

MeB – Pagine Elettroniche

Volume XIII

Novembre 2010

numero 9

IL PUNTO SU

Contare i globuli bianchi e leggere una formula leucocitaria in ambulatorio: un po' di storia della medicina ancora e sempre attuale

Lamberto Reggiani

Pediatra di famiglia; Pediatria di Gruppo, Imola (Bologna)

Indirizzo per corrispondenza: reggianilamberto@hotmail.com

Counting white blood cells and reading a leukocyte formula in an outpatient unit

Keywords White blood cells, Leukocyte formula, Outpatient unit**Abstract** Leukocyte count may be the most immediately available and at the same time most significant lab indication to direct intervention in a feverish child, presenting with a marginally compromised general condition or in a patient with suspected appendicitis or in a child at risk of bacteraemia.

Al di là dell'aspetto puramente suggestivo di poter utilizzare un microscopio in ambulatorio calandosi così nei panni del Medico ricercatore (leggendaria figura sempre presente nei pensieri di ognuno di noi), resta la lecita domanda se l'impegno necessario per un suo razionale utilizzo sia giustificabile in un ambulatorio pediatrico ai giorni nostri.

Attraverso il microscopio, posso eseguire con gli opportuni reattivi, una conta leucocitaria, posso leggere una formula, posso analizzare l'urina a fresco o un sedimento urinario (se possiedo anche una centrifuga), posso leggere lo scotch test per la ricerca delle uova di ossiuri, posso confermare la presenza di lendini, ricercare eosinofili nel muco nasale.

Le valutazioni della conta e della formula leucocitaria dovrebbero comunque rappresentare le applicazioni più frequenti di questo strumento diagnostico.

La conoscenza rapida di questi parametri sono utili nel bambino con febbre da causa sconosciuta e stato generale compromesso, nel bambino con sospetta appendicite acuta e in qualsiasi patologia dove possa sospettare una leucocitosi o al contrario una leucopenia.

Le più recenti linee guida relative alla valutazione del bambino febbrile, prevedono la conta leucocitaria come indagine diagnostica utile nella definizione di gravità per ridurre il rischio di trascurare una possibile batteriemia. Nel dossier del Childrens Hospital Medical Center di Cincinnati viene ribadita la necessità di ricorrere a una valutazione della conta leucocitaria nel bambino con stato generale compromesso (sottolineando a margine come una conta assoluta dei neutrofili sia più sensibile e più specifica di una conta leucocitaria generica nella valutazione di una batteriemia pneumococcica comunque percentualmente in declino dopo il miglioramento della copertura vaccinale contro lo pneumococco).

Una conta leucocitaria superiore a 15.000/mm³ aumenta il rischio di batteriemia del 3-4% e se superiore a 20.000/mm³ aumenta il rischio dall'8 al 10%¹

Nella linea guida del NICE² viene sottolineato come sia necessario ricorrere sempre a una conta leucocitaria nel bambino febbrile sotto i tre mesi di vita; nel bambino con più di 3 mesi di vita si ricorrerà a una conta leucocitaria se sono presenti una o più caratteristiche cliniche dell'area rossa dell'apposita tabella di riferimento relativa ai segni e ai sintomi (Tabella I). Decisioni successive (esecuzione di una puntura lombare o di una radiografia del torace, terapia) vengono modulate nel loro dossier sul valore della conta leucocitaria (Tabella II).

Red – high risk

Pale/mottled/ashen/blue

No response to social cues Appears ill to a healthcare professional Unable to rouse or if roused does not stay awake Weak, high-pitched or continuous cry

Grunting Tachypnoea: RR > 60 breaths/minute Moderate or severe chest indrawing

Reduced skin turgor

Age 0–3 months, temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$ Age 3–6 months, temperature $\geq 39^{\circ}\text{C}$

Non-blanching rash Bulging fontanelle Neck stiffness Status epilepticus Focal neurological signs Focal seizures

Bile-stained vomiting

Tabella I. I segni e sintomi dell'area rossa nella linea guida sul bambino febbrile del NICE indicativi di una situazione a rischio di batteriemia. Per un bambino con più di 3 mesi di età in presenza di uno o più di questi segni e sintomi viene consigliata l'esecuzione di una conta leucocitaria.

