

Prof.ssa **Damiana Pieragostino**



DIPARTIMENTO DI TECNOLOGIE INNOVATIVE IN MEDICINA & ODONTOIATRIA

Professore Associato di Biochimica Clinica (BIO12)

Lab Regionale di Screening Neonatale Esteso

Unità Di Biochimica Analitica e Proteomica

"G. d'Annunzio" Centro Studi E Tecnologie avanzate (CAST)

Ricevimento Venerdì dalle 9:00-11:00 su appuntamento

Tel. 0871 541593793/96

Fax. 0871 541598

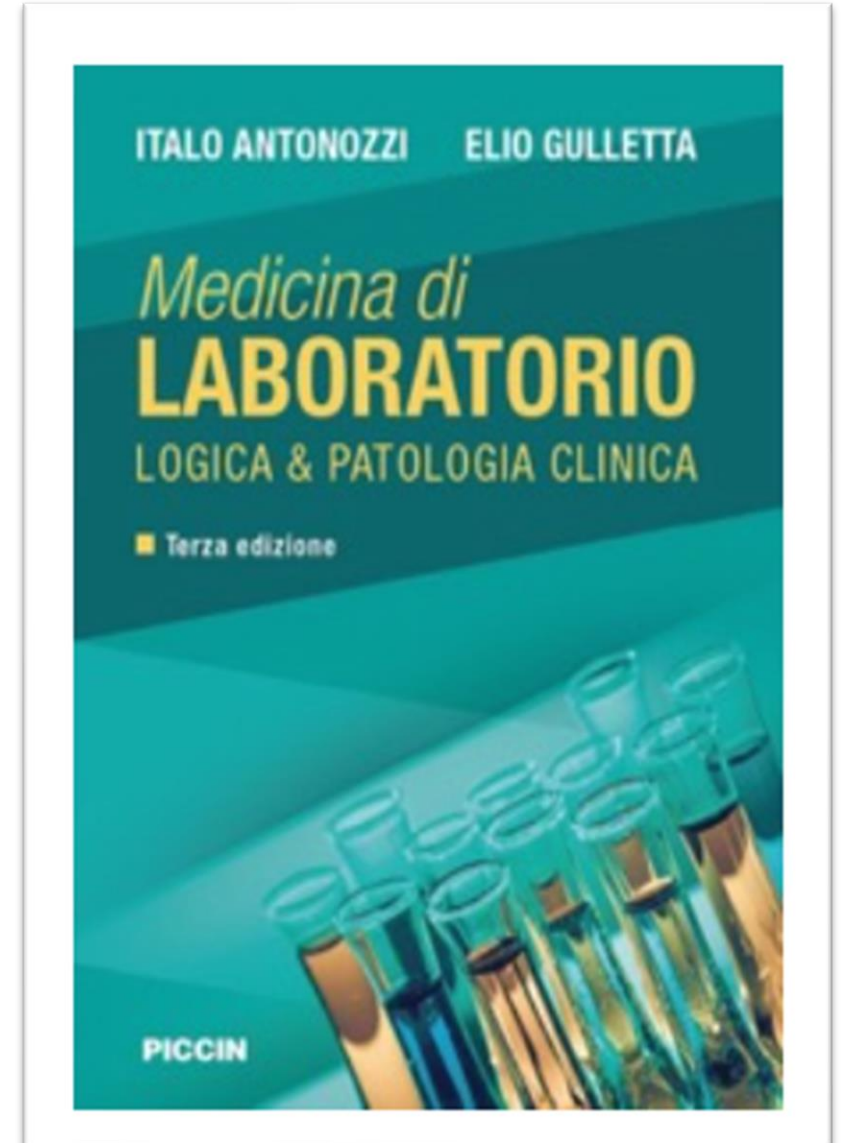
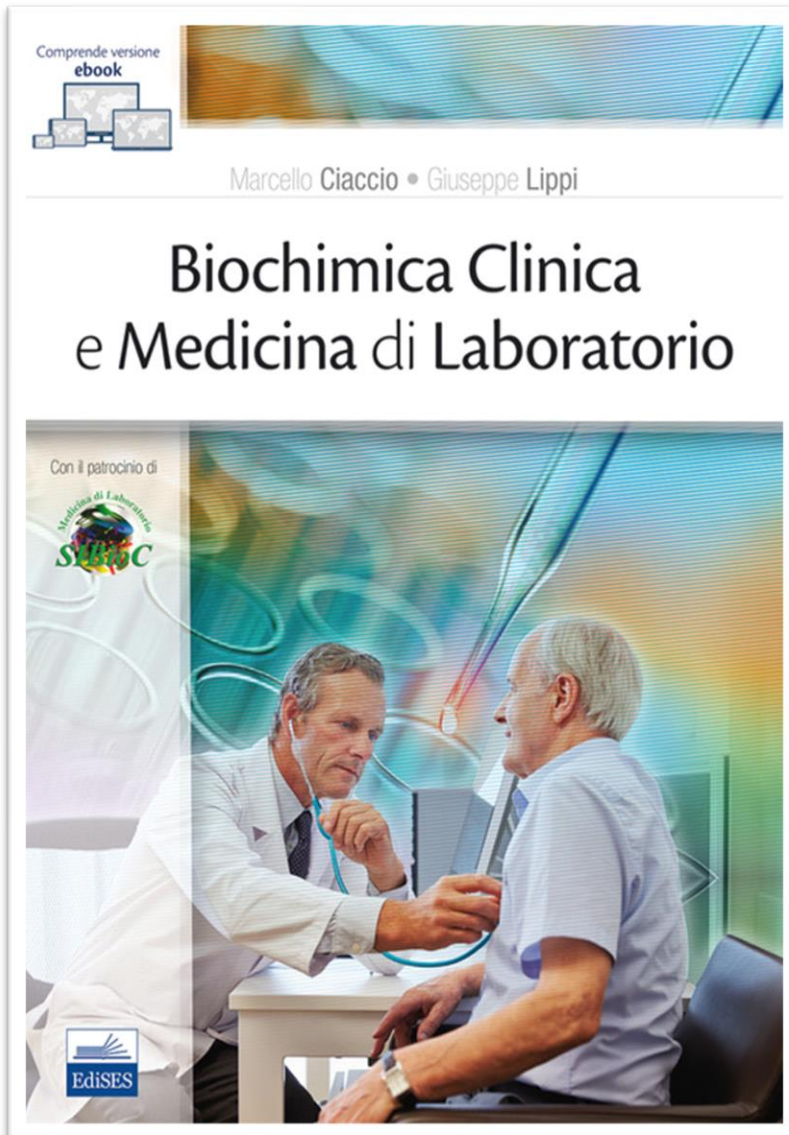
damiana.pieragostino@unich.it

Cultore della Materia: Beatrice Dufrusine

beatrice.dufrusine@unich.it



Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio: Testi Consigliati



Definizione di Medicina di Laboratorio



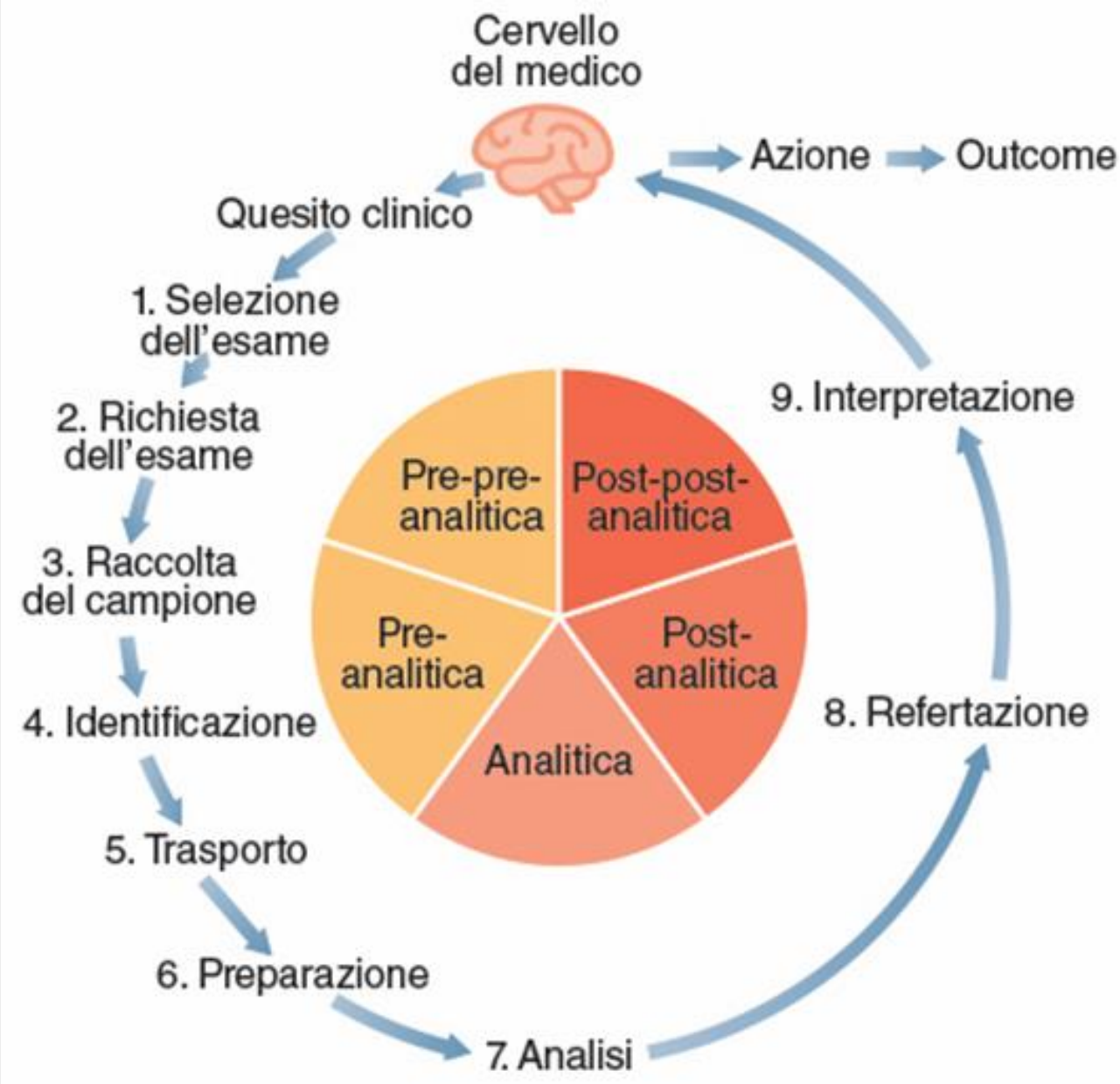
La medicina di laboratorio è quella disciplina che studia in **campioni biologici** provenienti dall'uomo (analisi in vitro su: sangue, urine, feci, ecc.) o nell'uomo stesso (analisi in vivo: per esempio spettroscopia a risonanza magnetica nucleare), quei **parametri fisico-chimici e chimici** che possono fornire **informazioni su processi fisiologici e/o patologici** che avvengono nell'uomo stesso ai suoi vari livelli di organizzazione strutturale, e quindi di sistemi, di organi, di tessuti, di cellule, ed anche di singole molecole (vedi DNA, proteine, ecc.).

Finalità della Medicina di Laboratorio



La finalità della medicina di laboratorio è quindi, in sintesi, quella di **fornire informazioni**, cioè elementi che, da soli ma più frequentemente unitamente ad altri raccolti dal clinico, indirettamente (strumentali) o direttamente (storia clinica, esame obiettivo), **consentano di formulare una DIAGNOSI con la più alta probabilità statistica**, oppure di coadiuvare il clinico nella scelta di una decisione, sia essa un approfondimento diagnostico, oppure una terapia o una modifica di essa.

fasi dell'esame di laboratorio



Esami di Routine

<i>Esame</i>	<i>Esito</i>	<i>U.M.</i>	<i>Valori di Riferimento</i>	<i>Metodica Validatore</i>
Glicemia	90	mg/dl	65 - 110	V28
Azotemia	35	mg/dl	10 - 50	V28
Creatinina	0.76	mg/dl	0.60 - 1.20	V28
Colesterolo Totale	165	mg/dl	0 - 200	V28
Trigliceridi	63	mg/dl	60 - 130	V28
Colesterolo HDL	29	* mg/dl	35 - 75	V28
Colesterolo LDL	122	mg/dl	0 - 130	V28
Acido Urico	7.2	* mg/dl	3.5 - 7.0	V28
AST-GOT (Aspartato Amino Transferasi)	77	* UI/L	0 - 40	V28
ALT-GPT (Alanina Amino Transferasi)	64	* UI/L	0 - 35	V28
Gamma Glutamilasi Transferasi (GGT)	15	UI/L	0 - 64	V28
Dosaggio Frazioni Bilirubina				V28
Bilirubina Totale (BT)	0.46	mg/dl	0.00 - 1.20	(Colorimetrica)
Bilirubina Diretta (BD)	0.11	mg/dl	0.00 - 0.25	(Colorimetrica)
Bilirubina Indiretta	0.35	mg/dl	0.00 - 0.95	

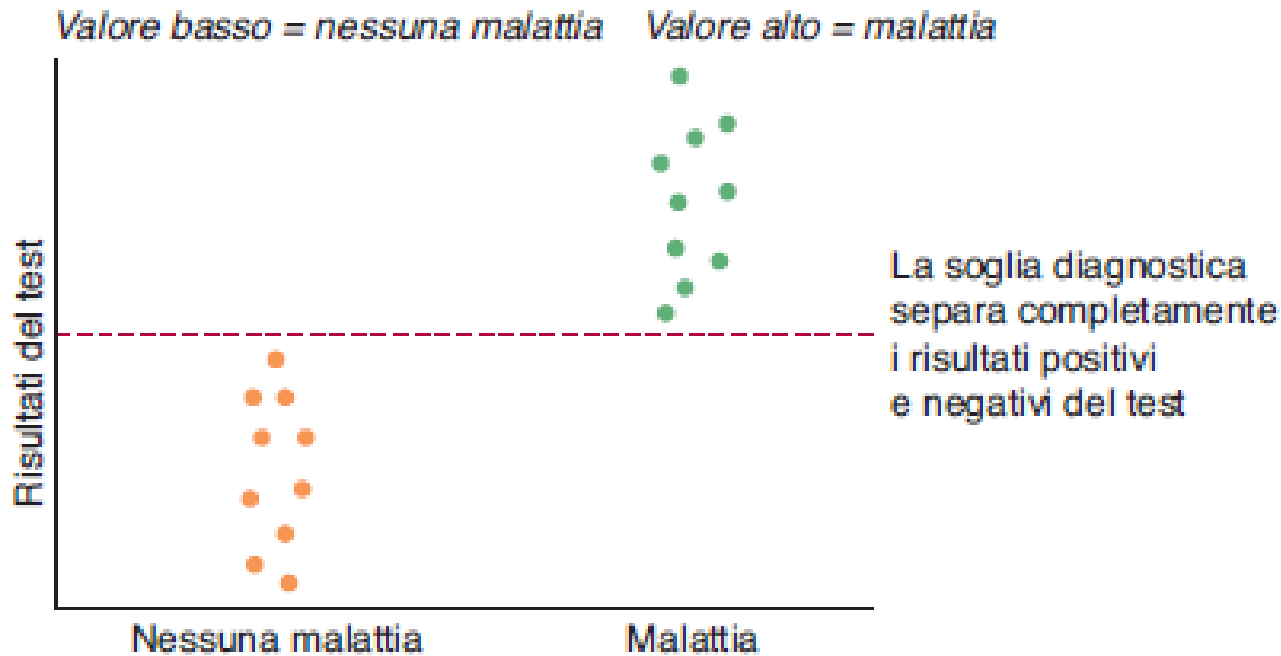
Valori di Riferimento

CutOff/Soglia

Valore soglia

Al disopra del quale si considera indicatore di patologia

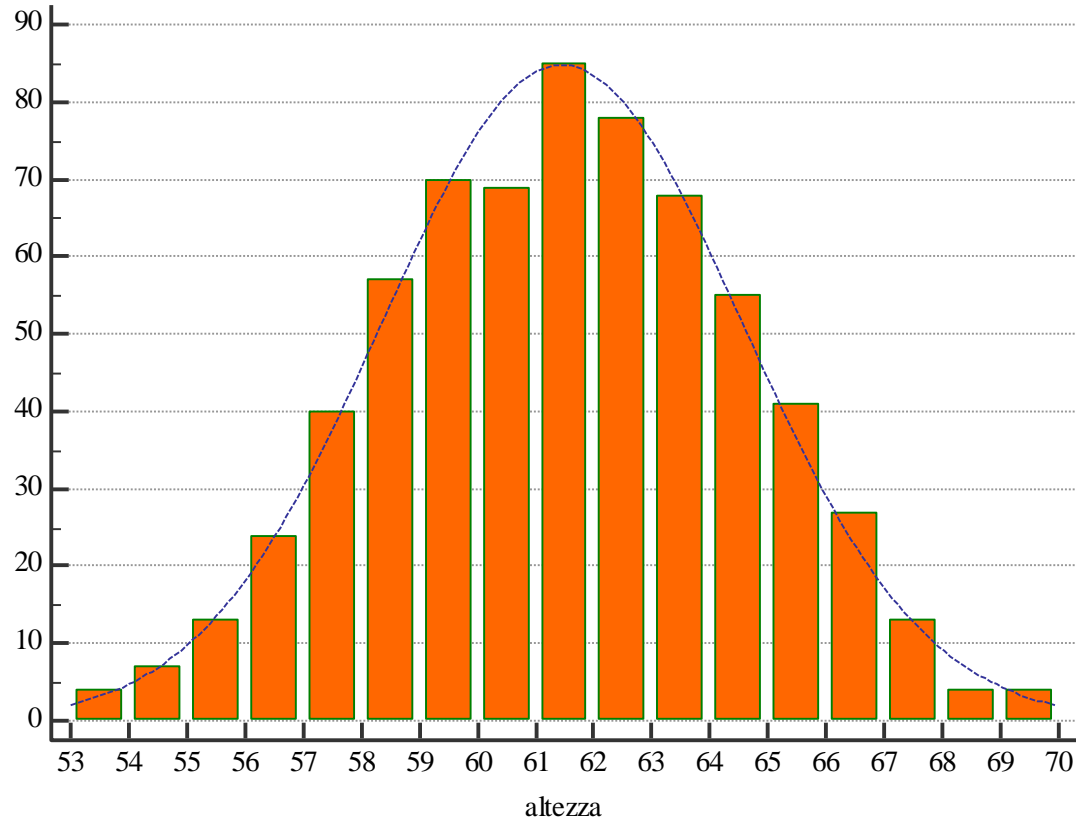
10 pazienti con la malattia e
10 pazienti senza la malattia



Situazione Ideale
estremamente rara

FIGURA 1-1 Una situazione clinica in cui la soglia diagnostica separa completamente i soggetti con la malattia da quelli senza la malattia.

Distribuzione di frequenza



la distribuzione di frequenza di una variabile quantitativa si ottiene dividendo la scala di misura in intervalli (classi) di eguale ampiezza e contando il numero di osservazioni che cadono all'interno di ogni classe (frequenza assoluta)

17 classi per 659 dati raggruppati di 1 cm
frequenza assoluta

Distribuzione di Frequenza in medicina

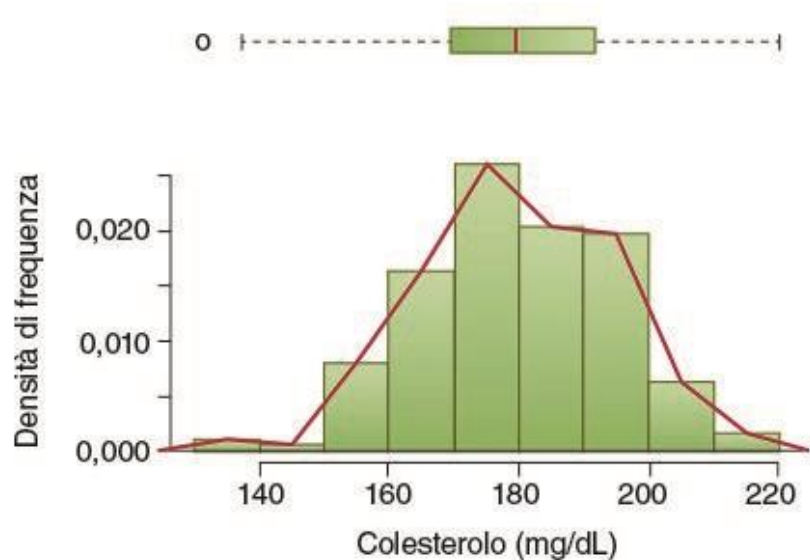


Figura 4.1: Distribuzione (densità di frequenza relativa) di 300 osservazioni di colesterolo, visualizzata tramite istogramma, poligono di frequenza e boxplot.



M. Ciaccio, G. Lippi
Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio
EdiSES

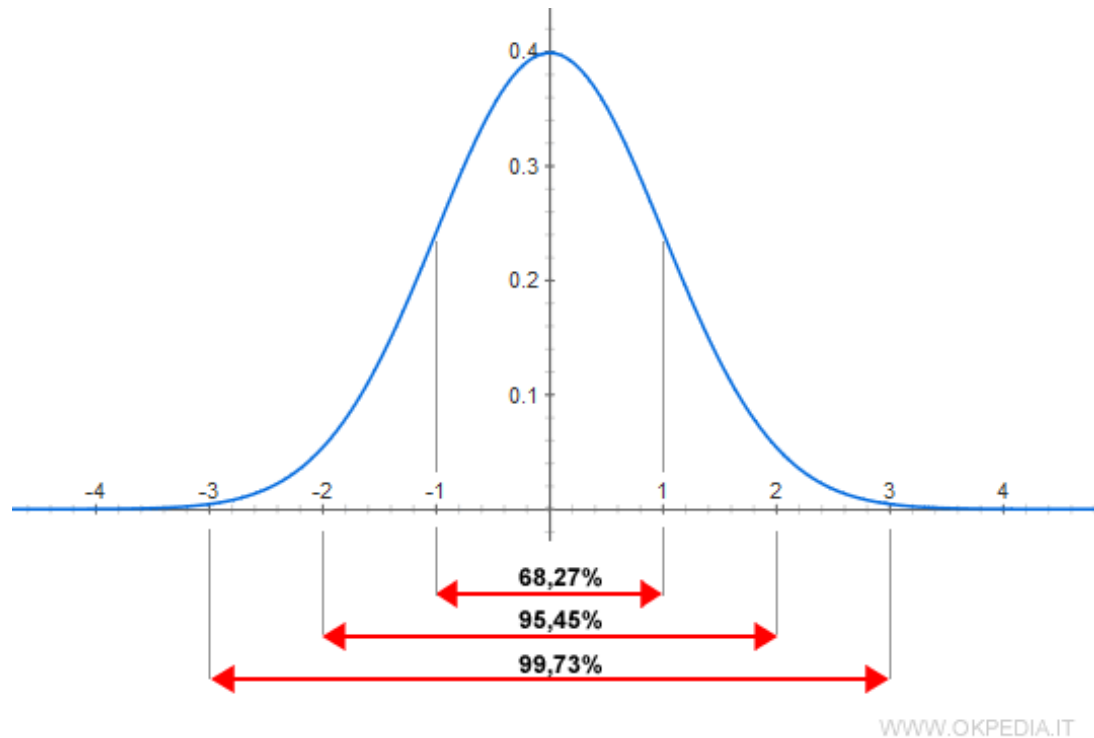
Consente di verificare come si distribuiscono i dati, ovvero dove sono concentrate le osservazioni e le eventuali presenza di osservazioni estreme.

**MISURAZIONE BIOLIGICHE SONO SPESSO
NORMALMENTE DISTRIBUITE**

Distribuzione simmetrica intorno alla media

Distribuzione Normale e Deviazione Standard

Contiene la % dei valori della popolazione



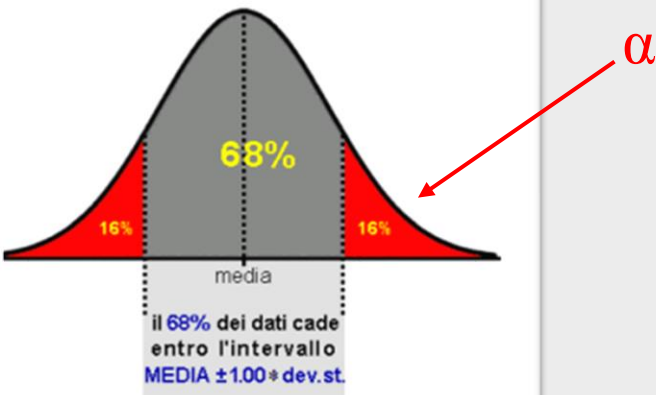
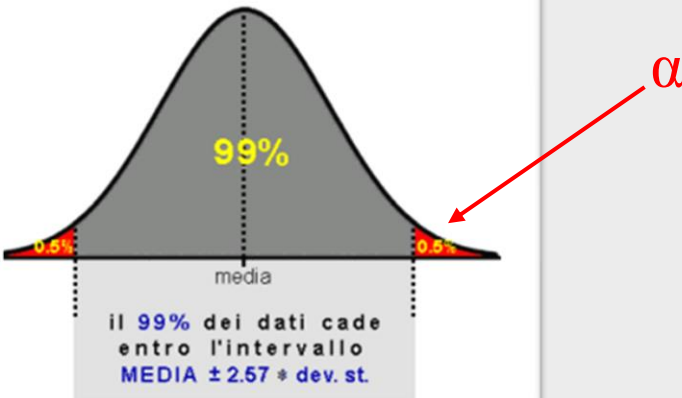
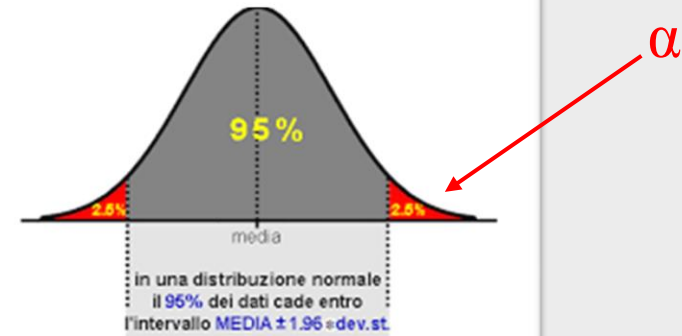
DevSt è un indice di dispersione statistico, vale a dire una stima della variabilità di una popolazione di dati o di una variabile casuale.

