

## ESAME EMOCROMOCITOMETRICO

Nella medicina di laboratorio l'ematologia ha il compito di studiare il sangue ed i tessuti emopoietici mediante l'impiego di esami quantitativi (conteggio e dimensionamento di particelle) o qualitativi (morfometria, citochimica, citofluorimetria...). Il sangue è un sistema bifasico, costituito da una fase liquida (plasma) in cui si trovano sospese cellule nucleate (leucociti), non nucleate (eritrociti) e frammenti cellulari (piastrine). La frazione di plasma privata dei fattori della coagulazione (in seguito a coagulazione) prende il nome di siero.

L'emopoiesi è il processo mediante il quale vengono prodotte le cellule del sangue ed ha sede nel midollo osseo. In particolare, la produzione di globuli rossi è continua ed è regolata dal livello di ossigenazione tissutale. L'ipossia, soprattutto a livello renale, stimola la produzione di eritropoietina, un ormone sintetizzato dalle cellule iuxtaglomerulari del rene. In presenza di una eritropoiesi efficace e di un adeguato apporto al midollo di ferro, folati e vitamina B<sub>12</sub>, l'Epo si dimostra in grado di accelerare quasi tutti gli stadi dell'eritropoiesi, favorendo l'entrata in circolo di reticolociti (globuli rossi non del tutto maturi). L'indice di reticolocitosi e la concentrazione di eritropoietina plasmatica consentono una valutazione del grado di eritropoiesi.

Con il termine emogramma, o con quello più noto di esame emocromocitometrico con formula leucocitaria, si indica una serie di valutazioni qualitative e quantitative degli elementi del sangue periferico, in cui sono compresi i seguenti parametri:

- conta e dimensionamento dei globuli rossi e delle piastrine
- ematocrito
- concentrazione di emoglobina
- conta differenziale dei leucociti.

Inoltre vengono presi in considerazione altri parametri, come le concentrazioni sieriche di ferro, ferritina, emosiderina, transferrina e del recettore solubile della transferrina. Entrando nel dettaglio:

- *Ferro*: è un fattore di crescita indispensabile per formare l'emoglobina, la mioglobina, il citocromo c, la catalasi... La quota maggiore di ferro è immagazzinata all'interno del sistema reticolo-endoteliale. Il duodeno è la sede principale dell'assorbimento del ferro, la cui captazione da parte delle cellule della mucosa intestinale avviene per trasporto attivo. In caso di deficit tissutale si riduce la quota presente negli enterociti, mentre se vi è accumulo di ferro nei tessuti la quota di ferro che si deposita negli enterociti è maggiore e viene eliminata con la desquamazione cellulare. Il deficit di ferro è la più frequente causa di anemia microcitica ed ipocromica.
- *Ferritina*: è una proteina intracellulare, di forma globulare con una cavità interna utilizzata per il sequestro del ferro in una forma non tossica per l'organismo. Nella cavità interna possono essere immagazzinati più di 2500 atomi di ferro sotto forma di un complesso polinucleare in associazione con fosfato. La ferritina del siero non presenta atomi di ferro e si ritrova in concentrazioni molto basse, dimostrando di essere un ottimo indicatore delle riserve di ferro nei tessuti, consentendo una diagnosi differenziale tra anemia microcitica ipocromica da carenza di ferro o da infiammazione. Per contro valori molto elevati sono indicazione di un sovraccarico di ferro (sindromi talassemiche, emocromatosi...).
- *Emosiderina*: la migliore stima delle riserve di ferro nei tessuti, compreso il midollo osseo, si ottiene con prelievi biotici sottoposti a reazione con Blu di Prussia che evidenzia la presenza di emosiderina o aggregati intracitoplasmatici di ferritina. Gli eritroblasti che contengono questi granuli sono definiti come sideroblasti. Se questi granuli si dispongono attorno al nucleo a formare un anello, gli eritroblasti sono detti sideroblasti ad anello.
- *Transferrina (Tf)*: l'apotransferrina plasmatica, in seguito al legame con il ferro, si trasforma nella forma diferrica, che può legarsi ai recettori della transferrina (TfR) presenti sulla superficie di ogni cellula. La transferrina agganciata al TfR viene internalizzata in un compartimento endosomiale acidico. La transferrina è sintetizzata nel fegato con una velocità inversamente proporzionale alle scorte di ferro. Di conseguenza un aumento della concentrazione di transferrina plasmatica tende ad aumentare in caso di sideropenia. Può essere calcolata sia come

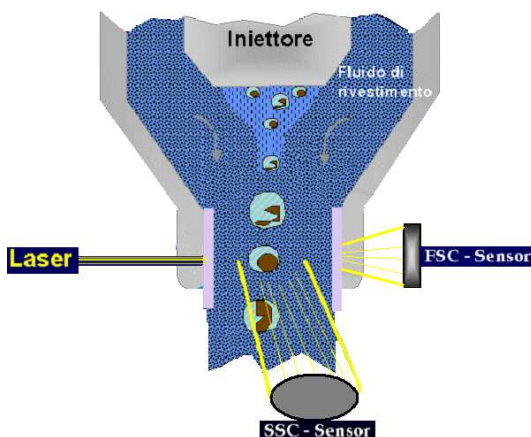
massa (in mg/dl) sia come indice di saturazione della transferrina, a partire dal valore della sideremia e dal valore della capacità totale di legare il ferro. In corso di sideropenia la transferrina aumenta come massa ma diminuisce la sideremia (ovvero la quota di ferro legata alla proteina).

