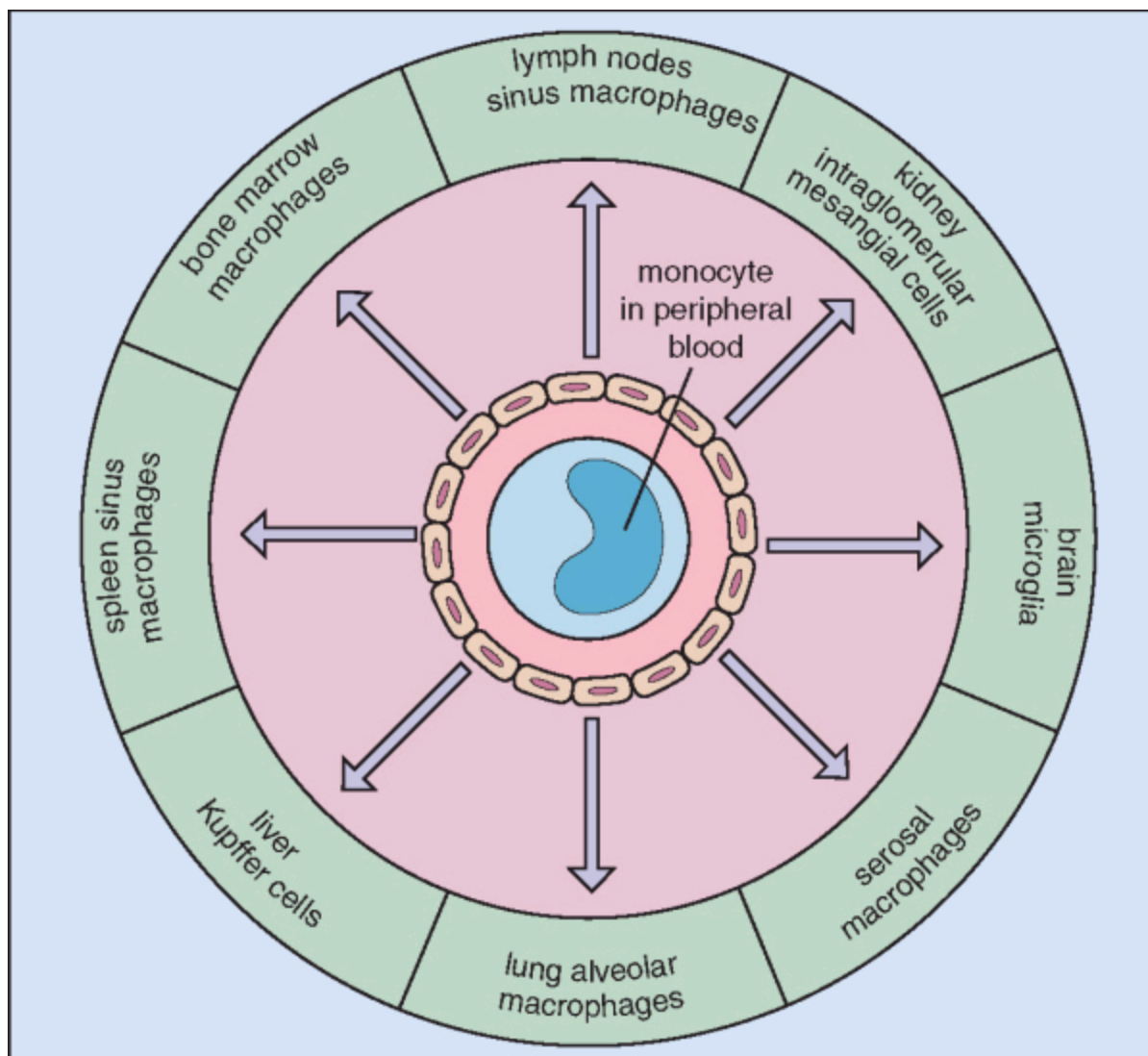


megacariocitopoiesi



megacariocitopoiesi





Mielogramma

	%
Cellule reticolari	-
Mieloblasti	2 (0,3-5)
Promielociti	5 (1-8)
Mielociti	
neutrofili	12 (5-19)
eosinofili	1,5 (0,5-3)
basofili	0,3 (0-0,5)
Metamielociti	22 (13-22)
Granulociti	
neutrofili	20 (7-30)
eosinofili	2 (0,5-4)
basofili	0,2 (0-0,7)
Linfociti	10 (3-17)
Monociti	-
Megacariociti	-
Plasmacellule	0,4 (0-2)
Proeritroblasti	4 (1-8)
Eritroblasti	18 (7-32)
basofili	
policromatofili	
ortocromatici	

Esame dell'aspirato midollare

- Successivamente si procede all'analisi degli aspetti **morfologici qualitativi** che è parte importante spesso decisiva nel processo diagnostico:
 - **anomalie morfologiche** (es. megaloblastosi)
 - **anomalie nel processo maturativo** a livello
 - nucleare (binuclearità, carioressi, picnosi, anomalia di Pelger-Huet, etc.)
 - citoplasmatico (disgranulopoiesi, vacuoli, etc.)
 - asincronie maturative nucleo-citoplasmatiche (es. sindromi mielodisplastiche)
 - **presenza di inclusioni cellulari patologiche** (depositi di ferro, cellule di Pot, etc.)
- La valutazione dei reperti midollari deve inoltre tenere presente la notevole variabilità che esiste nell'ambito dei midolli normali.

Esame dell'aspirato midollare

- La valutazione morfologica dopo colorazione May Grünwald Giemsa può essere successivamente completata con **accertamenti citochimici quali la reazione di Perls** (al blu di Prussia) al fine di determinare gli accumuli di ferro nell'interstizio e nei macrofagi midollari.
- Tale valutazione espressa secondo una scala semiquantitativa viene valutata a piccolo ingrandimento analizzando le zone del vetrino nelle quali il materiale è meno distribuito.
- La valutazione procede quindi a maggiore ingrandimento per valutare la presenza di sideroblasti ed in particolare, nei quadri di displasia midollare, la presenza di sideroblasti ad anello.

Esame dell'aspirato midollare

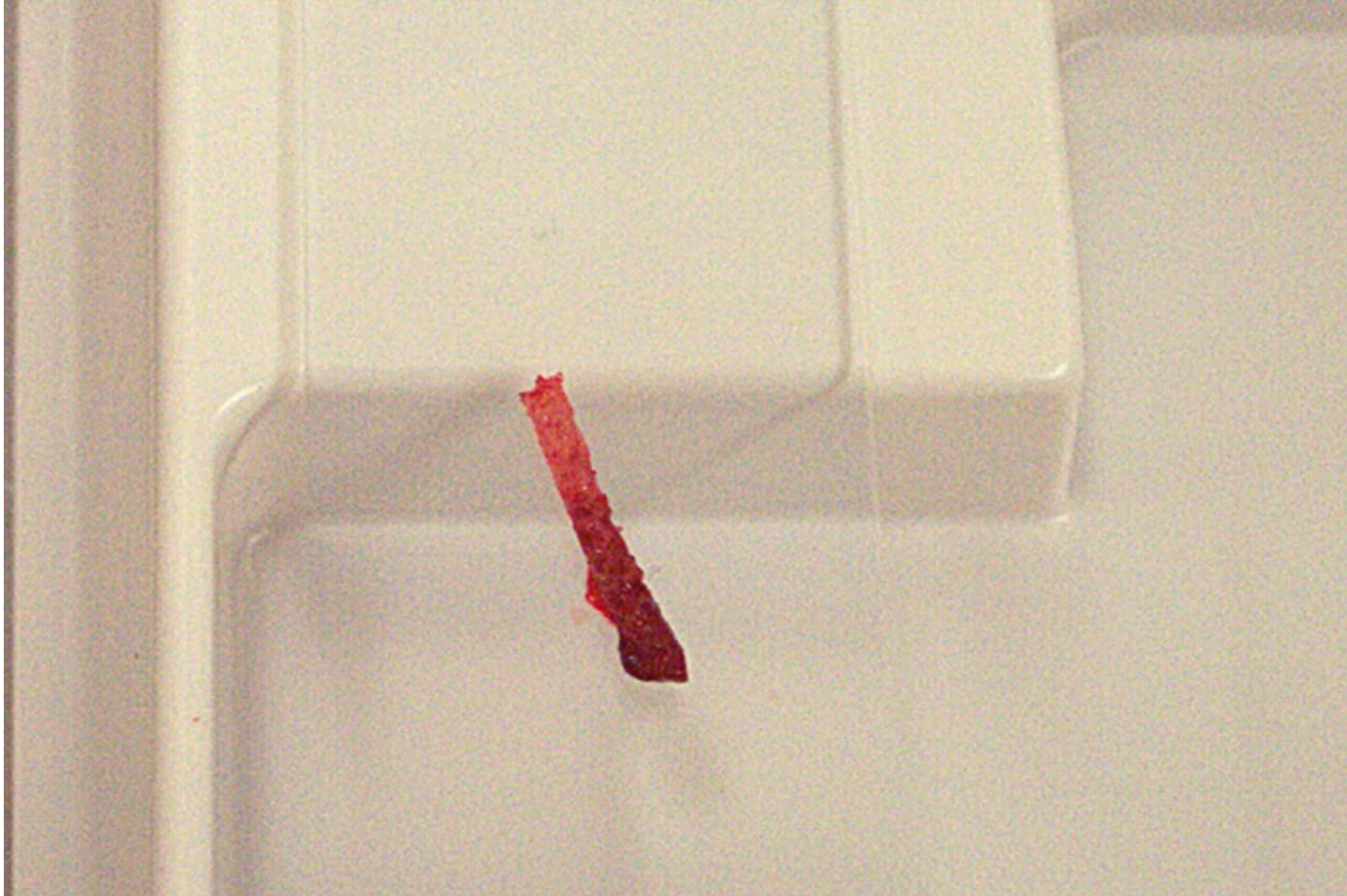
- Valutazioni citochimiche quali il PAS, la mieloperossidasi, il Sudan B Black, le esterasi specifiche e aspecifiche, la fosfatasi acida, la fosfatasi alcalina leucocitaria vengono principalmente effettuate nella definizione dei processi leucemici.
- Altre indagini di primaria importanza sono:
 1. l'analisi immunologica secondo tecniche immunoenzimatica o immunofluorescenza in citometria a flusso nella valutazione dei processi leucemici,
 2. l'analisi citogenetica e molecolare delle cellule midollari patologiche (leucosi acute, leucemia mieloide cronica, disordini linfoproliferativi etc.).

BIOPSIA OSSEA

- La biopsia ossea è un esame relativamente più cruento della biopsia midollare rispetto alla quale presenta indicazioni e dà valutazioni diverse talvolta complementari.
- Le indicazioni alla esecuzione della biopsia ossea in ambito ematologico sono:
 - la stadiazione di processi linfomatosi
 - le sindromi mieloproliferative
 - le sindromi mielodisplastiche
 - le aplasie o ipoplasie midollari
 - l'hairy cell leukemia
 - le fibrosi midollari
 - tutte le situazioni di punctio sicca e di pancitopenia
 - il sospetto di metastasi midollari da neoplasia epiteliale
 - la valutazione di processi granulomatosi

Biopsia ossea





Biopsia ossea

- Il materiale estratto è costituito da una **carotina di tessuto midollare** il cui esame, dopo opportuna fissazione ed inclusione, viene effettuato, diversamente dall'aspirato midollare, dall'anatomo patologo.
- L'ematologo da parte sua effettua una apposizione del frustolo su vetrino ed osserva al microscopio ottico il materiale adeso.
- .