- Nella teoria della probabilità **la distribuzione normale**, o di Gauss (o gaussiana) dal nome del matematico tedesco Carl Friedrich Gauss, è **una distribuzione** di probabilità continua in cui i valori reali tendono a concentrarsi **attorno a un singolo valor medio**

• l'area della curva è = 1

- è una distribuzione simmetrica dove media, mediana e moda coincidono
- è completamente definita dal valore medio e dalla deviazione standard

intervalli di confidenza



- l'intervallo di confidenza definisce un insieme di valori (intervallo) di un campione, i cui estremi contengono la media della popolazione con una probabilità approssimata a un livello di copertura pari a $1 - \alpha$
- α indica invece la probabilità di errore, la probabilità che i dati campionati provengano da una popolazione con una media che si trova fuori dell'intervallo
- l'intervallo di confidenza viene stabilito sulla base delle proprie necessità
- per esempio il 95% dei dati si trova in un intervallo di circa $\pm 2\sigma$ (nello specifico $\pm 1,96\sigma$) dalla media

intervalli di confidenza

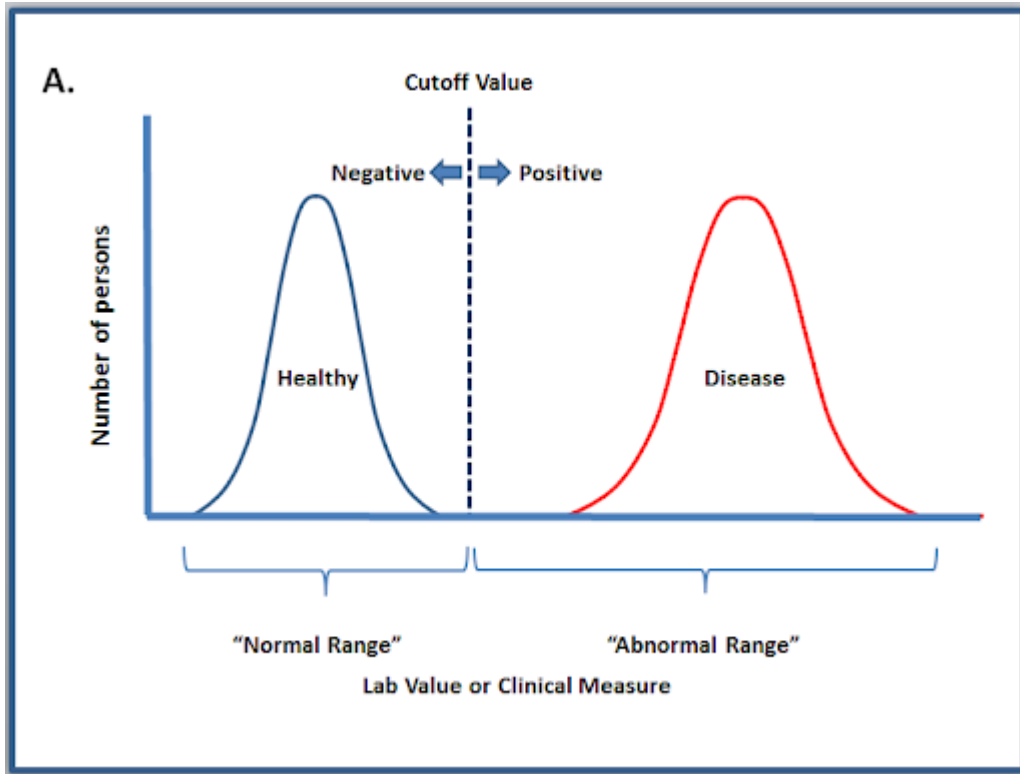
ESAMI IN ROUTINE

<i>Esame</i>	<i>Esito</i>	<i>U.M.</i>	<i>Valori di Riferimento</i>	<i>Metodica Validatore</i>
Glicemia	90	mg/dl	65 - 110	
Azotemia	35	mg/dl	10 - 50	
Creatinina	0.76	mg/dl	0.60 - 1.20	
Colesterolo Totale	165	mg/dl	0 - 200	
Trigliceridi	63	mg/dl	60 - 130	
Colesterolo HDL	29	* mg/dl	35 - 75	
Colesterolo LDL	122	mg/dl	0 - 130	
Acido Urico	7.2	* mg/dl	3.5 - 7.0	
AST-GOT (Aspartato Amino Transferasi)	77	* UI/L	0 - 40	
ALT-GPT (Alanina Amino Transferasi)	64	* UI/L	0 - 35	
Gamma Glutamilasi Transferasi (GGT)	15	UI/L	0 - 64	
Dosaggio Frazioni Bilirubina				
Bilirubina Totale (BT)	0.46	mg/dl	0.00 - 1.20	(Colorimetrica
Bilirubina Diretta (BD)	0.11	mg/dl	0.00 - 0.25	(Colorimetrica
Bilirubina Indiretta	0.35	mg/dl	0.00 - 0.95	

CONCLUSIONE

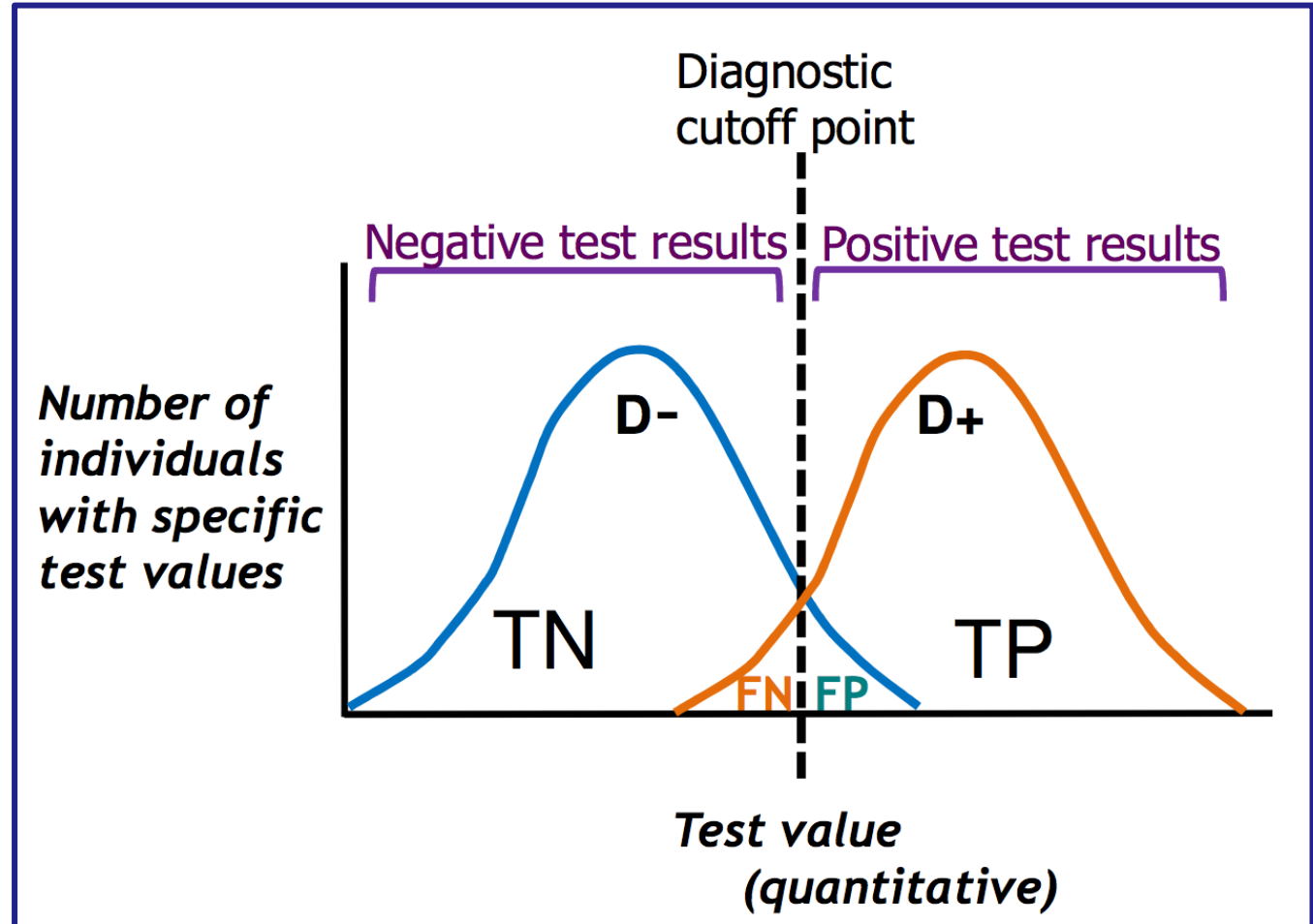
- La semplice individuazione di un singolo valore non è sufficiente.
- Stima di un **intervallo di valori plausibili per quel parametro**, definito intervallo di confidenza (intervallo di fiducia)
- L'intervallo di confidenza misura l'attendibilità di una statistica
- La stima intervallare fornisce un **insieme di valori che ha una certa probabilità di contenere il valore vero della popolazione**

Scelta del Cutoff



Situazione Ideale

Situazione Reale



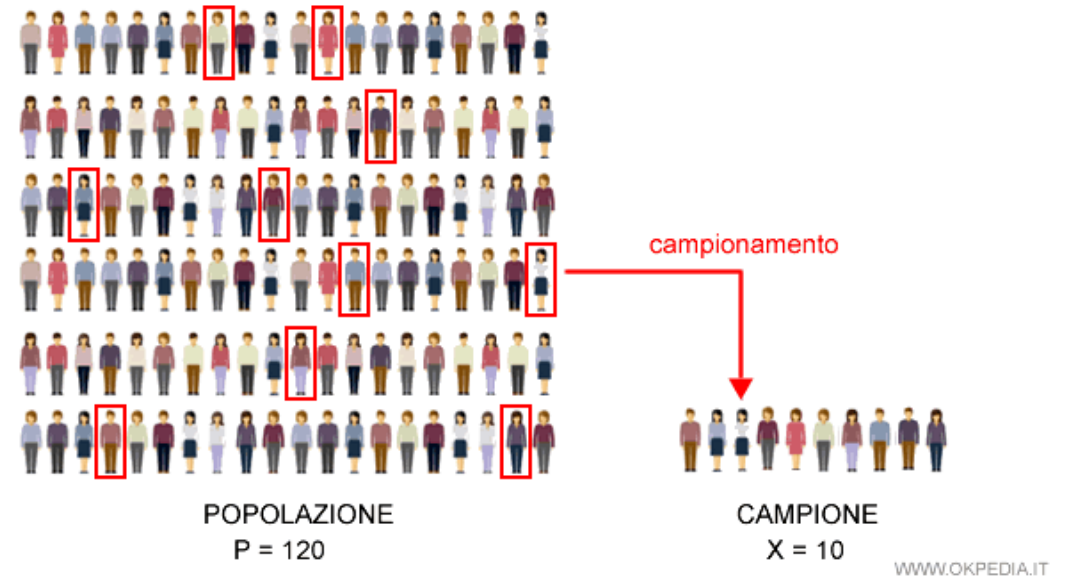
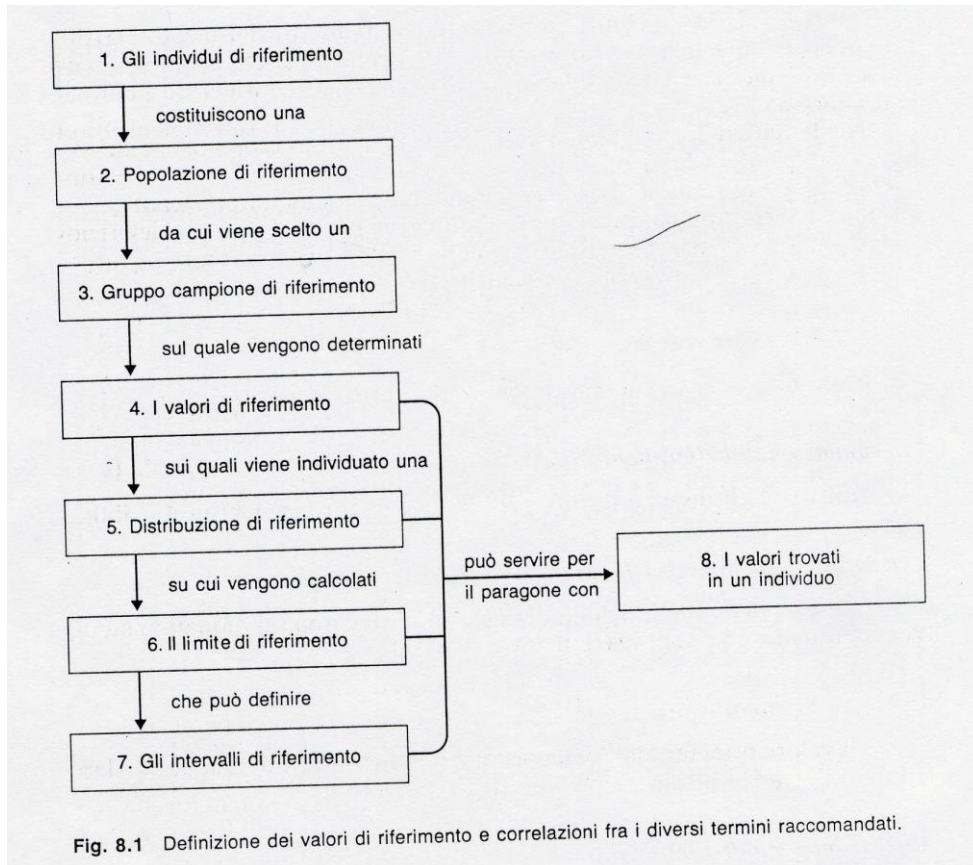
Variabilità e Valori di Riferimento

Il risultato analitico di Laboratorio per giungere alla sua utilizzazione clinica deve essere confrontato con i cosiddetti “Valori normali” nella terminologia più moderna definiti “Valori di riferimento”.

Indispensabile la buona scelta dei valori di riferimento



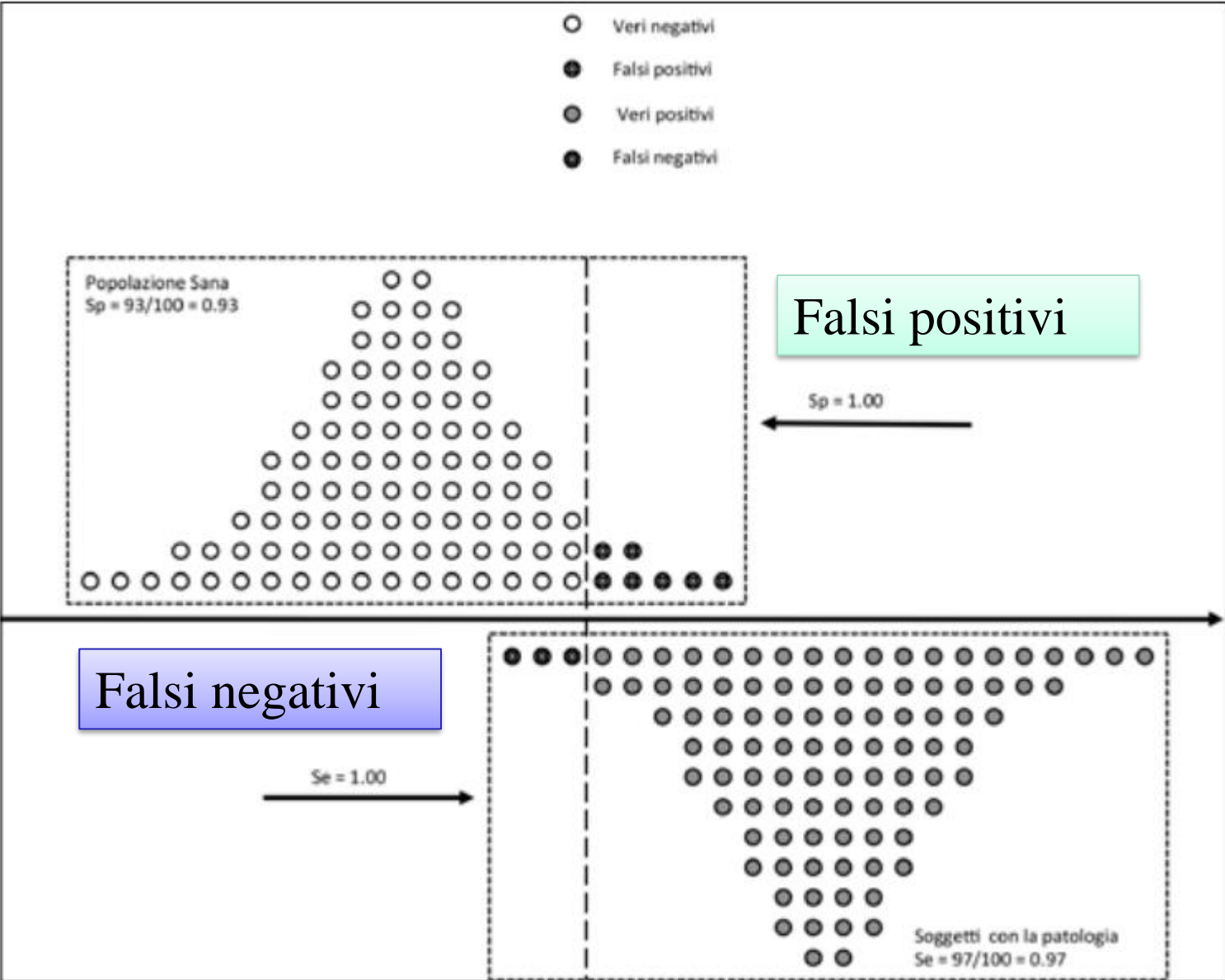
Come di costruiscono calcolano Valori di Riferimento





Interpretazione del dato analitico

Situazione Reale



You are not pregnant!

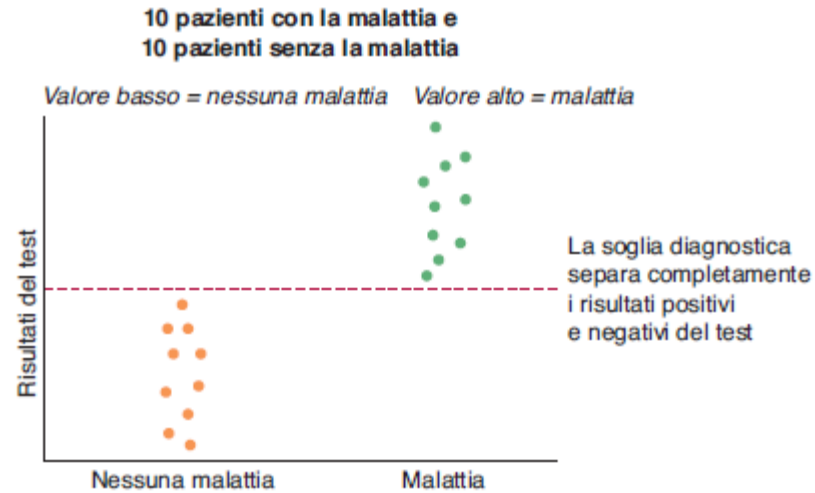


FIGURA 1-1 Una situazione clinica in cui la soglia diagnostica separa completamente i soggetti con la malattia da quelli senza la malattia.

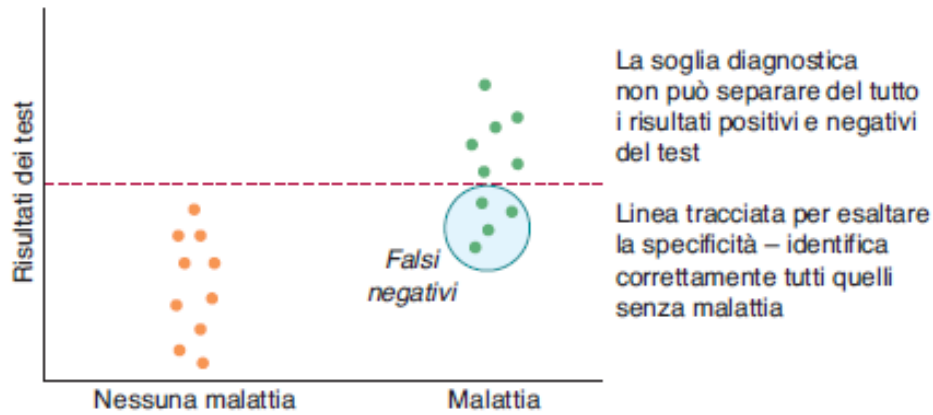


FIGURA 1-3 Una situazione clinica in cui viene selezionata una soglia diagnostica per esaltare la specificità.

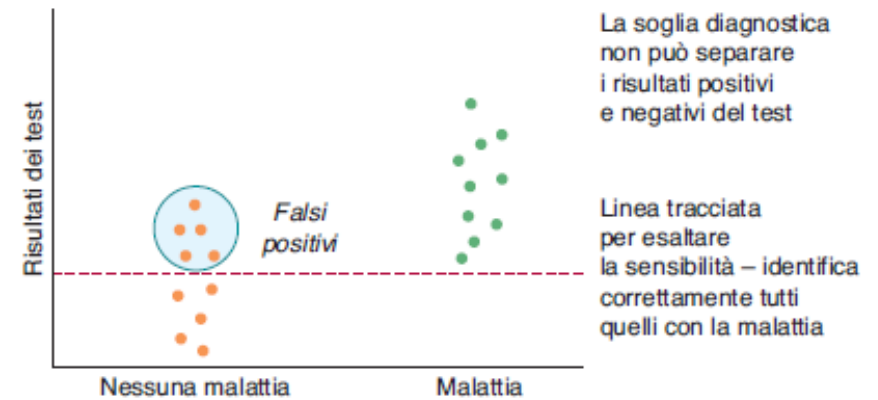


FIGURA 1-2 Una situazione clinica in cui sia stata selezionata una soglia diagnostica per esaltare la sensibilità.

Sensibilità di un test

- La sensibilità di un test è la capacità di identificare il maggior numero di soggetti con la malattia

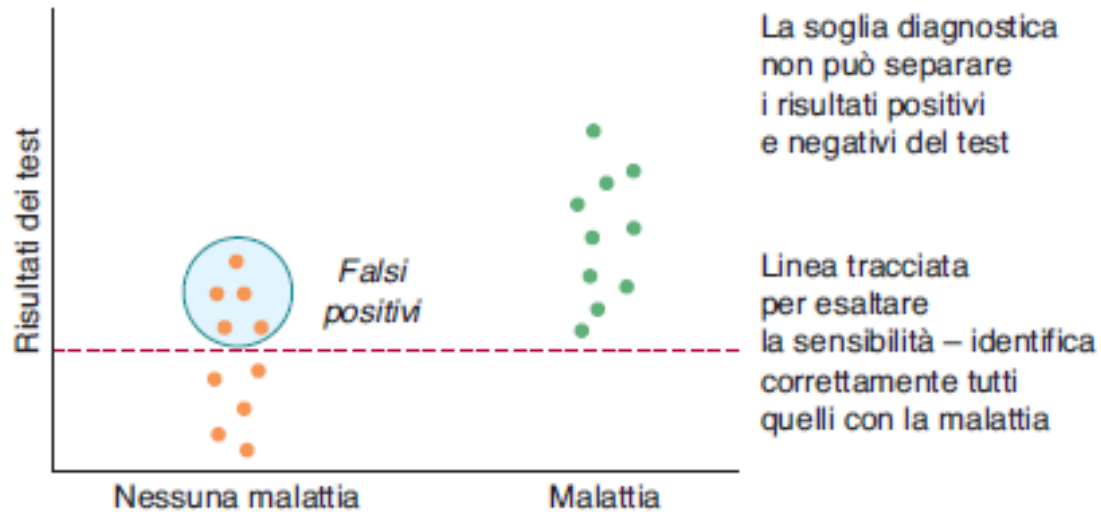


FIGURA 1-2 Una situazione clinica in cui sia stata selezionata una soglia diagnostica per esaltare la sensibilità.



Specificità di un test

- Capacità di identificare correttamente i sani

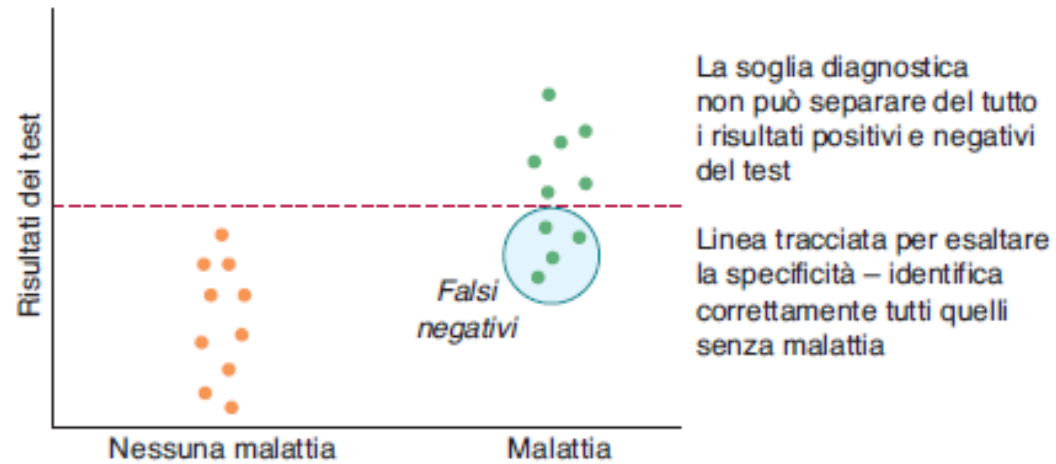


FIGURA 1-3 Una situazione clinica in cui viene selezionata una soglia diagnostica per esaltare la specificità.