- Recettore solubile della transferrina (TfR):** è una glicoproteina capace di legare la transferrina diferrica per poi mediarne l'internalizzazione cellulare. Il ferro è un fattore di crescita indispensabile e di conseguenza tutte le cellule del corpo umano, eccetto i granulociti maturi, presentano un numero variabile di TfR sulla loro membrana. La quota plasmatica è proporzionale alla concentrazione del recettore sulla cellula. L'Epo incrementa l'espressione del TfR, facendo diventare il dosaggio del TfR un utile parametro nella medicina dello sport per valutare un abuso di eritropoietina esogena. Anche nei soggetti affetti da carenza di ferro si riscontra un aumento della concentrazione del TfR. Questo è utile nella diagnosi differenziale tra anemie sideropeniche (IDA, iron deficiency anemia) e anemie dovute a fenomeni infiammatori cronici. Infatti, mentre la ferritina aumenta durante processi flogistici, l'espressione del TfR non è influenzato dalle citochine. Pertanto un aumento di ferritina e TfR può indicare l'insorgenza di un'IDA. È da notare come il rapporto TfR/log ferritina sia stato proposto come parametro per discriminare soggetti normali da pazienti anemici con carenza di ferro.

In generale, gli indici di valutazione dello stato marziale sono:

Sideremia	60-170 µg/dl
Capacità legante del ferro non saturo nel siero (UIBC)	100-370 µg/dl
Transferrina totale	2-3,5 g/l
Ferritina	30-250 ng/ml
Recettore solubile della transferrina (TfR)	0,83-1,76 mg/ml

### Citofluorimetria



I moderni contaglobuli multiparametrici (counters) misurano la luce dispersa (scatterata) dalle cellule ematiche isolate e immerse in flusso analitico. Il fenomeno di scattering è proporzionale alle loro dimensioni. Con la misura dell'indice di rifrazione si determina invece la densità cellulare. I parametri tradizionali elaborati dai contaglobuli automatici sono:

- RBC: Red Blood Cells. È il numero di globuli rossi per litro di sangue.
- Hb: Hemoglobina. Esprime la quantità di emoglobina, espressa in grammi, presente in un litro di sangue.
- HTC: ematocrito. Rappresenta il volume percentuale della frazione corpuscolata rispetto al volume totale del sangue. I valori sono diversi in base al sesso: 42-52% negli uomini contro 37-47% nelle donne. In passato veniva dosato dopo centrifugazione in provette ematocrito di Wintrobe di un campione ematico reso incoagulabile. Oggi viene calcolato dai contaglobuli automatici dal prodotto tra MCV e RBC.

- MCV: Mean Corpuscular Volume. È il volume medio dei globuli rossi, ottenuto dal rapporto tra HTC e RBC.
- MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin. Indica la quantità media di emoglobina in ogni globulo rosso. Si ottiene dal rapporto tra Hb e RBC.
- MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration. Diversamente dal MCH che indica la quantità di emoglobina per eritrocita, l'indice MCHC ne indica la concentrazione media. Si ottiene dal rapporto:  $Hb/100HTC$
- RDW: Red cell Distribution Width. Indica l'eterogeneità volumetrica dei globuli rossi ed è quindi l'indice di anisocitosi. Se si esprime graficamente il volume cellulare dei singoli eritrociti si ottiene una curva gaussiana, il cui coefficiente di variazione espresso in percentuale è il RDW. Si calcola dividendo la deviazione standard della distribuzione dei volumi (SD) per l'MCV. In breve:  $RDW=SD/MCV$ .
- WBC: White Blood Cells. Indica il numero di globuli bianchi per litro di sangue.
- PLT:Platelets. Indica il numero di piastrine presenti nel campione esaminato.
- (anisopoichilocitosi) eterogeneità nelle forme delle emazie.

Inoltre, data l'importanza dell'indice reticolocitario sono stati aggiunti altri parametri. I reticolociti sono emazie di nuova formazione contenenti ancora mitocondri e residui ribosomiali. Il numero di reticolociti nel sangue periferico è un indice di valutazione dell'attività eritropoietica midollare ed un loro aumento indica una difficoltà a sostituire quelli persi (per qualsiasi motivo). La valutazione dei reticolociti è nella lista degli esami di routine, compresa nell'emocromo. Si hanno aumenti in caso di emorragia, emolisi, trattamento dell'anemia perniziosa o assunzione di ferro. I parametri utili a valutare la presenza e la qualità dei reticolociti sono:

- IRF: frazione dei reticolociti immaturi
- CHr: contenuto emoglobinico reticolocitario
- MCVr: Volume reticolocitario medio.
- MCHCr: concentrazione emoglobinica media.
- retHb: emoglobina reticolocitaria.

Questi parametri rivestono una notevole importanza sia nel monitoraggio della terapia antianemica, sia nella valutazione della ripresa midollare dopo trapianto o chemioterapia.

Per quanto riguarda la conta differenziale delle classi leucocitarie, che permette sia il riconoscimento di alterazioni di forma e di dimensioni, sia la valutazione quantitativa (in percentuale) delle singole classi leucocitarie. In microscopia ottica è poco precisa ed accurata, soprattutto per quelle specie scarsamente rappresentate, senza contare del grado di soggettività e dalla difficoltà nell'esecuzione dell'esame (soprattutto con grossi carichi di lavoro).

Nei moderni citometri a flusso di tipo elettroottico il riconoscimento delle cinque sottoclassi leucocitarie si fonda sull'analisi di due parametri cellulari: uno fisico, il volume corpuscolare (misurato con la tecnica del light-scattering), l'altro di tipo citochimico relativo al contenuto in mieloperossidasi dei singoli leucociti:

- in base al criterio dimensionale le cellule sono raggruppate in due classi: grandi cellule (grandi linfociti, linfociti attivati, monociti, neutrofili ed eosinofili) e piccole cellule (piccoli linfociti)
- mentre il criterio citochimico le distingue in base al parametro della perossidasi: negative (linfociti e monociti) e positive (neutrofili, eosinofili). I basofili sono riconosciuti per la loro tangibilità con l'alcian-bleu.

L'esperienza comunque consiglia che, quando si esegue per la prima volta questo test in un paziente non conosciuto, è sempre necessaria una valutazione microscopica del campione di sangue periferico.

