



[ COME SI FA ]

Bruno Nobili,  
Sofia MR Matarese,  
Francesca Rossi

Dipartimento della Donna, del Bambino  
e di Chirurgia generale e specialistica  
Università degli Studi della Campania  
"Luigi Vanvitelli"

## Esame emocromocitometrico

Uno degli esami più richiesti, semplice e poco costoso,  
utile a fornire preziose informazioni di salute.  
Eppure si tende a non leggerlo.

**L'**ESAME EMOCROMOCITOMETRICO è uno degli esami di laboratorio maggiormente richiesto nella pratica clinica; è un esame semplice, poco costoso, fonte di preziose informazioni sullo stato di salute di un paziente. Mediante questo semplice esame possiamo conoscere la quantità delle cellule del sangue (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine) e numerosi altri parametri che caratterizzano qualitativamente i diversi elementi corpuscolati. Nonostante sia l'esame di laboratorio più richiesto, l'esame

emocromocitometrico probabilmente è il "meno letto".

I moderni contaglobuli forniscono un numero sempre maggiore di nuovi parametri la cui corretta interpretazione è di notevole aiuto nella diagnostica ematologica di base; è importante quindi orientarsi bene fra i tanti numeri e le sigle, individuando una quantità non eccessiva di parametri informativi per il sospetto diagnostico.

Una corretta interpretazione dell'esame emocromocitometrico deve tener conto delle variazioni proprie dei parametri ematologici nei vari

periodi dell'età pediatrica, dal neonato all'adolescente (Tabella 1).

Fino ai primi anni '60 il conteggio e la descrizione delle cellule del sangue erano effettuati manualmente mediante camere calibrate, lettura spettrofotometrica dell'emoglobina, valutazione morfologica su striscio colorato; dai dati così ottenuti, mediante formule matematiche erano ricavati gli indici eritrocitari (Indici di Wintrobe), mentre la differenziazione e conta delle diverse popolazioni leucocitarie erano appannaggio della microscopia; produrre un emocromo →

Tabella 1. Valori normali degli indici eritrocitari alle varie età: valori medi e limiti inferiori della norma.

	Emoglobina (g/dl)		Ematocrito (%)		Globuli rossi ( $10^{12}/l$ )		MCV (fl)		MCH (pg)		MCHC (g/dl)		
	Media	-2 SD	Media	-2 SD	Media	-2 SD	Media	-2 SD	Media	-2 SD	Media	-2 SD	
Nascita (cordone)	16,5	13,5	51	42	4,7	3,9	108	98	34	31	33	30	
1-3 giorni (capillare)	18,5	14,5	56	45	5,3	4,0	108	95	34	31	33	29	
1 settimana	17,5	13,5	54	42	5,1	3,9	107	88	34	28	33	28	
2 settimane	16,5	12,5	51	39	4,9	3,6	105	86	34	28	33	28	
1 mese	14,0	10,0	43	31	4,2	3,0	104	85	34	28	33	29	
2 mesi	11,5	9,0	35	28	3,8	2,7	96	77	30	26	33	29	
3-6 mesi	11,5	9,5	35	29	3,8	3,1	91	74	30	25	33	30	
0,5-2 anni	12,0	10,5	36	33	4,5	3,7	78	70	27	23	33	30	
2-6 anni	12,5	11,5	37	34	4,6	3,9	81	75	27	24	34	31	
12-18 anni	maschio	14,5	13,0	43	37	4,9	4,5	88	78	30	25	34	31
	femmina	14,0	12,0	41	36	4,6	4,1	90	78	30	25	34	31
18-49 anni	maschio	15,5	13,5	47	41	5,2	4,5	90	80	30	26	34	31
	femmina	14,0	12,0	41	36	4,8	4,0	90	80	30	26	34	31

MCH, emoglobina corpuscolare media; MCHC, concentrazione emoglobinica corpuscolare media; MCV, volume corpuscolare medio (da Lee Gr, Bithell TC, Foerster J, et al. 1993, modificata).