Biopsia ossea

- La valutazione del midollo tramite biopsia dà **informazioni differenti rispetto a quelle fornite dall'aspirato midollare**: in particolare è possibile dare una valutazione della struttura del tessuto midollare con definizione
 1. della quota cellulare emopoietica
 2. della sede dove vengono osservati gli elementi delle filiere emopoietiche nell'ambito del tessuto midollare
 3. dei rapporti quantitativi tra le divise componenti midollari soprattutto con il microambiente midollare e con le componente cosiddette accessorie, alle quali oggi vengono attribuite proprietà funzionali di primaria importanza nella fisiologia del midollo e di altri sistemi cellulari.
 4. riconoscimento di eventuali localizzazioni metastatiche, di proliferazioni neoplastiche epiteliali extramidollari
 5. valutazione della componente osteo-trabecolare.

Preparazione delle sezioni

- **Fissazione.**
- La fissazione del preparato può essere effettuata con diverse soluzioni: le più utilizzate sono la formalina al 10% tamponata a pH 7.0 ed il B5.
- Il B5 è costituito da una miscela di 9 parti di una soluzione di acetato di Na (1.25 gr) e Cloruro di Hg (6 gr) in 90 ml di acqua distillata (la soluzione è stabile per circa 72 h) ed una parte di aldeide formica al 40% (da preparare subito prima dell'esecuzione della biopsia).
- Il B5 offre il vantaggio di ridurre i tempi di fissazione (2 h contro le 12-18 della formalina) permettendo una maggiore conservazione dei dettagli morfologici e l'esecuzione di alcune indagini di tipo immunoistochimico intracitoplasmatiche.
-

Preparazione delle sezioni

- **Decalcificazione.**
- Successivamente il preparato dopo essere stato posto in alcool 70% per circa 30 min., viene sottoposto a processo di decalcificazione per 2 h in una soluzione di EDTA (37.22 g in 1 L di acqua distillata portato ad ebollizione) a cui vanno aggiunti 70 ml di HCl concentrato (a 40 °C). La soluzione dopo una notte di riposo va filtrata prima dell'uso. Il processo di decalcificazione comporta inevitabilmente dei fenomeni di distorsione della struttura midollare ed una alterazione dei dettagli morfologici cellulari (perdita delle granulazioni degli elementi mieloidi ed incremento della colorazione di fondo nelle reazioni immunoistochimiche). L'utilizzo di resine plastiche (metacrilato) permette dopo aver fissato il preparato di passare direttamente alla inclusione senza decalcificazione.

-

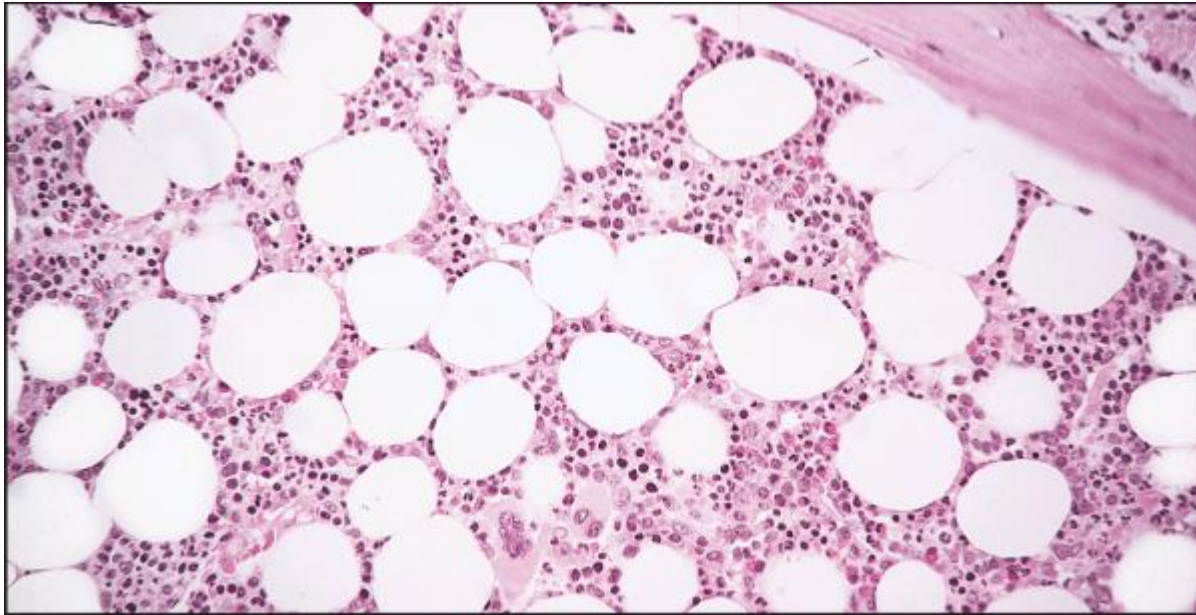
Preparazione delle sezioni

- **Inclusione.**
- Dopo aver sottoposto il preparato decalcificato alla scala ascendente e discendente degli alcoli per disidratarlo e diafanizzarlo, lo si include in paraffina e, dopo un periodo di tempo sufficiente per la solidificazione, con il microtomo lo si seziona per ottenere delle fettine dello spessore di 4-5 μ .
- Nel caso in cui l'inclusione venga effettuata con resine di metacrilato è possibile ottenere, con microtomi motorizzati con lama di vetro, sezioni più sottili (1-2 μ) le quali, prima di essere colorate, vanno trattate per rimuovere la resina con acetone, metanolo e soluzioni di metanolo-ammonio e acqua. L'utilizzo di queste resine permette per la rigidità che esse conferiscono al preparato di sezionarlo direttamente senza ricorrere alla decalcificazione, conservando allo stesso tempo i dettagli morfologici cellulari.
-

Preparazione delle sezioni

- **Colorazione.**
- Il preparato viene quindi colorato di routine con ematossilina ed eosina, con metodiche di impregnazione argantica per evidenziare la struttura reticolare (sec. Gomori) e con il PAS.
- In seconda istanza o per indagini mirate è possibile ricorrere a colorazioni istochimiche più raffinate (Perls, naftol-AS-D-cloro acetato esterasi, Rosso Congo).
- Per le colorazioni con tecniche immunoistochimiche non vengono utilizzati preparati inclusi in metacrilato in quanto la struttura della resina impedisce, per motivi sterici, il passaggio delle macromolecole utilizzate in queste reazioni immunologiche.
- I preparati ottenuti con metodiche di inclusioni classiche non permettono tuttavia la conservazione di tutti i marcatori immunologici evidenziabili su materiale non fissato.
- Per alcuni markers è necessario operare colorazioni su pezzi di tessuto non fissati freschi o sezionati dopo congelamento.

BIOPSIA OSSEA NORMALE



Esame della biopsia ossea

- L'esame delle sezioni biottiche viene condotto **dall'anatomo patologo**.
- Il procedimento diagnostico seguito prevede la valutazione di aspetti morfo-funzionali che nel loro complesso permettono di giungere alla definizione del processo patologico in atto.
- Valutazione quantitativa della **cellularità definita come percentuale** sul totale considerando la componente adiposa.
 - Tale dato va obbligatoriamente correlato con il quadro ematologico periferico, con l'età e la storia clinica del paziente, con le terapie effettuate. Il range di normalità a livello della cresta iliaca è stato definito tra il 30-80%. In un soggetto anziano la componente emopoietica è ridotta soprattutto se valutata a livello della cresta iliaca ed il tessuto midollare è occupato principalmente da tessuto adiposo. La componente emopoietica va infatti riducendosi nell'età avanzata: a 70 anni viene valutata mediamente pari al 30 % (range 11-47%) contro una media del 79 % sotto i 10 anni e del 50% a 30 anni.
- Un midollo potrà essere quindi definito normo-, iper-, ipo-cellulato a seconda della percentuale riscontrata ed in rapporto con l'età del paziente in oggetto.

Esame della biopsia ossea

- **Topografia** degli elementi emopoietici.
- Nel midollo normale gli elementi emopoietici presentano una localizzazione caratteristica che viene a modificarsi in condizioni patologiche.
- Gli **elementi mieloidi più immaturi** sono localizzati a livello delle regioni **trabecolari** direttamente a contatto con la superficie endostale e con le arteriole midollari.
- Gli **isolotti eritroidi e gli elementi megacariocitari** sono invece localizzati nelle regioni **intertrabecolari**.
 - Gli eritroni risultano costituiti da elementi eritroblastici in diverse fasi maturative con un elemento macrofagico centrale (cellula nutrice) che li rifornisce di ferro e ne regola l'attività proliferativa.
 - Questo tipo di "homing" è sicuramente correlato ad un ruolo decisivo svolto dagli elementi endostali, endoteliali oltre che dagli adipociti e dagli elementi simil-fibroblastici nella regolazione dell'emopoiesi mediante produzione di citochine (fattori di crescita, interleuchine).
 - Nelle mielodisplasie, importante e caratteristico fattore prognostico negativo è il ritrovamento di precursori mieloidi in posizione centrale (ALIP) come pure suggestivo di patologia mielomatosa è il riscontro di nidi plasmacellulari.

•

Esame della biopsia ossea

- Valutazione dei **rapporti quantitativi** tra le diverse filiere emopoietiche che risultano alterati in modo significativo nelle sindromi mieloproliferative nelle quali si può osservare oltre che ad una ipercellularità, soprattutto nelle fasi iniziali, la prevalenza a seconda della forma di una filiera sulle altre.
- Valutazione del grado di **fibrosi midollare** ripetutamente correlato con la prognosi nella mielofibrosi idiopatica, nella leucemia mieloide cronica e nelle sindromi mielodisplastiche.
- Definizione di **alterazioni di tipo qualitativo: questo tipo di indicazioni sono difficilmente valutabili** in una sezione di biopsia ossea anche se di ottima qualità come quelle incluse in resine di metacrilato, mentre vengono ben valutate in un aspirato midollare.

Esame della biopsia ossea

- Ricerca di eventuali **localizzazioni midollari** nella stadiazione di processi linfoproliferativi (linfomi non-Hodgkin, malattia di Hodgkin) e di processi neoplastici extramidollari.
- Nella valutazione dell'interessamento in corso di processi linfoproliferativi risulta spesso importante anche ai fini prognostici definire oltre alla presenza o meno dell'invasione midollare anche del tipo di interessamento (nodulare, follicolare, interstiziale o diffuso), della sede di localizzazione (centrale, paratrabecolare, mista) ed ovviamente del grado di infiltrazione.
- Importantissimo in questi casi è la differenziazione tra un interessamento di natura neoplastica linfomatosa e **la presenza invece di follicoli linfatici benigni spesso reattivi**.
 - Criteri di ordine morfologico (dimensioni del follicolo, polimorfismo cellulare, presenza del centro germinativo) e l'utilizzo di metodiche immunoistochimiche volte alla ricerca di marcatori immunologici e molecolari che dimostrino la clonalità della popolazione in esame, sono di ausilio in questa discriminazione.
 - Le metodiche immunoistochimiche possono inoltre essere di grande ausilio nella definizione della natura di certe localizzazioni metastatiche midollari.