## Valori normali

In particolare si valutano le variazioni dei valori di emoglobina. Un aumento di tale parametro si può avere in numerose condizioni, come nell'esercizio fisico intenso, ad altitudini elevate, nell'uso di tabacco, in periodi di stress, in presenza di un carcinoma renale o di patologie cardiovascolari o in una condizione nota come policitemia vera, i cui si ha un aumento della produzione di tutti gli elementi cellulari. Una deplezione di emoglobina, al di sotto dei 12 g/dl invece è sintomo di anemia. Per anemia si intende uno stato patologico in cui si ha una riduzione dell'emoglobina e/o dei RBC, i cui sintomi sono quelli dell'ipossia tissutale (bradicardia e letargia).

	Maschi	Femmina
Ematocrito	40-54%	38-47%
Emoglobina	13,5- 18 g/dl	12-16 g/dl
Eritrociti/ $\mu\text{L}$	$4,6-6,2 \times 10^6$	$4,2-5,4 \times 10^6$
Leucociti/ $\mu\text{L}$	$4,5-11 \times 10^3$	
Piastrine/ $\mu\text{L}$	$150-450 \times 10^3$	
(MCV)	80-98 fl	81-99 fl
(MCH)	26-32 pg	
(MCHC)	32-36%	
(RDW)	11,6-14,6%	
Reticolociti	0,5-2,5%	

Gli stati anemici possono avere diverse cause, tra cui:

- Diminuzione dell'eritropoiesi o della sintesi di emoglobina:
  - deficit di vitamina B<sub>12</sub> e folati
  - carenza di ferro
  - IRC e insufficiente produzione di eritropoietina
  - anemia aplastica: blocco irreversibile della produzione.
- Perdita di sangue
- Emolisi (anemie emolitiche)
  - cause intra ed extraglobulari
  - talassemia

In realtà quasi tutte le malattie possono determinare uno stato anemico, che si ritiene si instauri quando il valore della concentrazione di emoglobina scende al di sotto del 20% rispetto ai valori di riferimento (12 g/dl nella donna e 13 g/dl nell'uomo). Anche in alcune condizioni fisiologiche si assiste ad una diminuzione del livello emoglobinico, ed in particolare nel periodo mestruale e in gravidanza (dovuta ad emodiluizione). I meccanismi fisiopatologici delle anemie sono principalmente di due tipi: produzione insufficiente di eritrociti o emoglobina e accelerata distruzione o perdita delle emazie circolanti. Il primo meccanismo è alla base delle anemie iporigenerative, mentre il secondo meccanismo riguarda le anemie dovute a cause che risiedono nel sangue e si rende evidente con la perdita o la distruzione delle emazie circolanti. Queste ultime vengono pertanto dette anemie rigenerative, comprendenti:

- anemie emorragiche acute, in genere normocromiche e a volte macrocitarie, in cui, subito dopo il fenomeno emorragico, la concentrazione totale di emoglobina può non subire variazioni
- anemie emolitiche, dovute ad anomalie costituzionali o acquisite. Le cause di iperemolisi possono essere di origine intracorporeale o extracorporeale.

La classificazione fisiopatologica, che prende in considerazione le cause dell'anemia, comprende:

- Ridotta produzione di eritrociti
  - aplasia midollare
  - infiltrazione neoplastica del midollo osseo
  - carenza di vitamina B<sub>12</sub> e folati
  - sindromi mielodisplastiche
  - anemia da insufficienza renale cronica (riduzione della sintesi di Epo)
- Sintesi emoglobinica anomala o ridotta
  - anemia sideropenica
  - anemia da disordini cronici (infiammazioni, infezioni, neoplasie)
  - sindromi talassemiche
  - emoglobine abnormi

- anemia associata ad endocrinopatie
- Aumentata distruzione eritrocitaria (anemie emolitiche)
  - Da causa intracorporeale
    - alterazioni della membrana eritrocitaria
    - alterazioni della glicolisi anaerobia
    - deficit enzimatici dello shunt dei pentosi
    - alterazioni qualitative dell'emoglobina
  - Da causa extracorporeale
    - cause meccaniche (es. valvole cardiache artificiali)
    - malattie emolitiche isoimmuni ed autoimmuni.

La diagnosi di laboratorio, con la valutazione di parametri sia cellulari che sierici, pone invece un'altra tipologia di classificazione degli stati anemici. In particolare, rispetto all'MCV, le anemie possono esordire come normocitiche, microcitiche e macrocitiche. Volendo invece caratterizzare le anemie dal punto di vista del contenuto di emoglobina con questa classificazione, in relazione al valore di MCHC si distinguono anemie normocromiche, ipocromiche ed ipercromiche.

Dall'associazione di questi criteri si possono classificare le anemie come segue:

### **Anemie ipocromiche**

Sono caratterizzate da una bassa MCHC e possono derivare da disturbi dell'emoglobinopoesi dovuti a fatti carenziali (ferro, vitamina B<sub>12</sub> e folati) oppure a disordini ereditari a carico della sintesi di emoglobina (sindromi talassemiche) o della struttura delle catene polipeptidiche dell'emoglobina (varianti strutturali della molecola). La forma di anemia con la maggiore prevalenza è quella microcitica/ipocromica in cui ad una ipocromia delle emazie (MCHC diminuito) si associa un discreto stato di anisocitosi (RDW aumentato) e microcitosi (MCV diminuito). Questa è tipica delle sindromi talassemiche e degli stati carenziali. È pertanto necessaria una diagnosi differenziale tra anemia sideropenica (sideremia diminuita, transferrina insatura aumentata, ferritina diminuita e TfR aumentato) ed il trait talassemico, ovvero l'eterozigote asintomatico (sideremia aumentata, frazione di HbA<sub>2</sub> aumentata). Nella sideropenia e nelle talassemie i quadri ematologici sono simili (anisocitosi ed anisopoichilocitosi delle emazie) ma nelle talassemie è preminente la presenza di cellule a bersaglio (target cells) ed infarcimento basofilo delle emazie. Nelle anemie microcitiche ipocromiche con sideremia normale o aumentata è opportuno procedere allo studio qualitativo delle emoglobine mediante elettroforesi o microcromatografia su colonna. Nell'eterozigote (trait talassemico, βThal<sup>+</sup>) la quota percentuale di HbA<sub>2</sub> risulta significativamente superiore al cut-off del 3,5%, mentre quote inferiori all'1,8% pongono il sospetto di α-talassemia. Nei casi di anemie ereditarie è utile l'anamnesi familiare, possibilmente associata all'impiego di sonde geniche o dei microchips per il riconoscimento della talassemia.