→ completo non era certamente cosa rapida. L'avvento dei contaglobuli elettronici ha ridotto tutte queste operazioni a pochi secondi, ma questo non è l'unico vantaggio che l'automatizzazione ha portato; in realtà il poter esaminare migliaia di elementi e tradurre alcune loro caratteristiche in segnali "oggettivi" hanno moltiplicato le informazioni utili il cui significato è ancora oggi poco conosciuto e il loro valore diagnostico sottovalutato.



## Parametri eritrocitari

**I** GLOBULI ROSSI (GR) SONO DEFINITI da parametri quantitativi e qualitativi.

I parametri quantitativi esprimono il numero di globuli rossi per unità di volume, il loro valore percentuale (ematocrito) e la concentrazione dell'emoglobina (un valore di emoglobina < 2DS per sesso ed età configura una condizione anemica) (vedi tabella).

I parametri qualitativi sono rappresentati dai classici indici di Wintrobe (volume corpuscolare medio, MCV; emoglobina corpuscolare me-

dia, MCH; concentrazione emoglobinica corpuscolare media, MCHC); dalle curve di distribuzione volumetrica degli eritrociti (Red Cell Distribution Width, RDW; Hemoglobin Distribution Width, HDV) e dal citogramma volume/concentrazione dell'emoglobina.

### MCV: (FL) HT X 1.000/GR

Ben radicato nella cultura diagnostica, rappresenta il volume medio dei globuli rossi ed è indice di micro, normo e macrocitosi, costituendo un importante parametro nella classificazione delle anemie. Le anemie infatti possono essere classificate in rapporto alla loro fisiopatologia (iporigenerative, emolitiche, da perdita), al contenuto di emoglobina dei globuli rossi (normo, ipo, ipercromiche), ma la classificazione maggiormente utilizzata è quella che consente proprio in rapporto all'MCV, di distinguerle in microcitiche, normocitiche e macrocitiche.

L'MCV espresso in femtonlitri (fl pari a  $10^{-15}$ ) deve essere valutato in rapporto alle varie età; il valore normale è compreso fra il 3° (-2DS) ed il 97°(+2DS) percentile (vedi tabella).

### MCH: (FL) HB X 1.000/GR

Rappresenta il contenuto emoglobinico medio dei GR ed è meno utilizzato dell'MCV nella diagnostica ematologica.

### MCHC: (G/DL) HB X 1.000/HT

Esprime la misura della concentrazione emoglobinica corpuscolare media ed è utilizzato quasi esclusivamente nella diagnostica della anemie emolitiche, in particolare nella sferocitosi in cui risulta ai limiti alti della norma o quasi sempre al di sopra della stessa.

**RDW:** misura l'ampiezza della curva di distribuzione volumetrica dei GR.

Espresso come RDW-DS(fl) rappresenta la deviazione standard della distribuzione dei volumi di una popolazione eritrocitaria (indice di anisocitosi assoluta); espresso come RDW-CV (%) rappresenta il coefficiente di variazione della popolazione dei globuli rossi rispetto al valore medio (indice di anisocitosi relativa). Utile nella diagnostica differenziale fra una condizione microcitemica legata alla carenza marziale (RDW aumentato) e quella legata allo stato

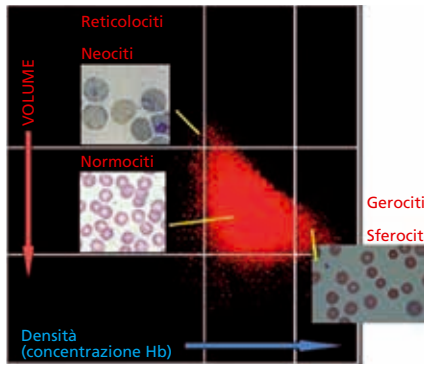


Figura 1. Citogramma eritrocitario di volume e concentrazione emoglobinica.

di portatore di beta-tal eterozigote (RDW normale o leggermente aumentato); anche una reticulocitosi solitamente si associa ad un aumento dell'RDW.