COLORAZIONI SPECIALI

- Le colorazioni speciali sono di 2 categorie:
 1. Citochimiche che usano reazioni enzimatiche della cellula per la colorazione
 2. Immunocitochimiche che colorano specifici epitopi cellulari con anticorpi monoclonali.
- Queste colorazioni sono molto utili per la diagnosi e caratterizzazione delle neoplasie ematologiche.

COLORAZIONI CITOCHIMICHE

- Le colorazioni citochimiche sono particolarmente utili nella classificazione delle leucemie acute
- Esse permettono una corretta classificazione delle leucemie acute mieloidi rispetto a quelle linfoidi e la subclassificazione delle leucemie acute mieloidi secondo la classificazione FAB (Franco-Americana-Britannica) e/o WHO (World Health Organization).
- Le colorazioni citochimiche possono essere effettuate su sangue periferico e midollare.

MIELOPEROSSIDASI (MPO)

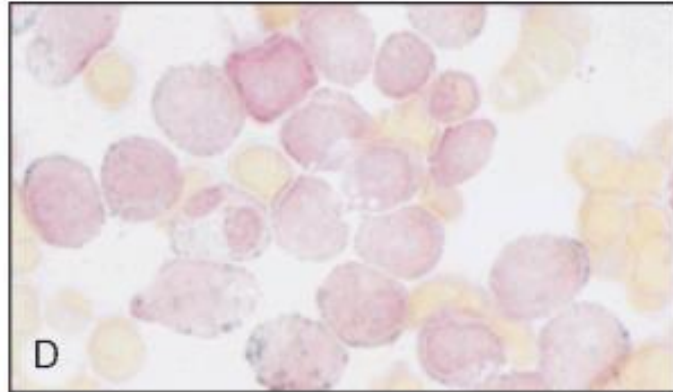
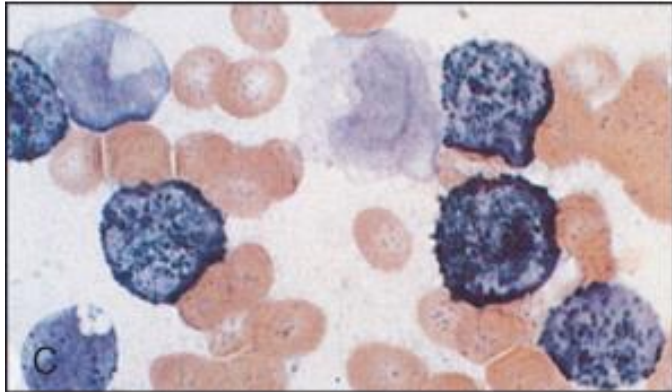
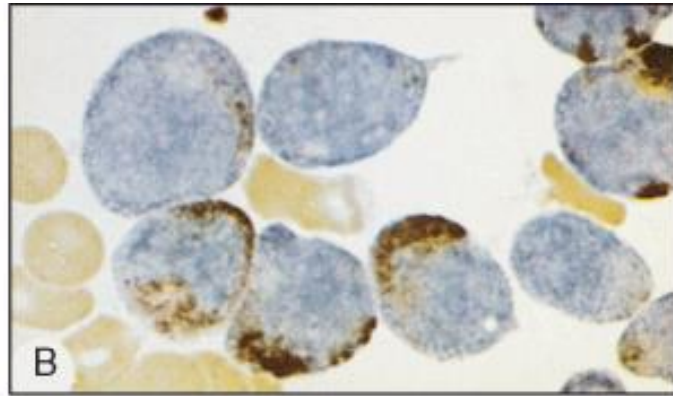
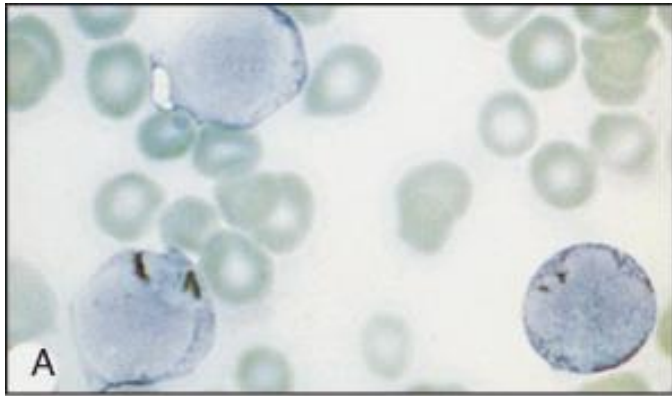
- I granuli primari dei neutrofili e quelli secondari degli eosinofili contengono la MPO
- I lisosomi dei monociti sono debolmente positivi.
- I linfociti e i GR sono privi di MPO.
- Originariamente la colorazione dipendeva dalla ossidazione della benzidina dal perossido di idrogeno; tuttavia poiché la benzidina è un carcinogeno, altri substrati sono possibili 3-amino-9-ethylcarbazole o 4-chloro-1-naphthol, che sono ossidati dalla MPO a formare un precipitato brunastro nelle cellule che contengono MPO.
- La MPO è un enzima sensibile alla luce ed i vetrini dovrebbero essere colorati immediatamente o conservati al buio.
- L'attività enzimatica diminuisce nelle cellule nel tempo e quindi non dovrebbe essere effettuata su vetrini più vecchi di 3 settimane.
- La MPO è sensibile al caldo ed al metanolo.
- Le cellule eritroidi possono colorarsi per la MPO dopo trattamento con metanolo per una interazione non enzimatica tra i reagenti della colorazione e l'Hb (*pseudoperossidasi* o *Lepehne reaction*).

SUDAN BLACK B

- Il Sudan black B colora i fosfolipidi intracellulari ed altri.
- Il pattern di colorazione è analogo alla MPO con una colorazione positiva per le cellule granulocitarie e gli eosinofili, debole colorazione per i monociti, e negatività per i linfociti, sebbene una positività può essere presente nei granuli azzurrofilo dei linfoblasti.
- Il Sudan black B ha il vantaggio rispetto alla MPO che può essere usata in preparati vecchi di sangue e midollo e che schiarisce poco nel tempo.

Leucemia mieloide acuta

(A, B) LAM M2, Sudan B Black



(C) LAM M4 Sudan B Black

(D) LAM M2, MPO

ESTERASI SPECIFICA (NAPHTHOL AS-D CHLOROACETATE)

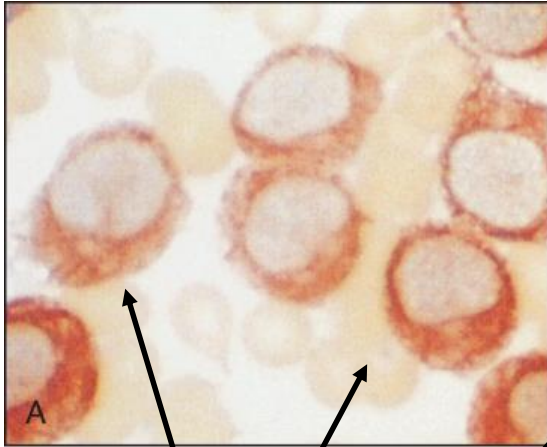
- L'esterasi specifica (naphthol AS-D chloroacetate), è usata per identificare le cellule della serie granulocitaria.
- Non colora i linfociti, ed i monociti.
- Grazie alla sua stabilità nei tessuto fissati ed inclusi in paraffina, è molto utile per identificare le cellule della serie granulocitaria e le mast cells nei tessuti.
 - È pertanto utile per identificare i tumori mieloidi extramidollari (sarcoma granulocitario e cloroma) costituiti da blasti.
- L'enzima esterasi nelle cellule idrolizza il substrato naphthol AS-D chloroacetate. Il prodotto di questa reazione è quindi è quindi accoppiato con un sale (dialzo salt) per formare un composto rosso-rosato nei siti di attività enzimatica.
- L'enzima è inibito dalla presenza di mercurio, soluzioni acide, calore e iodio producendo così risultati falsamente positivi.

ESTERASI NONSPECIFICHE (ALPHA-NAPHTHYL BUTYRATE OR ALPHA-NAPHTHYL ACETATE)

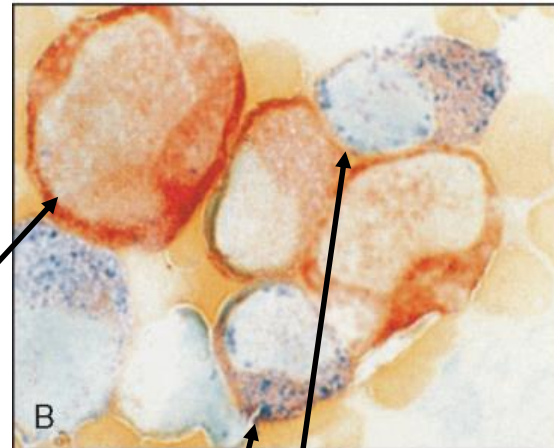
- Le esterasi non specifiche (alpha-naphthyl butyrate or alpha-naphthyl acetate) sono usate per identificare le cellule monocitarie in cui la reazione è NaF inibibile.
- I linfociti T maturi si colorano caratteristicamente a spot.
- Oltre ai monociti, la colorazione reagisce anche con macrofagi, istiociti, megacariociti, ed alcuni carcinomi.
- L'alpha-naphthyl butyrate è considerata più specifica, ma un po' meno sensibile della alpha-naphthyl acetate.
- I megacarioblasti non si colorano con l'alpha-naphthyl butyrate ma con l'alpha-naphthyl acetate.

esterasi

LAM M5



MONOBLASTI
esterasi non specifica positivi



MIELOBLASTI
esterasi specifica positivi

LAM M4

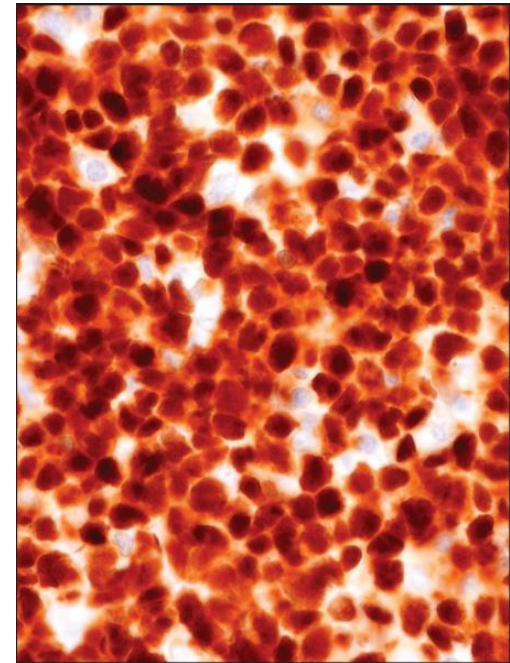
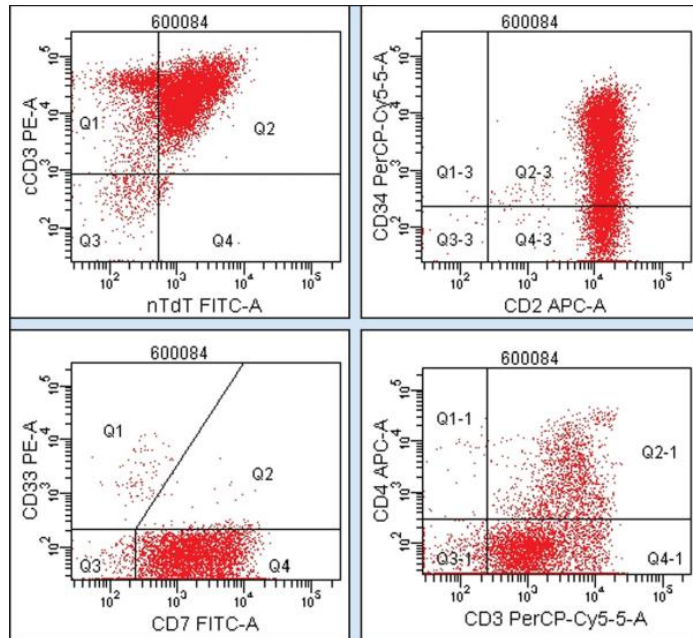
Leucemie acute: citochimica