Più sensibile ma
meno specifico

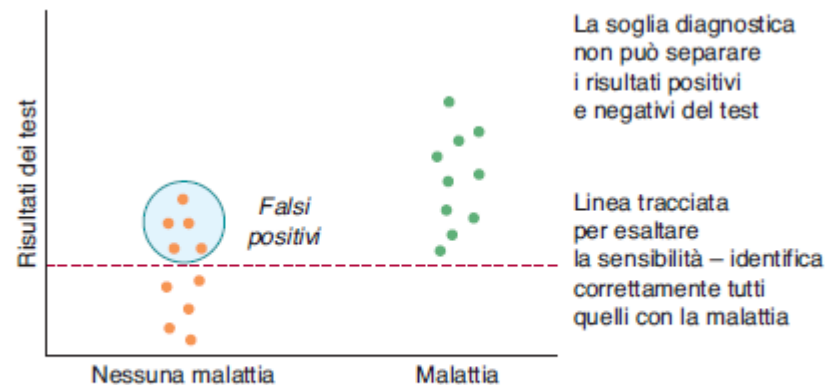
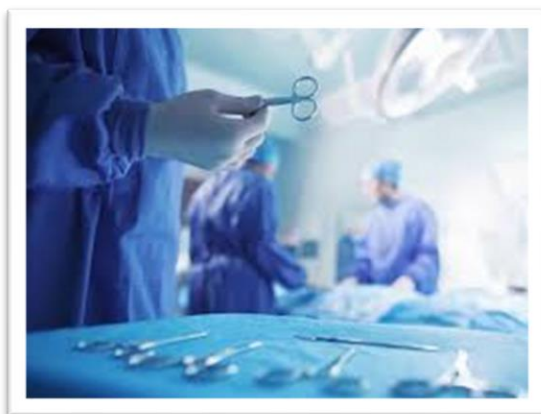


FIGURA 1-2 Una situazione clinica in cui sia stata selezionata una soglia diagnostica per esaltare la sensibilità.



Più specifico ma
meno sensibile

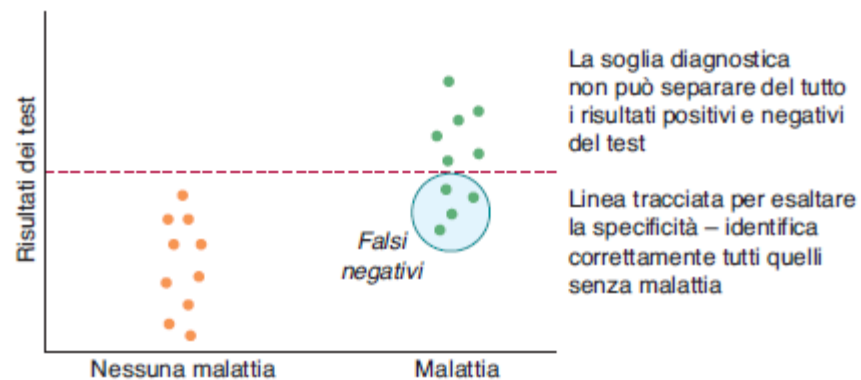


FIGURA 1-3 Una situazione clinica in cui viene selezionata una soglia diagnostica per esaltare la specificità.

Valore predittivo di un test positivo

Probabilità che un risultato positivo identifichi qualcuno con la malattia

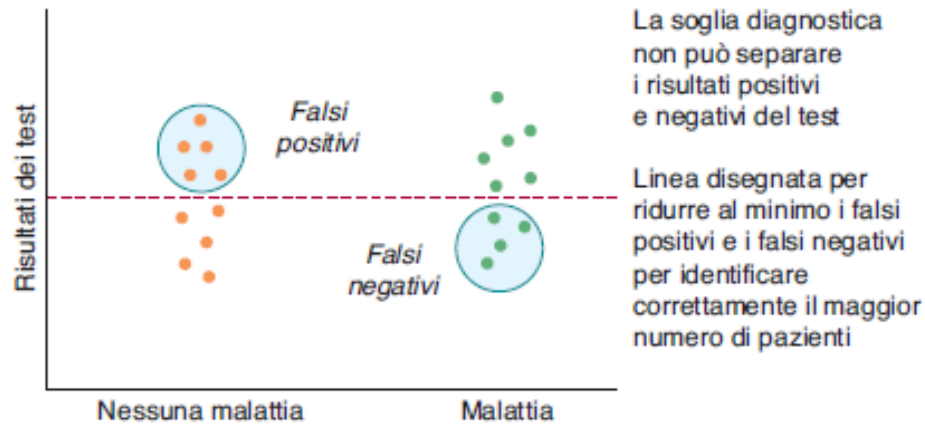


FIGURA 1-4 Una situazione clinica in cui viene selezionata una soglia diagnostica per ridurre al minimo il numero dei falsi positivi e dei falsi negativi.

$$\frac{\text{Veri positivi}}{\text{veri positivi} + \text{falsi positivi}} \times 100$$

$$\frac{6}{6+5} \times 100 = 0.54 \times 100 = 54\%$$

Valore predittivo di un test negativo

Probabilità che un risultato negativo identifichi qualcuno senza la malattia

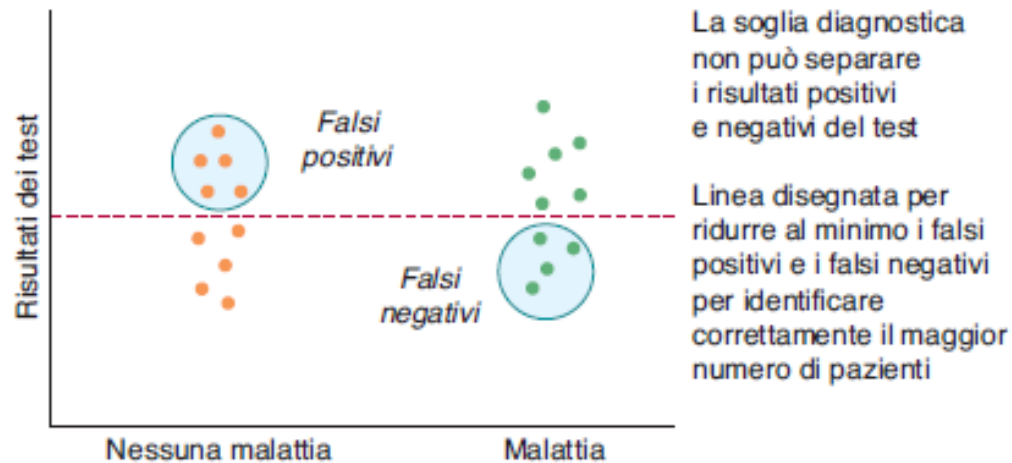
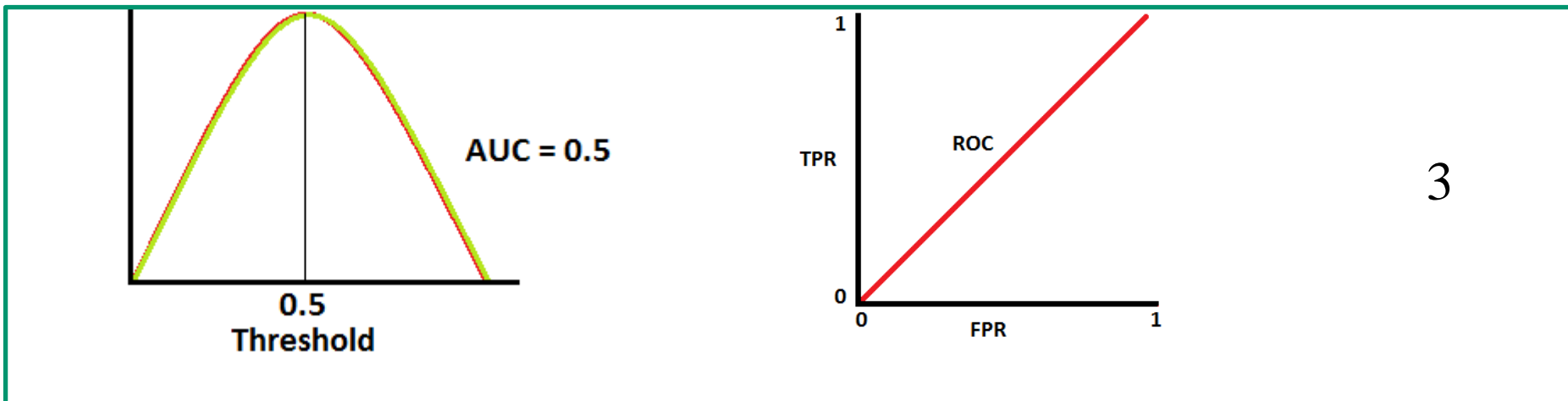
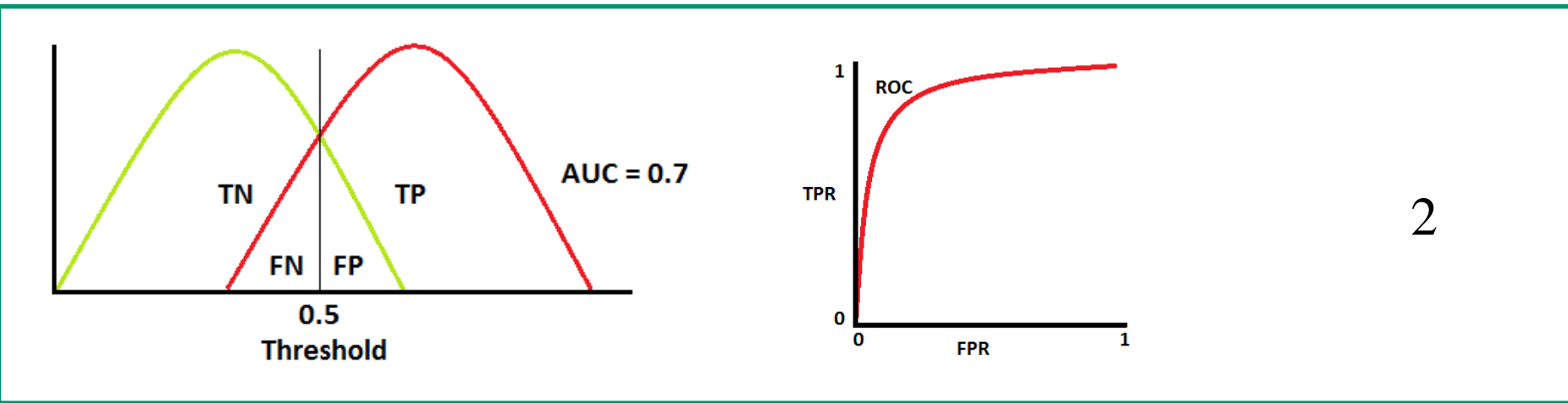
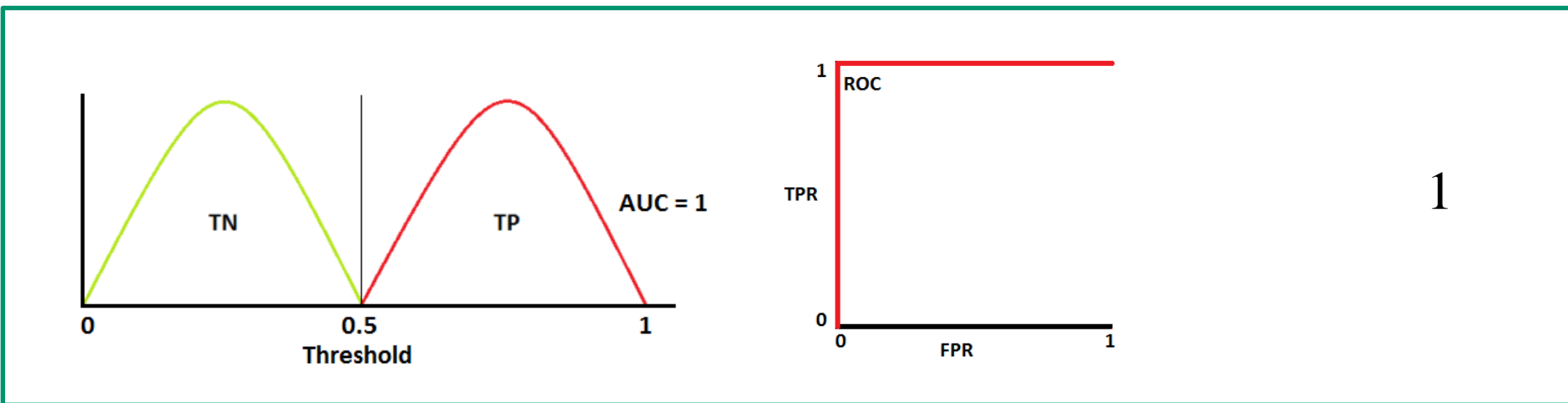


FIGURA 1-4 Una situazione clinica in cui viene selezionata una soglia diagnostica per ridurre al minimo il numero dei falsi positivi e dei falsi negativi.

$$\frac{\text{Veri negativi}}{\text{veri negativi} + \text{falsi negativi}} \times 100$$

$$\frac{5}{5+4} \times 100 = 0.55 \times 100 = 55\%$$

**Curva delle caratteristiche operative relative
(ROC curve)**



COSA INFLUENZA LE CURVE GAUSSIANE?



shutterstock.com • 683658667

VARIABILITÀ ED ERRORI

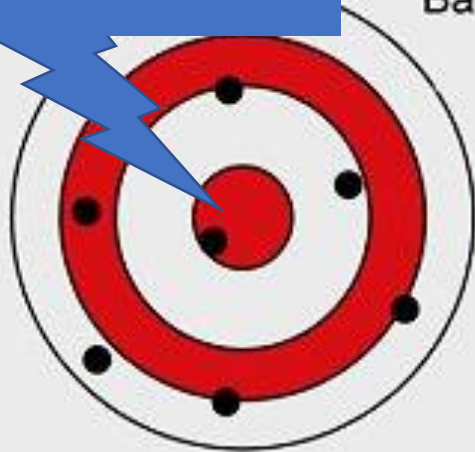
Variabilità analitica

- fonti di variabilità:
 - reagenti
 - calibratori e calibrazione
 - strumentazione
 - operatore
- tali variabili possono introdurre due tipi di errori:
 - errori casuali
 - errori sistematici

Variabilità analitica

Valore Vero

Bassa accuratezza
Bassa precisione



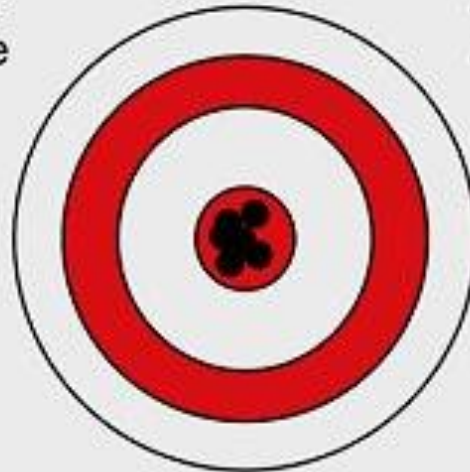
Bassa accuratezza
Alta precisione



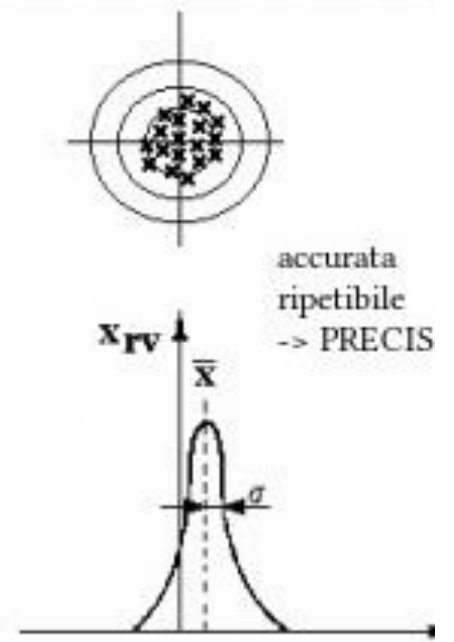
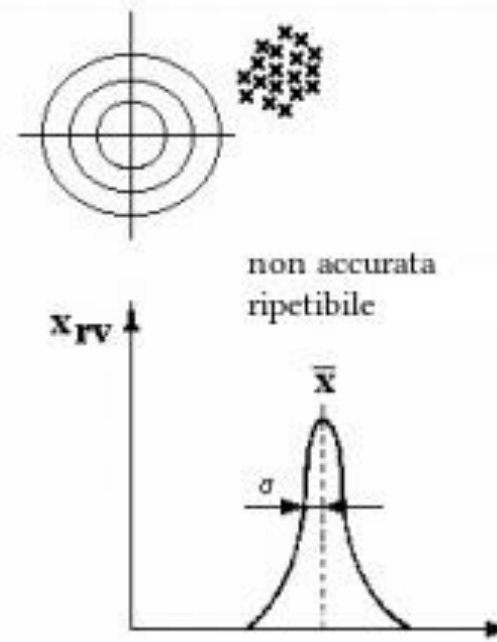
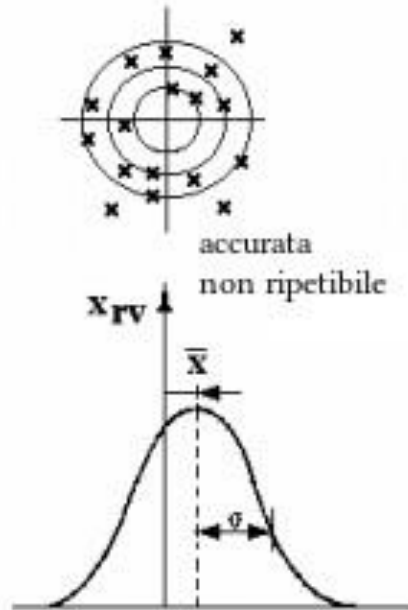
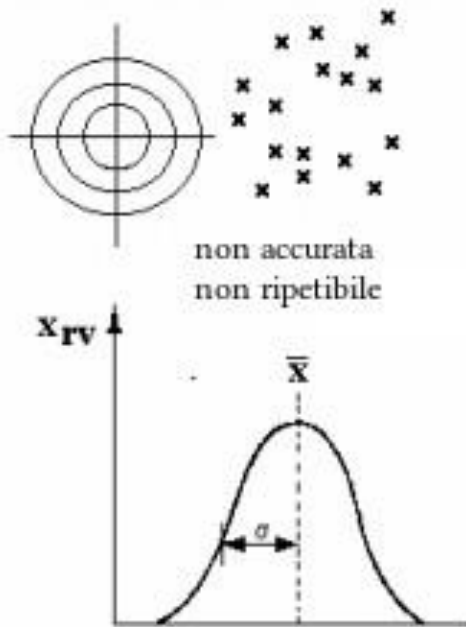
Alta accuratezza
Bassa precisione



Alta accuratezza
Alta precisione



Variabilità analitica



variabilità biologica

- variabilità biologica intraindividuale:
 - variabile intrinseca dell'organismo
espressione di fluttuazioni casuali intorno a un punto omeostatico.
- variabilità biologica interindividuale:
 - differenza tra i punti omeostatici di individui diversi
- essenziale per la definizione di traguardi analitici e per la corretta interpretazione di un test

variabilità biologica intra-individuale (CV_i)



La **variabilità biologica intra-individuale** è caratteristica propria dell'analita e ci possono essere variazioni anche significative tra individui e dipende dalla fisiologia alla base del suo controllo, e.g.:

- concentrazione critica per il buon funzionamento dell'organismo (ormoni)
- l'analita non esplica la sua funzione nel plasma (enzimi marcatori di danno tissutale)

variabilità biologica interindividuale (CV_g)



- rappresenta la variabilità dovuta alle diverse caratteristiche degli individui
- l'entità di questa variabilità è dato dall'ampiezza dell'intervallo dei valori in una popolazione di soggetti sani
- la variabilità biologica interindividuali definisce di fatto gli **INTERVALLI DI RIFERIMENTO**

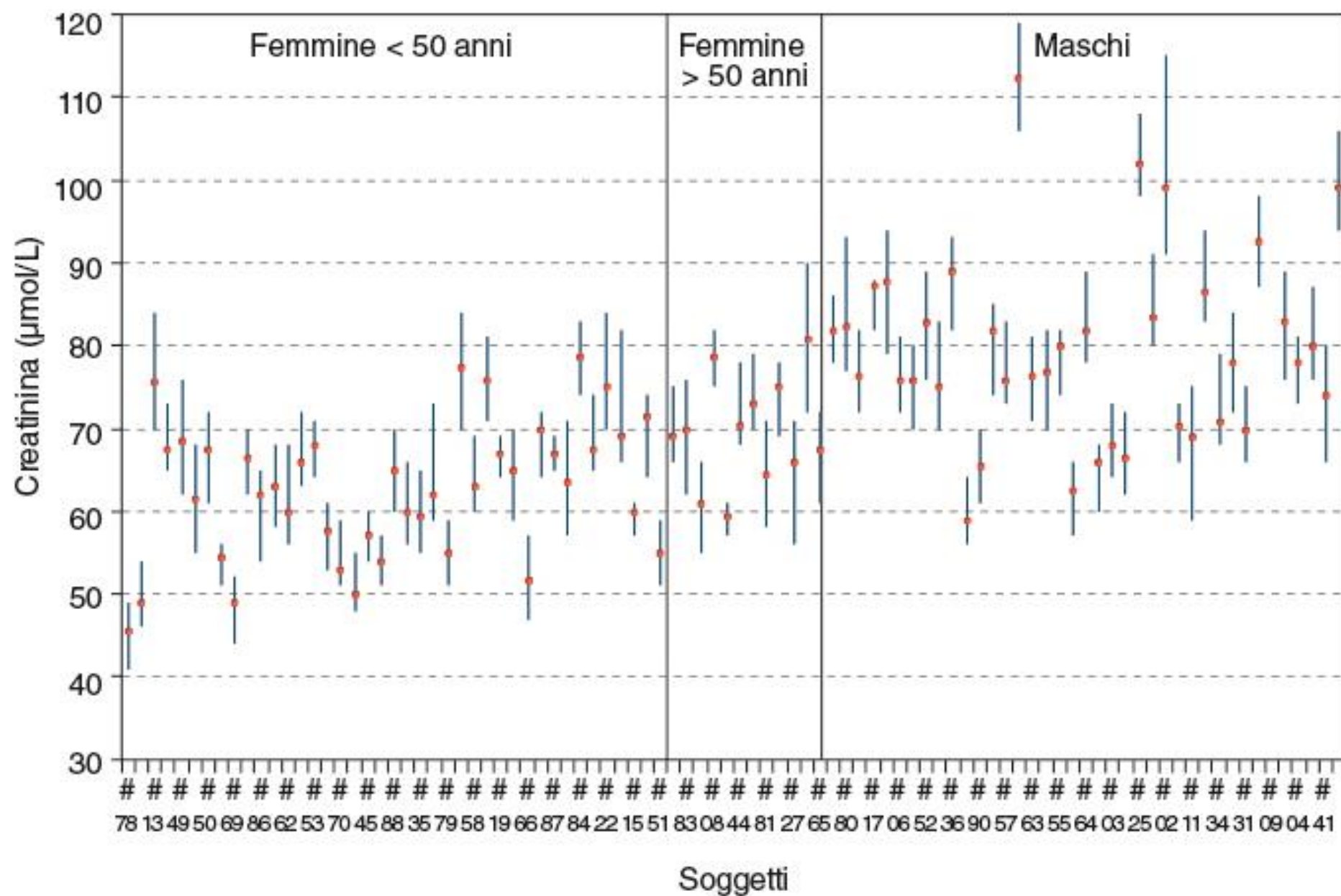


Figura 7.1: Variabilità biologica della creatinina nel siero di 90 soggetti con funzionalità renale fisiologica, prelevati una volta alla settimana per 10 settimane consecutive. I dati sono suddivisi per sesso e, nell'ambito dello stesso gruppo, ordinati per età crescente (da 20 a 69 anni per le donne, da 20 a 59 anni per gli uomini). Il tratto orizzontale indica la mediana, quello verticale l'ambito di dispersione dei valori (massimo-minimo) di ciascun soggetto.