**HDW:** misura l'ampiezza di distribuzione della concentrazione emoglobinica corpuscolare media ed è indice di anisocromia.

#### CITOGRAMMA ERITROCITARIO DI VOLUME E CONCENTRAZIONE EMOGLOBINICA

Fornisce una visione di insieme della popolazione eritrocitaria e permette di individuare e quantificare le diverse sottopopolazioni; evidenzia doppie e triple popolazioni, agglutinati eritrocitari, anomalie di distribuzione (Figura 1).

#### RETICOLOCITI

Sono eritrociti giovani appena immessi nel circolo che conservano per 24-48 ore residui di organuli citoplasmatici di derivazione ribosomiale; questi ultimi precipitano per effetto dei coloranti sopravitali (blu cresile brillante, blu di metilene) formando un reticolo che è alla base della loro denominazione (Figura 2).

Analogamente agli indici eritrocitari i contaglobuli di ultima generazione sono in grado di fornire nuove informazioni sui reticulociti calcolando i relativi indici:

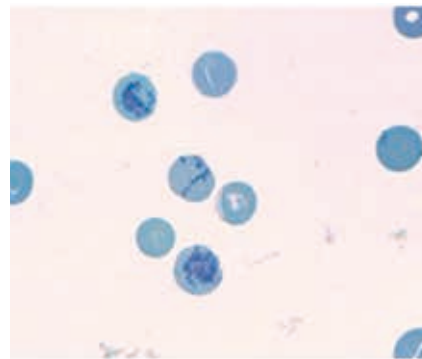


Figura 2. Microscopio ottico: incubazione con coloranti vitali (blu di metilene) in grado di legare l'RNA ribosomiale.

- $MCV_r$  ( $110 \text{ fl } 20\% > GR$ )
- $CHCM$  ( $MCHC; 20\% < GR$ )
- $CH_r$  ( $MCH$ ) contenuto Hb; 26-30 pg).

Una diminuzione di  $CH_r$  è espressione di una eritropoiesi ferrocarenziale recente, mentre l' $MCV_r$  rappresenta il volume corpuscolato medio, direttamente proporzionale allo stato marziale; diminuisce infatti nel caso di eritropoiesi ferro carente per aumentare rapidamente in risposta alla terapia marziale.

Altri parametri reticulocitari consentono di dividere i reticulociti totali in tre classi in rapporto al diverso contenuto ribosomiale che è inversamente proporzionale al loro grado di maturità:

- $LFR$  (Low Fluorescence Ratio) frazione di reticulociti più maturi (78%-92%);  $MFR$  (Medium Fluorescence Ratio) fra-

• • •

**Il citogramma eritrocitario di volume e concentrazione emoglobinica fornisce una visione di insieme della popolazione eritrocitaria dando conto delle sottopopolazioni.**

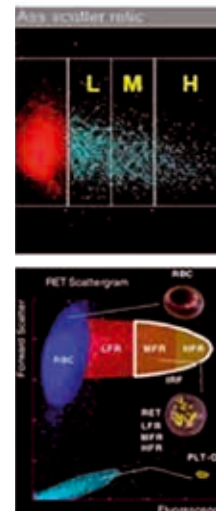


Figura 3. Microscopio ottico: incubazione con coloranti vitali (blu di metilene) in grado di legare l'RNA ribosomiale.

#### RMI = Reticulocyte Maturity Index

Nei diversi studi è usato come:

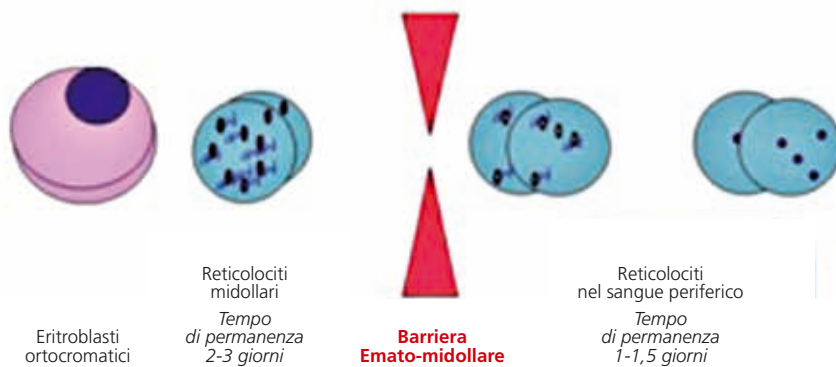
- intensità media di tutta la popolazione reticulocitaria
- reticulociti ad elevata fluorescenza o Assorbimento
- reticulociti a media ed elevata fluorescenza e assorbimento, che alla fine sono stati definiti come **IRF - Immature Reticulocyte Fraction**

zione di reticulociti con caratteristiche maturative intermedie (6%-18%) e  $HFR$  (High Fluorescence Ratio) che rappresentano la frazione di reticulociti più immaturi (0%-4%).

- $LIRF$  (frazione reticulociti immaturi) è un indice precoce di attività eritropoietica midollare e pertanto consente di monitorare la ripresa eritropoietica (trattamenti con rh-EPO, trapianto cellule staminali, TEC, trapianti renali, risposta a terapia con  $B_{12}$ , folati, ferro), prima ancora che il numero totale dei reticulociti sia aumentato (Figura 3).

Il numero dei reticulociti (espresso in valore assoluto) è un indice attendibile dell'attività eritropoietica del midollo; un midollo normofunzionante è in grado di aumentare fino ad otto volte la produzione di GR e pertanto una reticulocitosi è espressione di una intensa attività eritropoietica in risposta ad una aumentata distruzione periferica o intramidollare (emolisi). Una condizione di reticulocitopenia invece è espressione di una ridotta attività →

Come si fa | Esame emocromocitometrico



La determinazione dei reticolociti permette una valutazione della eritropoiesi senza il ricorso a manovre invasive

Figura 4. Maturazione dei reticolociti ed immissione in circolo.

→ midollare e quindi associata ad una anemia iporgenerativa (Figura 4).



### Parametri leucocitari

**L**GLOBULI BIANCHI (QUANDO SEDIMENTANO in provetta formano uno strato biancastro al di sopra degli eritrociti) in rapporto alla presenza o meno di granulazioni citoplasmatiche possono essere distinti in: granulati (neutrofili, basofili, eosinofili) e non granulati (linfociti, monociti). La conta totale è espressa come 10<sup>9</sup> cell/l, deve sempre essere accompa-

gnata dalla formula leucocitaria che esprime il rapporto quantitativo e percentuale fra le diverse popolazioni di GB.

Come i GR anche i leucociti variano in rapporto all'età, sia in valore assoluto che in percentuale.

Nel neonato il numero dei globuli bianchi è molto più alto rispetto a quello delle successive età pediatriche e a quello dell'adulto; la formula leucocitaria è caratterizzata, per le prime 48 ore di vita, da una neutrofilia cui segue una linfocitosi che persiste fino al 3-4 anno di età, quando il rapporto tra neutrofili e linfociti

si inverte nuovamente a favore dei neutrofili che rappresenteranno la popolazione più espressa negli anni successivi (Tabella 2).

I contaglobuli elettronici classificano come globuli bianchi tutte le cellule generanti impulsi corrispondenti ad un volume superiore a 35 fl. La differenziazione nelle cinque popolazioni leucocitarie, con l'impiego di diverse tecnologie applicate simultaneamente (forward-scatter, conduttività/opacità), è in grado di differenziare le cellule non solo per il loro volume ma anche per il loro contenuto (grandezza del nucleo, rapporto nucleo/citoplasma, presenza di granuli, quantità e volume dei granuli). La metodica quindi estremamente sofisticata permette di conoscere in tempo reale il completo assetto leucocitario.

In presenza di monociti attivati le caratteristiche fisiche e morfologiche di queste cellule non sono dissimili da quelle presentate dai blasti, per cui tali elementi sono conteggiati insieme e classificati come LUC ("large unstained cells") ovvero cellule grandi non differenziate. Il riscontro di

Tabella 2. Conta normale di leucociti.