	TALL	BALL	AML M1-M3	AML M4-M5	AML M6-M7
MPO	-	-	+ / +++	+	-
Sudan B Black	-	-	+ / +++	+	-
Esterasi non specifiche	-	-	-	++ (NaF inibibile)	+
Esterasi specifiche	-	-	+	+ (mieloidi) – (mono)	-
PAS	-	+ a granuli	+ / -	+	+
Fosfatasi Acida	+ focale	-	-	+ diffuso	+ focale

TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE (TdT)

- La TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) è un enzima intranucleare che catalizza l'aggiunta del deoxynucleotide trifosfato al parte terminale 3'-hydroxyl degli oligonucleotidi o polideossinucleotidi.
- La TdT si trova normalmente nel nucleo dei timociti e delle cellule linfoidi immature nel midollo ma non è presente nei linfociti maturi.
- È pertanto un marcatore utile nelle identificazione delle leucemie linfoblastiche ed in alcune leucemie mielodi acute.
- La TdT può essere determinata con **tecnica biochimica** con colorazione citochimica con **tecnica di immunofluorescenza**, o mediante **citometria a flusso**, o **metodica immunoistochimica**.
- La tecnica di immunofluorescenza indiretta è molto sensibile e può essere utilizzata su campioni seccati all'aria dopo diverse settimane.
- Metodiche immunoistochimiche possono essere utilizzate su campioni congelati e su sezioni di tessuto paraffinato.

TdT

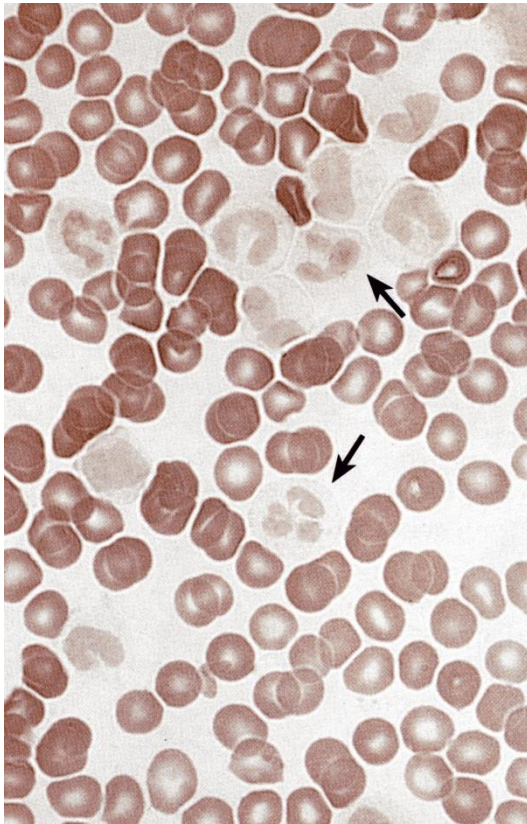


FOSFATASI ALCALINA LEUCOCITARIA

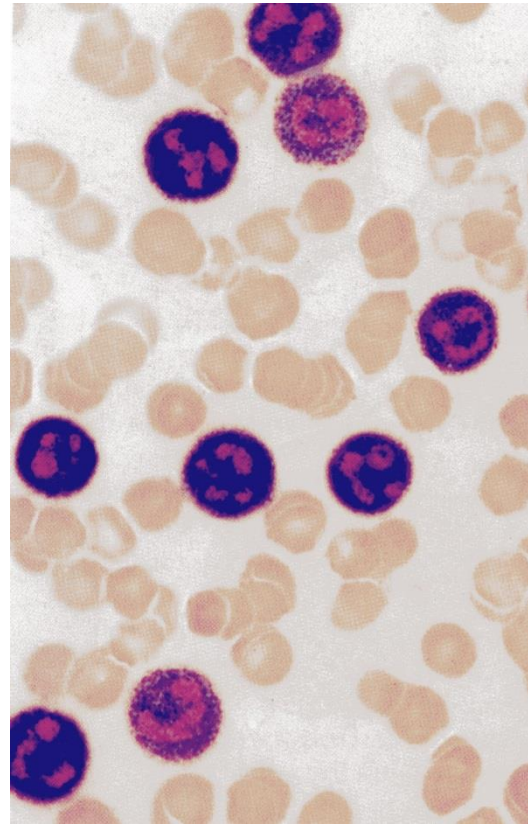
- La fosfatasi alcalina leucocitaria (FAL) si trova nel citoplasma dei neutrofili, degli osteoblasti, delle cellule endoteliali vascolari, e in alcuni linfociti.
- I livelli di FAL nei neutrofili di sangue periferico sono quantificati mediante uno score che viene utilizzato per differenziare la leucemia mieloide cronica dalle reazioni leucemoidi e dagli altri disordini mieloproliferativi cronici.
- I pazienti con CML hanno score bassi.
 - Anche la emoglobinuria parossistica notturna ed alcune sindromi mielodisplastiche possono avere score di FAL bassi.
- Le reazioni leucemoidi in risposta ad infezioni e altri disordini mieloproliferativi cronici (mielofibrosi e policitemia vera) hanno un elevato score di FAL.
- Nei campioni con EDTA c'è una rapida perdita di FAL.
- Il test è viene meglio effettuato su sangue fresco capillare o su sangue in eparina ed entro 48 ore.
- Gli strisci di sangue possono essere conservati in freezer per 2 - 3 settimane con poca perdita di attività.

CML: fosfatasi alcalina leucocitaria

**Leucemia
mieloide
cronica**



**Policitemia
vera**



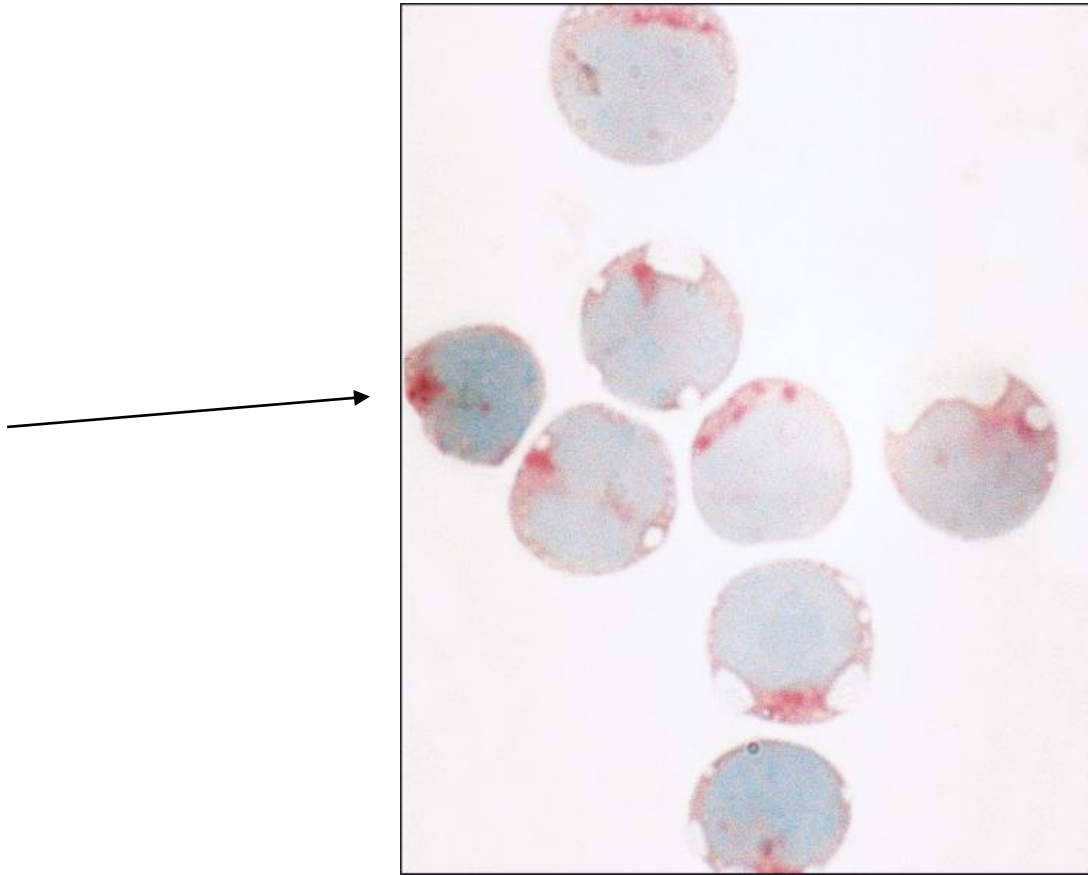
Condizioni Associate con anomali livelli di fosfatasi alcalina leucocitaria

Bassi livelli di FAL
Leucemia mieloide cronica
emoglobinuria parossistica notturna
neoplasie ematologiche (rare)
sindromi mielodisplastiche
infezioni (rare) od esposizione a tossici
Alti livelli di FAL
Infezioni
terapia con fattori di crescita
sindromi mieloproliferative croniche non LMC
quadr infiammatori
Gravidanza, contraccettivi orali
Stress
Farmaci (litio, corticosteroidi, estrogeni)

Fosfatasi acida

- Fosfatasi acida è presente nelle cellule ematopoietiche, ma i più alti livelli sono riscontrati nei macrofagi e negli osteoclasti.
- Un pattern di positività a spot si osserva in molti cellule T, ma questa positività non è sempre affidabile.
- La fosfatasi acida tartrato resistente (TRAP) è un isoenzima che si trova ad elevati livelli nella hairy cell leukemia e negli osteoclasti.
- Una TRAP positiva può talora essere osservata in alcune cellule T attivate, macrofagi, e istiociti (cellule di Gaucher).

