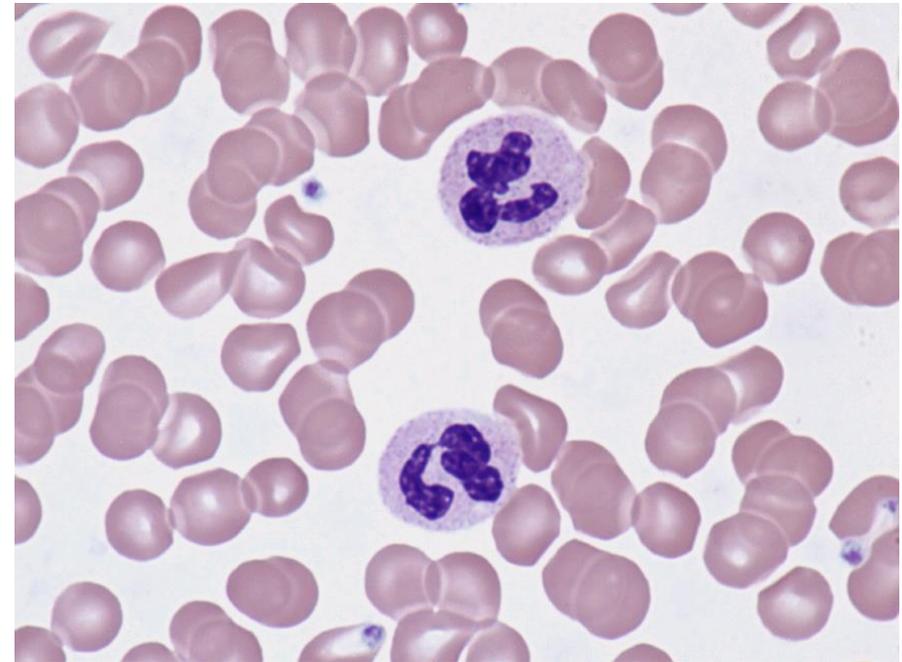


# Tecniche di laboratorio di ematologia

**Prof. Gian Matteo Rigolin**  
**Ematologia**

## **3. Conteggi cellulari**



# 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).

# Conteggi cellulari

- 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 siano 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

# Diluizione del campione

- Gli errori nei conteggi cellulari sono determinati per lo più da errori nella aliquotazione 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

<b>Coefficienti di variazione</b>		
<b>Tipo cellulare contato</b>	<b>Emocitometro manuale (%)</b>	<b>Automated Hematology Analyzer (%)</b>
<b>Globuli rossi</b>	<b>±11.0</b>	<b>±1.0</b>
<b>Globuli bianchi</b>	<b>±16.0</b>	<b>±1.5</b>
<b>Piastrine<sup>b</sup></b>	<b>±22.0</b>	<b>±2.0</b>
<b>Reticolociti</b>	<b>±33.9</b>	<b>±5.0</b>

<sup>a</sup>Minimum error. Usual error.

<sup>b</sup>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 Burker, 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 contate.

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.

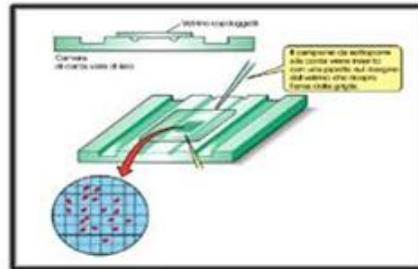
Il Trypan Blue ha un effetto tossico, quindi il colorante va aggiunto solo poco prima di effettuare la conta con il microscopio ottico.

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 Burker 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 Burker.
- Contare le cellule contenute nei quadrati disposti sulle diagonali della camera e calcolare il numero medio di cellule per quadratino. La camera di Burker 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 Burker si contano 48 quadratini, ovvero 24 quadratini per ciascun settore.