Età	Totale leucociti		Neutrofili			Linfociti			Monociti		Eosinofili	
	Media	(Range)	Media	(Range)	%	Media	(Range)	%	Media	%	Media	%
Nascita	18,1	9,0-30,0	11,0	6,0-26,0	61	5,5	2,0-11,0	31	1,	6	0,4	2
12 ore	22,8	13,0-38,0	15,5	6,0-28,0	68	5,5	2,0-11,0	24	1,2	5	0,5	2
24 ore	18,9	9,4-34,0	11,5	5,0-21,0	61	5,8	2,0-11,5	31	1,1	6	0,5	2
1 sett.	12,2	5,0-21,0	5,5	1,5-10,0	45	5,0	2,0-17,0	41	1,1	9	0,5	4
2 sett.	11,4	5,0-20,0	4,5	1,0-9,5	40	5,5	2,0-17,0	48	1,0	9	0,4	3
1 mese	10,8	5,0-19,5	3,8	1,0-9,0	35	6,0	2,5-16,5	56	0,7	7	0,3	3
6 mesi	11,9	6,0-17,5	3,8	1,0-8,5	32	7,3	4,0-13,5	61	0,6	5	0,3	3
1 anno	11,4	6,0-17,5	3,5	1,5-8,5	31	7,0	4,0-10,5	61	0,6	5	0,3	3
2 anni	10,6	6,0-17,0	3,5	1,5-8,5	33	6,3	3,0-9,5	59	0,5	5	0,3	3
4 anni	9,1	5,5-15,	3,8	1,5-8,5	42	4,5	2,0-8,0	50	0,5	5	0,3	3
6 anni	8,5	5,0-14,5	4,	1,5-8,0	51	3,5	1,5-7,0	42	0,4	5	0,2	3
8 anni	8,3	4,5-13,5	4,4	1,5-8,0	53	3,3	1,5-6,8	39	0,4	4	0,2	2
10 anni	8,1	4,5-13,5	4,4	1,8-8,0	54	3,1	1,5-6,5	38	0,4	4	0,2	2
16 anni	7,8	4,5-13,0	4,4	1,8-8,0	57	2,8	1,2-5,2	35	0,4	5	0,2	3
21 anni	7,4	4,5-11,0	4,4	1,8-7,7	59	2,5	1,0-4,8	34	0,3	4	0,2	3

**AIUTANO LA DIAGNOSI**

- Valutazione del LI
- Morfologia shift maturativo



Figura 5. Indice di lobularità.

**SCHEMA DI ARNETH**

Classificazione granulociti in base ai lobi nucleari

1 lobo → 5%    2 lobi → 35%    3 lobi → 41%    4 lobi → 17%    5 lobi → 2%

- Deviazione a sinistra: granulociti giovani (es. infezioni acute)
- Deviazione a destra: granulociti vecchi (es. carenza acido folico, vit. B12)

Figura 5bis. Formula di Arneth.

LUC aumentati impone sempre l'esecuzione di uno striscio periferico per una corretta identificazione di queste cellule.

Un altro parametro leucocitario che viene fornito dalle letture automatizzate è l'indice di lobularità (LI), espressione del grado di segmentazione dei neutrofilo, corrispondente alla classica formula di Arneth.

Un LI basso (shift a sinistra della curva di Arneth) indica un incremento in circolo di "nuovi" neutrofilo, con nucleo poco o nulla segmentato (infezione batterica, mobilitazione di neutrofilo dopo terapia con G-CSF). Un LI aumentato corrisponde ad uno spostamento a destra della curva di Arneth, quindi ad un incremento in circolo di neutrofilo ipersegmentati come si può osservare nell'anemia perniziosa o nell'anemia megaloblastica da deficit di acido folico e/o di vit. B12, o in caso di leucemia mieloide (Figura 5).

