L'effetto della durata e della temperatura di stoccaggio sui parametri ematologici

MQZH 2019-3

Introduzione

I risultati più corretti si ottengono su campioni freschi. Idealmente quindi il campione per l'emogramma automatico va lavorato il più rapidamente possibile, direttamente dopo il prelievo o dopo brevi trasporti.

La realtà però comporta spesso intervalli inevitabili fra il prelievo e l'analisi. In questi casi è utile sapere quali sono gli effetti che tali intervalli possono avere sui diversi parametri. Oltre al tempo di stoccaggio vanno prese in considerazione la temperatura e il procedimento analitico dello strumento. Inoltre, le alterazioni patologiche del campione possono influenzarne la stabilità.

Gli analizzatori ematologici a tre popolazioni differenziano basandosi esclusivamente sulla dimensione delle cellule. L'osservazione dell'istogramma leucocitario aiuta a riconoscere artefatti da stoccaggio.

Effetti della durata e della temperatura di stoccaggio

Quanto può deviare un valore per essere considerato ancora corretto? Una possibilità è utilizzare come criterio il coefficiente di variazione del metodo impiegato. Un campione è considerato stabile fintanto che la deviazione è inferiore al coefficiente di variazione (in %) [1]. Le analisi su analizzatori a 5 popolazioni permettono di formulare le seguenti raccomandazioni:

Analisi	Stabilità	Note
Ec, Hb, MCH, RDW	72 ore a 4-8°C	Anche a temperatura ambiente nessuna variazione
MCV ed ematocrito	24-72 ore a 4-8°C	Rigonfiamento degli Ec (l'ematocrito appare più elevato). Le differenze dipendono molto dallo strumento. A temp. ambiente si osservano deviazioni già dopo 4 ore.
leucociti	72 ore a 4-8°C	A temperatura ambiente i valori diminuiscono, secondo lo strumento, già dopo 24 ore
Leucociti-Differenziatore automatico	24-72 ore a 4-8°C	Deviazioni significative secondo lo strumento. Negli strumenti a 5 popolazioni il numero di monociti può aumentare o diminuire secondo il procedimento analitico. Negli strumenti a 3 popolazioni il numero di monociti aumenta sempre. A temp. ambiente i valori sono alterati già dopo 4 ore.
Tromobociti	24-72 ore a 4-8°C	I valoro diminuiscono leggermente e progressivamente.

[1] Imeri F, et al. Clin Chim Acta 2008;397:68-71.

Deviazioni in strumenti a 3 popolazioni

In quali analisi si osservano le maggiori differenze?
MCV ed ematocrito aumentano rapidamente a temperatura ambiente. Già dopo 24 ore senza refrigerazione il valore di MCV è fino a 5% più elevato, il differenziamento con Sysmex XP-300 non è più possibile perché lo strumento non è più in grado di identificare gli avvallamenti fra i picchi e quindi i discriminatori.
Negli strumenti a 3 popolazioni Sysmex i monociti sono rappresentati dal picco intermedio (zona delle cellule miste MXD). Durante lo stoccaggio i granulociti si contraggono, i picchi non sono più riconoscibili. La popolazione dei granulociti si sposta verso sinistra e il picco appare a livello dei 120 fl, mentre in un campione fresco esso si posiziona sui 150-200 fl. In caso di monociti elevati va sempre cercato il picco dei monociti sull'istogramma, se non è riconoscibile è un indizio che si tratti di un artefatto dovuto all'ingrossamento dei granulociti.

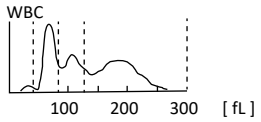


Fig. 4. Vera monocitosi (campione MQ 2019-3 H3b). Il picco della zona MXD è ben visibile. L'istogramma è di un Sysmex XP-300.