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



Schema di un settore della camera di Burker

# Camera di Burker

- 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  $\mu\text{L}$  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 Burker

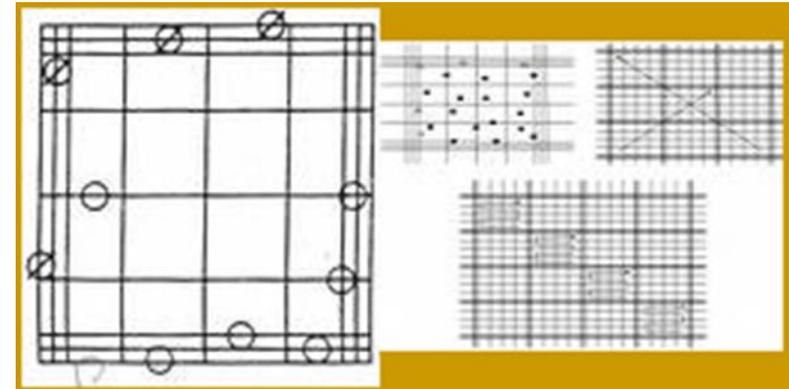
48 sono i quadrati che costituiscono le 4 diagonali della camera di Burker

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

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

1000 è il fattore di conversione da  $\mu\text{L}$  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.



# 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
  - sull'uso della differenza nella scatterizzazione della luce o delle proprietà ottiche,
- sia da soli che in combinazione.

# Contatori automatici

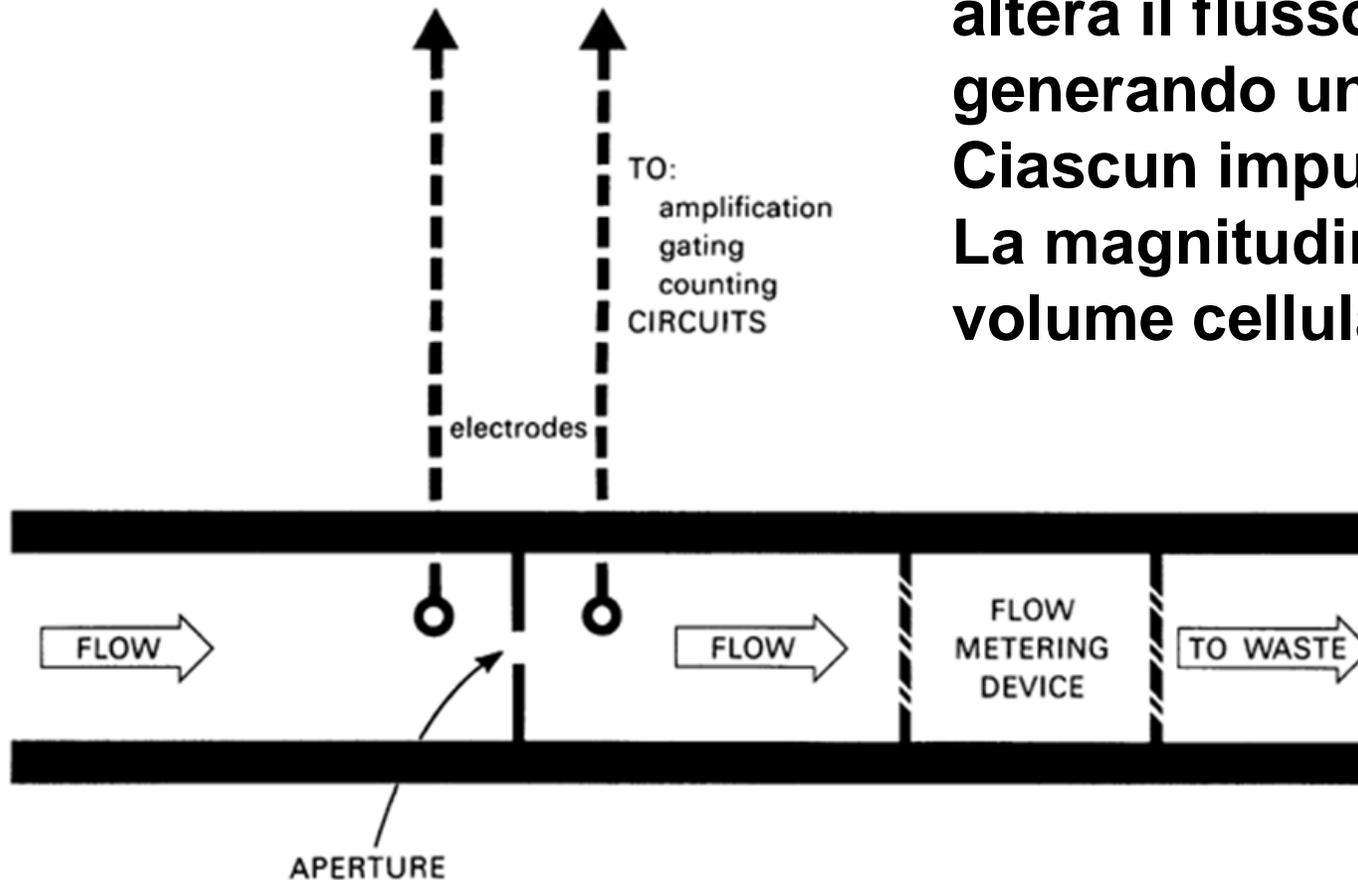
- Avanzamenti tecnologici
  1. **strisciatori automatici** di sangue periferico con sistemi di acquisizione digitale delle immagini delle cellule ematiche e elaborazione di formule in modo automatico
  2. Possibilità di incorporare un laser ad argon negli analizzatori automatici, cosicché si possono 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