Una falsa leucocitosi può realizzarsi per la presenza in circolo di eritroblasti (soggetti splenectomizzati, talassemici non regolarmente trasfusi), per la presenza di aggregati piastrinici (artefatti di laboratorio senza significati clinico), per la presenza di crioglobuline, chetoacidosi diabetica (mobilitazione di granulociti neutrofilo dal pool marginato). Una falsa leucopenia invece può essere espressione di un aumento del pool marginato come nei soggetti sottoposti

**Gli indici piastrinici risultano di grande aiuto in condizioni di piastrinopenia perché indirizzano il sospetto diagnostico.**

• • •

a dialisi o espressione di condizione idiopatica.

L'osservazione dello striscio periferico per tutte queste ragioni costituisce un momento irrinunciabile nella valutazione di un esame emocromocitometrico.



**Piastrine**

**L**A CONTA DELLE PIASTRINE viene espressa come  $10^9$  cell/l ed analogamente agli eritrociti i contaglobuli, oltre al dato quantitativo, forniscono parametri qualitativi (indici piastrinici):

- MPV: volume piastrinico medio
- PDW: ampiezza di distribuzione volumetrica
- Pct: piastrinocrito
- P-LCR: % di larghe piastrine.

L'MPV esprime la media analitica dei volumi piastrinici (non esiste un MPV normale, ma l'MPV normale per quel numero di piastrine); più rallentato è il tasso di produzione

delle piastrine più basso è l'MPV. Un rallentato tasso di produzione delle piastrine infatti è associato ad una diminuzione dell'MPV, come avviene nelle piastrinopenie centrali, mentre è normale o francamente aumentato nelle forme periferiche (in rapporto alla velocità di produzione).

L'MPV è un parametro poco attendibile in presenza di una grave piastrinopenia (Figura 6).

Il PDW esprime la distribuzione volumetrica delle piastrine (anisocitosi piastrinica); un aumento del PDW è l'espressione di una grande differenza tra i volumi delle piastrine, mentre un PDW basso è dato dalla presenza di piastrine di dimensioni uniformi.

Il Pct esprime la massa piastrinica per unità di volume di sangue ed è il vero rischio reale di sanguinamento.

L'utilizzo degli indici piastrinici costituisce un notevole aiuto in condizioni di piastrinopenia, in quanto è in grado di indirizzare il sospetto diagnostico.

Un MPV diminuito si riscontra in condizioni di ipersplenismo, anemia megaloblastica, in corso di chemioterapia, aplasia midollare, s. di Wiskott-Aldrich.

Un MPV e PDW aumentati sono caratteristici di piastrinopenia immune, delle malattie mieloproliferative, della s. di May-Hegglin, della s. Bernard-Soulier e dei soggetti splenectomizzati.



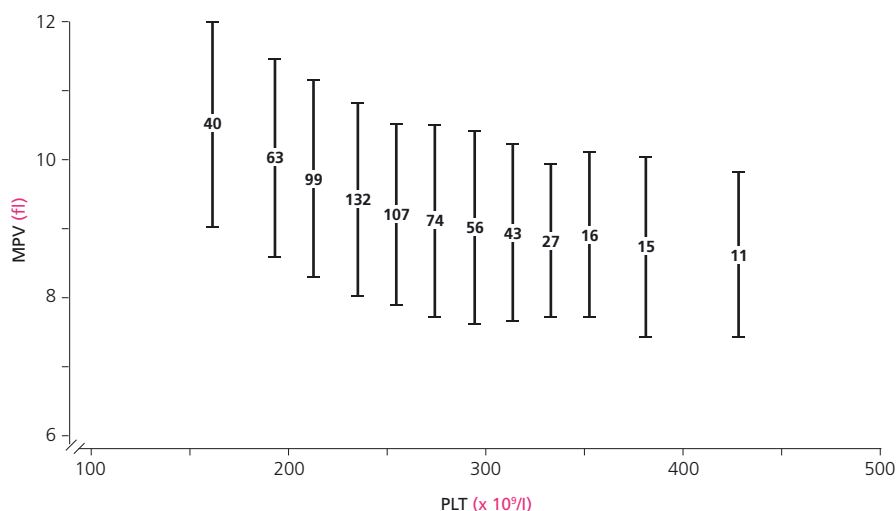


Figura 6. MPV normale e numero di piastrine.