Tipi di Errori

1.1 Pre-preanalitici

Paziente
Ospedale

- Inadeguata preparazione del paziente (non a digiuno)
 - Variabilità biologica
 - Ingestione di farmaci
- Raccolta
 - Ritardo nel trasporto,



Laboratorio

1.2 Preanalitici

- Conservazione non corretta
- Trattamento Campione
- Aliquotazione



Tipi di Errori

- Eta'
- Sesso
- Massa corporea
- Preparazione del paziente (digiuno)
- Postura



glucosio



leucociti



CK



Tipi di Errori

- Richiesta inappropriata
- Errore di tracciabilità
- Errore del contenitore
- Campione insufficiente
- Campione coagulato
- Campione emolizzato
- Campione emolizzato
- Campione lipemico

COGNOME NOME
VIA GARIBOLDI 706006 VIGOLEZZA (VI) 0445
SERVIZIO SANITARIO NAZIONALE
HOSPITALIARI ROMANA
TIMRRP11480123000
SPEDIZIONE IN ABBONDO PER LA POSTA
D.D. ROSSO



Tipi Errori

2. Analitici (Più rari)

- uso non corretto della strumentazione
- reagenti scaduti



3. Post-analitici

Inserimento di dati del paziente sbagliato



BRAIN-TO-BRAIN LOOP: di George Lundberg

Pre-post analitica 80% errore

Pre-pre-analitica: Fuori dal lab

Pre-analitica: Dentro il lab

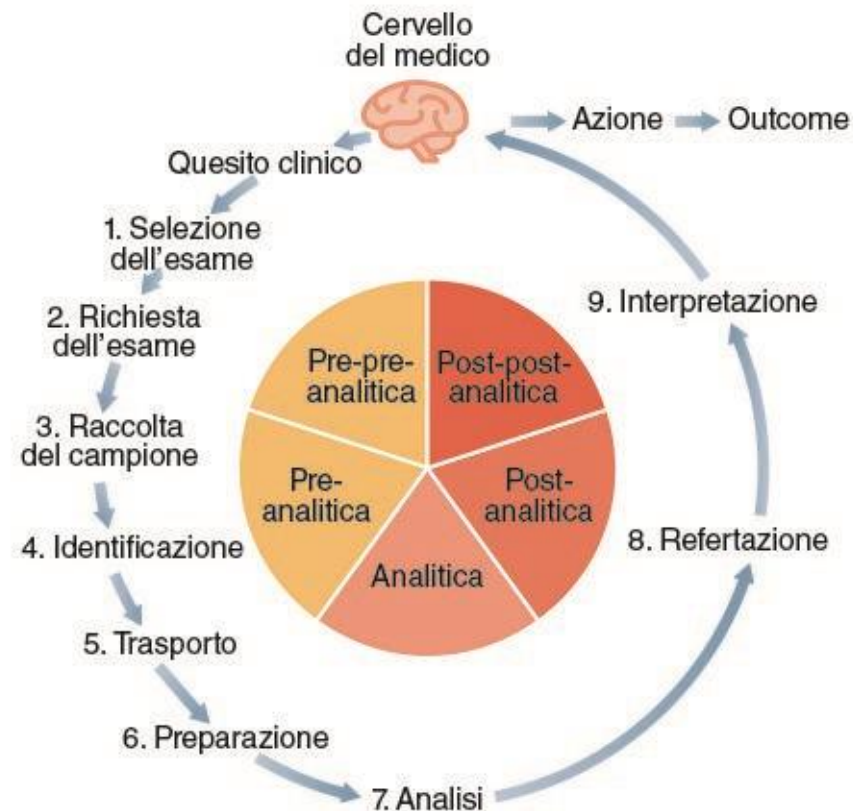


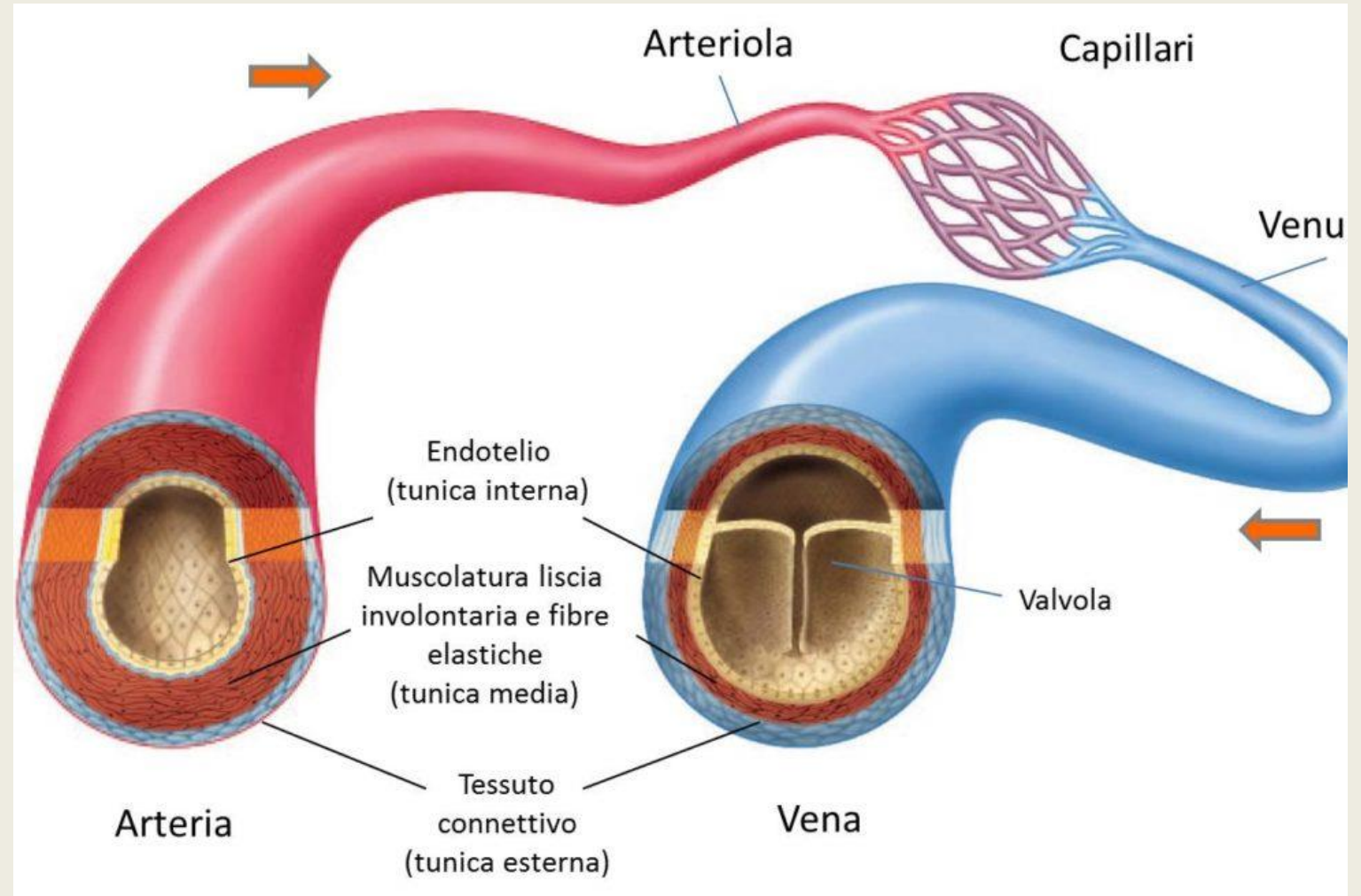
Figura 6.1: Processo "Brain-to-brain loop" di George D. Lundberg.

IL SANGUE



Tipi di prelievo

- Sangue Arterioso
- Capillare
- Sangue Venoso



Sangue
Arterioso:
EMOGASANALISI

1. VALUTAZIONE
DELLO STATO DI
OSSIGENAZIONE

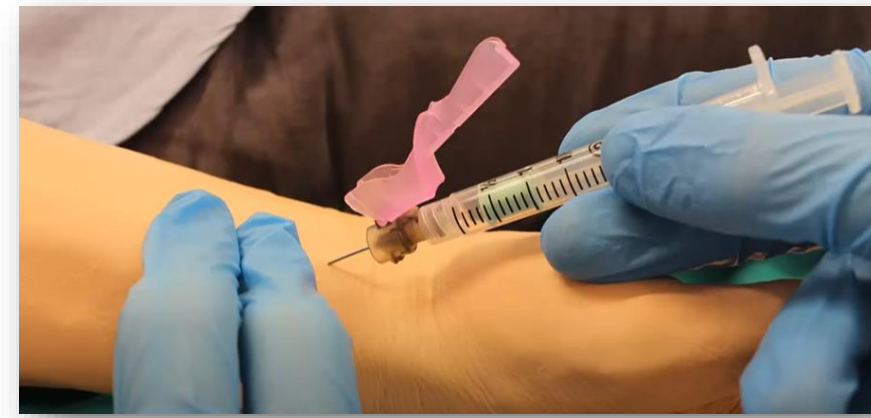
2. VALUTAZIONE
DELL'EQUILIBRIO
ACIDO-BASE



Sangue Arterioso: EMOGASANALISI

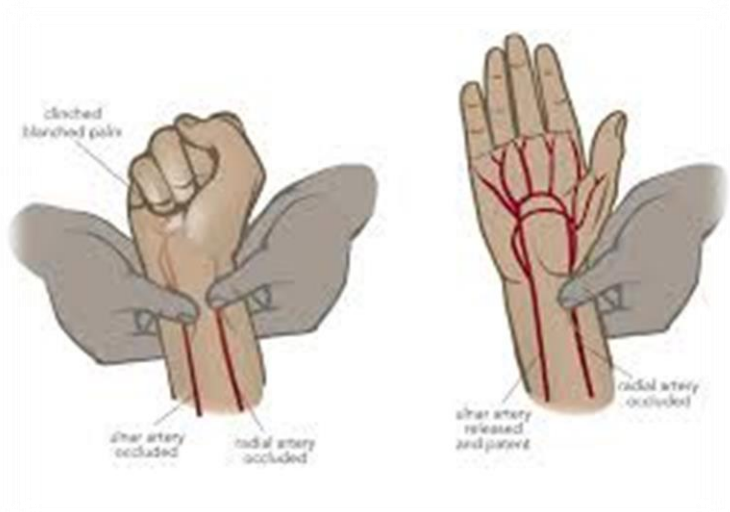
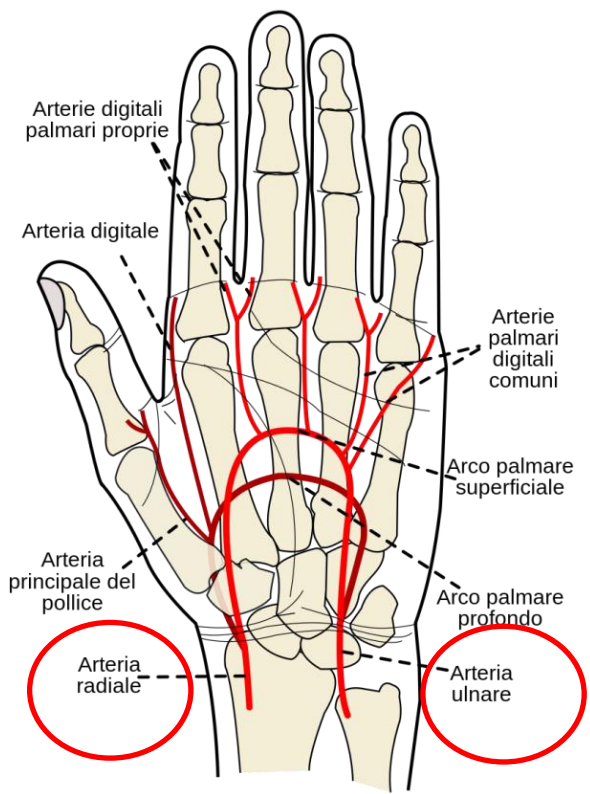
1. Prelievo arterioso è più profondo
2. Informazioni precise sulla funzionalità polmonare
3. Da informazioni su :
 - pH del sangue
 - pO₂
 - pCO₂

PRONTO SOCCORSO : - Paziente incosciente



Le arterie sono i vasi sanguigni che portano il sangue ossigenato dal ventricolo sinistro del cuore verso gli altri organi

PRIMA DI EFFETTUARE UN PRELIVO ARTERIOSO



Test di Allen



ARTERIA RADIALE

COME SI FA UN'EMOGAS?

1. Far estendere l'avambraccio
2. Disinfettare la cute dell'avambraccio
3. Palpare l'arteria radiale e cercare il punto dove si sente meglio la pulsatilità
4. Inserire delicatamente l'ago da emogas (sotto vuoto ed eparinato) a circa 45°
5. Approfondirsi finché non si vede fuoriuscire il sangue

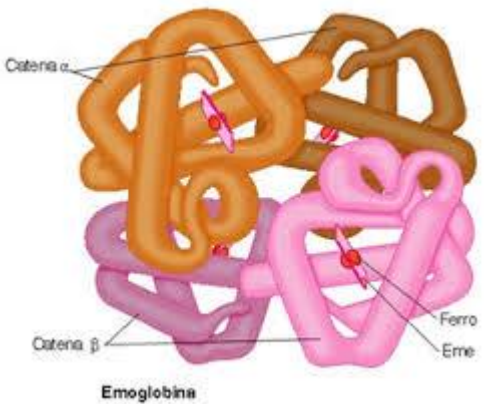


Stato di ossigenazione

Stato di ossigenazione della EMOGLOBINA




L SYNTHESIS	
29 SETT. 98 15:52	
IO B.P. 768 mmHg	
re 123	
arterioso prelevato alle 15:50	
INFO PAZIENTE	
i 5678901234	
io Galli	
s	37 °C
a	60.0 %
MOGASANALISI	
	37.0 °C
	7.419
	37.4 mmHg
pO ₂	80 mmHg
ELETTROLITI	
Na ⁺	140 mmol/L
K ⁺	4.1 mmol/L
Ca ⁺⁺	1.20 mmol/L
Cl ⁻	106 mmol/L
HCT (conduttimetrico)	
Hct	46 %
PARAMETRI CALCOLATI	
HCO ₃	24.4 mmol/L
TCO ₂	25.6 mmol/L
BE _s	0.8 mmol/L
BE _{act}	-0.3 mmol/L
SBC	25.5 mmol/L
Ca ⁺⁺ (pH 7.4)	1.21 mmol/L
sO _{2c}	95.9 %
AsDO ₂	311.3 mmHg
RI	3.89
Anion Gap	16 mmol/L
pO ₂ / FIO ₂	1.3
CO-OSSIMETRO	
Hb	11.8 g/dL
%O ₂ Hb	96.0
%COHb	1.9
%MetHb	0.4
%RHb	1.7
O ₂ ct	15.7 Vol %
O ₂ cap	16.0 Vol %
sO _{2m}	98.2 %
T. Bil	—



Fisiologia di ossigenazione in soggetti normali a livello del mare



EMOGASANALISI: Risultati

	IL SYNTHESIS 29 SETT. 98 15:52
Acc. No. 790 B.P. 768 mmHg ID Operatore 123 Campione arterioso prelevato alle 15:50	
INFO PAZIENTE ID Paziente 5678901234 Nome: Mario Galli Temperatura 37 °C FIO ₂ 60.0 %	
EMOGASANALISI Misurati a 37.0 °C pH 7.419 pCO ₂ 37.4 mmHg pO ₂ 80 mmHg	
ELETTROLITI Na ⁺ 140 mmol/L K ⁺ 4.1 mmol/L Ca ⁺⁺ 1.20 mmol/L Cl ⁻ 106 mmol/L	
HCT (conduttimetrica) Hct 46 %	
PARAMETRI CALCOLATI HCO ₃ 24.4 mmol/L TCO ₂ 25.6 mmol/L BE _s 0.8 mmol/L BE _{ed} -0.3 mmol/L SBC 25.5 mmol/L Ca ⁺⁺ (pH 7.4) 1.21 mmol/L sO ₂ c 95.9 % AaDO ₂ 311.3 mmHg RI 3.89 Anion Gap 16 mmol/L pO ₂ / FIO ₂ 1.3	
CO-OSSIMETRO Hb 11.8 g/dL %O ₂ Hb 96.0 %COHb 1.9 %MetHb 0.4 %RHb 1.7 O ₂ d 15.7 Vol % O ₂ cap 16.0 Vol % sO ₂ m 98.2 % T. Bil —	



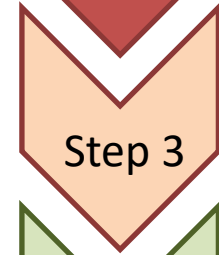
Step 1

Valutazione stato di ossigenazione



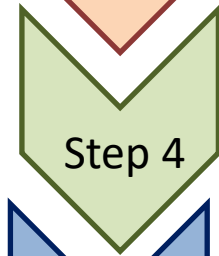
Step 2

Analisi del pH



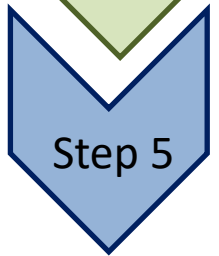
Step 3

Analisi della PdCO₂



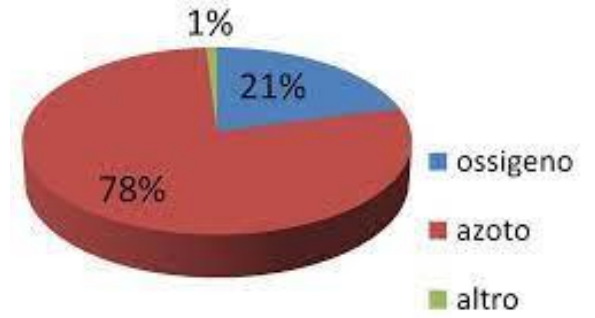
Step 4

Valutazione dei bicarbonati



Step 5

Valutazione del compenso atteso



La composizione dell'aria

Step 1

Valutazione stato di ossigenazione

Valori Normali	
PaO2	60-100 mmHg
PaCO2	38- 40mmHg
FiO2	21%

Valori Alterati	
Ipossia	< 60mmHg
Ipercapnia	> 40mmHg
Ipocapnia	<38 mmHg

Indici Derivati	
$P/F = PaO_2 / FiO_2$	>450

$P/F < 200 \rightarrow$ Insufficienza respiratoria **Grave**

P/F tra 200 e 400 \rightarrow Insufficienza respiratoria **Moderata**

IL SYNTHESIS
29 SETT. 98 15:52
Acc. No. 790 B.P. 768 mmHg
ID Operatore 123
Campione arterioso prelevato alle 15:50

INFO PAZIENTE
ID Paziente 5678901234
Nome: Mario Galli
temperatura 37 °C
FiO₂ 60.0 %

EMOGASANALISI
Misurati a 37.0 °C
pH 7.419
pCO₂ 37.4 mmHg
pO₂ 80 mmHg

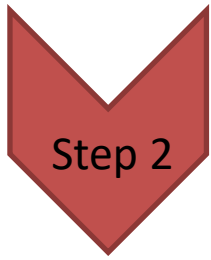
ELETTROLITI
Na⁺ 140 mmol/L
K⁺ 4.1 mmol/L
Ca⁺⁺ 1.20 mmol/L
Cl⁻ 106 mmol/L

HCT (conduttimetrico)
Hct 46 %

PARAMETRI CALCOLATI
HCO₃ 24.4 mmol/L
TCO₂ 25.6 mmol/L
BE_s 0.8 mmol/L
BE_{ed} -0.3 mmol/L
SBC 25.5 mmol/L
Ca⁺⁺ (pH 7.4) 1.21 mmol/L
sO₂c 95.9 %
AaDO₂ 311.3 mmHg
RI 3.89
Anion Gap 16 mmol/L
pO₂ / FiO₂ 1.3

CO-OSSIMETRO
Hb 11.8 g/dL
Hb 96.0
Hb 1.9
Hb 0.4
Hb 1.7
Hb 15.7 Vol %
Hb 16.0 Vol %
Hb 98.2 %
—

FiO2:Frazione Inspirata O2: Generalmente 21% in ambiente

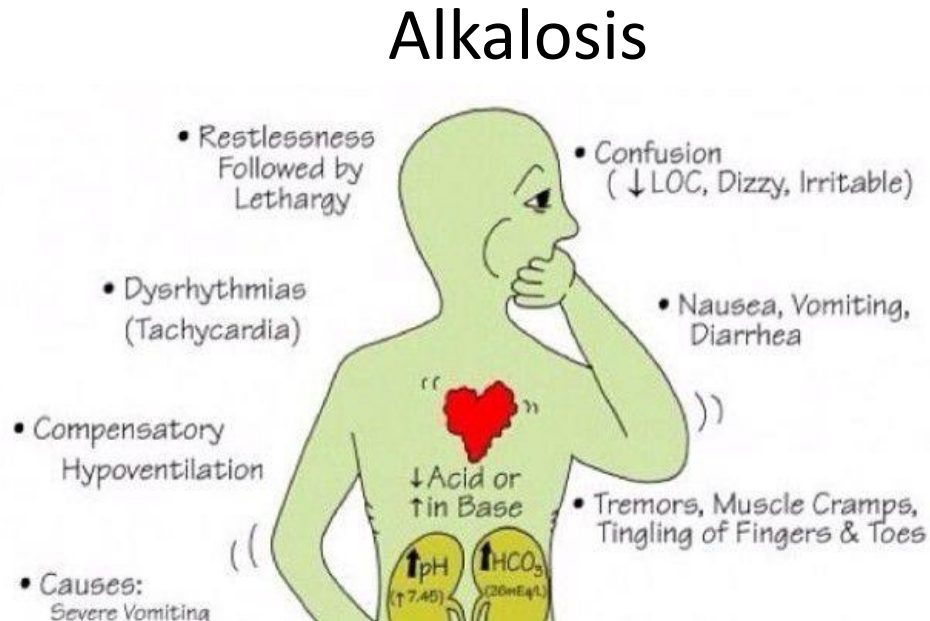
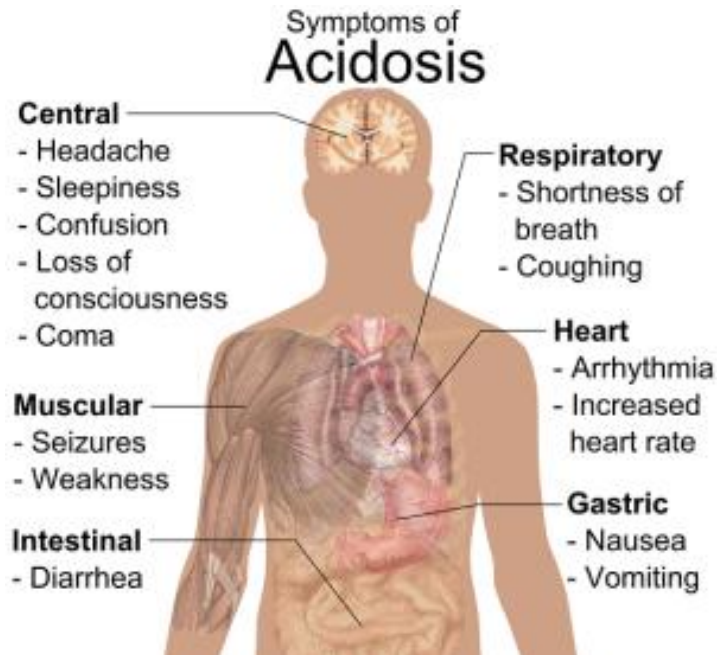