Leucemia linfoblástica T



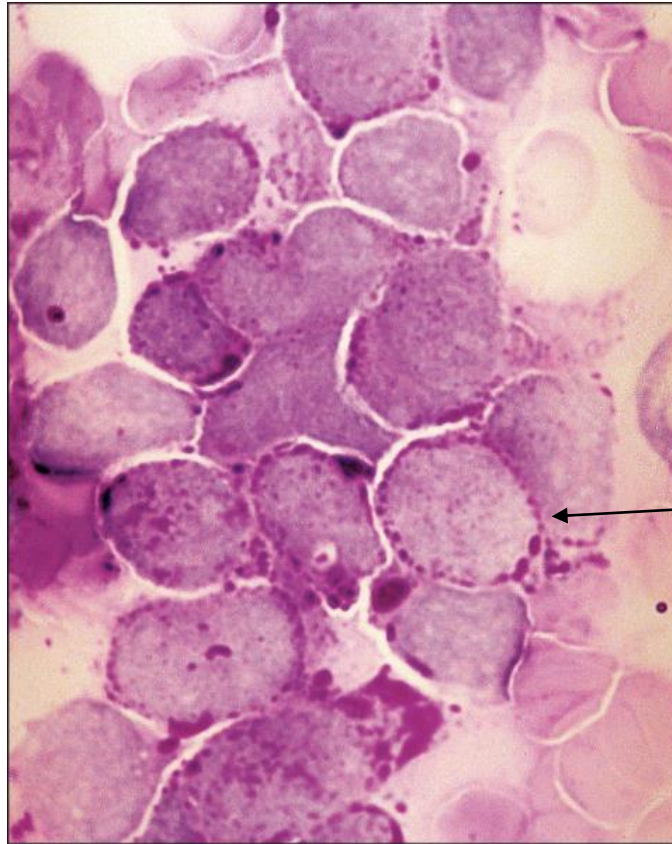
ACIDO PERIODICO DI SCHIFF (PAS)

- Il PAS colora il glicogeno intracellulare e i mucopolisaccaridi neutri, che sono presenti in quantità variabile nella maggior parte delle cellule ematopoietiche.
- Una positività per il PAS si ha nei blasti di leucemia acuta linfoblastica e mieloide, sebbene vi sia una certa variabilità tra i casi.
- Le eritroleucemie presentano una intensa diffusa positività citoplasmatica.
- Il PAS è inoltre utile per dimostrare l'anomalo accumulo di glucocerebrosidasi nella malattia di Gaucher.

PAS: eritroleucemia



Leucemia linfoblástica B



FERRO

- Il ferro cellulare viene identificato con la reazione di Perls o del blu di Prussia, nella quale il ferro ionico reagisce con il ferrocianuro acido che conferisce una colorazione blu.
- La colorazione del ferro è utilizzata per dimostrare il ferro negli eritroblasti (sideroblasti) e gli istiociti (ferro reticoloendoteliale).

Sideroblasti

Perinuclear Siderotic Granules



Il Working Group ha definito 3 tipi di sideroblasti:

Tipo 1: meno di 5 granuli di ferro nel citoplasma;

Tipo 2: 5 o più granuli di ferro, ma non in una distribuzione perinucleare;

Tipo 3 o sideroblasti ad anello: 5 o più granuli in posizione perinucleare, che circondano il nucleo o interessano almeno un terzo della circonferenza nucleare.

Nel conteggio dei sideroblasti ad anello, occorre valutare almeno 100 precursori eritroidi nei vari stadi maturativi.

La percentuale di sideroblasti ad anello ai fini della classificazione rimane il 15% come per la classificazione FAB e WHO.

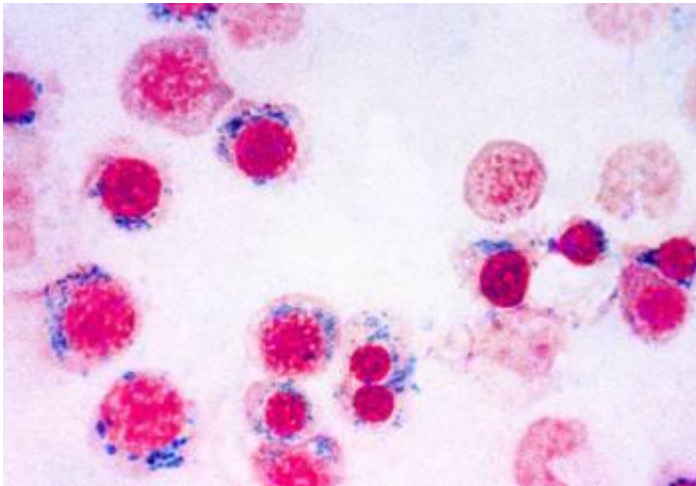


Figure 1. The presence of iron is detected by cytochemical stains and localized in the aspirate spicule

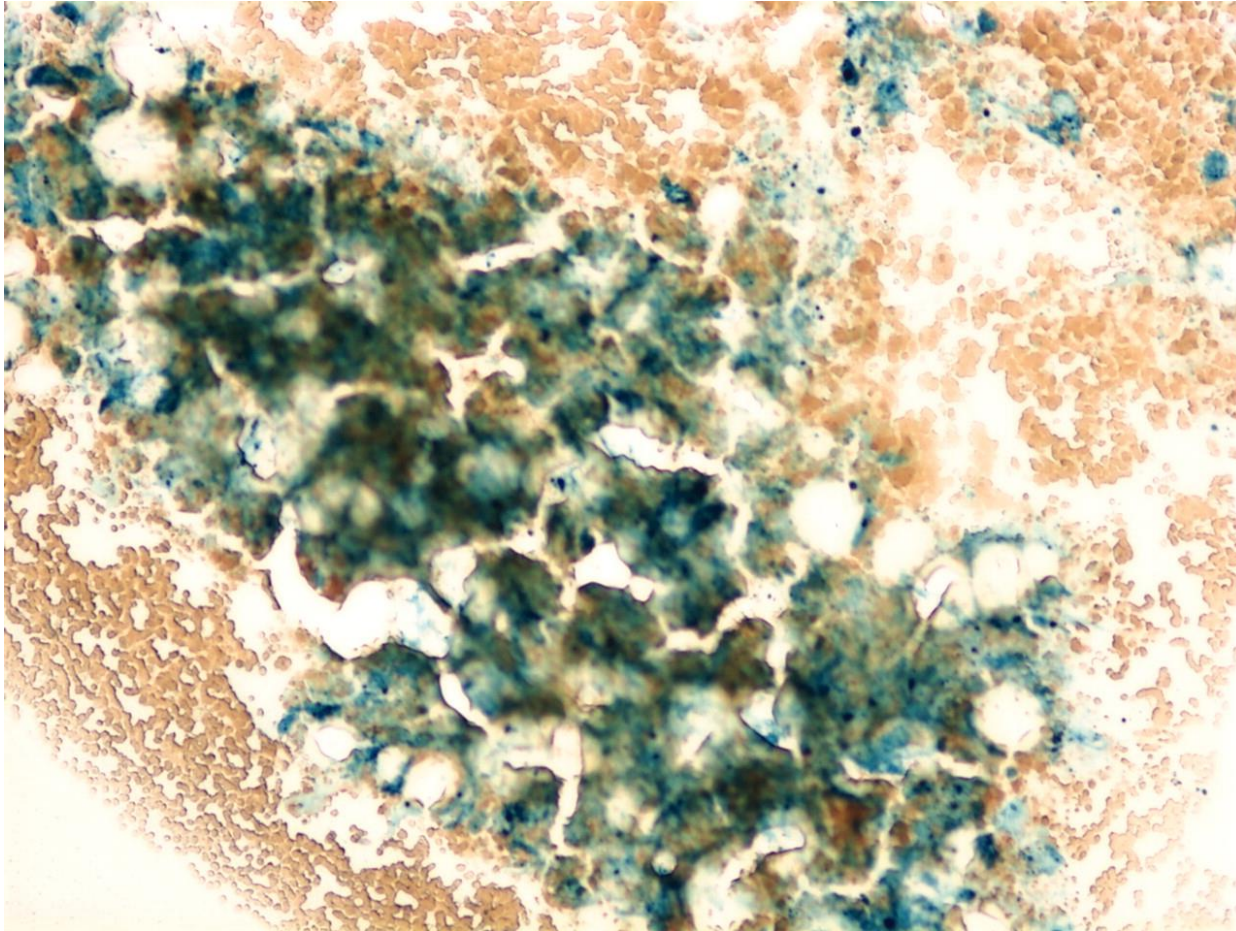
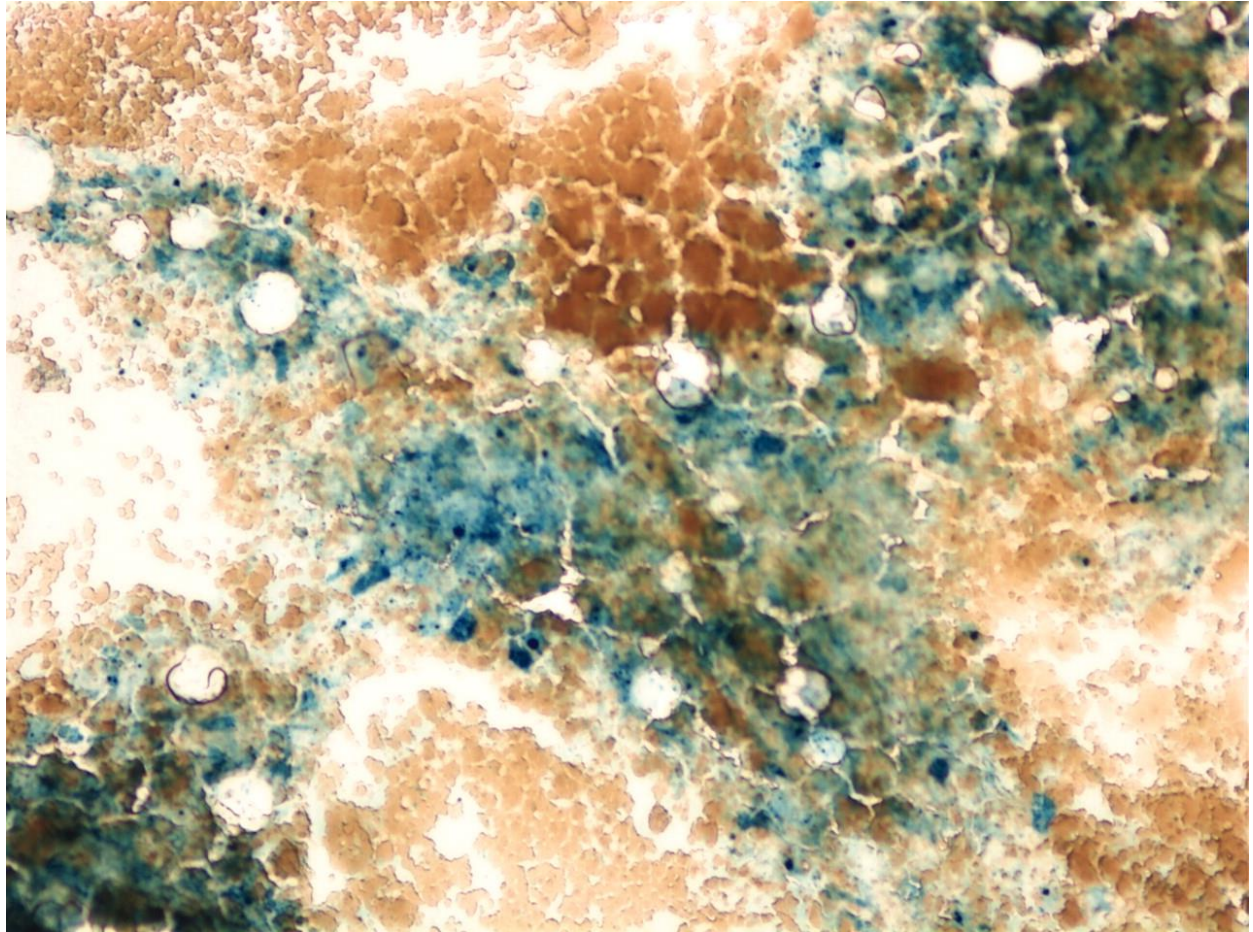