Tabella II. Strategie relative all'esito della conta leucocitaria in riferimento all'età del bambino nella linea guida del NICE. Da notare come anche una conta < 5.000/mm³ viene identificata come fattore di rischio.

Bambini fra 1 e 3 mesi di vita con conta leucocitaria < 5.000 o > 15.000 /mm ³	Puntura lombare Antibiotico terapia parenterale
Bambini di 3 mesi di vita o più con temperatura di 39 o oltre e conta leucocitaria > 20.000/mm ³	Rx torace

Nell'ambito della valutazione di un bambino con sospetta appendicite acuta, il parametro della conta leucocitaria presenta alcune luci e alcune zone d'ombra. La linea guida sull'argomento sempre del *Cincinnati Children's Hospital Medical Center*³ nella sezione relativa agli esami di laboratorio, recita testualmente che nessun esame singolo o in combinazione con altri è risultato predittivo di appendicite acuta nei bambini. Più in dettaglio: la conta leucocitaria è elevata dall'87 al 92% dei pazienti con appendicite acuta. Dobbiamo quindi considerare l'aspetto negativo di quel 8-13% di falsi negativi, bambini cioè con appendicite e conta leucocitaria normale. (Tutti i lavori a conferma di queste affermazioni sono lavori con grado di evidenza D: analisi retrospettive).

Una ricerca recente retrospettiva e prospettica⁴ proprio sull'utilità della conta leucocitaria e della granulocitosi con deviazione a sx della formula, nella diagnosi di appendicite nel bambino, conclude che una leucocitosi o lo spostamento a sx della formula possiedono una sensibilità del 79% e insieme una specificità del 94%. Ancora troppi falsi negativi che rendono poco rassicurante un esame negativo per escludere una appendicite, mentre l'alta specificità permette una buona conferma della diagnosi in presenza di leucocitosi e granulocitosi.

Sia nel caso del bambino con febbre di causa sconosciuta o del bambino con sospetta appendicite, il fatto di poter disporre di un sistema ambulatoriale che da sangue capillare, con

una puntura dal dito (attualmente con i più recenti pungidito veramente indolore) permette di eseguire una conta e una formula leucocitaria, facilita notevolmente anche la ripetibilità dell'esame per verificare incrementi o riduzioni del numero dei leucociti e monitorare quindi più da vicino l'andamento della malattia.

COME ESEGUIRE UNA CONTA LEUCOCITARIA IN AMBULATORIO

Il sistema diagnostico Unopette era l'unico sistema in commercio predisposto per eseguire una conta leucocitaria ambulatoriale senza dover ricorrere all'uso della provetta di Thoma Zeiss e del colorante di Turke, attraverso l'utilizzo associato di una camera contaglobuli e di un microscopio. La ditta produttrice ne ha interrotto momentaneamente la produzione. Attualmente una ditta Italiana produce un sistema analogo chiamato Leuchrom che ha rimpiazzato il vecchio Unopette.

Il sistema è caratterizzato da contenitori di plastica con all'interno del cristallo violetto, colorante in grado di distruggere gli eritrociti e colorare i leucociti per poterli evidenziare e quindi contare all'interno del reticolo della camera contaglobuli. Nella confezione sono compresi i capillari da 10 microlitri necessari per la raccolta dell'esatta quantità di sangue, i contagocce e le lancette monouso per il prelievo capillare.



Figura 1. Prima di eseguire la conta leucocitaria è bene aver preparato tutto l'occorrente: i capillari, il flacone del reattivo, il pungidito indolore caricato con l'apposita lancetta, la pinzetta per maneggiare il capillare da 10 microlitri e, a parte, il cotone e il disinfettante.



Figura 2. Il dito andrà massaggiato diverse volte per aumentare il flusso capillare.