# Contatori automatici

- Utilizzando **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**.

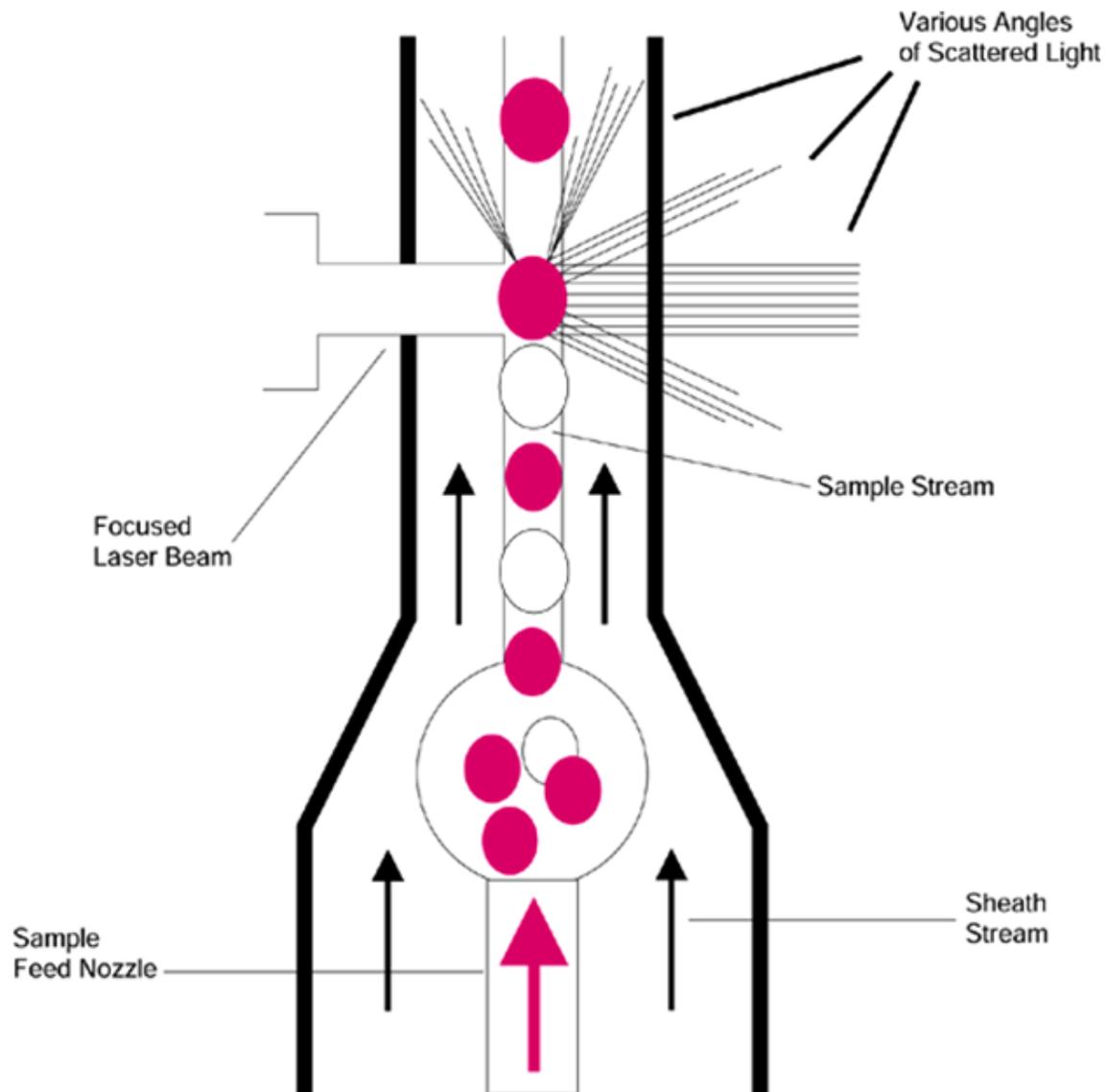
# Contatori con metodica ottica

- 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.