→ La piastrinosi può rappresentare una condizione primitiva o secondaria di molte patologie non solamente ematologiche.

Una forma primitiva la si può riscontrare nella trombocitemia essenziale, policitemia vera, LMC o essere secondaria a disordini infiammatori, gravi stati di carenza marziale, neoplasie.

Una falsa piastrinosi può essere espressione di una microcitemia (piastrine e microciti hanno lo stesso volume e pertanto vengono letti sullo stesso canale delle piastrine), in condizioni di emocostruzione o in presenza di frammenti eritrocitari.

Una piastrinopenia in presenza di un esame obiettivo negativo per manifestazioni emorragiche deve sempre far pensare alla possibilità di una falsa piastrinopenia come viene a determinarsi nella pseudopiastrinopenia EDTA-dipendente, in presenza di microaggregati piastrinici o di coaguli. La pseudopiastrinopenia EDTA-dipendente si registra in vitro ed è “tempo dipendente” e pertanto è utile ripetere il dosaggio subito dopo il prelievo o utilizzare l'eparina come anticoagulante e procedere alla lettura in camera di Burker.

La aggregazione piastrinica è un fenomeno fisiologico dovuto alla liberazione di ADP da parte delle piastrine adese fra di loro. La presenza di microaggregati è un artefatto di laboratorio senza significato clinico e la bassa conta piastrinica è dovuta al fatto che gli aggregati vengono letti come leucociti; utile anche in questo caso il cambio di anticoagulante.

PDW esprime il grado di variabilità delle dimensioni piastriniche (anisocitosi piastrinica); di conseguenza, alti valori di PDW indicano una grossa discrepanza tra i volumi piastrinici, mentre quando il PDW è basso significa che le piastrine hanno dimensioni uniformi. Alti valori di PDW si registrano in tutte le situazioni di accelerata trombopoiesi per la produzione di piastrine giovani (> MPV) rispetto a quelle anziane presente in circolo (sindromi mieloproliferative, anemia megaloblastica,

anemia refrattaria); una sua corretta lettura non può prescindere ovviamente dalla valutazione contestuale del numero totale di piastrine, dell'MPV e del PcT.

Una corretta lettura dell'esame emocromocitometrico presuppone:

- conoscenza dell'esatto significato dei parametri e delle sigle offerti dai moderni conta globuli;
- confronto del dato numerico con i valori normali per sesso ed età;
- valutazione del coinvolgimento di una o più linee cellulari;
- consapevolezza di possibili “falsi” e necessità di dirimere i dubbi con l'ausilio il morfologo; molto spesso l'osservazione dello striscio periferico permette di confermare o contraddire i “numeri” forniti dal conta globuli;
- non dimenticare che il punto di partenza per una corretta diagnosi è sempre il paziente con la sua storia e la sua clinica.

I punti di contatto fra i numeri forniti dai moderni contaglobuli e lo studio morfologico delle cellule permettono una completa diagnostica che libera “il morfologo dalla ripetitività della routine, integrando i dati forniti dalle misurazioni automatiche con le qualità della memoria, della intuizione e della fantasia” ■

Gli autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse.

## Bibliografia

- D'Onofrio G, Zini G. *Morfologia delle malattie del sangue*. Roma: Verduci Editore, 1997.
- Burgio G, Martini A, Nespoli L, Notarangelo L. *Pediatria essenziale*. 5 edizione. Milano: Edi Ermes, 2012.
- Natham DG, Stuart HO, Ginsburg D, Look AT. *Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood*. 8th edition. Philadelphia: Saunders, 2008.
- Stanton BF. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 19th edition. Amsterdam: Elsevier 2011.
- Lee Gr, Bithell TC, Foerster J, et al. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 9th edition. Philadelphia-London: Lea & Febiger, 1993.
- JP Greer, Arber DA. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 13th edition. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.