Figure 2. The iron is contained within cells of the RES system



Maslak, P. ASH Image Bank 2004;2004:101141

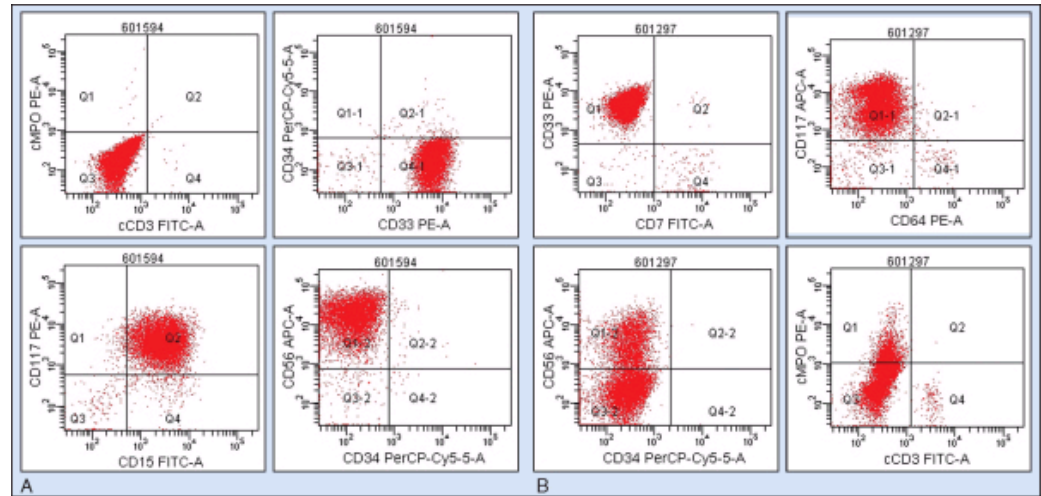
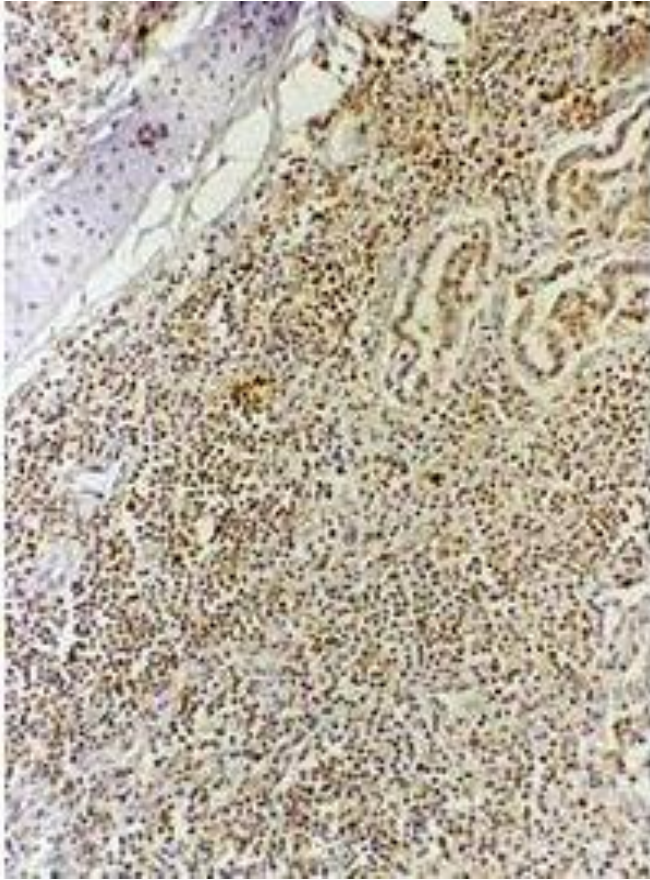
BLU DI TOLUIDINA

- Il blu di toluidina specificamente identifica i basofili e le mast cells reagendo con i mucopolisaccaridi acidi nei granuli cellulari per formare complessi metacromatici.
- Le mast cellule o i basofili maligni possono avere bassi livelli di mucopolisaccaridi acidi e possono non reagire alla colorazione.

Colorazioni immunocitochimiche

- Sono basate sull'utilizzo di anticorpi monoclonali che riconoscono specifici antigeni cellulari (di superficie ed intracellulari)
- Presentano un elevato livello di specificità, che consente una maggiore accuratezza diagnostica.
- Possono essere applicate al sangue periferico, midollo, sospensioni cellulari, tessuti.
- Alcuni anticorpi hanno sostituito le classiche tecniche citochimiche (ad esempio MPO) e possono essere utilizzati su campioni più vecchi o fissati.

MPO



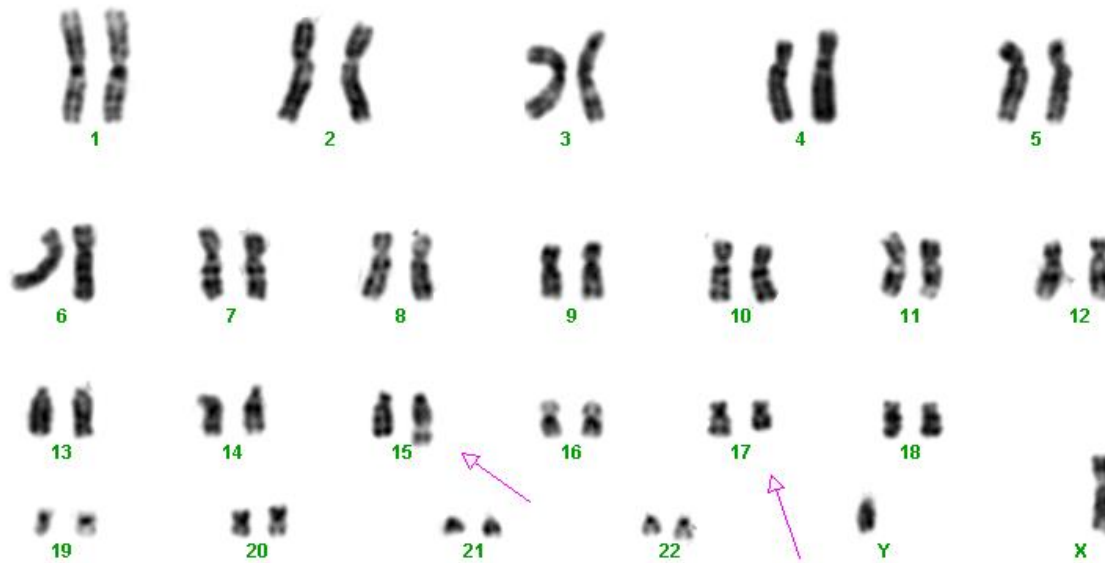
Altre metodiche

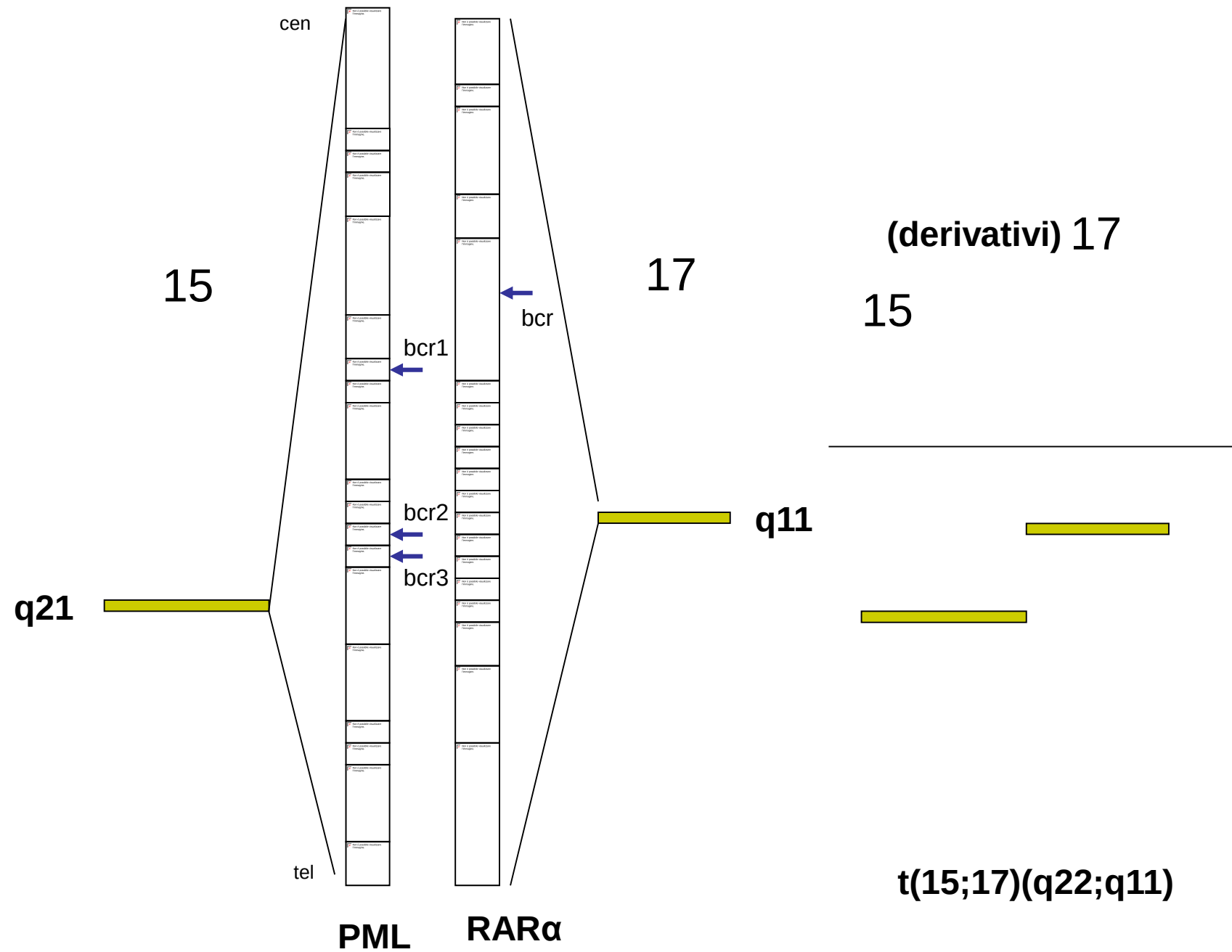
Table 4. Tests/procedures for a patient with AML

For a patient with AML

Tests to establish the diagnosis	Additional tests/procedures at diagnosis (cont'd)
Complete blood count and differential count	Analysis of comorbidities
Bone marrow aspirate	Biochemistry, coagulation tests, urine analysis**
Bone marrow trephine biopsy*	Serum pregnancy test††
Immunophenotyping	Information on oocyte and sperm cryopreservation‡‡
Genetic analyses	Eligibility assessment for allogeneic HCT (including HLA typing) ^a
Cytogenetics†	Hepatitis A, B, C; HIV-1 testing
Screening for gene mutations including‡	Chest radiograph, 12-lead electrocardiogram, and echocardiography or MUGA (on indication)
<i>NPM1, CEBPA, RUNX1, FLT3, TP53, ASXL1</i>	Lumbar puncture ^b
Screening for gene rearrangements§	Biobanking ^c
<i>PML-RARA, CBFB-MYH11, RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL1</i> , other fusion genes (if available)	Sensitive assessment of response by RT-qPCR or MFC^d
Additional tests/procedures at diagnosis	RT-qPCR ^{e,f} for <i>NPM1</i> mutation, <i>CBFB-MYH11</i> , <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , <i>BCR-ABL1</i> , other fusion genes (if available) ^d
Demographics and medical history	MFC ^{f,g}
Detailed family history¶	
Patient bleeding history#	
Performance status (ECOG/WHO score)	

t(15;17)