Figura 3. è consigliabile disinfettare il dito con disinfettante per cute integra



Figura 4. una volta scelta la profondità di puntura del pungidito indolore a seconda delle dimensioni del dito del bambino e della quantità di sangue richiesta, si praticherà il prelievo nella zona mediale o laterale del dito stesso.



Figura 5. è consigliabile asciugare la prima goccia di sangue.



Figura 6. Si raccoglierà il sangue intero appoggiando l'apposito capillare sulla goccia successiva ottenuta spremendo delicatamente il dito.



Figura 7. Il capillare andrà riempito completamente e poi se ne asciugherà l'eventuale eccesso all'esterno.

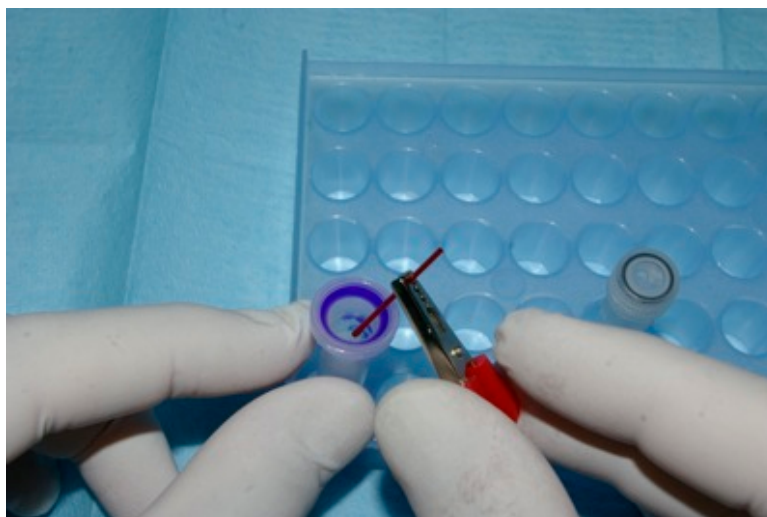


Figura 8. Il capillare andrà inserito all'interno del flacone contenente il reattivo.



Figura 9. Il flacone andrà chiuso con l'apposito contagocce.



Figura 10. Per favorire il passaggio del sangue dal capillare al colorante si agiterà il flacone con lo stesso movimento del polso necessario a azzerare la colonna di mercurio nei vecchi termometri.



Figura 11. Si appoggerà quindi una goccia del liquido ottenuto fra vetrino coprioggetto e camera contaglobuli in modo che si riempia il sottile spazio compreso fra le due strutture. A questo punto la camera contaglobuli è pronta per poter essere valutata al microscopio.

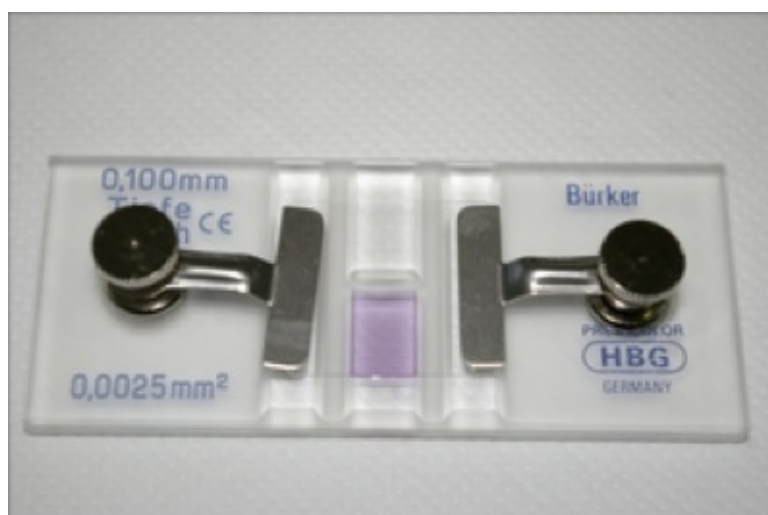


Figura 12. La camera contaglobuli di Bürker. Il vetrino coprioggetti è tenuto in sede dalle 2 apposite alette metalliche. In questo caso la camera presenta 2 reticoli disegnati nella struttura, separati da un incavo che impedisce la commistione del materiale, consentendo quindi 2 letture leucocitarie sullo stesso vetrino.