### *Anemia sideropenica (IDA)*

L'incidenza dell'anemia da carenza di ferro (IDA) è diminuita nei paesi industrializzati, mentre lo stato subclinico di deficit di ferro (ID) è rimasto invariato. Le indicazioni biochimiche per definire una condizione clinica o subclinica del deficit di ferro derivano dai seguenti parametri:

- TfR sierico
- Ferritina sierica
- Rapporto TfR/log ferritina.

Lo sviluppo della deficienza di ferro comprende due processi sequenziali:

- deplezione delle riserve di ferro in cui la concentrazione del recettore rimane stabile, mentre il valore della ferritina diminuisce
- esaurimento delle riserve e inizio della deplezione del ferro tissutale, stadio in cui sopravviene l'eritropoesi ferro-deficiente (IDE), il cui indicatore precoce è un innalzamento compensatorio del TfR sierico.

La ferritina in genere è un buon indicatore delle riserve di ferro tissutale, mentre il sTfR descrive il compartimento funzionale. Ecco perché combinando i due valori in un rapporto (sTfR/log ferritina) otteniamo un utile parametro per evidenziare la presenza di forme anemiche carenziali.

Il quadro tipico di una anemia sideropenica comprende:

- o microcitosi ed ipocromia delle emazie, con relativa anisocitosi (MCV<80fl, MCHC<30%, RDW>14%), con un left shift degli istogrammi di volume e concentrazione emoglobinica
- o ipo-sideremia ed ipo-ferritinemia, con aumento della transferrina
- o aumento del TfR solubile
- o diminuzione dei reticolociti

### **Anemie ipercromiche**

Le sollecitazioni chinico-fisiche del microcircolo possono essere sostenute dal globulo rosso solo grazie alla struttura della membrana ed alla disponibilità energetica per mantenerne intatte le funzioni. La membrana eritrocitaria si compone, oltre che da un doppio strato fosfolipidico, anche da un membrano-scheletro, costituito da diverse proteine organizzate a formare un network bidimensionale responsabile della forma discoide. Ogni alterazione qualitativa o quantitativa della componente membranaria determina un cambiamento delle caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche della membrana stessa, dal quale può originare un danno transitorio o permanente.

Le eventuali perdite di membrana portano alla condizione di sferocitosi, in cui si assiste al passaggio dell'eritrocita dalla forma a disco biconcavo a quella sferica, con conseguente fragilità in ambiente ipo-osmotico (poiché si perde il rapporto favorevole superficie/volume), riconoscibile mediante il test dell'autoemolisi da eritrostasi (a 24 e 48 ore, l'aggiunta di glucosio o ATP impedisce l'aumentata autoemolisi) oppure con il test di Osmored, utilizzato per valutare l'iper-resistenza (talassemie) o l'ipo-resistenza (sferocitosi ereditaria) osmolare delle emazie. La sferocitosi ereditaria si caratterizza per la presenza di piccoli eritrociti sferici ed ipocromici.

### **Anemie macrocitiche**

Il referto dell'esame emocromocitometrico evidenzia un MCV >94 fl, con un valore variabile di MCHC (può essere normocromica o ipocromica), mentre l'esame morfologico svela la presenza di eritrociti con un volume corpuscolare aumentato, unitamente a leucociti e piastrine di grandi dimensioni. Se il numero di reticolociti non è aumentato o è diminuito, si può presupporre un deficit di folati o di vitamina B<sub>12</sub>. Nel caso in cui il valore dell'MCV supera i 110 fl si parla di anemia megaloblastica. L'aumento del volume eritrocitario non è attribuibile solo a cause carenziali. Può infatti dipendere da processi rigenerativi dell'eritrono, alcolismo, epatopatie, esposizione industriale a solventi organici, sindromi mielodisplastiche primitive o chemioindotte, in cui è spesso associata leucopenia e piastrinopenia che comporta una prima diagnosi differenziale.

Le anemie macrocitiche e megaloblastiche costituiscono un gruppo eterogeneo di malattie dovute a carenza di fattori alimentari o di costituenti fisiologici (fattore intrinseco, FI) o alla presenza nel paziente di anticorpi anti FI. Queste anemie si possono distinguere in base al fattore carente.

#### *Anemia da deficit di vitamina B<sub>12</sub>*

La molecola di vitamina B<sub>12</sub> (che senza ligando prende il nome di cobalamina) è coinvolta in diverse attività enzimatiche come la conversione del metilmalonil-CoA a succinil-CoA, nel processo di metilazione dell'omocisteina a metionina, l'attivazione dell'acido folico... pertanto una carenza di questa molecola determina aumento dell'escrezione urinaria di metilmalonato, un aumento dell'omociteinemia e un deficit di acido folico. L'organismo umano non è in grado di sintetizzare la vitamina B<sub>12</sub>, pertanto il fabbisogno giornaliero è assicurato da alimenti (pane, carne, uova, latte).

Il prototipo delle anemie da carenza di B<sub>12</sub> è dato dall'anemia perniciosa che si manifesta con il tipico quadro ematologico di anemia megaloblastica, accompagnato spesso da lesioni neurologiche e dell'epitelio del tubo gastroenterico. Sembra esservi un'apparente predisposizione familiare, ma la diagnosi differenziale si fonda sul riconoscimento del deficit di vitamina B<sub>12</sub> o di folati. Essendo composti fotosensibili, la fase preanalitica richiede che il campione non sia esposto alla luce. Un altro test utile è quello di Schilling, basato sull'assorbimento, in un intervallo di tempo di 48 ore, di

vitamina B<sub>12</sub> marcata. Valutandone l'escrezione urinaria possiamo stimarne il grado di assorbimento.