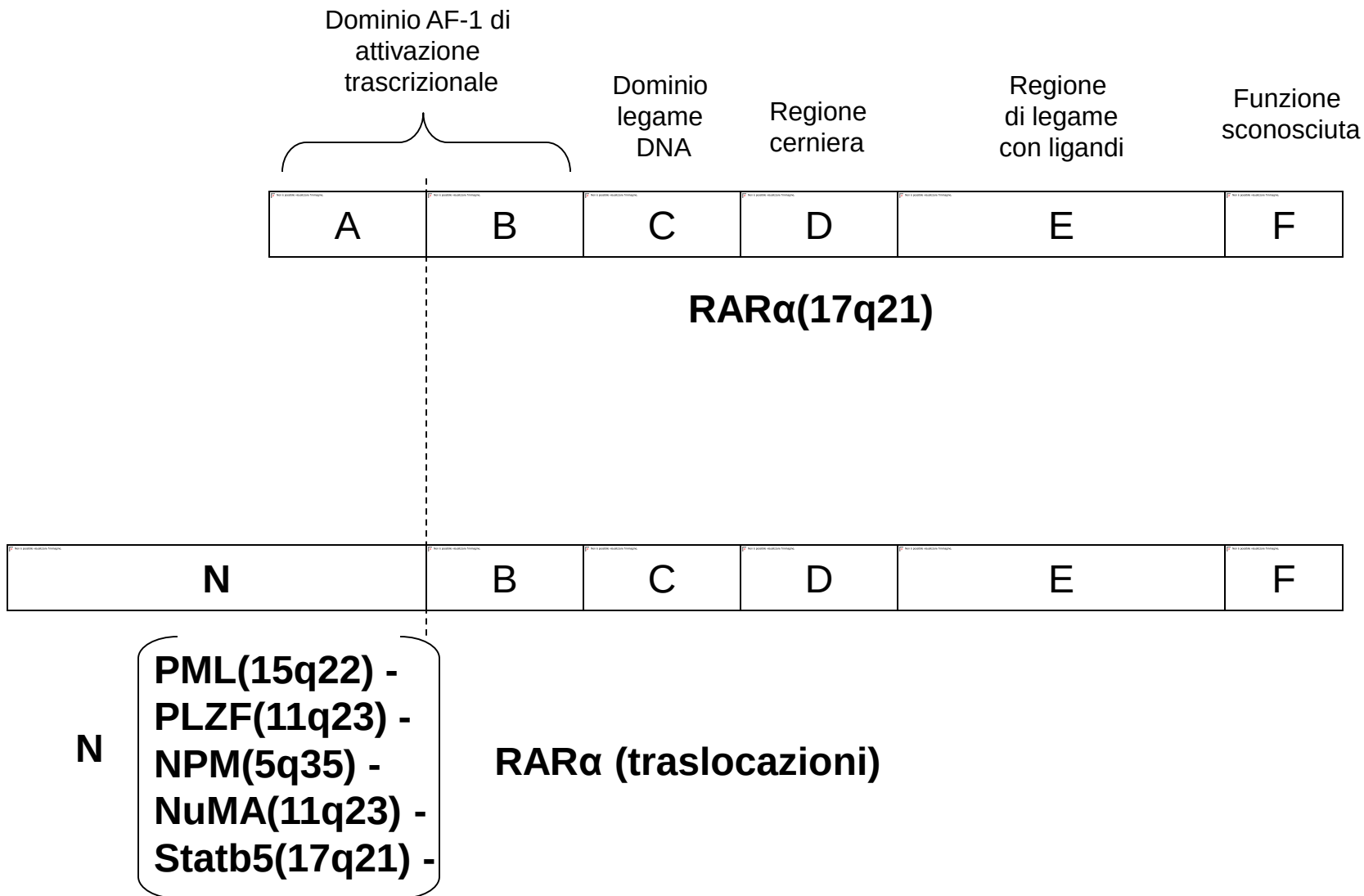
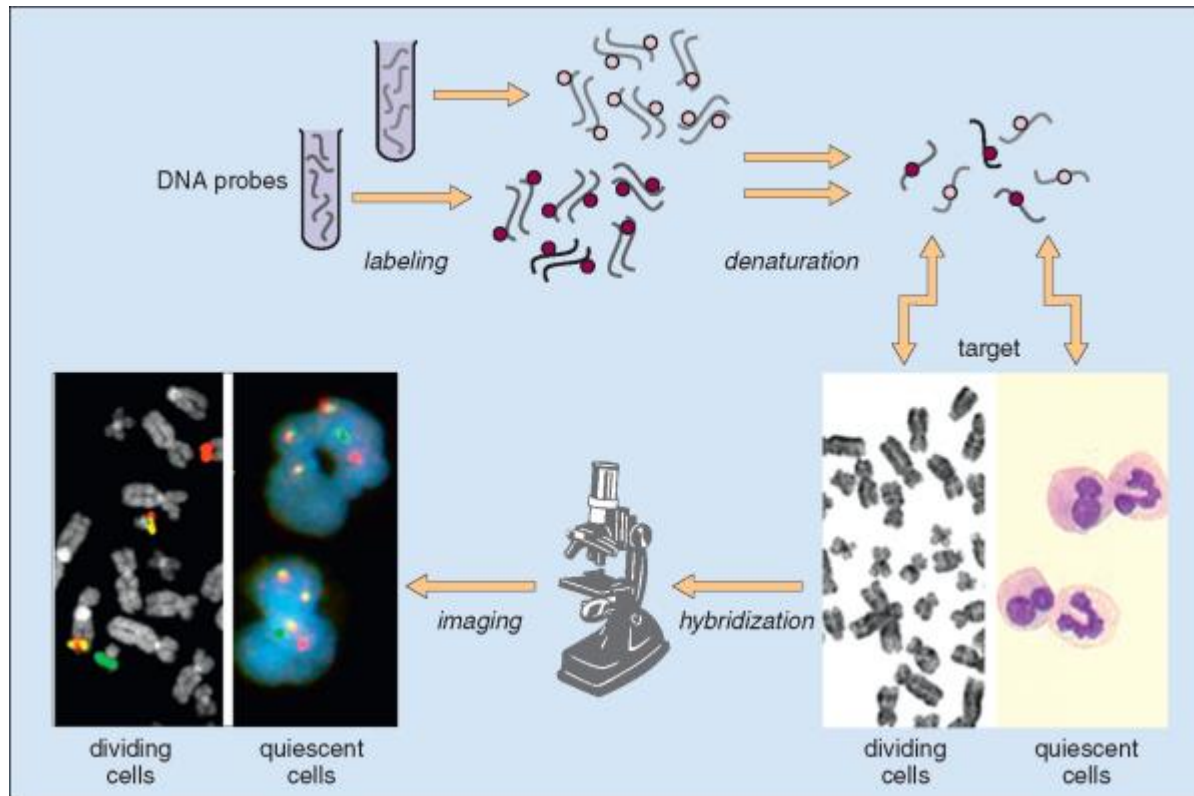
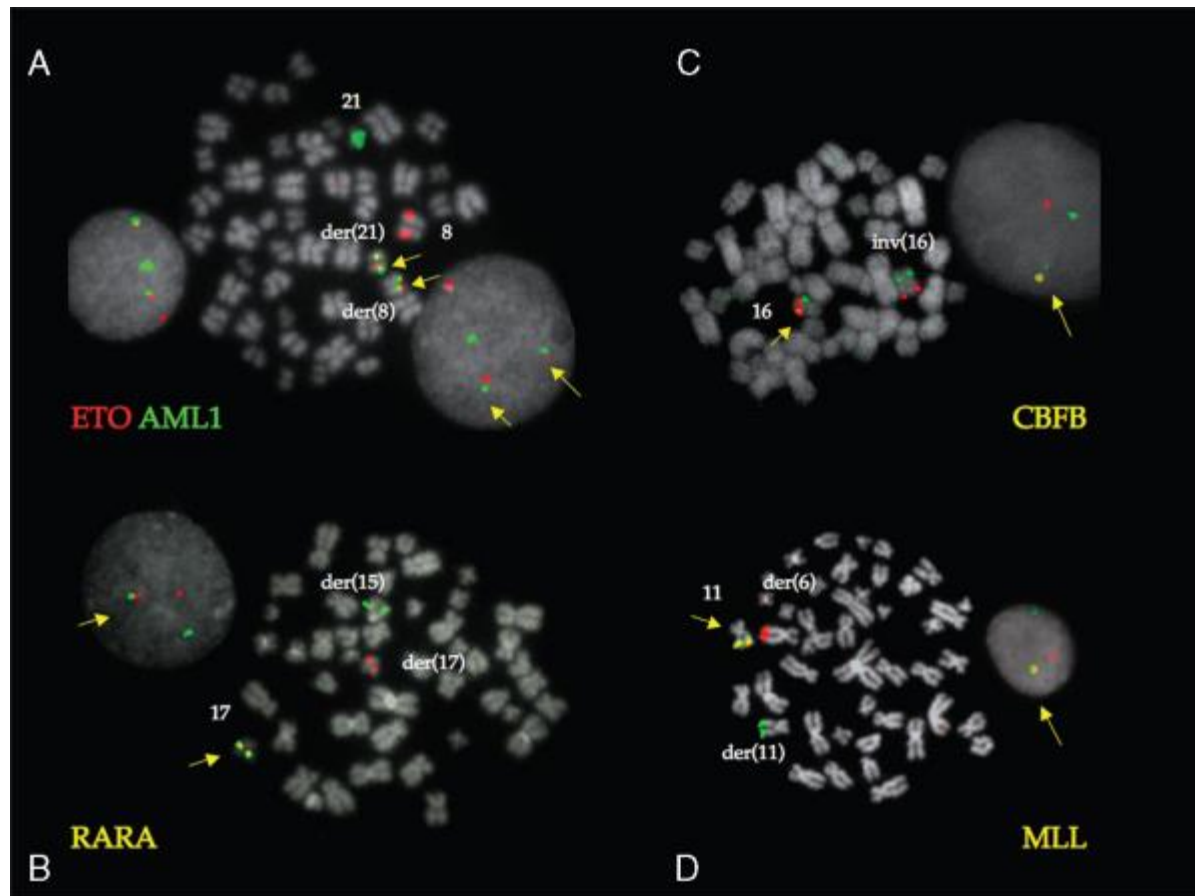