# 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.

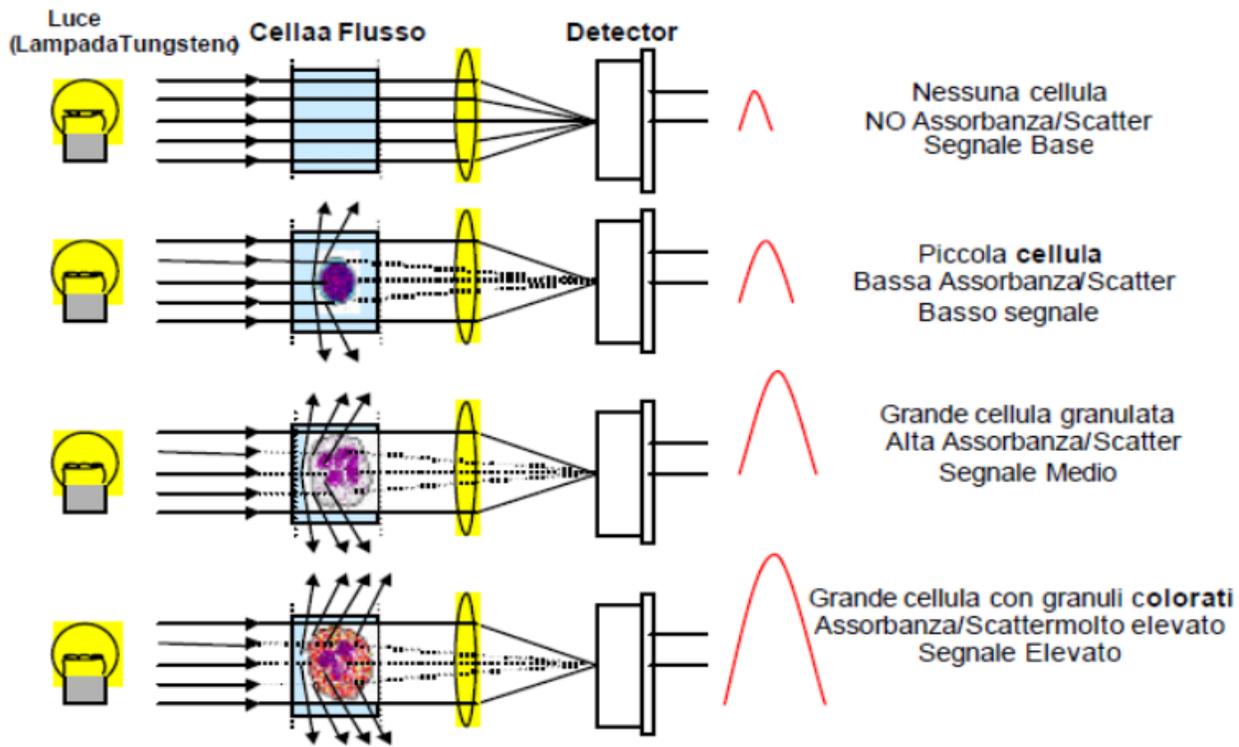


Figura 2. Analisi del segnale

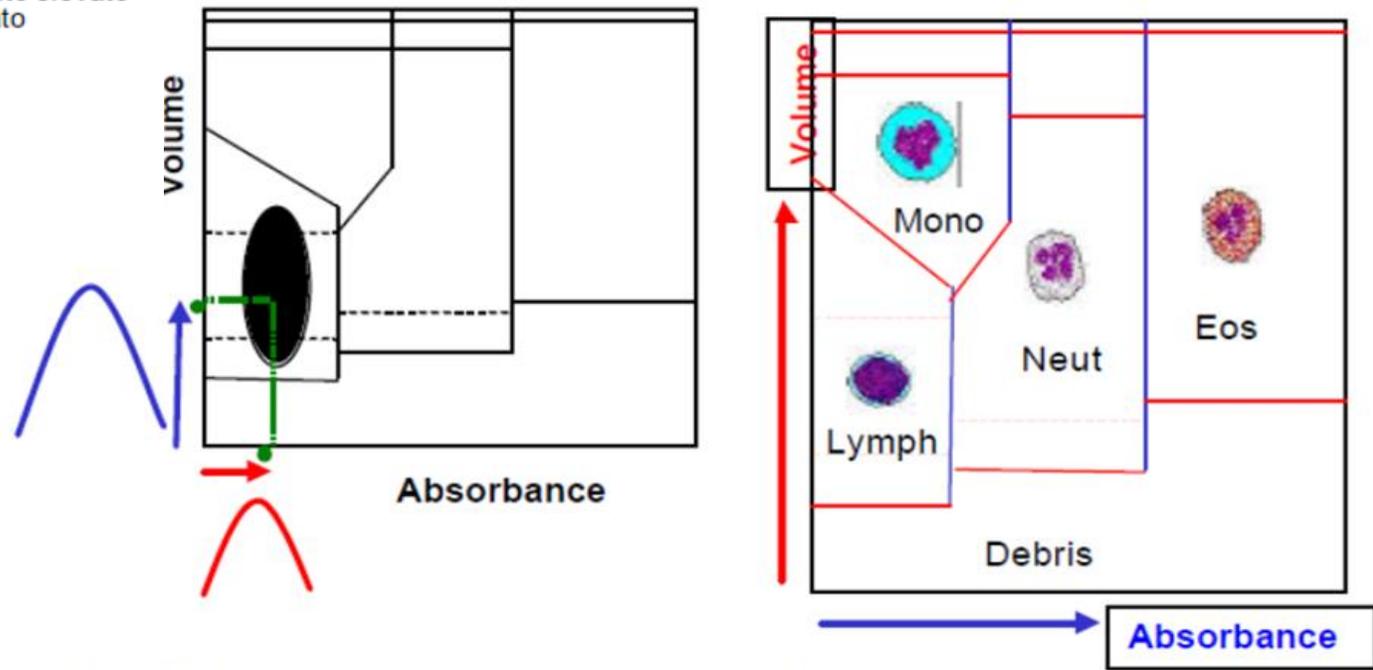


Figura 3. Correlazione tra segnali e popolazioni cellulari nel grafico DiffPlot

# 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).

# Contatori con metodo impedenzometrico ed ottico combinati

- 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.**