#### *Anemia da carenza di folati*

L'uomo non è in grado di sintetizzare i folati e quindi il fabbisogno viene soddisfatto dall'assunzione di cibi, soprattutto quelli non sottoposti a cottura. L'assorbimento dei folati avviene principalmente a livello di digiuno ed ileo. La forma attiva è rappresentata dall'acido tetraidrofolico, forma ridotta dell'acido folico. La sua carenza determina l'iperproduzione di acido formiminoglutammico (FIGLU), il cui aumento nelle urine concorre alla diagnosi di deficit di folati. Questa carenza, oltre che da cause alimentari, può derivare da malassorbimento (morbo celiaco), aumentato fabbisogno (gravidanza), può essere associato ad epatopatia (etilismo cronico) o derivare dall'assunzione di farmaci che interferiscono con il metabolismo dei folati.

#### **Anemie normocitiche/normocromiche** (anemie post-emorragiche)

Possono essere causate da una ridotta produzione di eritrociti, dovuta a cause differenti: disfunzioni renali o midollari, anemie da malattie croniche, perdita o distruzione di eritrociti.

#### *Anemie in corso di malattie croniche*

Numerose infezioni determinano processi emolitici che determinano uno stato anemico. Tra queste, l'esempio tipico è dato dal protozoo della malaria, che provoca la distruzione meccanica dei globuli rossi in seguito al rilascio di una nuova generazione di proozoi. Questo processo induce i sintomi tipici di febbre con brividi ciclica connessi con questa patologia. Anche altri microrganismi causano anemia come i clostridi e gli stafilococchi emofili, ma anche la TBC, la sifilide, le infezioni da HIV, micosi profonde e parassitosi sistemiche. Inoltre, anche alcuni tipi di neoplasie maligne (soprattutto linfomi, mielomi e neoplasie solide) e di malattie infiammatorie croniche a carattere immunitario (artrite reumatoide, lupus ed infiammazioni croniche intestinali) possono provocare anemie normocitiche/normocromiche. In tutti questi casi si ha una riduzione di MCH, transferrina e sideremia con TfR e ferritina normale.

#### *Anemie da perdita ematica*

Un'acuta perdita di sangue non causa immediatamente uno stato anemico, anche se la perdita di un volume ematico determina un abbassamento del valore percentuale dell'ematocrito, piastrinosi e leucocitosi neutrofila. Poiché non vi è un deposito di reticolociti, la risposta eritropoietica impiega circa una settimana per compensare la perdita di sangue. Se c'è stata perdita ematica non vi è aumento della bilirubina indiretta (solo in caso di emolisi si osserva un aumento di bilirubina totale e indiretta che testimoniano fenomeni di iperemolisi). La perdita di sangue comporta però un'anossia tissutale che, a livello renale, si traduce con un incremento della produzione di Epo. Questo determina un incremento dell'eritropoiesi con uno shoulder a destra dell'istogramma dei volumi eritrocitari, normalizzandosi entro un mese dall'emorragia (aumento dell'MCV).

#### *Anemie emolitiche*

Il globulo rosso nel sangue periferico vive in media 120 giorni ed ogni giorno circa l'1% degli eritrociti circolanti viene rimosso dal sistema reticolo-endoteliale (emocateresi) e sostituito con reticolociti dal midollo osseo. Il processo di emocateresi avviene principalmente a livello dei sinusoidi splenici ed in minima parte nei vasi sanguigni, processo definito emolisi intravascolare, che libera emoglobina. Questa si dissocia in dimeri di catene omologhe che si complessano con l'aptoglobina, impedendo la perdita di emoglobina con il filtrato glomerulare e favorendone il trasporto al fegato. La deplezione dell'aptoglobina è un segno di emolisi intravascolare recente o sintomo di processi emolitici cronici. L'esaurimento della capacità legante dell'aptoglobina si associa con la comparsa in circolo di emoglobina libera che, per le sue dimensioni viene filtrata dal glomerulo renale comparando nelle urine e causando il fenomeno dell'emoglobinuria. L'emoglobina libera viene dosata con il test di Shumm (assorbanza a 560 nm per la reazione tra metaemoglobina e il solfito d'ammonio).

Un evento qualunque che causi iperemolisi, ovvero distruzione prematura dei globuli rossi, può essere la causa di anemia. Poiché il midollo eritroide può aumentare considerevolmente la sua produzione, l'anemia può non manifestarsi se non quando la vita dei globuli rossi è accorciata di

almeno 20-30 giorni. La diagnosi di anemia emolitica si effettua in seguito all'aumento della concentrazione di bilirubina indiretta (ed urobilinogeno), emoglobinemia (ed emoglobinuria), LDH eritrocitaria ed incremento del numero di reticolociti (processo compensatorio) e deplezione dell'aptoglobina. Una classificazione di laboratorio delle anemie si fonda sul riconoscimento delle cause dell'iperemolisi, che possono essere di origine intracorporeale oppure extracorporeale.

- **Anemie emolitiche da cause intraglobulari**  
Qualsiasi alterazione a carico della membrana eritrocitaria, del sistema energetico, del meccanismo di detossificazione o dell'emoglobina si può tradurre in una forma di anemia. Pertanto possiamo raggruppare i processi patologici delle anemie emolitiche da cause intraglobulari in tre grandi categorie: difetti di membrana, difetti enzimatici ed emoglobinopatie.