Analisi del pH

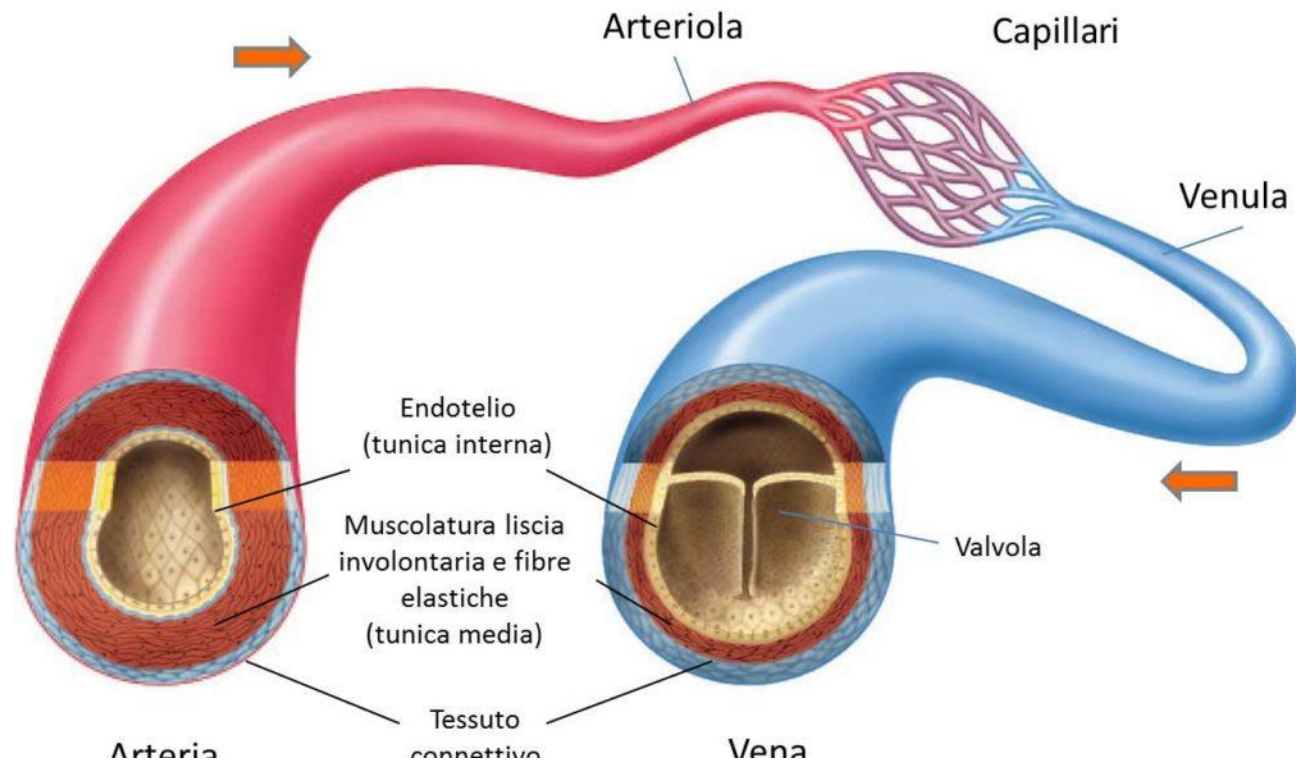
Valori Normali	
pH	7.38-7.42

Valori Alterati	
Acidosi	< 7.38
Alcalosi	> 7.42

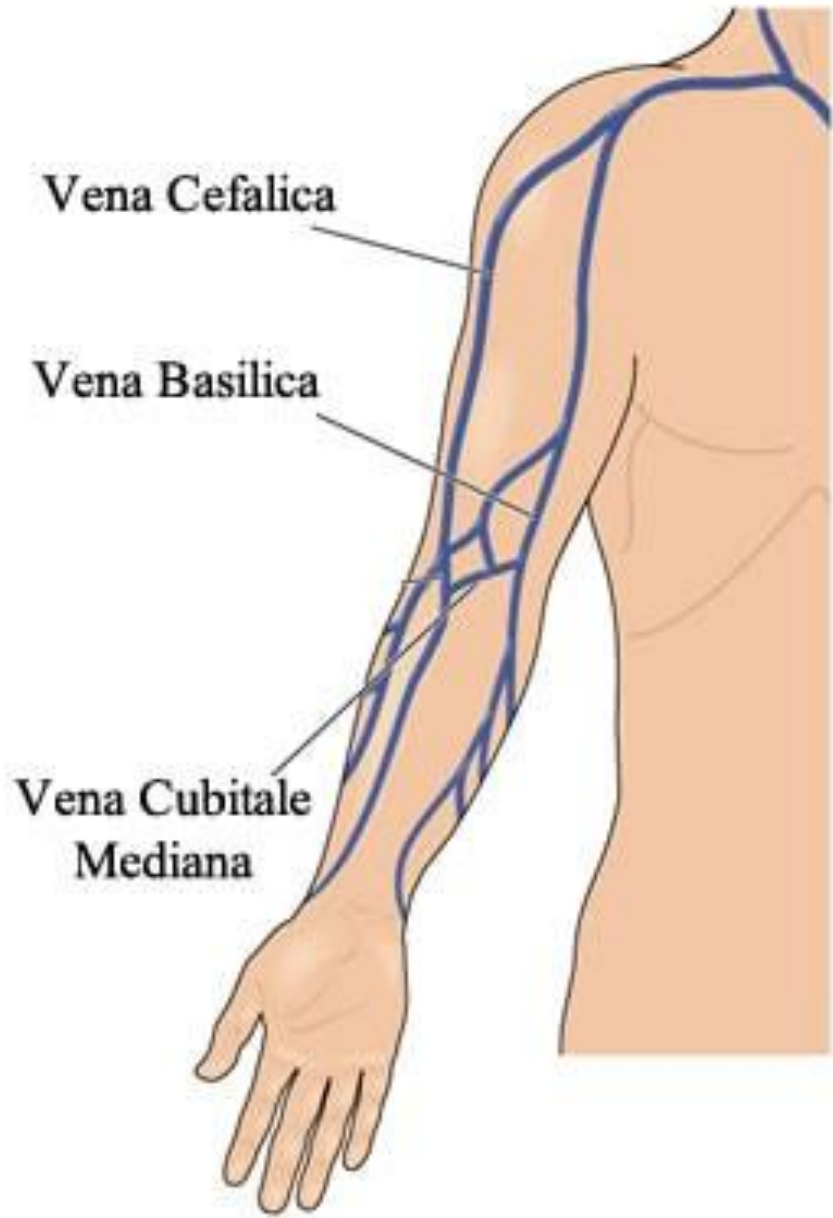
IL SYNTHESIS 29 SETT. 98 15:52	
Acc. No. 790 B.P. 768 mmHg ID Operatore 123 Campione arterioso prelevato alle 15:50	
INFO PAZIENTE	
ID Paziente 5678901234 Nome: Mario Galli temperatura 37 °C FIO ₂ 60.0 %	
EMOGASANALISI	
Misurati a	37.0 °C
pH	7.419
pCO ₂	37.4 mmHg
pO ₂	80 mmHg
ELETTROLITI	
Na ⁺	140 mmol/L
K ⁺	4.1 mmol/L
Ca ⁺⁺	1.20 mmol/L
Cl ⁻	106 mmol/L
HCT (conduttimetrico)	
Hct	46 %
PARAMETRI CALCOLATI	
HCO ₃	24.4 mmol/L
TCO ₂	25.6 mmol/L
BE _s	0.8 mmol/L
BE _{act}	-0.3 mmol/L
SBC	25.5 mmol/L
Ca ⁺⁺ (pH 7.4)	1.21 mmol/L
sO _{2c}	95.9 %
AsDO ₂	311.3 mmHg
RI	3.89
Anion Gap	16 mmol/L
pO ₂ / FIO ₂	1.3
CO-OSSIMETRO	
Hb	11.8 g/dL
%O ₂ Hb	96.0
%COHb	1.9
%MetHb	0.4
%RHb	1.7
O ₂ ct	15.7 Vol %
O ₂ cap	16.0 Vol %
sO _{2m}	98.2 %
T. Bil	—



Tipi di prelievo



- Sangue Arterioso
- Sangue Capillare
- Sangue Venoso



Il Sangue Venoso



Sangue

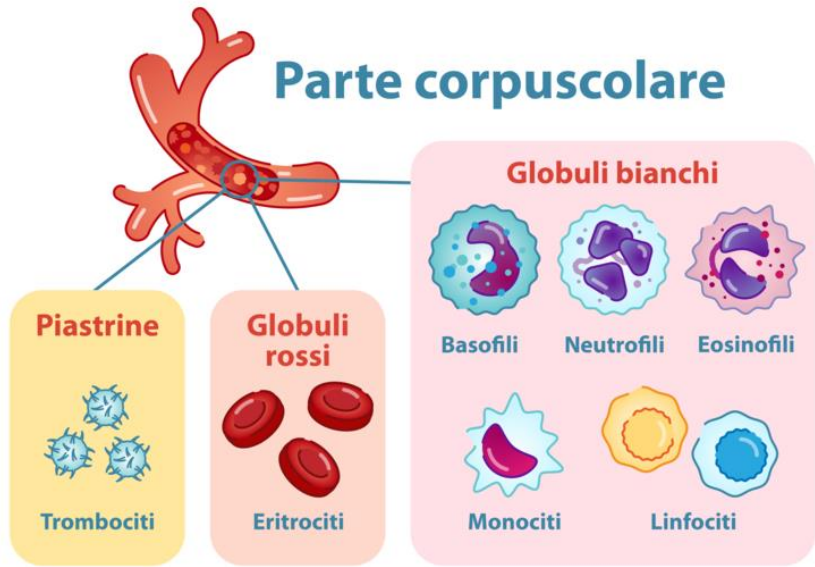
Parte Corpuscolare

Parte Liquida

Siero

Plasma

(Deprivato Dei fattori della coagulazione)



PLASMA

sangue privato degli elementi corpuscolati
Si ottiene da sangue prelevato con
anticoagulante separandolo dagli elementi
corpuscolati mediante centrifugazione a 2.000
rpm per 10-15 min.



SIERO

Il siero è ciò che rimane del sangue dopo aver allontanato gli
elementi figurati ed i fattori di coagulazione. La composizione del
siero, pertanto, è sostanzialmente simile al plasma, ma manca del
fibrinogeno.

Si ottiene dal sangue intero senza aggiunta di anticoagulanti
coagulazione (2 ore a t° ambiente)
retrazione del coagulo
separazione per centrifugazione (2.000 rpm per 10-15 min.)



Siero o Plasma come si ottengono?



EFLM TFG-STCC Proposal for the color coding standard of the blood tube closures

Specimen type	Additive	ISO 4822 (1981) ‡	BS 4851 (1982)	ISO 6710 (1995)	CLSI H1-A5 (2003)	CLSI GP41-A6* (2007)	Swedish standard SS-872805 (2011)	EFLM proposal (color)
Serum	Clot activator	Z (no additive)	White (no additive)	Red	Red	Red	Red	
Serum with gel	Gel, clot activator	NA	NA	NA	NA	Red	Yellow	
Plasma	LI-Heparin	LH (LI-heparin)	Orange (LI-heparin)	Green	Green	Green	Dark green	
Plasma with gel	Gel, LI-heparin	NA	NA	NA	NA	Green	Light green	
Plasma	Citrate (1:9)	9 NC	Indigo	Light blue	Blue	Blue	Light blue	
Whole blood	Citrate (1:4)	4 NC	Mauve	Black	Black	NA	Black	
Whole blood	EDTA	KE (K salt) LE (Lithium salt) NE (Sodium salt)	Pink	Lavender	Lavender	Lavender or Pearl	Lavender	
Plasma EDTA with gel	Gel, EDTA	NA	NA	NA	NA	Lavender or Pearl	White or pearl	
Plasma	Glycolytic inhibitor	FX	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	

‡ - ISO 4822 standard had suggested a letter coding for different anticoagulants (the standard did not contain color coding proposal)

* - (former H03-A6)

SANGUE: funzioni

Apporto ossigeno ai tessuti

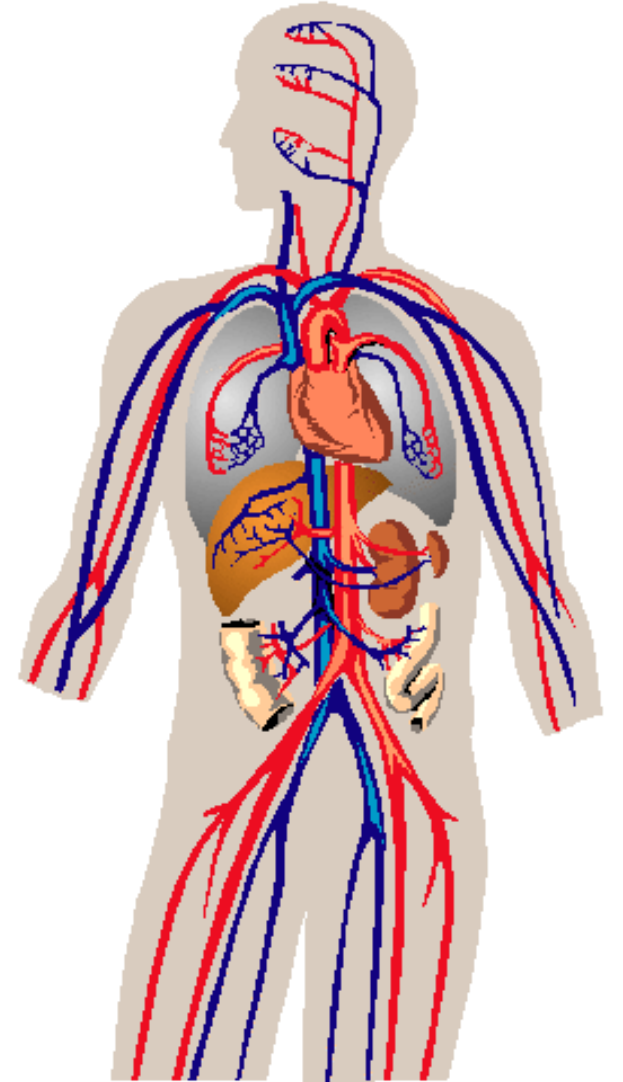
Nutritiva

Sistema tampone

Immunitaria

Antinfettiva

Emostatica



STUDIARE LA COMPOSIZIONE DEL SANGUE CI PERMETTE DI CAPIRE COME
FUNZIONA IL NOSTRO ORGANISMO

LA COMPOSIZIONE DEL SANGUE



Porzione plasmatica

Componenti	Acqua	Sali: sodio, potassio, calcio, magnesio, cloruro, bicarbonato.	Proteine plasmatiche: albumina, fibrinogeno, immunoglobuline.
Funzioni	Solvente	Bilanciamento osmotico, tamponamento del pH, regolazione dei potenziali di membrana.	Bilanciamento osmotico, tamponamento del pH, coagulazione, risposta immunitaria.

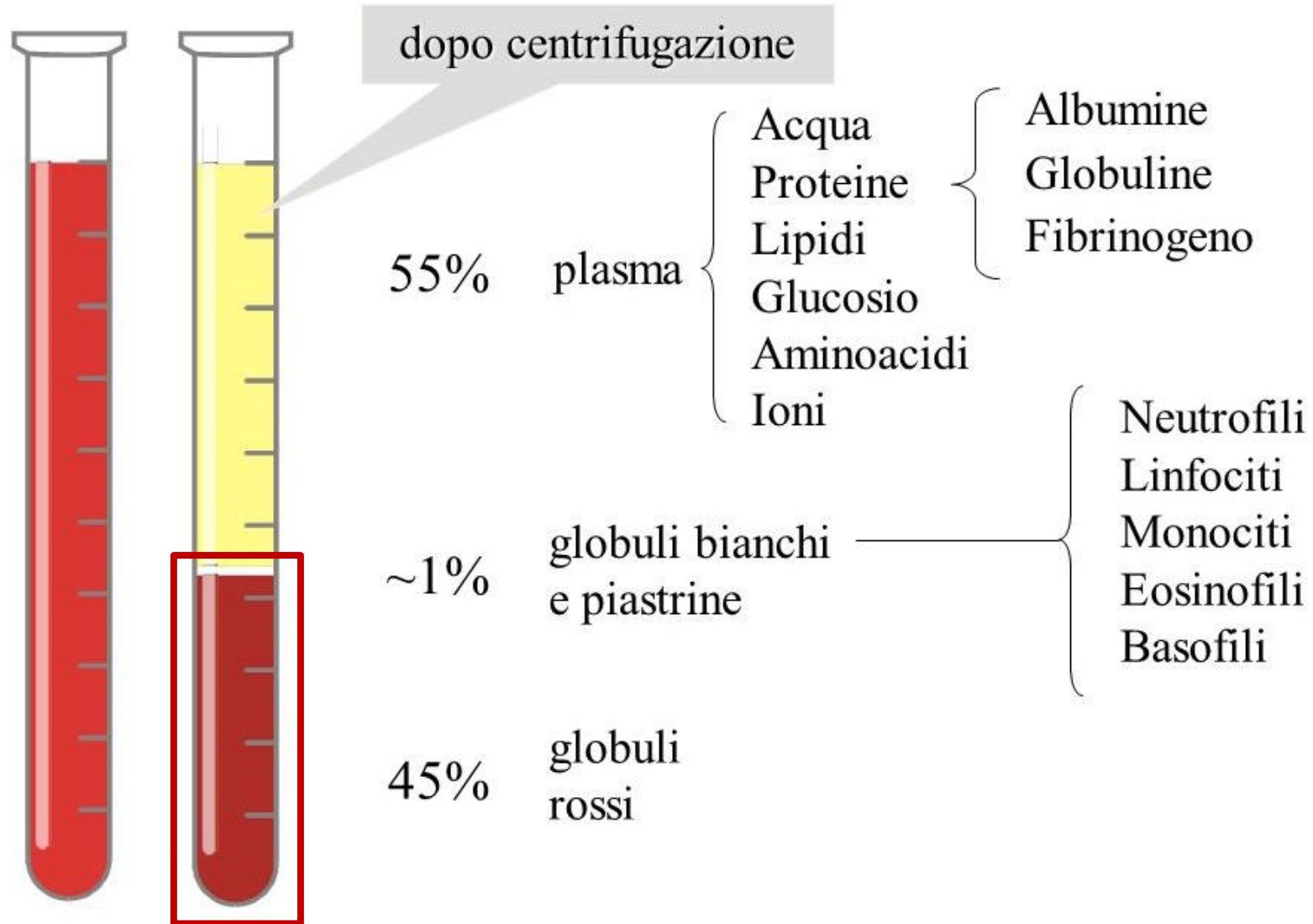
Trasportati dal sangue:

- nutrienti (come glucosio e vitamine)
- prodotti di scarto del metabolismo
- gas respiratori (O₂ e CO₂)
- ormoni
- calore

Porzione cellulare

Componenti	Eritrociti (globuli rossi)	Leucociti (globuli bianchi)					Piastrine (frammenti cellulari)
		Basofilo	Eosinofilo	Neutrofilo	Linfocita	Monocita	
Numero per mm³ di sangue	4-6 milioni	4000-10 000					150 000 - 400 000
Funzioni	Trasportare O ₂ e CO ₂ .	Distruzione cellule estranee, produrre anticorpi, risposte allergiche.					Coagulazione sanguigna.

Informazioni ottenute dal SANGUE



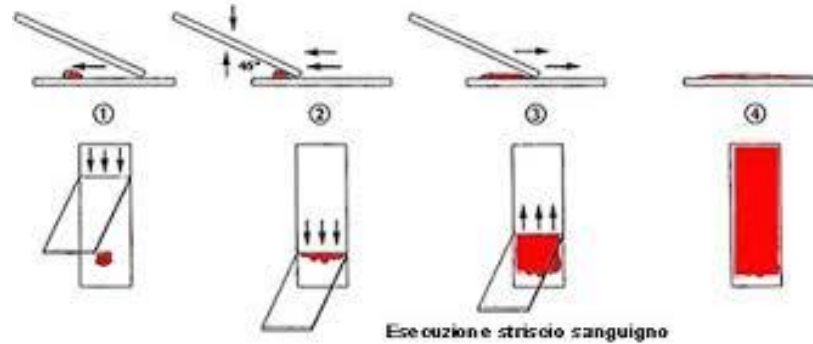
STUDIO DEI GLOBULI

1. STUDIO QUANTITATIVO



CONTA LEUCOCITARIA
CONTA DEI ROSSI
CONTA PIASTRINICA...

2. STUDIO QUALITATIVO-MORFOLOGICO



STRISCIO DI SANGUE

1. STUDIO QUANTITATIVO CITOFLUORIMETRI-EMOCITOMETRI-CONTA GLOBULI

EMOCROMO

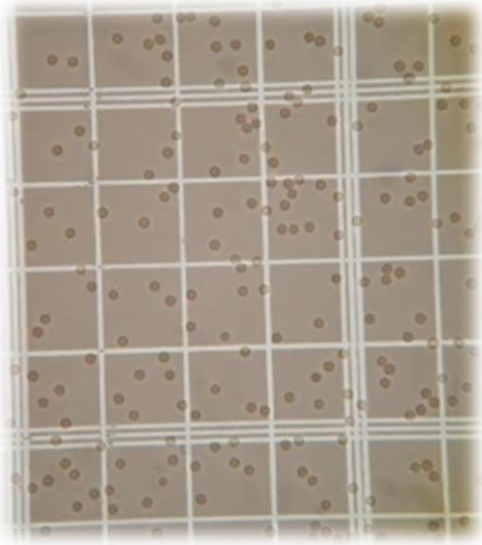
Valutazione quantitativa
degli elementi del sangue
periferico

EMOCROMO	
Leucociti	8.17 x 10.e3 / uL 3.6 - 9.6
Eritrociti	3.45 x10.e6 /uL uomini : 4.80 - 5.70 donne : 4.20 - 5.00 bambini : 3.90 - 4.80
Emoglobina	10.3 gr/dl uomini : 15 - 17 donne : 13 - 15 bambini : 12 - 14
Ematocrito	30.2 % uomini : 41 - 48 donne : 36 - 44 bambini : 34 - 42
MCV	87.5 fL 82.2 - 97.4
MCH	29.9 pico gr 27.6 - 33.3
MCHC	34.2 gr/l 33 - 35.3
RDW	13.1 % 11.6 - 13.7
Piastrine	288 x 10.e3 / uL 150 - 386
FORMULA LEUCOCITARIA	
% Neutrofili	81.9 > % 40 - 74
% Linfociti	10.6 < % 19 - 48
% Monociti	4.3 % 3.4 - 9
% Eosinofili	1.8 % 0 - 7
% Basofili	0 % 0 - 1.5
NEUTROF. #	6.69 x 10.e3 / uL 1.9 - 8
LIMPH.#	0.87 < x 10.e3 / uL 0.9 - 5.2
MONO #	0.35 x 10.e3 / uL 0.16 - 1
EOSIN.#	0.15 x 10.e3 / uL 0 - 0.8
BASOF.#	0 x 10.e3 / uL 0 - 0.2

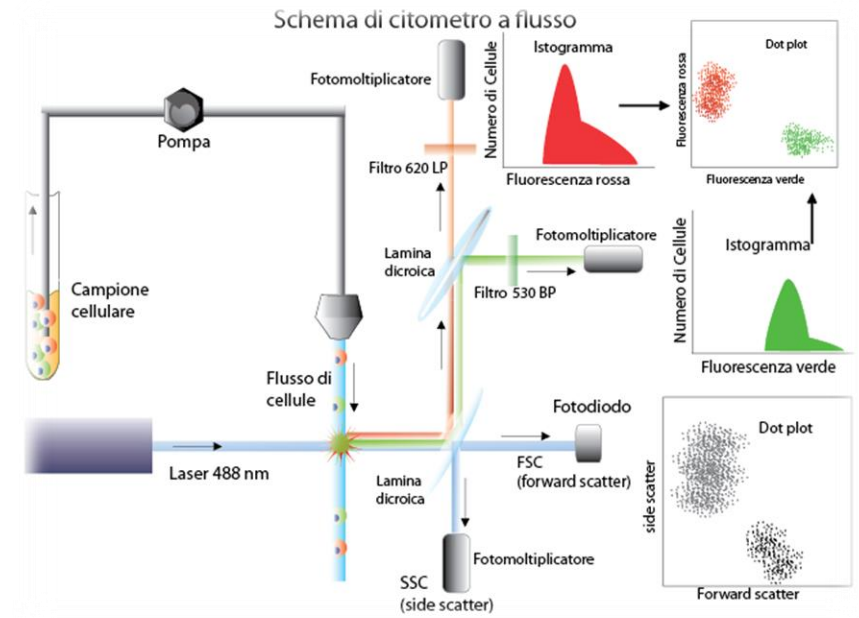
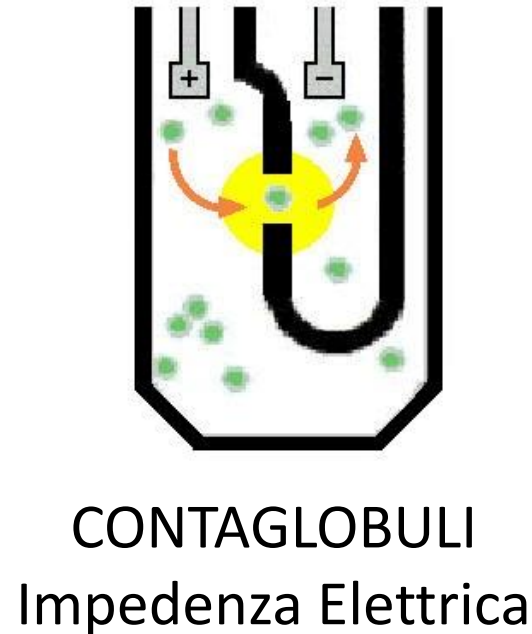


L'emocromo completo (CBC) è utilizzato per valutare il numero di cellule nel sangue e restituisce valori misurati e calcolati.