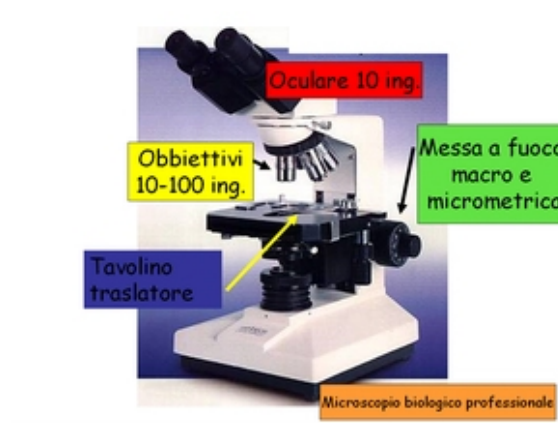


Figura 13. Le caratteristiche tecniche minime per un microscopio ambulatoriale: binoculare per sforzare meno la vista oculari da 10 ingrandimenti almeno 2 obiettivi da 10 e 100 ingrandimenti tavolino traslatore messa a fuoco macro o micrometrica

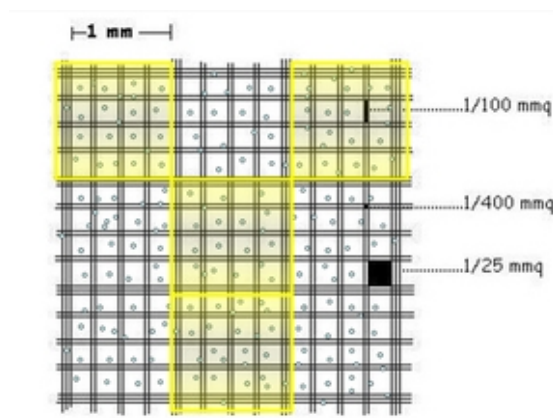


Figura 14. Il reticolo disegnato nella camera contaglobuli di Burk.

È fondamentalmente suddiviso in nove quadrati grandi delimitati da 3 righe parallele con all'interno quadrati e rettangoli più piccoli delimitati da 2 righe parallele. I leucociti appaiono come piccole sfere più o meno rifrangenti a seconda della messa a fuoco nel microscopio.

Le lettura della conta andrà eseguita a 100 ingrandimenti, prodotto fra i 10 ingrandimenti dell'oculare e quelli dell'obiettivo da 10. A questo ingrandimento si evidenzieranno uno alla volta i nove quadrati che compongono il reticolo della camera di Burk.

Una buona tecnica di conteggio tiene conto del fatto che la distribuzione casuale delle cellule nella camera durante il suo riempimento quasi mai è uniforme e quindi suggerisce di considerare la media delle cellule contate nei 4 quadrati disposti a Y evidenziati in giallo nella Figura 14 facenti parte dei 9 del reticolo. Il valore ottenuto dovrà essere moltiplicato per 10 per riportarsi a 1 mm³ e poi moltiplicato per il coefficiente di diluizione del campione.

Se ad esempio le conte nei quattro quadrati disposti a Y sono state rispettivamente di: 40-30-48-34 otterrò come media delle cellule/quadrato: 38 nel volume di 0,10 mm³.

Quindi dovrò moltiplicare tale numero per 10 (porto al mm³) e poi di nuovo moltiplicherò per 10 o per 20 a seconda del fattore di diluizione (per il Leuchrom dovrò moltiplicare per 20).