Elementi diagnostici delle anemie emolitiche da difetto intraeritrocitario		
Comuni		Specifici
Segni di emolisi	Segni di iper-funzione midollare Dipendenti dalla causa	
↑Bilirubinemia ↑non coniugata	Reticolocitosi	Morfologia Emazie
↑ Urobilinogeno	Iperplasia eritroblastica	Emosiderosi
↑ LDH isoenzima 2 ↓ Aptoglobinemia	↑ Turnover del Fe sideremia ≥ alla norma	- Aumentata fragilità osmo-tica - Dosaggi enzimi eritrocitari (G6PD) - Elettroforesi Hb

- Difetti di membrana. Le alterazioni del membrano-scheletro, causate da deficit delle proteine strutturali, sono uno dei principali fattori eziologici delle anemie emolitiche da cause intraglobulari. In queste patologie gli eritrociti sono caratterizzati da una ridotta deformabilità, da perdita di frammenti del doppio strato lipidico che causa la forma di sferocita, aumento di rigidità (accumulo di calcio nella membrana) e fragilità. Queste caratteristiche determinano emolisi, soprattutto a livello dei sinusoidi splenici. Il test dell'autoemolisi (dopo 48 h a 37°) è stato il test di discriminazione tra anemie sferocitiche e non. Oggi si preferisce effettuare il test dell'AGLT, che studia la cinetica della lisi provocata da una soluzione di glicerolo acidificata. La sferocitosi ereditaria (HS) è una patologia genetica a carattere autosomico dominante (nel 25% compare come mutazione primaria) può associarsi ad una condizione asintomatica che rimane silente fino alla vita adulta, manifestandosi improvvisamente in concomitanza di uno stress (febbre, infezione...). L'impiego del test di Osmored è utile per fare diagnosi differenziale tra anemie carenziali (iposideremiche) o ereditarie (talassemie) dalle alterazioni di membrana. Il test viene effettuato con l'aggiunta di una soluzione ipotoniche e mentre nelle alterazioni di membrana si riscontra un'iporesistenza, negli altri casi le emazie risultano iperesistenti.
- Difetti enzimatici. Il processo maturativo dell'eritrocita comporta la perdita del nucleo e dei mitocondri, con una conseguente incapacità ad utilizzare le vie metaboliche normali. L'importanza degli episodi emolitici è dipendente dalla natura del difetto enzimatico e dall'importanza dell'enzima stesso. Tra le varie forme di anemia da enzimopatia hanno una maggiore rilevanza clinica i difetti alla PK (piruvato-chinasi) e alla G6PD (glucosio6fosfodeidrogenasi), due enzimi chiave del metabolismo eritrocitario. Se si poncono in incubazione a 37°C, gli eritrociti normali sopravvivono circa 48 h senza alcuna riserva energetica esterna. In presenza di deficit alla PK l'autoemolisi risulta positiva, con un decremento dopo somministrazione di ATP (mentre il glucosio non sortisce alcun effetto). Nel caso in cui ci sia invece un deficit della G6PD, si verifica un deficit di NADP che non contrasta più gli stress ossidativi a carico di membrana ed emoglobina. L'ossidazione di quest'ultima comporta una precipitazione dell'Hb, determinando la formazione degli aggregati (corpi di Heinz). Il deficit di G6PD è una malattia a trasmissione sessuale (favismo), con una presenza maggiore nelle aree colpite da malaria (vantaggio dell'eterozigote). Le condizioni che possono causare episodi emorragici nei soggetti affetti da favismo sono molteplici: assunzione di farmaci (sulfamidici),



l'ingestione di fave e piselli o episodi infettivi nei quali l'attività di fagocitosi causa la liberazione di  $H_2O_2$ , non neutralizzato dagli eritrociti carenti.

- Emoglobinopatie. Rappresentano la più comune forma di alterazione genetica nell'uomo e sono suddivisibili in due gruppi: sindromi talassemiche (riduzione o completa mancanza della sintesi di una o più catene dell'emoglobina) e varianti strutturali dell'emoglobina (emoglobinopatie propriamente dette, in cui si hanno anomalie strutturali delle catene globiniche). Il sospetto diagnostico si ha in presenza di anemia microcitica ipocromica non correggibile con la terapia marziale, in seguito alla quale si procede con indagini più approfondite. Le tecniche di genetica molecolare su cellule del liquido amniotico o dei villi coriali vengono utilizzate per effettuare diagnosi prenatale sia per le talassemie sia per le emoglobinopatie (soprattutto l'anemia falciforme).
- . Talassemie. Lo studio delle sindromi talassemiche può avvenire a due livelli: utilizzo di analisi semplici e poco costose (emocitometria, test di Osmored, elettroforesi e microcromatografia su colonna) o indagini biomolecolari per conoscere l'esatta natura del difetto genetico. Le sindromi talassemiche presentano un alto grado di eterogeneità genetica ma è indubbio che i soggetti con deficit a carico della catena polipeptidica  $\beta$  siano più frequenti. La  $\beta$ -talassemia è sinonimo di anemia mediterranea. Vista l'incidenza di portatori sani asintomatici (trait talassemico) nelle regioni del Mediterraneo, il loro riconoscimento diviene un'importante azione di profilassi eugenetica tendente ad evitare la nascita di soggetti omozigoti affetti da una grave e spesso fatale anemia (morbo di Cooley). Il trait presenta una eritrocitosi (RBC e reticolociti aumentati) di tipo compensatorio che assicura un livello di emoglobina di poco inferiore al normale. Questo, insieme al dosaggio del ferro ematico (aumentato), della Tf e del TfRs (normali, non diminuiti), rappresenta l'insieme delle analisi necessarie per una diagnosi differenziale tra trait talassemico e anemia sideropenica, accomunate da una microcitosi. Nel caso che entrambi i genitori siano portatori di un gene talassemico, si può determinare nella prole la condizione omozigote che determina un quadro grave definito  $\beta$ talassemia maior o morbo di Cooley. In questi casi, il soggetto non produce affatto le catene  $\beta$  e, clinicamente presenta deformazioni ossee dovute ad espansione del territorio emopoietico in risposta all'anossia tissutale, oltre che epato-splenomegalia e cardiomegalia. Nel paziente non trasfuso si riscontrano valori di Hb intorno a 5 g/dl, con emazie a bersagli (target cell) con punteggiature basofile. La talassemia intermedia, causata dalla presenza di entrambi i geni difettosi ma con difetti different (doppia eterozigosi), presenta dei quadri clinici che vanno da lieve a grave, un esordio più tardivo con uno sviluppo psicomotorio abbastanza normale. Il quadro ematologico è simile a quello della talassemia maior ma la splenectomia si rende necessaria solo con il progressivo ricorso a regime ipertrasfusionale (ipersplenismo). Oltre alla  $\beta$ -talassemia si può avere anche l' $\alpha$ -talassemia, meno frequente ma non meno grave. I geni che codificano per la catena  $\alpha$  sono 4 e questo concorre nell'aumentare l'eterogeneità della gravità patologica. La totale assenza di catene  $\alpha$  determina una condizione nota come idrope fetale che determina morte intrauterina o sopravvivenza non oltre le prime ore dal parto. Si hanno gravi deformazioni anatomopatologiche dovute alla presenza massiva di emoglobina di Bart (Hb 4 $\gamma$ ).
- . Emoglobinopatie propriamente dette. Sono dovute a mutazioni puntiformi a carico dei geni che codificano per le catene globiniche (soprattutto la catena  $\beta$ ). la patologia più conosciuta è l'anemia drepanocitica, o anemia falciforme. È un'anemia emolitica cronica, trasmessa con carattere autosomico recessivo, dovuta a sostituzione dell'acido glutammico in posizione 6 con la valina. Questo determina la produzione della variante HbS che in condizioni di ipossia polimerizza, determinando la formazione di emazie "a falce" che causano l'occlusione dei capillari e la forma cronica dell'anemia emolitica. l'HbS può essere riconosciuta mediante elettroforesi zonale delle emoglobine a pH basico (migrazione cationica lenta).