Fig. 87

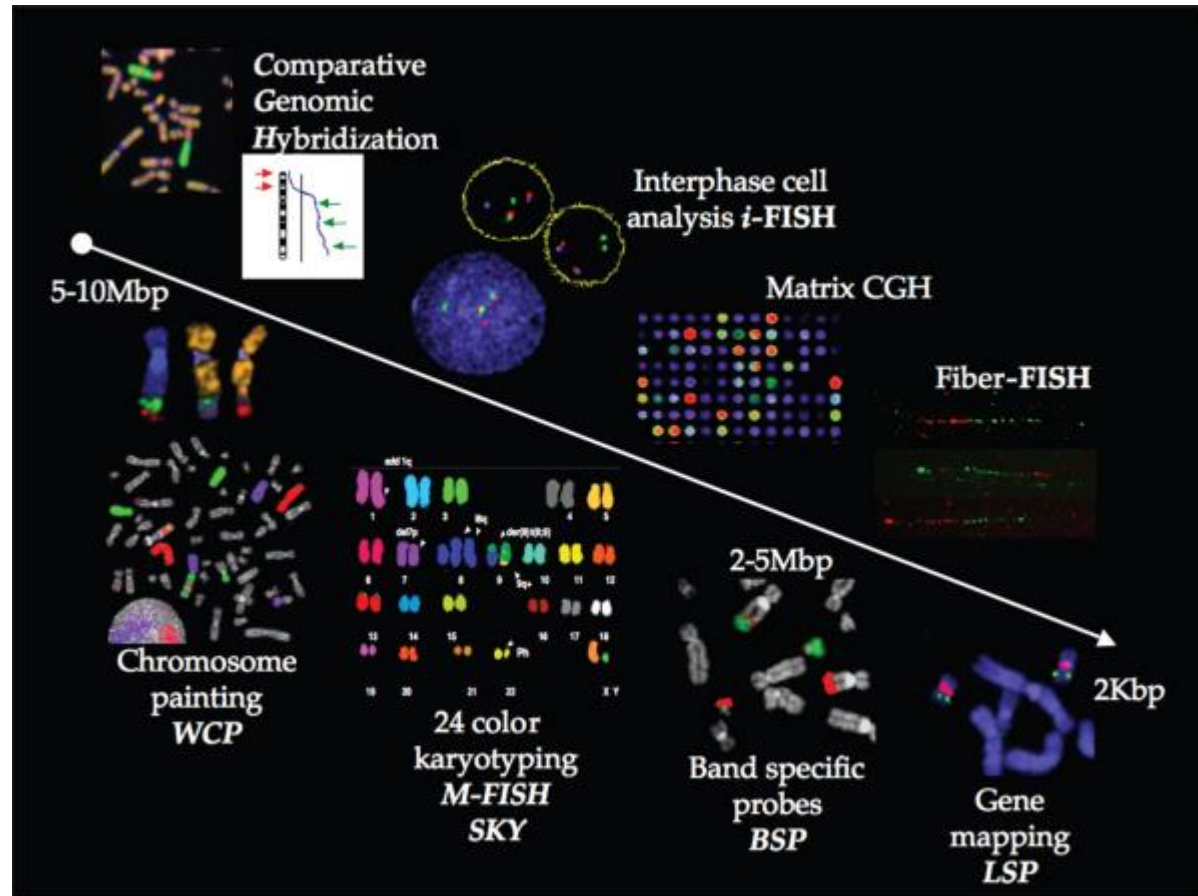
FISH



FISH



Summary of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques.



Below the diagonal line methods for analysis of dividing cells are illustrated: whole chromosome painting (WCP), color karyotyping (SKY and M-FISH), band-specific paints (BSP), and locus-specific probes (LSP). Above the diagonal line methods for analysis of interphase cells are illustrated: comparative genomic hybridization (CGH), i-FISH, matrix CGH, and fiber FISH.

	Molecular genetic defect	Prevalence	Study
t(8;21)	KIT exon 8 mutation	2%	21
	KIT codon 816 mutation	11%	21,25
	FLT3 ITD or D835 mutation	6–11%	21,25
inv(16)/t(16;16)*	KIT exon 8 mutation	24–26%	21,23
	KIT codon 816 mutation	7–8%	21,23
	FLT3 ITD or D835 mutation	8%	21,23
	NRAS mutation	18–26%	23,28
	KRAS mutation	9–17%	23,28
Normal karyotype	FLT3 ITD	28–34%	73–76
	FLT3 TKD mutation	11–14%	74,75
	NPM1 mutation	48–64%	79–83
	CEBPA mutation	15–18%	87,99
	MLL1 PTD	8–11%	89,90
	NRAS mutation	14%	28
	KRAS mutation	4%	28 BAALC
gene overexpression	..	..	98
t(6;9)	FLT3 ITD	90%†	75
+11	MLL PTD	91%†	94
+21	RUNX1 mutation	38%†	92
del(9q)	CEBPA mutation	41%	93

*≤70% of inv(16) leukaemias have mutations in receptor tyrosine kinase or RAS genes.²³†Prevalence based on few cases.

Table 3: Association of cytogenetic findings with molecular genetic defects

Table 1. Myeloid neoplasms with germ line predisposition, AML and related precursor neoplasms, and acute leukemias of ambiguous lineage (WHO 2016)

Myeloid neoplasms with germ line predisposition (see Table 2)	
AML and related neoplasms	AML and related neoplasms (cont'd)
AML with recurrent genetic abnormalities	Acute myelomonocytic leukemia
AML with t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	Acute monoblastic/monocytic leukemia
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>	Pure erythroid leukemia#
Acute promyelocytic leukemia with <i>PML-RARA</i> *	Acute megakaryoblastic leukemia
AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> †	Acute basophilic leukemia
AML with t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>	Acute panmyelosis with myelofibrosis
AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i>	Myeloid sarcoma
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i> ‡	Myeloid proliferations related to Down syndrome
Provisional entity: AML with <i>BCR-ABL1</i>	Transient abnormal myelopoiesis
AML with mutated <i>NPM1</i> §	Myeloid leukemia associated with Down syndrome
AML with biallelic mutations of <i>CEBPA</i> §	Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm
Provisional entity: AML with mutated <i>RUNX1</i>	Acute leukemias of ambiguous lineage
AML with myelodysplasia-related changes	Acute undifferentiated leukemia
Therapy-related myeloid neoplasms¶	MPAL with t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> **
AML, NOS	MPAL with t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged
AML with minimal differentiation	MPAL, B/myeloid, NOS
AML without maturation	MPAL, T/myeloid, NOS
AML with maturation	

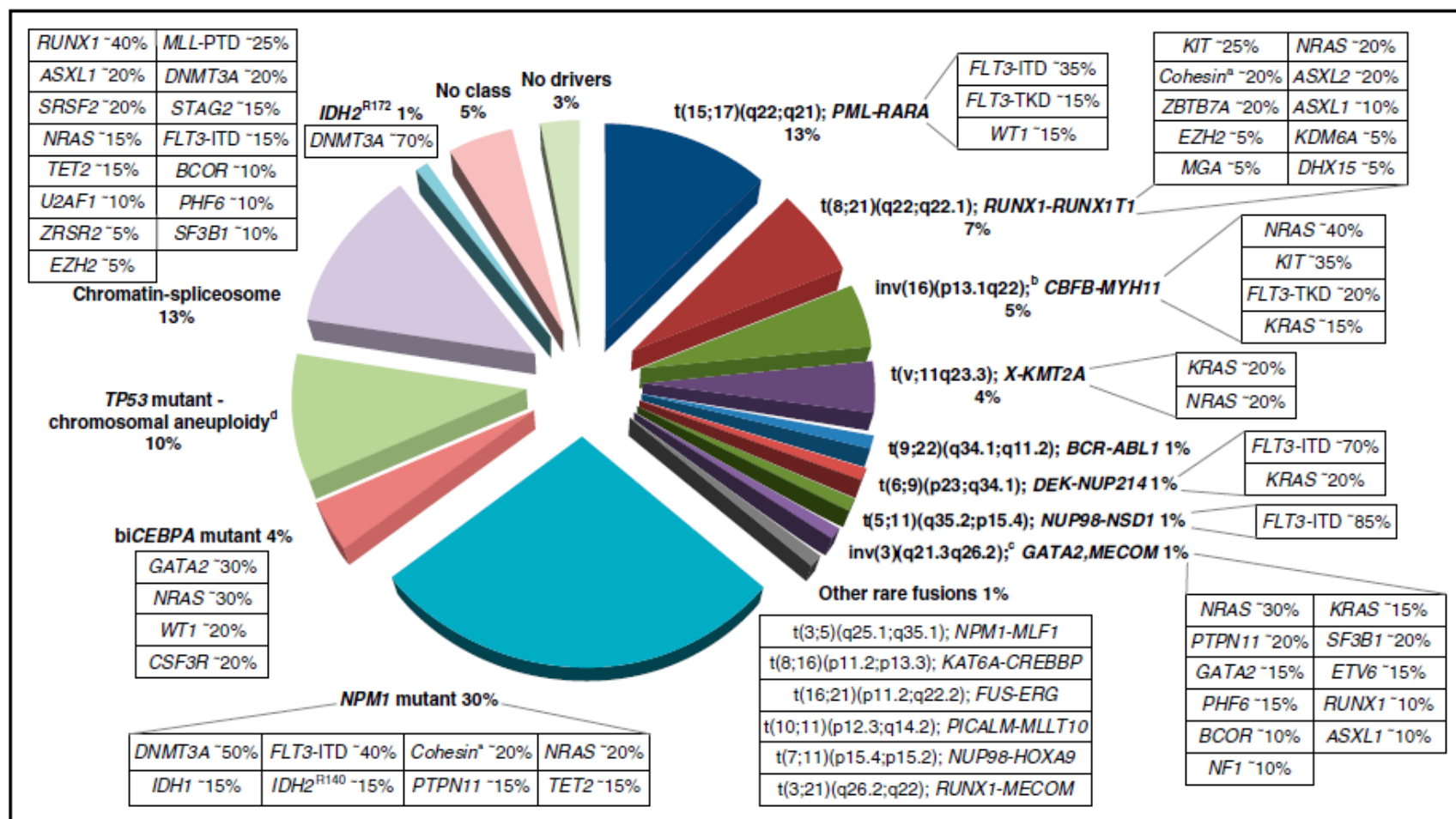


Figure 1. Molecular classes of AML and concurrent gene mutations in adult patients up to the age of ~65 years. Class definition is based on the study by Papaemmanuil et al.³⁷ For each AML class denoted in the pie chart, frequent co-occurring mutations are shown in the respective boxes. Data on the frequency of genetic lesions are compiled from the databases of the British Medical Research Council (MRC), the German-Austrian AML Study Group (AMLSG), and from selected studies.^{37,87,88,299} ^a indicates cohesin genes including *RAD21* (~10%), *SMC1A* (~5%), and *SMC3* (~5%); ^b, *inv*(16)(p13.1q22) or *t*(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*; ^c, *inv*(3)(q21.3q26.2) or *t*(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*(*EV11*); and ^d, *TP53* mutations are found in ~45%, and complex karyotypes in ~70% of this class. The structure of the pie chart is adapted from Grimwade et al.,⁵⁰ generated by Adam Ivey (King's College London, London, United Kingdom).

Table 5. 2017 ELN risk stratification by genetics

Risk category*	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i>-ITD or with <i>FLT3</i>-ITD^{low}† Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i>-ITD^{high}† Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i>-ITD or with <i>FLT3</i>-ITD^{low}† (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>‡ Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> –5 or del(5q); –7; –17/abn(17p) Complex karyotype,§ monosomal karyotypell Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i>-ITD^{high}† Mutated <i>RUNX1</i>¶ Mutated <i>ASXL1</i>¶ Mutated <i>TP53</i>‡