1. STUDIO QUANTITATIVO CITOFUORIMETRI-EMOCITOMETRI-CONTA GLOBULI



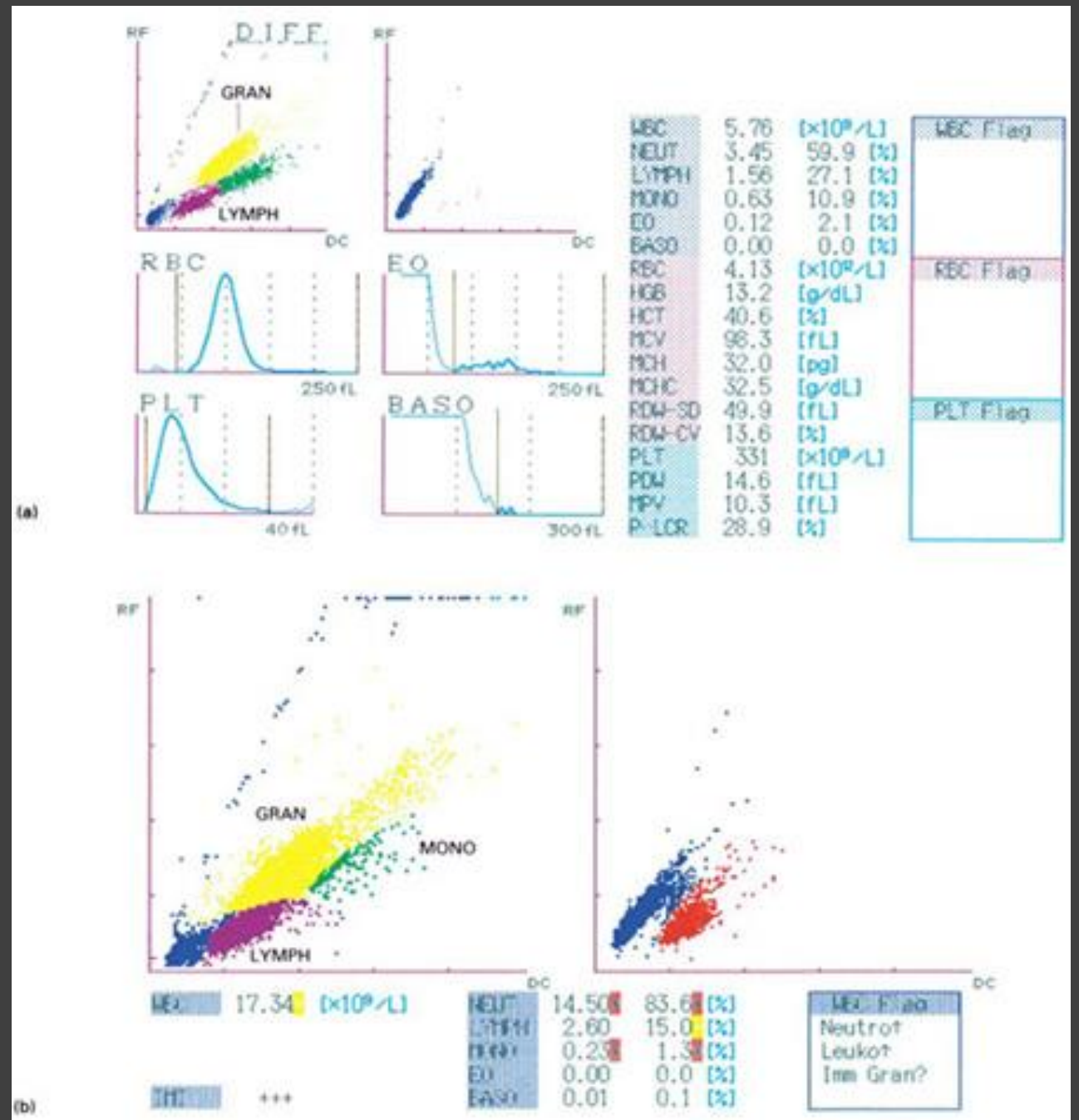
Conta al
MICROSCOPIO



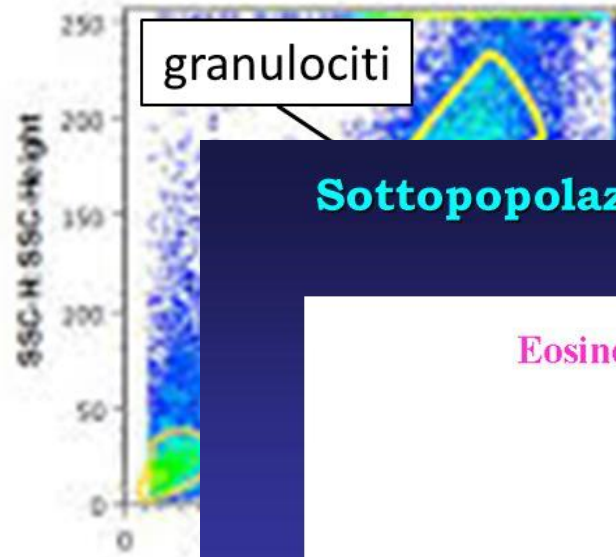
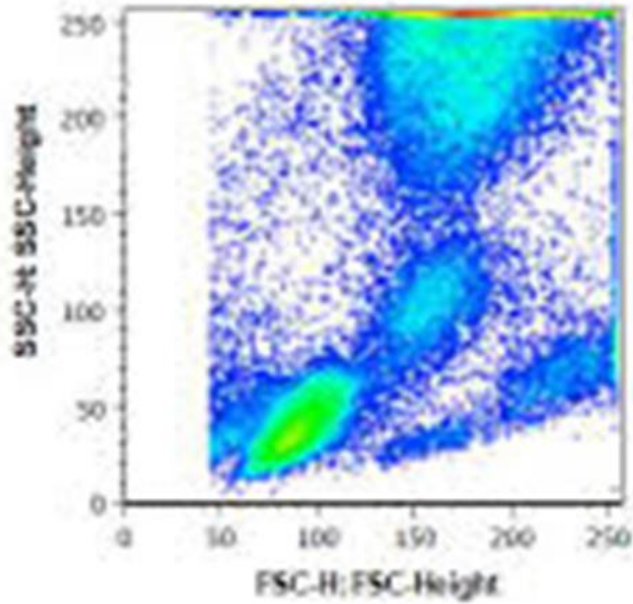
CITOMETRI E CITOFUORIMETRI
Basata sulla rilevazione
dell'assorbimento e della
diffrazione della luce

CITOMETRI E CITOFUORIMETRI

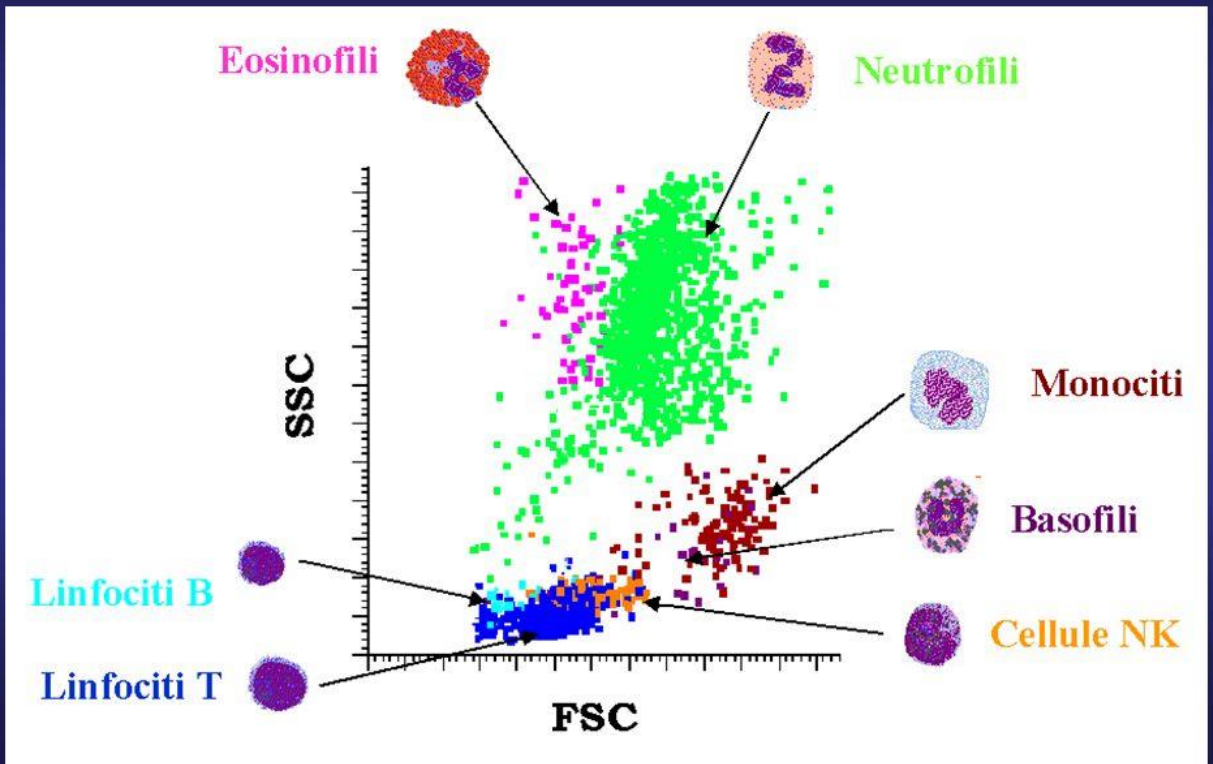
Basata sulla
rilevazione
dell'assorbimento e
della diffrazione della
luce



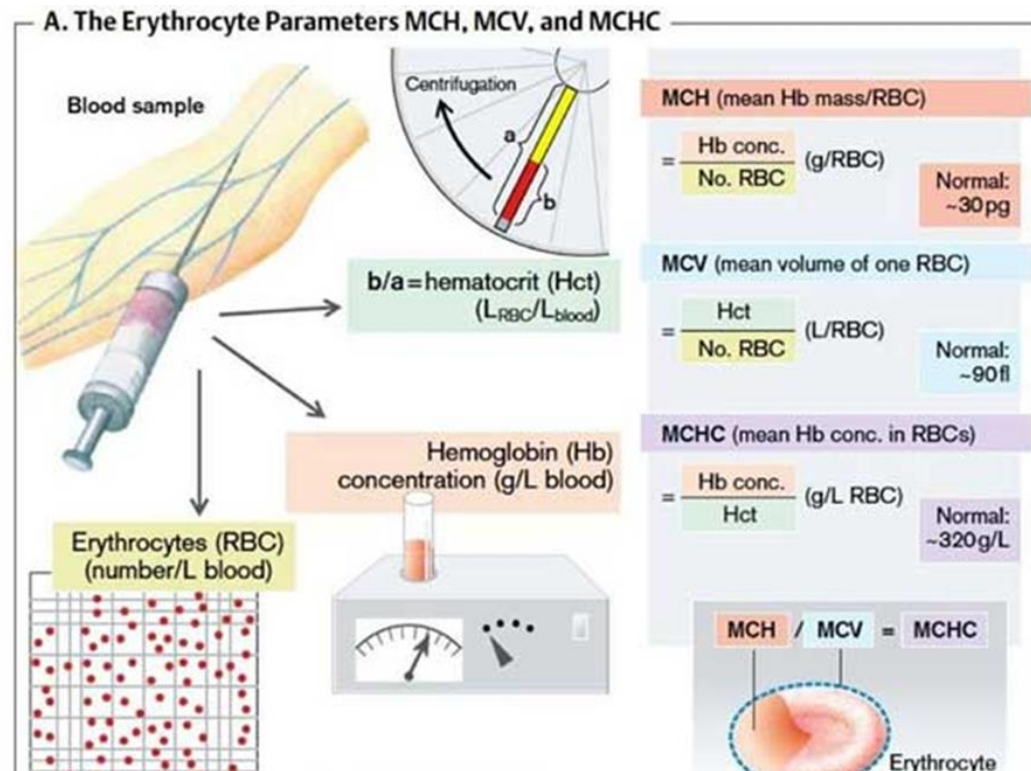
INFORMAZIONI CITOFLUORIMETRICHE



Sottopopolazioni leucocitarie in sangue periferico -Citogramma -



Emocromo – Esame EMOCROMOCITOMETRICO



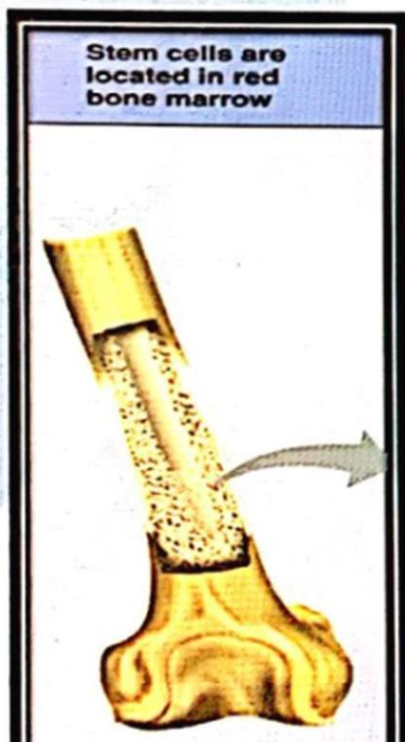
• Il test indica:

- Misura dell'**ematocrito** (la percentuale in volume della parte corpuscolata del sangue separata dal plasma),
- Misura dell'**emoglobina**
- Conta delle emazie
- Morfologia delle Emazie
- **Conta Leucociti** (con stima dei diversi tipi)
- **Conta delle piastrine**

L'EMATOPOIESI

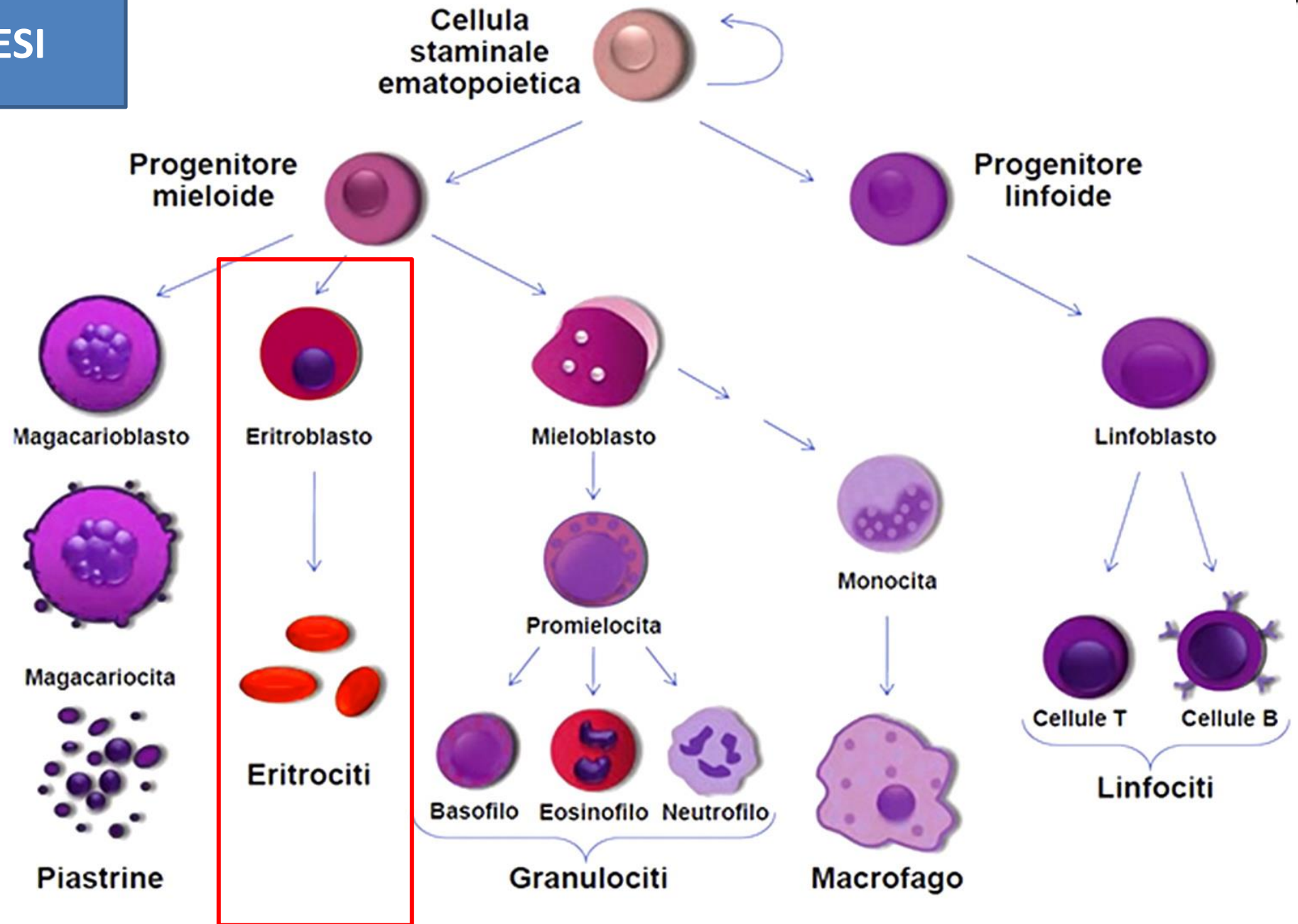
L'ematopoiesi è il processo mediante il quale vengono prodotte gli elementi corpuscolati del sangue.

In età adulta avviene nell'interstizio extravascolare del midollo osseo, nel quale sono residenti le CELLULE STAMINALI TOTIPOTENTI.



Dalle cellule staminali totipotenti si differenziano i precursori non circolanti che, in seguito a maturazione, abbandonano il parenchima (attraverso l'endotelio fenestrato) per emergere nei seni venosi e passare nel circolo sanguigno.

EMATOPOIESI



Gli Eritrociti:

Sono ricchi di una PROTEINA tetramericata chiamata emoglobina. Tale proteina è formata da 4 catene globiniche e ogni catena è legata ad un Gruppo eme contenente Ferro

4 tipi di globine, α , β , γ , δ

Feto:

HbF, $\alpha_2 \gamma_2$

I

Adulto:

HbA₁, $\alpha_2 \beta_2$

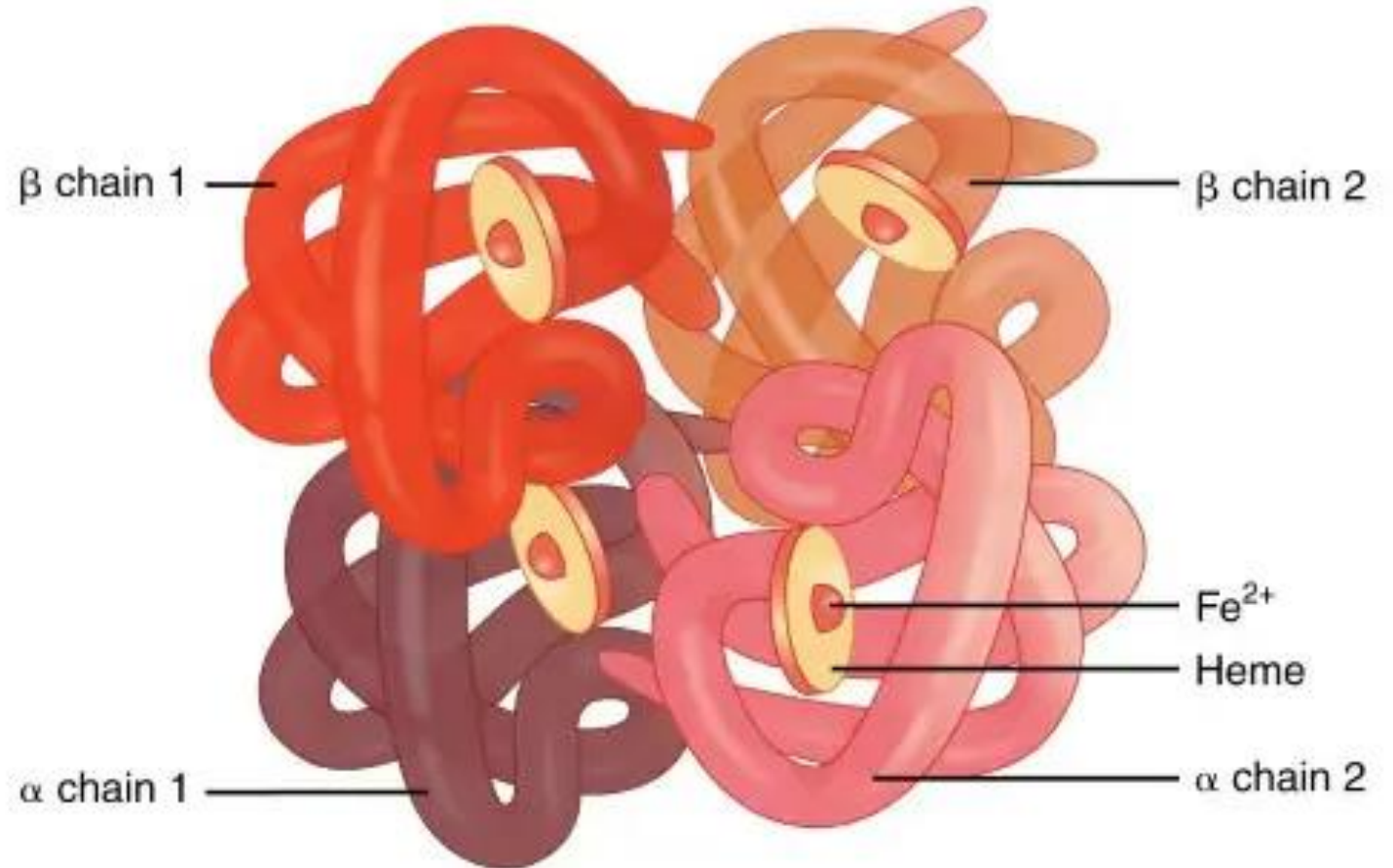
96% del totale

HbA₂, $\alpha_2 \delta_2$

2% del totale

HbF

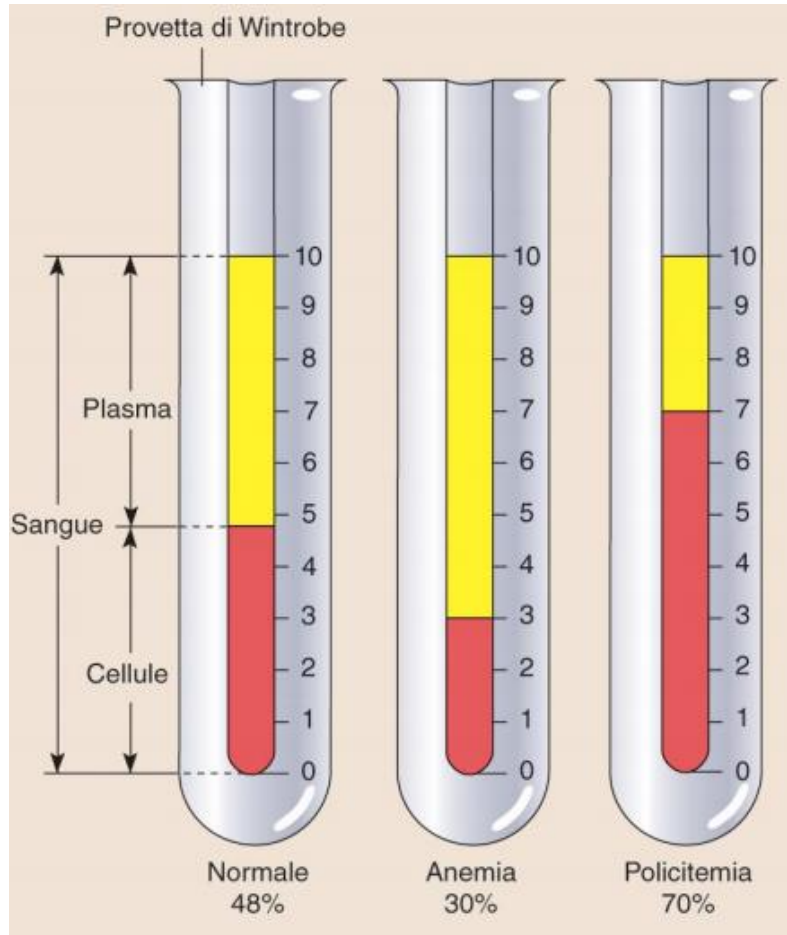
restante 2%



(a)

1. Misura dell'ematocrito (*Hct*):

rapporto tra V occupato dai gl. rossi e il V del campione



$$\text{Hct} = \frac{\text{Volume degli eritrociti}}{\text{Volume tot del sangue}} \times 100$$

Valori normali di ematocrito

Femmina adulta	37-47%
Maschio adulto	42-52%

Può essere fatto anche misurando Hb eritrociti/HbTot

2. Misura dell'emoglobina

- Concentrazione TOTALE di Hb dopo lisi dei globuli rossi-ossidazione e misura in spettrofotometria

Valori di riferimento:

Maschio adulto : 13,0-17,0 g/dL

Femmina Adulta: 12,0-16,0 g/dL

Bambino 1 anno: 11,1-14,1 g/dL

Anziano: Lieve diminuzione

Gravidanza: lieve diminuzione

MISURA SPETTROFOTOMERICA
EFFETTUATA OTTENENDO
CIANMETAEMOGLOBINA



3. Conta delle emazie

Valori di riferimento:

Maschio adulto : $4.3-5.9 \times 10^6/\mu\text{L}$

Femmina Adulta: $4.0-5.1 \times 10^6/\mu\text{L}$

Neonato: 3.5-5,1 g/dL

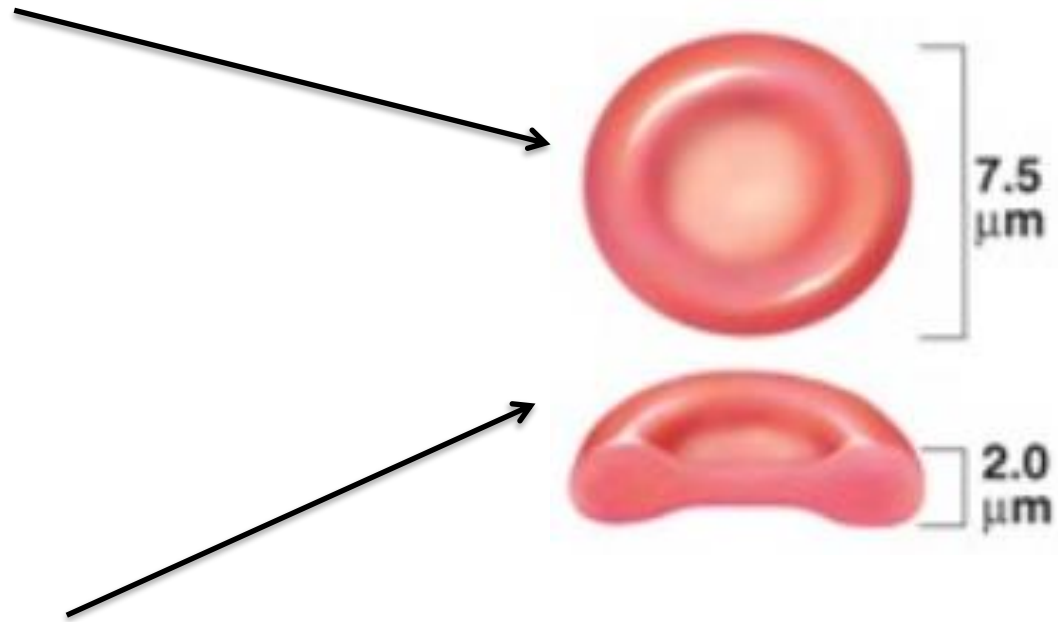
Bambini: $4.0-5.4 \times 10^6/\mu\text{L}$

Valori primari essenziale al
calcolo degli indici derivati



4. Morfologia Emazie

- Diametro medio di ciascun Eritrocita (MCD)
(7-8 μm)



- Spessore medio di ciascun Eritrocita (MCT)
(1,7-2,5 μm)

GLI INDICI DERIVATI



Mean Corpuscular Volume
MCV
volume medio dei globuli rossi

Mean Corpuscular Haemoglobin
MCH
RELAZIONE AL NUMERO

Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
MCHC
(RELAZIONE AL VOLUME DEL GR)

Red Cell Distribution Width
RDW

INDICI DERIVATI

1. Volume corpuscolare medio (MCV: mean corpuscular volume)

Indica il volume medio dei globuli rossi.