- Anemie emolitiche da cause extraglobulari

In base all'origine della causa che determina l'anemia emolitica possiamo distinguere le forme di anemia associate ad una condizione immune e le anemie emolitiche non immuni.

- Anemie emolitiche di origine immunitaria. Sono anemie mediate dalla presenza di un'anticorpo, che può essere un autoanticorpo, ovvero diretti contro antigeni self, o un alloanticorpo, cioè diretti contro gli antigeni della stessa specie. Le patologie emolitiche autoimmuni possono essere primitive (o idiopatiche) quando non si evidenzia una causa, oppure secondarie se vi è associata una malattia sistemica di tipo linfoproliferativo (leucemie, linfomi, lupus, soprattutto in età geriatrica) o un'infezione (sifilide, mononucleosi, rosolia, varicella e mycoplasma pneumoniae, in età pediatrica o adolescenziale). Inoltre, alcune forme autoimmuni secondarie sono scatenate dall'azione di farmaci. Per quanto riguarda i casi di alloanticorpi, il caso più caratteristico è l'incompatibilità trasfusionale che determina agglutinazione e lisi intravasale delle emazie con ostruzione dei vasi capillari, attivazione del complemento e liberazione di sostanze istaminosimili, attivazione della CID. L'emolisi causa prima emoglobinemia, seguita da emoglobinuria ed ittero ostruttivo. Merita menzione anche la malattia emolitica del neonato, dovuta ad incompatibilità ematica tra madre e figlio per il fattore Rh. Questa evenienza si manifesta nel caso in cui una madre Rh<sup>-</sup> aspetti un figlio Rh<sup>+</sup>. La madre produce infatti anticorpi diretti contro l'antigene D del sistema Rh del feto. Il fenomeno può iniziare in gravidanza ma, essendo lento, produce solo IgM che non possono attraversare la barriera placentare. Al momento del parto si ha la commistio sanguis che può determinare il fenomeno emolitico. Alla seconda gravidanza con feto Rh<sup>+</sup>, le piccole quantità di emazie fetali che passano la barriera placentare sono sufficienti ad innescare la produzione di IgG che passano la barriera agglutinando le emazie del feto. Mentre la madre può andare incontro a tossemia gravidica, per il feto si ha epatosplenomegalia e si instaura un'ipossia progressiva che provoca alterazioni con una entità in relazione al periodo di vita intrauterina.
- Anemie emolitiche non immuni. Sono dovute principalmente all'azione chemiotossica esercitata da alcuni farmaci o veleni (solitamente solventi organici) che determinano danni alle membrane eritrocitarie, provocando emolisi. Inoltre si possono avere anemie dovute a traumi fisici a carico della stessa membrana. Quando l'azione traumatica viene esercitata dalle pareti artificiali di valvole cardiache o grossi vasi dopo sostituzione, si parla di anemia emolitica macroangiopatica, mentre se la lisi meccanica è dovuta al passaggio in capillari parzialmente ostruiti da fibrina o microcoaguli si parla di anemia emolitica microangiopatica. Una forma lieve di anemia da trauma fisico è tipica dei maratoneti, nei quali si può evidenziare un'emoglobinuria da marcia, evidenziabile anche in coloro che praticano arti marziali e nei suonatori di bongo.

Il sospetto di anemia emolitica richiede la valutazione di differenti aspetti clinici e di laboratorio:

. ↑ bilirubinemia totale, dovuta prevalentemente ad aumento di bilirubina non coniugata, con valori bassi di bilirubina diretta, si associa ad aumentata distruzione eritrocitaria ed aumento del catabolismo dell'eme.

. ↑ della quota di Hb libera nel plasma, ↓ dell'aptoglobina e comparsa di Hb nelle urine sono segni importanti di emolisi intravascolare.

. valutazione del grado di autoemolisi (test di Osmored, test al glicerolo acidificato, crioemolisi...).

In alcuni casi è indispensabile analizzare il midollo osseo.

. valutazione della causa dell'emolisi, distinguendosi tra cause extraglobulari (test di coomb diretto e indiretto) e cause intraglobulari (difetti enzimatici, emoglobinopatie o sindromi talassemiche).

Test di Coomb: quello diretto consente di riconoscere, con l'agglutinazione delle emazie, la presenza di anticorpi o frazioni del complemento adesi sulla loro superficie mediante anticorpi diretti contro le globuline umane o reazioni del complemento. In quello indiretto si ricerca la presenza di anticorpi incompleti nel siero del paziente, al quale vengono aggiunte ed incubate emazie normali. Se vi sono anticorpi si verifica l'agglutinazione delle emazie.