Quindi: 38 per 10 per 20 = 7.600 cellule/mm³

Non è possibile eseguire una formula leucocitaria in camera contaglobuli se non in modo molto approssimativo e con

difficoltà; l'unico dato sul quale basarsi è la dimensione cellulare (differenziazione fra granulociti più grandi e linfociti più piccoli) ma la visione microscopica non è sufficiente per poter ottenere un dato affidabile.

COME ESEGUIRE UNA FORMULA LEUCOCITARIA IN AMBULATORIO

Attualmente è possibile eseguire in modo semplice e applicabile alla normale attività pediatrica quotidiana, una formula leucocitaria utilizzando i vetrini precolorati Testsimplerts che permettono una distinzione morfologica colorando le cellule (gli eritrociti rimangono, ma i leucociti vengono evidenziati per la colorazione di nucleo e citoplasma) avendo comunque a disposizione un microscopio. In questo modo è possibile valutare morfologicamente gli eritrociti e i leucociti valutando percentualmente la distinzione fra polinucleati (granulociti neutrofili, basofili e eosinofili) e mononucleati (linfociti, monociti, linfociti attivati) senza però poter valutare il numero assoluto dei leucociti.

Non è possibile pensare di effettuare in ambulatorio uno striscio tradizionale con l'impiego di diversi coloranti e fissanti da aggiungere in tempi diversi. I vetrini precolorati invece, sono molto semplici da utilizzare e sufficientemente rapidi. Nella confezione sono previsti i vetrini con al centro il colorante essiccato (cresilvioletto) e i vetrini copri oggetto di dimensioni corrispondenti alla zona reattiva.

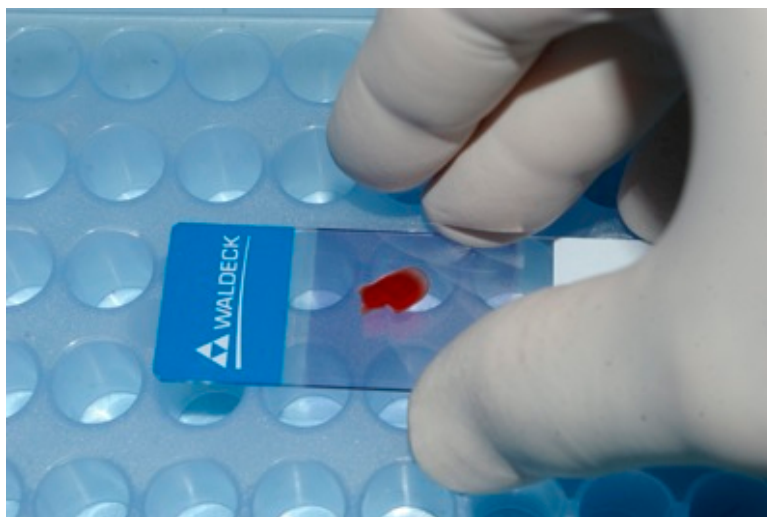


Figura 15. Una volta deposta la goccia di sangue sul vetrino coprioggetti, si capovolge il vetrino stesso per far aderire la goccia alla porzione colorata del vetrino precolorato.



Figura 16. Si distribuisce la goccia di sangue in modo uniforme premendo con un qualsiasi oggetto a punta smussa sul copri oggetto, cercando di eliminare gli eccessi. Con l'esperienza si acquisirà la valutazione della dimensione ottimale della goccia per ottenere una distribuzione corretta.

Attesi 5 minuti (tempo necessario affinché le cellule incorporino il colorante), il vetrino può essere letto al microscopio. Si utilizza l'obiettivo da 100 per ottenere 1000 ingrandimenti definitivi (prodotto fra oculare 10 ingrandimenti e obiettivo

100 ingrandimenti = 1000 ingrandimenti) con l'aggiunta di una goccia di olio da immersione da porre fra l'obiettivo e il vetrino.