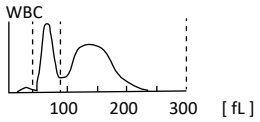
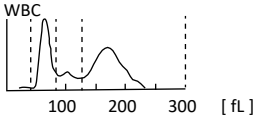


Fig. 5. Artefatto da stoccaggio (27 ore a temp. ambiente). La contrazione dei neutrofili ne ha causato lo spostamento del picco verso la zona MXD. L'istogramma è di un Sysmex XP-300.

Esempio di campione analizzato con Sysmex XP-300

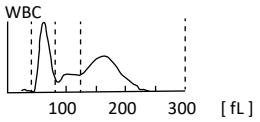
WBC	6.4 x10³/µL
RBC	- 3.66 x10⁶/µL
HGB	- 11.5 g/dL
HCT	- 34.4 %
MCV	94.0 fL
MCH	31.4 pg
MCHC	33.4 g/dL
PLT	311 x10³/µL



LYM%	32.8 %
MXD%	12.6 %
NEUT%	54.6 %
LYM#	2.1 x10³/µL
MXD#	0.8 x10³/µL
NEUT#	3.5 x10³/µL

Fig. 1. Campione fresco

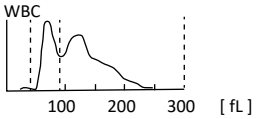
WBC	6.5 x10³/µL
RBC	- 3.69 x10⁶/µL
HGB	- 12.1 g/dL
HCT	- 34.5 %
MCV	93.5 fL
MCH	32.8 pg
MCHC	35.1 g/dL
PLT	291 x10³/µL



LYM%	32.8 %
MXD%	+ 15.2 %
NEUT%	52.0 %
LYM#	2.1 x10³/µL
MXD#	1.0 x10³/µL
NEUT#	3.4 x10³/µL

Fig. 2. Stoccaggio 72 ore a 4°C

WBC	6.4 x10³/µL
RBC	- 3.57 x10⁶/µL
HGB	- 11.7 g/dL
HCT	- 36.1 %
MCV	+ 101.0 fL
MCH	32.8 pg
MCHC	32.4 g/dL
PLT	297 x10³/µL



LYM%	F1* 32.0 %
MXD%	T2 ---.- %
NEUT%	T2 ---.- %
LYM#	F1* 2.0 x10³/µL
MXD#	T2 ---.- x10³/µL
NEUT#	T2 ---.- x10³/µL

Fig. 3. Stoccaggio 72 ore a temp. ambiente

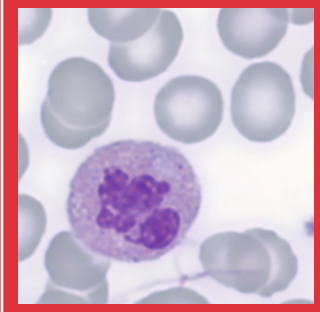


Fig. 6. Campione fresco

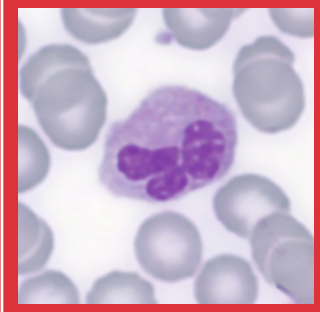


Fig. 7. Campione refrigerato per 24 ore

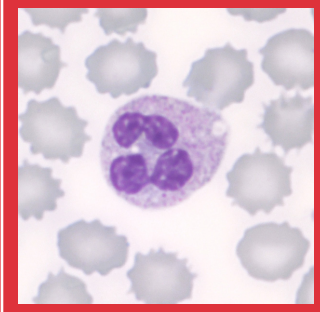


Fig. 8. Campione a temp. ambiente per 24 ore

Deviazioni in strumenti a discriminatori fissi

Gli strumenti che utilizzano discriminatori fissi possono emettere valori di monociti anche molto alti in campioni vecchi. Anche in questo caso i neutrofili si contraggono e occupano lo spazio dei monociti (Fig. 11). In questo esempio è evidente che nel campione raffreddato non c'è stata alcuna contrazione e di conseguenza il numero di monociti è normale (Fig. 10).