## ALTERAZIONI DEI LEUCOCITI

Le alterazioni a carico della popolazione leucocitaria riguardano principalmente le variazioni quantitative di tutta la popolazione leucocitaria di una o più classi di leucociti, mentre i disturbi funzionali sono più rari e spesso assumono il carattere della malignità.

Le alterazioni quantitative con aumento del numero dei leucociti sono definite leucocitosi, mentre le riduzioni della concentrazione prendono il nome di leucopenie.

### *Leucocitosi*

Si dichiara la presenza di una leucocitosi quando nel sangue periferico dell'adulto il numero totale dei globuli bianchi supera il cut-off di 10.000 cell/mm<sup>3</sup>, mentre per l'età pediatrica la soglia limite viene posta a 14.000 cell/mm<sup>3</sup>. I sistemi automatici, pur funzionando correttamente, possono incorrere in risultati non veritieri poiché possono incorrere nell'errore di fit-pall, per il quale la presenza di crioglobuline, aggregati piastrinici, eritroblasti e microcoaguli può generare una pseudoleucocitosi.

### *Neutrofilia*

La neutrofilia corrisponde all'aumento del valore assoluto dei neutrofili circolanti oltre il cut-off di 7.500 cell/μl, mentre per neutrofilia relativa si verifica quando i rapporti percentuali tra le classi leucocitarie dichiarano un valore di neutrofili superiore al 60%, indipendentemente dal valore totale di leucociti. Possono essere distinte in neutrofilie primitive e secondarie. Tra le primitive si annoverano le sindromi mieloproliferative (leucemia mieloide cronica, mielodisplasia e policitemia vera), mentre le neutrofilie secondarie sono dovute a varie cause differenti come l'assunzione di farmaci (glucocorticoidi), infezioni acute, flogosi immuni e non immuni (ustioni, emorragie, tumori metastatici, infarto, embolia polmonare), stress, adrenalina...

### *Neutropenia*

Si dichiara una neutropenia assoluta se il numero di neutrofili in circolo scende al di sotto delle 2.000 cell/μl, condizione che espone il paziente a processi infettivi. Si distinguono tre livelli di neutropenia:

- lieve: 1.000-2.000 cell/μl
- moderata: 500-1.000 cell/μl
- grave: <500 cell/μl

Può derivare da difetti ereditari, o essere una forma acquisita imputabile ad un sequestro da parte del pool marginale (aumentata marginazione da setticemia da gram-, malaria, tifo), associata a condizioni autoimmuni (LES, neutropenia isoimmune neonatale dovuta a IgG materne contro antigeni paterni), in seguito ad assunzione di farmaci (immunosoppressori, antiplastici, antibiotici, antiaritmici...), per sequestro splenico (cirrosi) o dovuta ad aplasia midollare, leucemie e linfomi.

### *Eosinofilia*

I ritmi circadiani degli eosinofili indicano che il valore assoluto misurato al mattino è più alto di quello pomeridiano. L'eosinofilia è fisiologica nei primi tre mesi di vita. nell'adulto, in cui il valore cut-off è 450 cell/μl, l'eosinofilia si associa spesso a manifestazioni allergiche, ad infestazioni da elminti e ad alcune forme neoplastiche. Inoltre, anche l'assunzione di alcuni farmaci può provocare sindromi eosinofile. La sindrome eosinofila idiomatica si manifesta con febbre, anemia, piastrinopenia, epatosplenomegalia, orticaria ed affezioni del tubo gastroenterico.

### *Eosinopenia*

Si parla di eosinopenia quando la conta degli eosinofili non supera le 100 cell/μl. Questo stato può essere dovuto ad infezioni batteriche acute, nell'abuso di steroidi o in caso di aumentata secrezione di glucocorticoidi (sindrome di Cushing)

### *Basofilia*

Si presenta quando il numero dei basofili nel sangue periferico supera il valore dell'1% dei globuli bianchi totali (>20 cell/μl) ed è spesso associata a reazioni di ipersensibilità di tipo immediato con elevazione delle IgE. Spesso aumentano nelle infiammazioni croniche dell'intestino (colite ulcerosa), nell'artrite reumatoide, nella varicella, ma in special modo nelle sindromi mieloproliferative come la leucemia mieloide cronica.

A causa del loro scarso numero nel sangue periferico, è molto difficile in condizioni normali riscontrarli in uno striscio di sangue. Pertanto non si può parlare di basofiloopenia.

#### *Linfocitosi*

Il cut-off per diagnosticare una linfocitosi è posto a 4.500 cell/μl negli adulti ed a 9.000 cell/μl nei bambini fino ai 10 anni. La conta dei linfociti varia in base all'età del soggetto, in seguito ad infezioni virali (ma anche da sifilide, toxoplasmosi, mycoplasma). Inoltre un aumento dei linfociti circolanti può essere dovuto a sensibilità verso alcuni farmaci, o a disturbi vari (linfomi, rifiuto d'innesto, ipertiroidismo, patologie autoimmuni...)

#### *Linfocitopenia*

Per linfocitopenia si intende quello stato in cui si ha un decremento della conta dei linfociti, in particolare quando questa scende sotto le 1.500 cell/μl negli adulti o sotto le 3.000 cell/μl nei bambini. Le cause più comuni sono immunodeficit congeniti ed acquisiti (AIDS), stress da aumentata produzione di glucocorticoidi (sindrome di glucocorticoidi), aplasia midollare, immunosoppressione da farmaci.

#### *Alterazioni del sistema monolitico-macrofagico*

È un sistema complesso costituito funzionalmente da cellule non linfoidi ad attività fagocitaria e da cellule specializzate nella presentazione dell'antigene. In relazione alle conoscenze più recenti le cellule facenti parte di questo sistema possono essere distinte in monociti circolanti, macrofagi residenti e cellule immunitarie attivate.

#### *Monocitosi*

Si hanno in seguito a diverse infezioni, in patologie autoimmuni e nel linfoma di Hodgkin.