Normale: normocita (80-100 fl)

Diminuito: microcita (talassemie, anemia ferro carenziale) (<80fl)

Aumentato: macrocita (anemie da carenza di vitamina B12) (>100fl)

$$\text{MCV} = \frac{\text{Hct} \times 10}{\text{n}^\circ \text{ GR}}$$

CLASSIFICATION

Based on MCV



Microcytic

MCV: < 80 fl



Normocytic

MCV: 80 - 100 fl



Macrocytic

MCV: > 100 fl

2. Emoglobina corpuscolare media (MCH):

Indica il contenuto di Hb per singolo globulo rosso

$$\text{MCH} = (\text{Contenuto di Hb} / \text{n}^\circ \text{ Globuli rossi}) \times 10$$

IPOCROMICHE= <27pg

NORMOCROMICHE= (27-31 pg)

IPERCROMICHE_ >31pg

CLASSIFICATION

Based on MCH



Hypochromic

MCH: < 27 pg/cell



Normochromic

MCH: 27 - 31 pg/cell

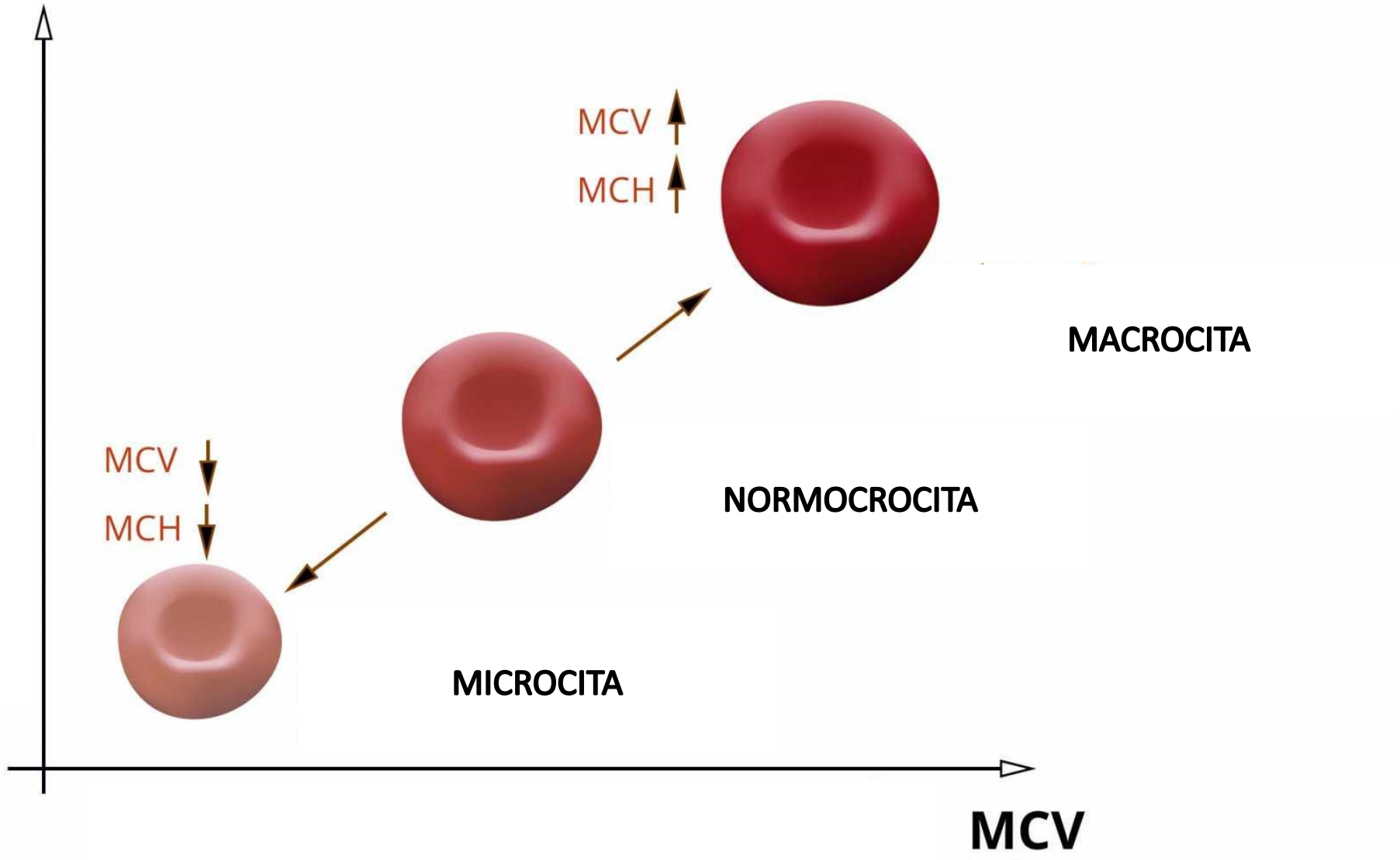


Hyperchromic

MCH: > 31 pg/cell

MCH

ERITROCITI



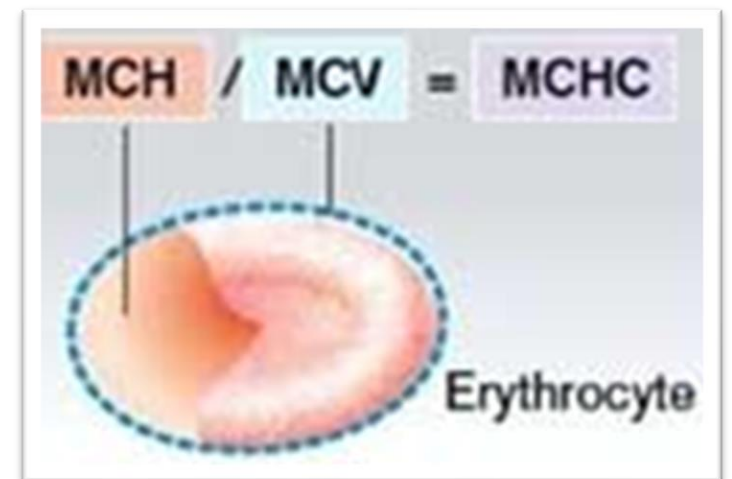
3. Concentrazione media di Emoglobina corpuscolare (MCHC):

Indica la percentuale di Hb nella massa totale totale dei globuli rossi:

$$\text{MCHC} = (\text{Contenuto di Hb} / \text{ematocrito}) \times 100$$

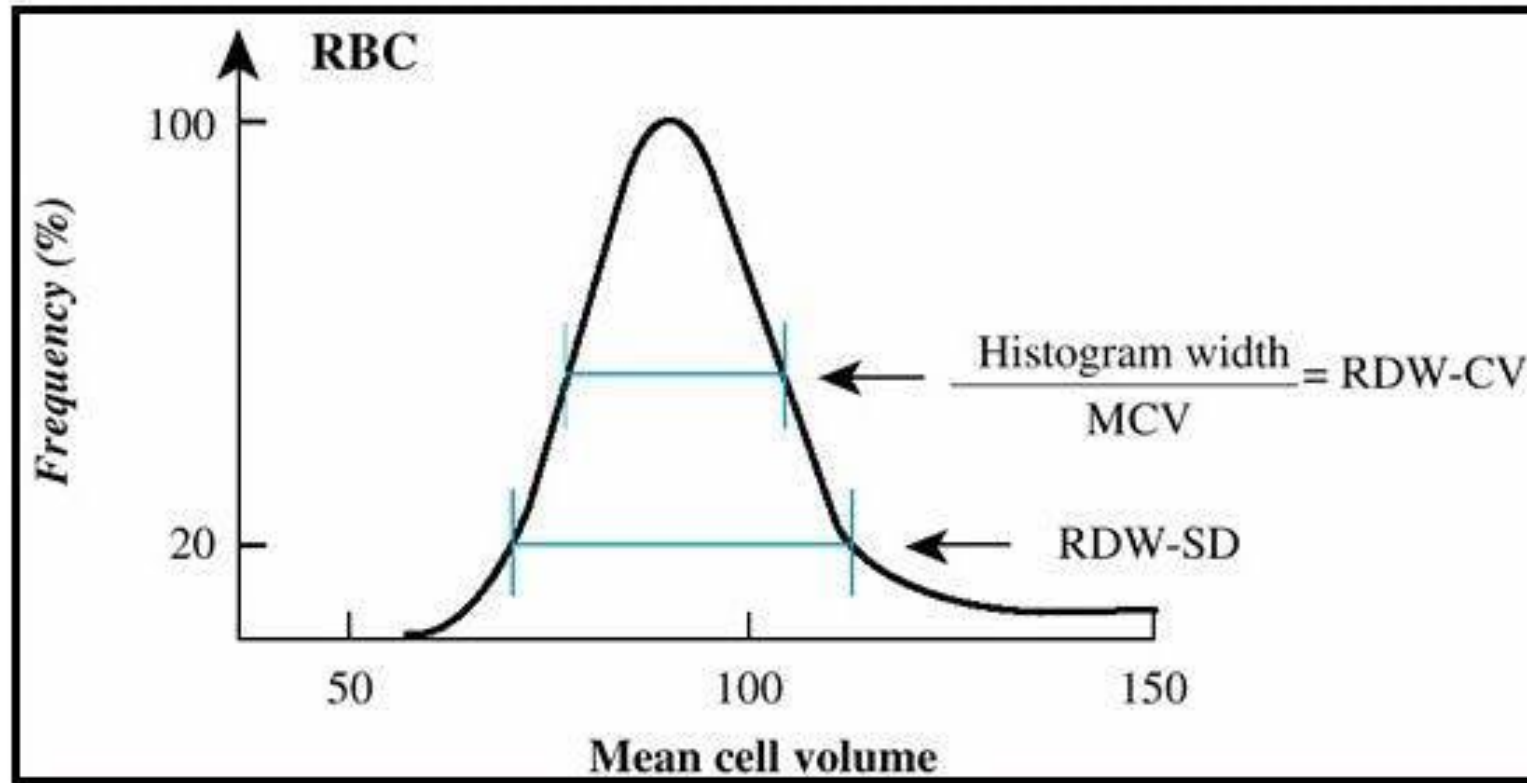
Valori di riferimento: 320-360 g/L

MCHC è la concentrazione media di emoglobina in un dato volume di globuli rossi concentrati, o in altre parole, il rapporto tra la massa di emoglobina e il volume dei globuli rossi. O, in altre parole, rappresenta l'MCH/MCV.



Conta Emazie: Valori derivati Red Cell Distribution Width (RDW)

Permette di valutare le alterazioni della morfologia: Indice della variabilità eritrocitaria



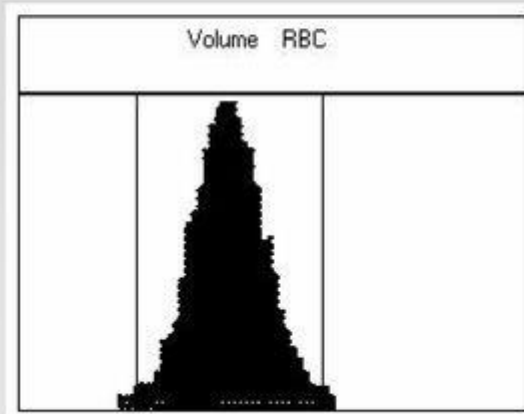
Valori di riferimento:
 $11.5 < RDW < 14.5$

$$RDW\% = \frac{\text{Dev. standard MCV}}{\text{MCV}} \times 100$$

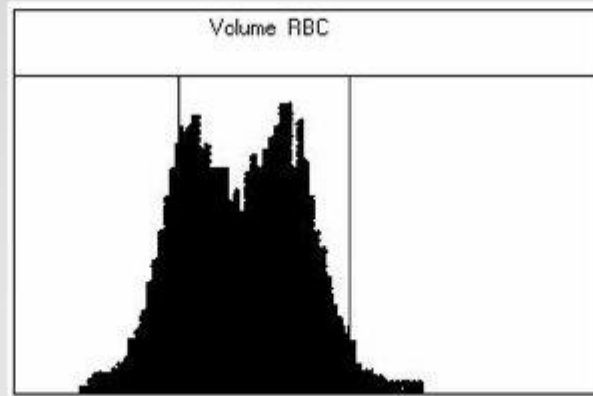
RDW è il grado di Anisocitosi

Per anisocitosi s'intende una condizione caratterizzata dalla presenza di globuli rossi (o eritrociti) di varie dimensioni nel sangue periferico. Quest'alterazione ematologica è frequentemente associata ad alcune forme di anemia, ma può dipendere anche da numerose altre patologie o situazioni fisiologiche.

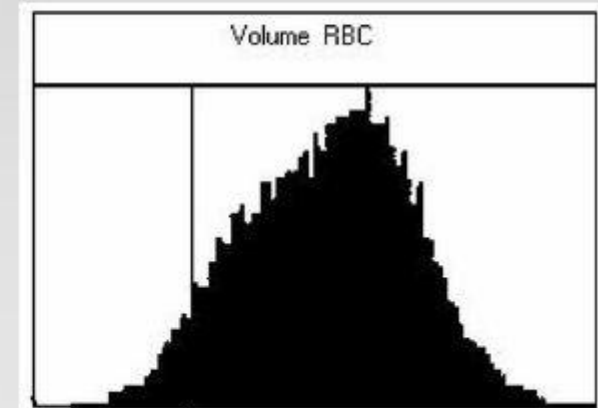
CURVA DI DISTRIBUZIONE DEL VOLUME ERITROCITARIO



Distribuzione Normale



Doppia Popolazione



Anisocitosi

IL SANGUE



STUDIO DI MORFOLOGIA

ESEMPI DI ANEMIE

Analisi dello striscio di sangue periferico

Spesa: Bassa

Preparazione dello striscio automatica o manuale, seguita da un esame microscopico

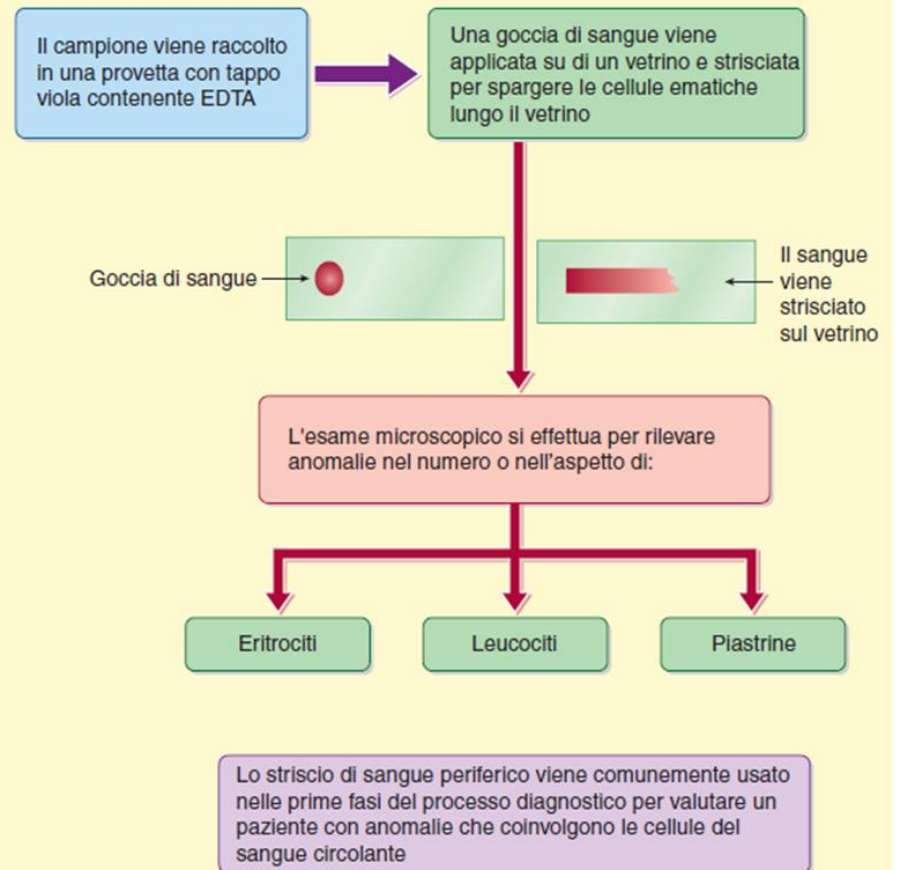
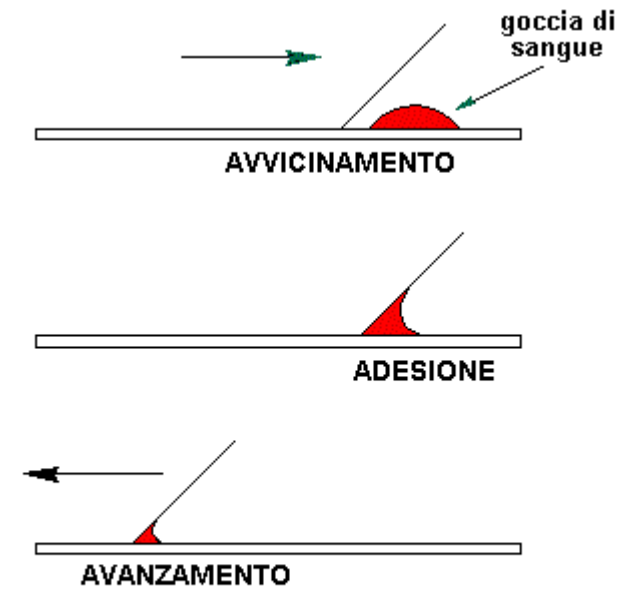
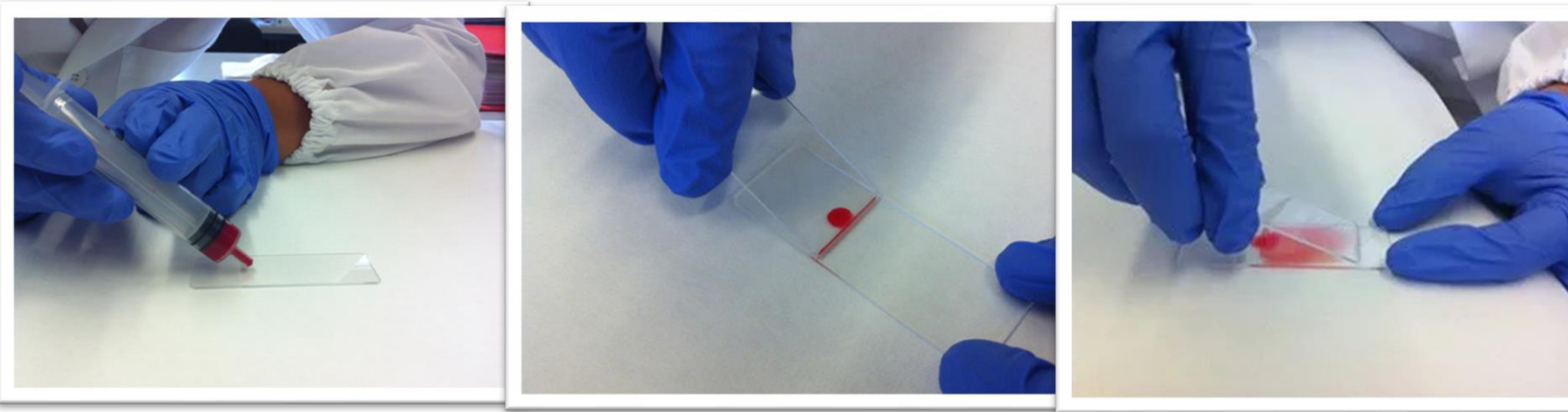


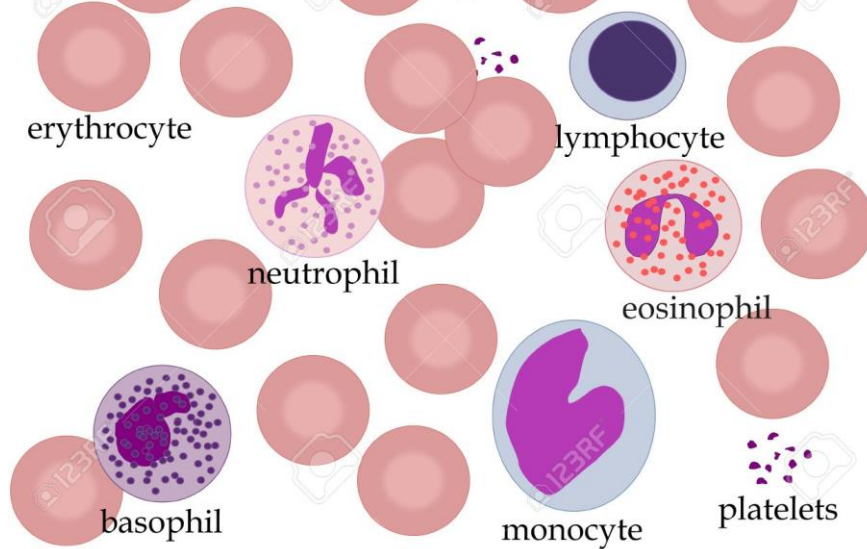
FIGURA 2-13

1. Alterazioni morfologiche: lo striscio di sangue



Come preparare uno striscio di sangue

Smear of peripheral blood

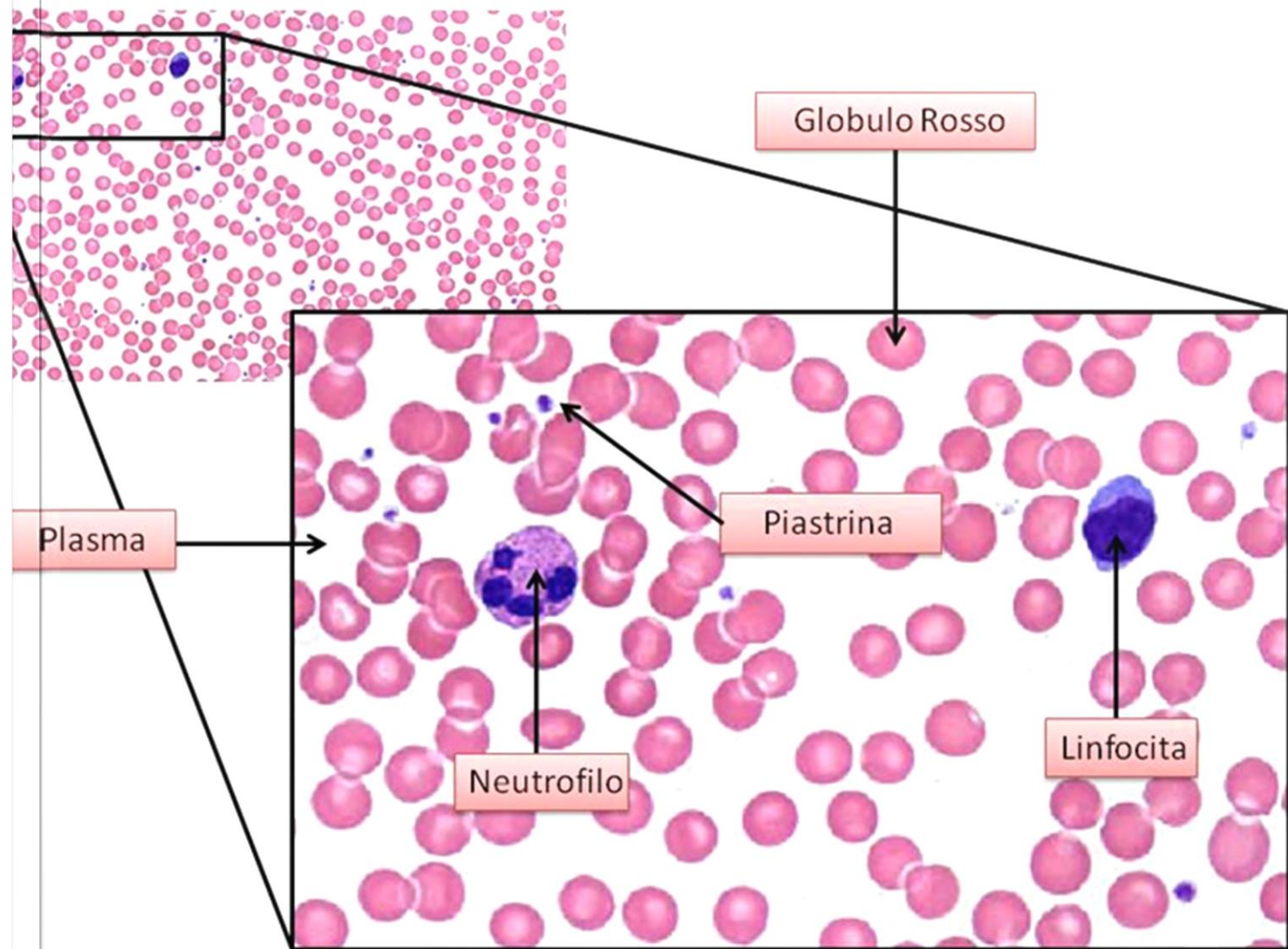


Lo striscio di sangue ci permette di osservare al microscopio la **MORFOLOGIA** delle cellule del sangue, mettendo in luce eventuali anomalie che possono sfuggire ai contatori automatici

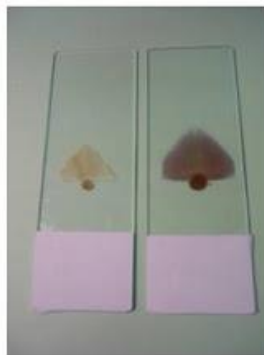
STRISCIO DI SANGUE

Striscio di sangue (uomo)