Esempio di campione analizzato con Microsemi

DIFF :		
LYM%:	33.1	%
MON%:	6.3	%
GRA%:	60.6	%
LYM#:	2.1	$10^3/\mu L$
MON#:	0.4	$10^3/\mu L$
GRA#:	4.0	$10^3/\mu L$

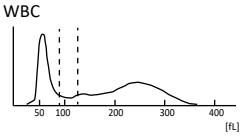


Fig. 9. Campione fresco analizzato con Microsemi

DIFF :		
LYM%:	33.7	%
MON%:	6.8	%
GRA%:	59.5	%
LYM#:	2.1	$10^3/\mu L$
MON#:	0.4	$10^3/\mu L$
GRA#:	3.8	$10^3/\mu L$

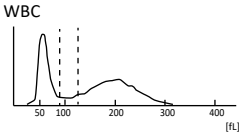


Fig. 10. Campione stoccato 72 ore a 4°C, analizzato con Microsemi

DIFF :		
LYM%:	45.6	%
MON%:	30.4	H %
GRA%:	24.0	L %
LYM#:	2.8	$10^3/\mu L$
MON#:	1.9	H $10^3/\mu L$
GRA#:	1.4	$10^3/\mu L$

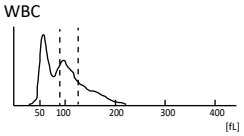


Fig. 11. Campione stoccato 72 ore a temp. ambiente, analizzato con Microsemi

Deviazioni dell'analisi microscopica dovuta a stoccaggio dei campioni

Come per gli analizzatori automatici, anche in microscopia si ottengono i risultati migliori su campioni freschi. Deviazioni che occorrono entro le prime 2-4 ore non influenzano i risultati. Se è necessario aspettare, il refrigeramento riduce gli effetti.

Una volta effettuato lo striscio, le cellule sono fissate sul vetrino e non sono alterabili. In questo stadio sono ancora possibili deviazioni artificiali, per esempio se i vetrini rimangono esposti a lungo a polvere o raggi solari prima della colorazione. Se uno striscio non può essere colorato subito si consiglia quindi di proteggerlo negli appositi involucri per vetrini.

Neutrofili	Nuclei: ingrossamenti, colorazione omogenea della cromatina, perdita delle strutture dei segmenti nucleari, polinuclei. Forme apoptotiche (di degradazione): condensazione nucleica, condensazione cromatinica, colorazione nera della massa cromatinica, carioressi. Citoplasma: bordi sfumati (sfrangiati), degradazione delle strutture citoplasmatiche, leggero aumento del numero di vacuoli dopo 3-4 ore, evidente dopo 6 ore.
Monociti	Citoplasma: leggero aumento del numero di vacuoli dopo 3-4 ore, evidente dopo 6 ore.
Linfociti	Nessuna deviazione fino a 5 ore di stoccaggio. Nucleo: dopo 5 ore, colorazione omogenea della cromatina, gemmazione del nucleo (nuclear budding). Citoplasma: protrusioni a bolla o filamentose, raramente piccoli vacuoli, nuclear budding.
Cellule danneggiate	Aumento del numero dopo 24-48 ore.
NRBC	Gli eritroblasti vengono degradati entro 1-2 giorni.
Eritrociti	Diminuizione della stabilità di membrana: formazione di echinociti e sferociti (sfero-echinocitosi).
Trombociti	Rigonfiamento (aumento delle dimensioni), ipogranulazione.

Colophon
Autrice *Annette Steiger*
Fotografie *Dr. Roman Fried*

Consulenza scientifica C. Hviid, Dr. C. Widmer, Klinik für Medizinische Onkologie und Hämatologie, Universitätsspital Zürich, Dr. J. Goede, Kantonsspital Winterthur

© 2019 Verein für medizinische Qualitätskontrolle www.mqzh.ch