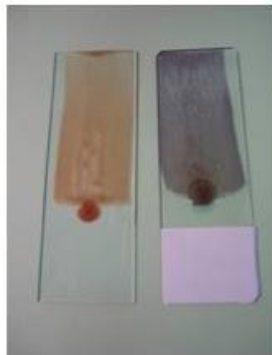
Colorazione: May-Grunwald



ERRORI NELLA PREPARAZIONE DELLO STRISCIO DI SANGUE



Troppo corti



Troppo lunghi



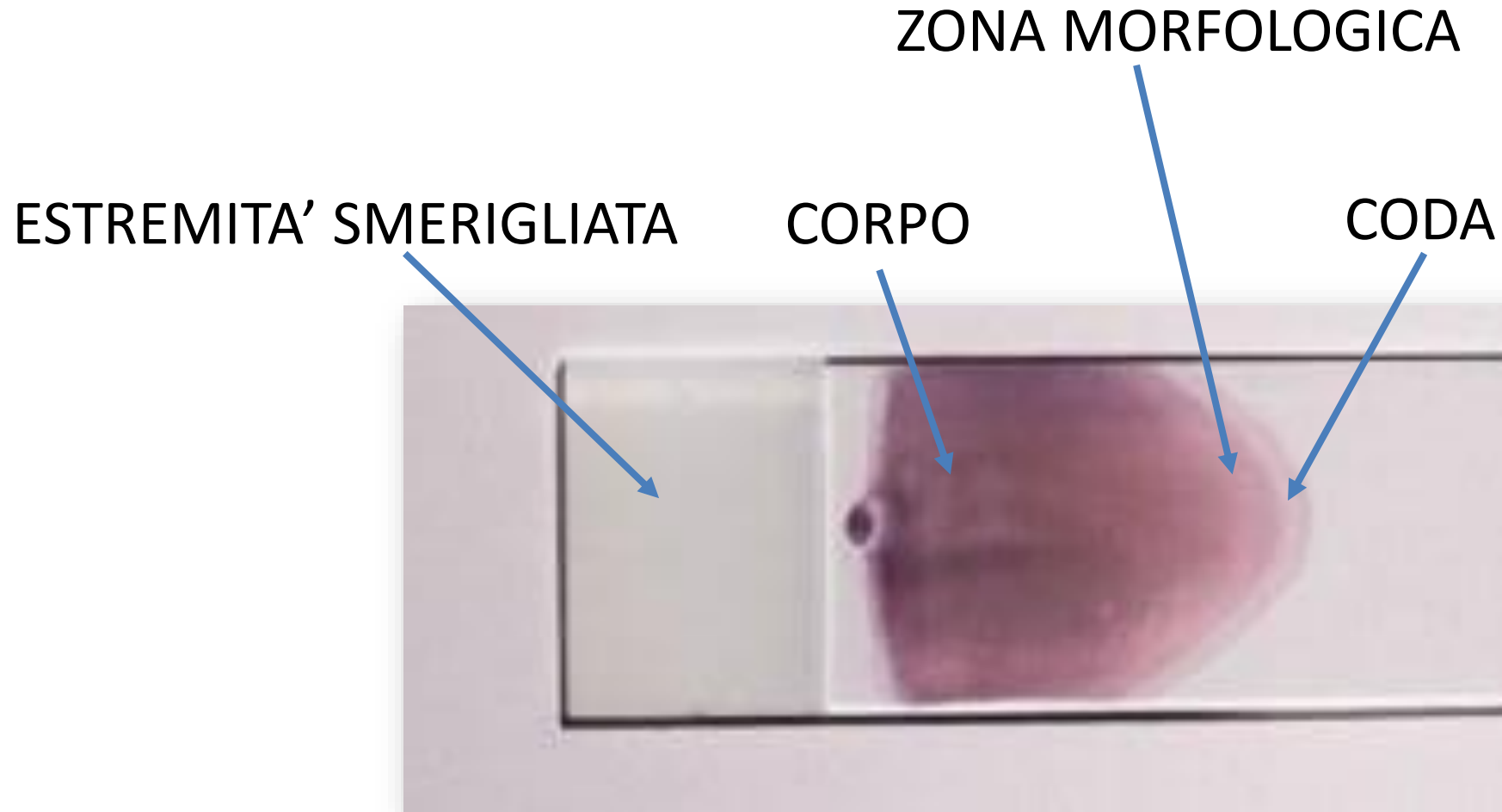
Troppo spesso



Troppo sottile

Striscio	Descrizione
	Striscio normale Lunghezza dello striscio accettabile: 2,5 cm (0,98 pollici) minimo e 4,3 cm (1,7 pollici) massimo
	Striscio lungo Possibile causa: emoglobina bassa, campione diluito o errata regolazione della velocità dello striscio
	Pattern della goccia grande o irregolare Possibile causa: contaminazione della coppetta di lavaggio/sonda di dispensazione
	Riga al centro dello striscio Possibile causa: bolla d'aria o coagulo presente nel campione o contaminazione della coppetta di lavaggio/sonda di dispensazione






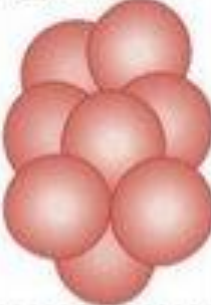






















CORRETTO STRISCIO DI SANGUE



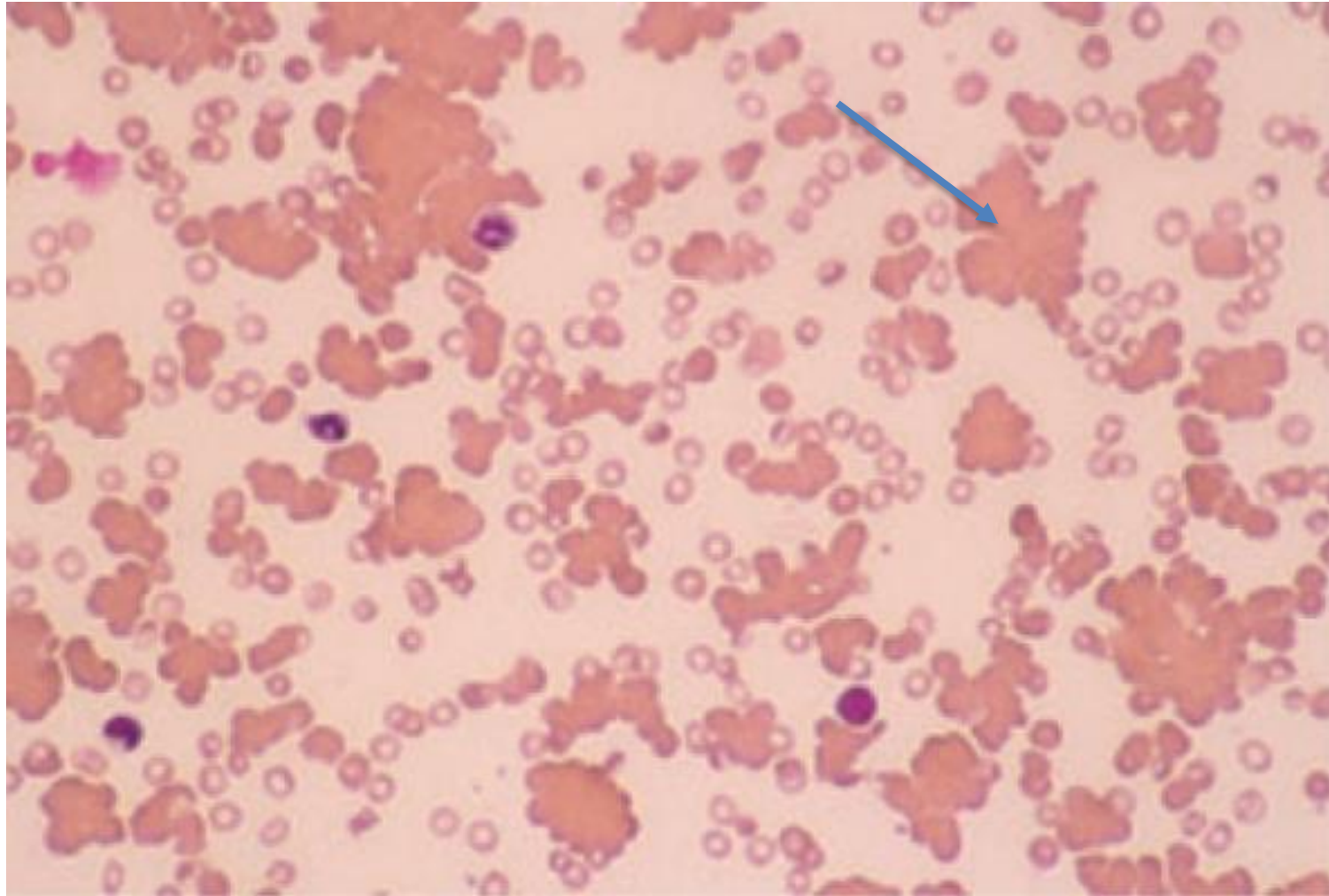
ALTERAZIONI DELLA DISTRIBUZIONE

Distribuzione fisiologica o normale: distribuzione uniforme in monostrato dei globuli rossi con una sovrapposizione di circa 10% nella zona ottimale di lettura.



RED BLOOD CELL MORPHOLOGY					
Size variation	Hemoglobin distribution	Shape variation		Inclusions	Red cell distribution
Normal 	Hypochromia 1+ 	Target cell 	Acanthocyte 	Pappenheimer bodies (siderotic granules) 	Agglutination 
Microcyte 	2+ 	Spherocyte 	Helmet cell (fragmented cell) 	Cabot's ring 	Rouleaux 
Macrocyte 	3+ 	Ovalocyte 	Schistocyte (fragmented cell) 	Basophilic stippling (coarse) 	
Oval macrocyte 	4+ 	Stomatocyte 	Tear drop 	Howell-Jolly 	
Hypochromic macrocyte 	Polychromasia (Reticulocyte) 	Sickle cell 	Burr cell 	Crystal formation	
				HbSC 	HbC 

ALTERAZIONI
MORFOLOGICHE
DEI GLOBULI
ROSSI



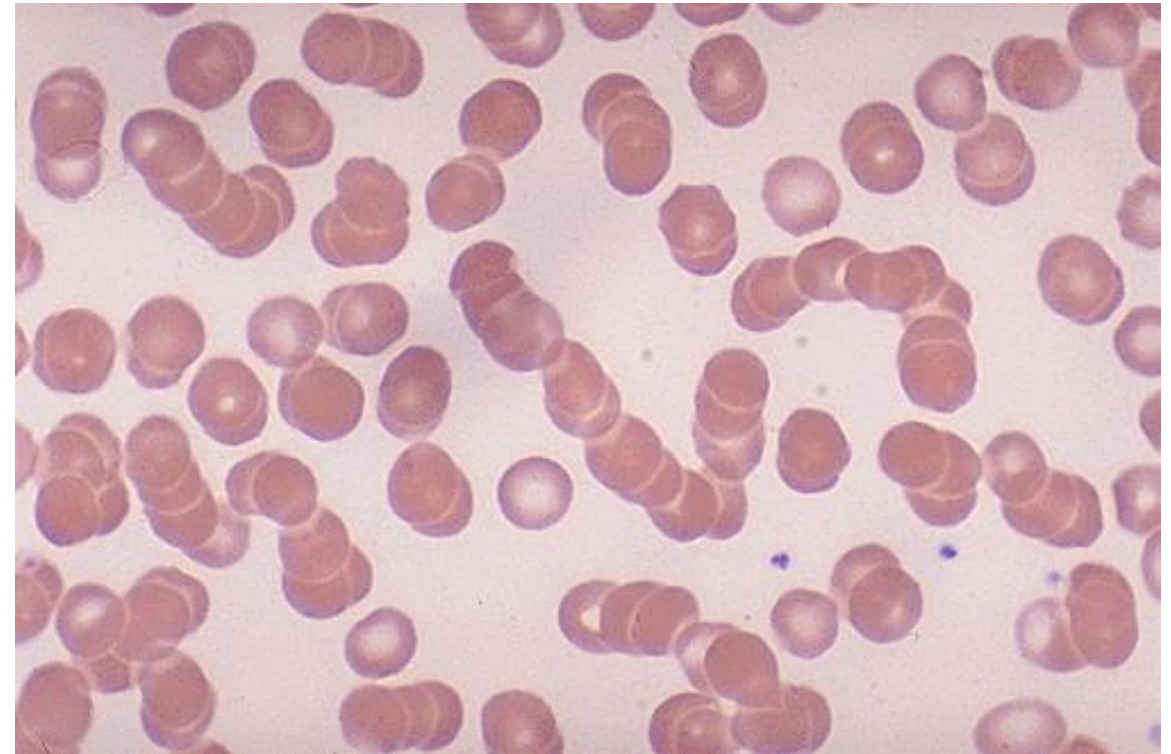
GLOBULI ROSSI AGGLUTINATI

Definiti GR a grappolo
o Emoagglutinazione.

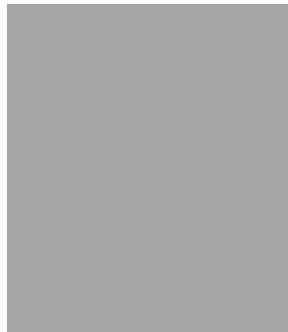
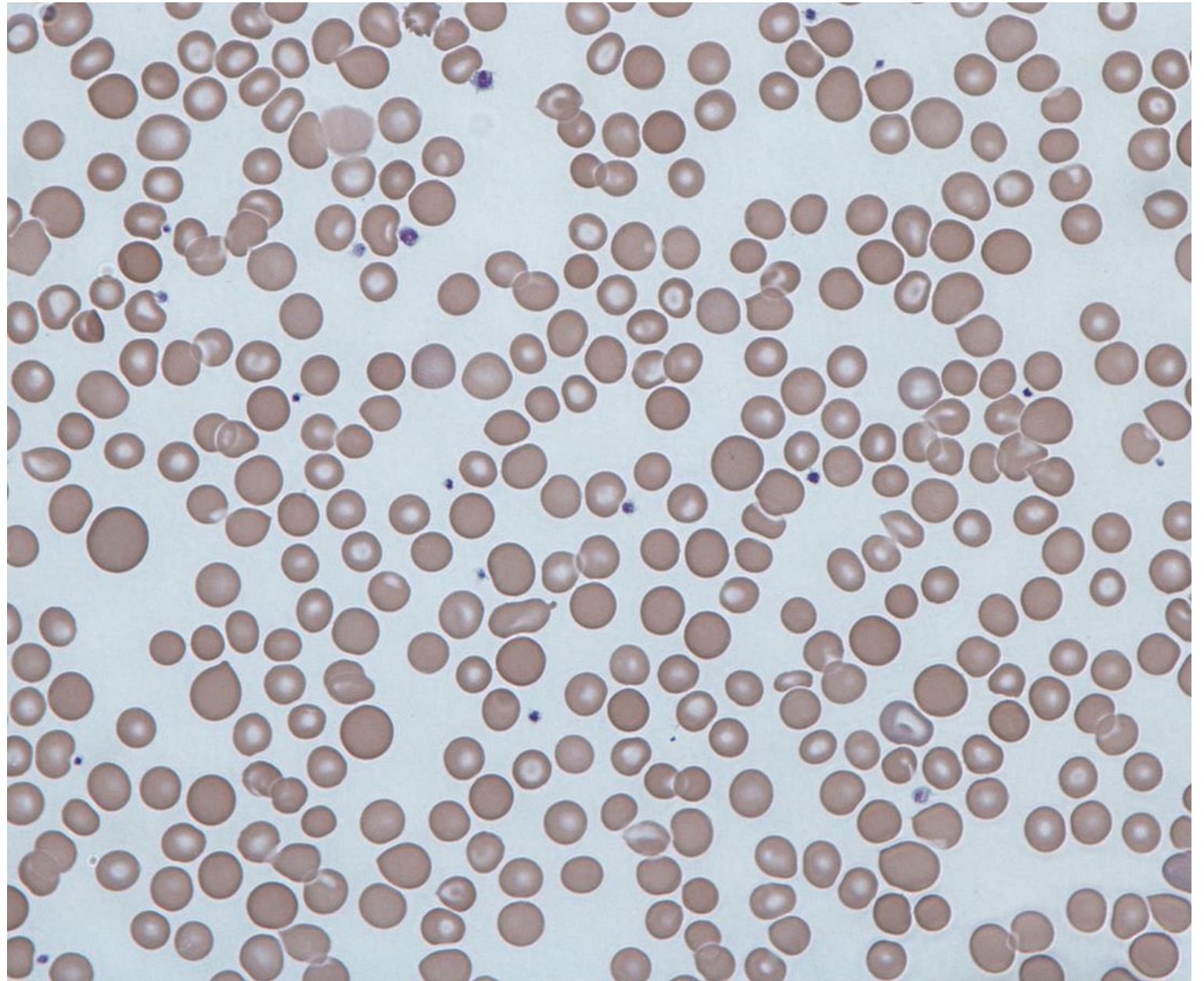
Dovuto, in genere,
alla presenza di
anticorpi specifici

Corpi di rouleaux

I GR si impilano per la presenza elevate di fibrinogeno e globuline o nelle gammopatie monoclonali



ANISOCITOSI
Estrema
variabilità
dimensionale
dei GR



Sferocitosi ereditaria

Anemia
Ipercromica e
microcitica

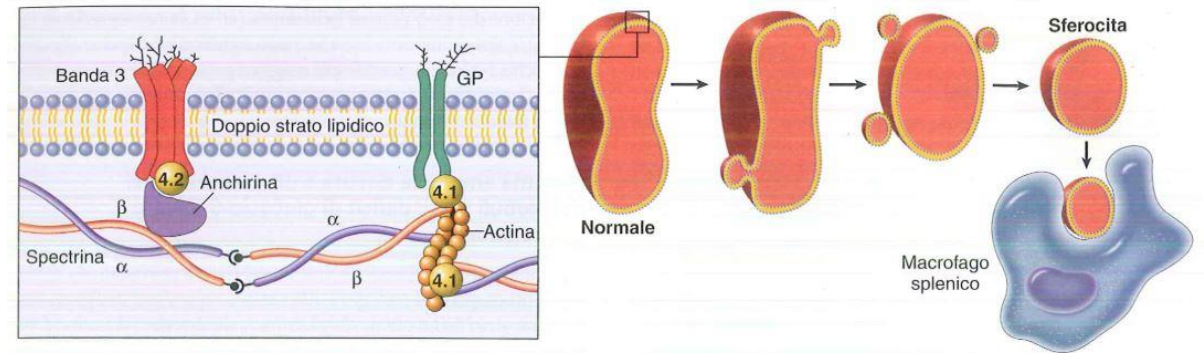
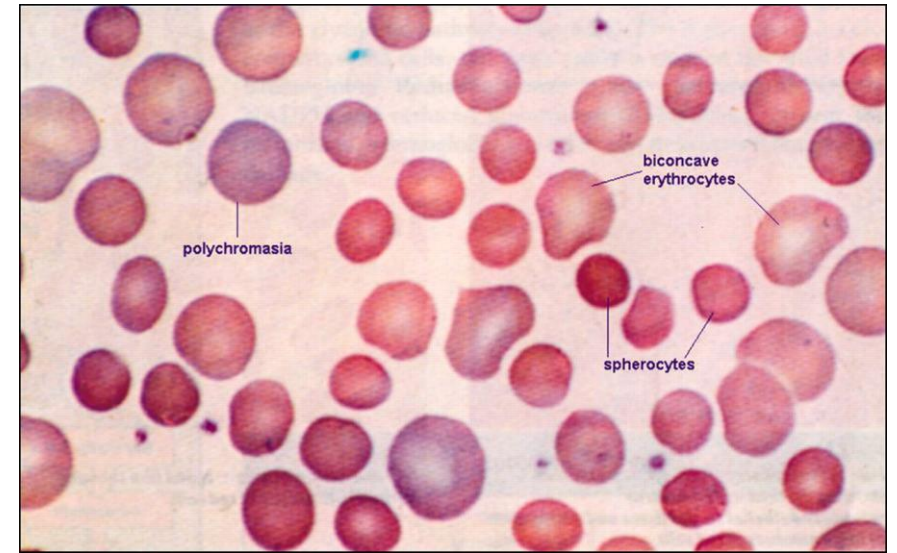


FIGURA 14.2 Citoscheletro della membrana nella sferocitosi ereditaria. A sinistra è illustrata l'organizzazione normale delle principali proteine citoscheletriche della membrana del globulo rosso. Le diverse mutazioni che coinvolgono α -spectrina, β -spectrina, anchirina, proteina della banda 4.2 o della banda 3 provocano la perdita di frammenti di membrana da parte dei globuli rossi. Per adattarsi al cambiamento nel rapporto tra superficie e volume i globuli adottano una forma sferica. Gli sferociti sono meno deformabili rispetto alla norma per cui rimangono intrappolati nei cordoni splenici e vengono fagocitati dai macrofagi. GP, glicoforina.

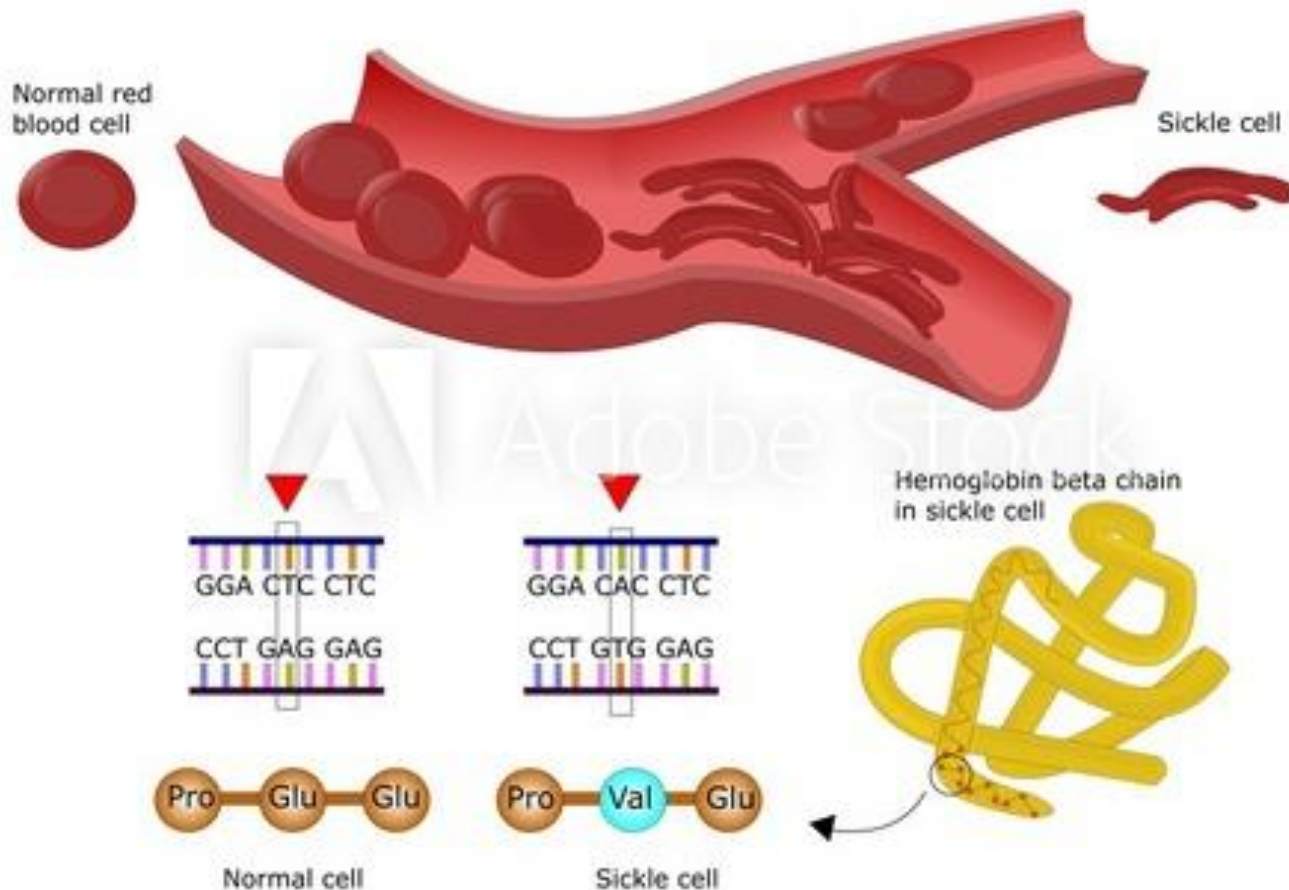


Anemia
Drepanocitica
o
Falciforme

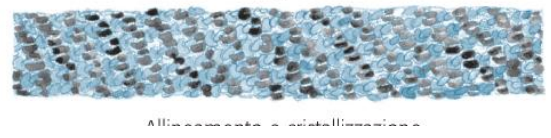
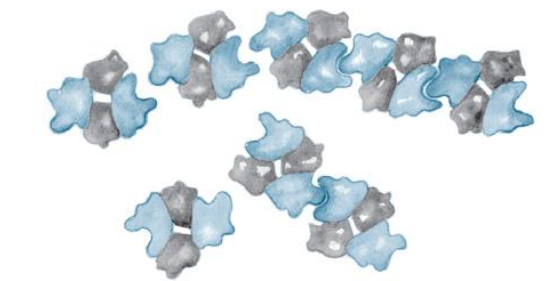
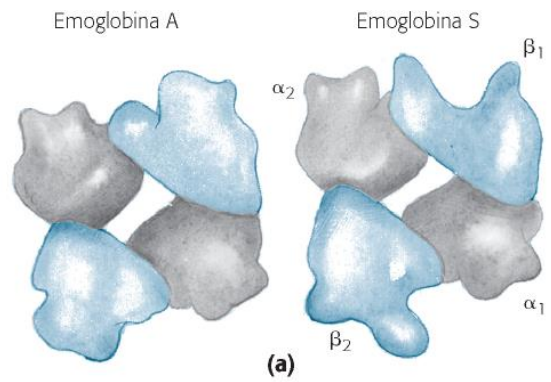


Aggregazione dell'emoglobina S

Sickle cell anemia



- L'ANEMIA FALCIFORME E' CUSATA DA UNA SINGOLA VARIAZIONE AMMINOACIDICA DELLA CATENA BETA.
- UN RESIDUO DI VALINA INVECE DI UN GLUTAMMATO
- SI CREA UN GRUPPO IDROFOBICO APPICCIOSO
- SI ABBASSA LA SOLUBILITA' DELL'HB
- HB PRECIPITA DENTRO IL GLOBULO ROSSO



Eritrociti di individuo con anemia a cellule falciformi