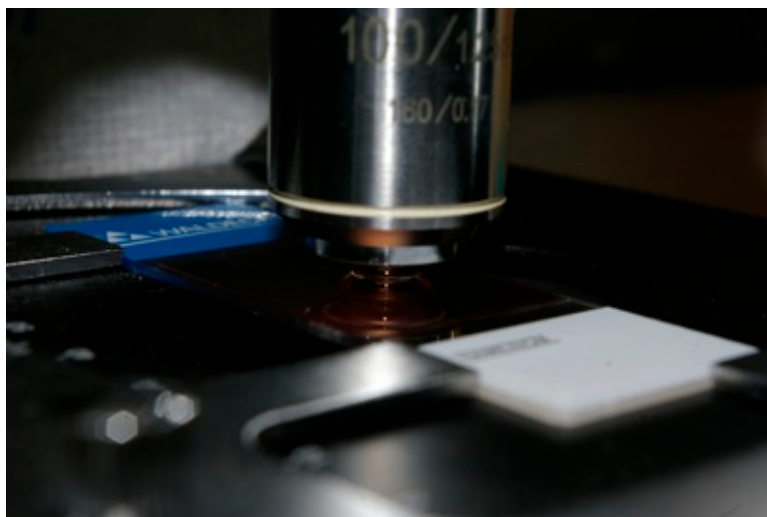


Figura 17. Per la valutazione della formula, l'obiettivo da 100 ingrandimenti deve essere delicatamente posto quasi a contatto del vetrino stesso "centrando" la goccia di olio da immersione.

A questo punto si dovranno contare almeno 100 cellule leucocitarie e segnarne l'appartenenza alla classe specifica (linfociti, monoliti, eosinofili, granulociti neutrofili e per questi ultimi si valuterà il loro stadio di maturazione sulla base delle segmentazioni del nucleo: un aumento dei granulociti neutrofili con nucleo poco segmentato significa tentativo di dissoluzione in circolo da parte dell'organismo anche delle cellule più giovani, segno di gravità dell'infezione).

Si dovrà analizzare tutta la superficie del vetrino precolorato muovendosi con il tavolino traslatore del microscopio a zig

zag, in quanto alla periferia tendono a raccogliersi le cellule più grandi come i neutrofili e i monociti, mentre al centro quelle più piccole come i linfociti.

Le variazioni della formula leucocitaria nelle più frequenti patologie ambulatoriali sono illustrate in Tabella III⁵.

Non è possibile eseguire una conta leucocitaria con i vetrini precolorati non essendoci un reticolo di riferimento, si può solamente avere una stima indicativa e approssimativa di leucocitosi per campo di osservazione.

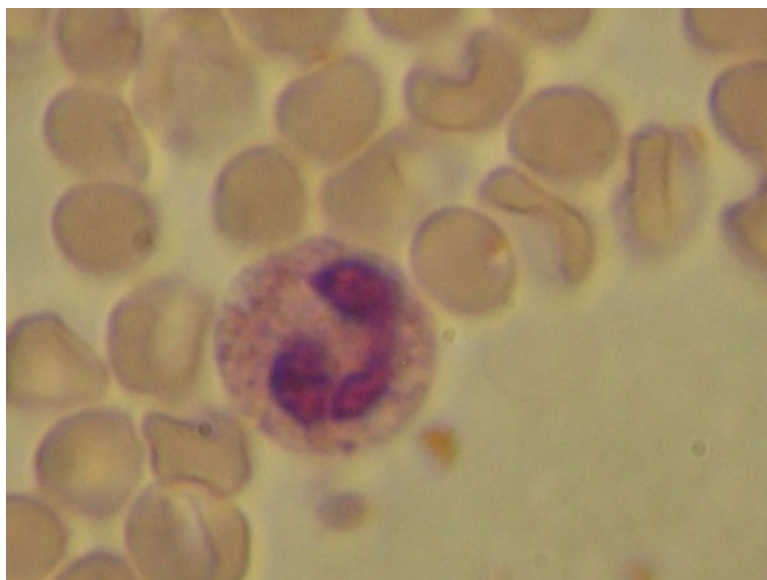


Figura 18. Un granulocita neutrofilo con nucleo plurisegmentato.

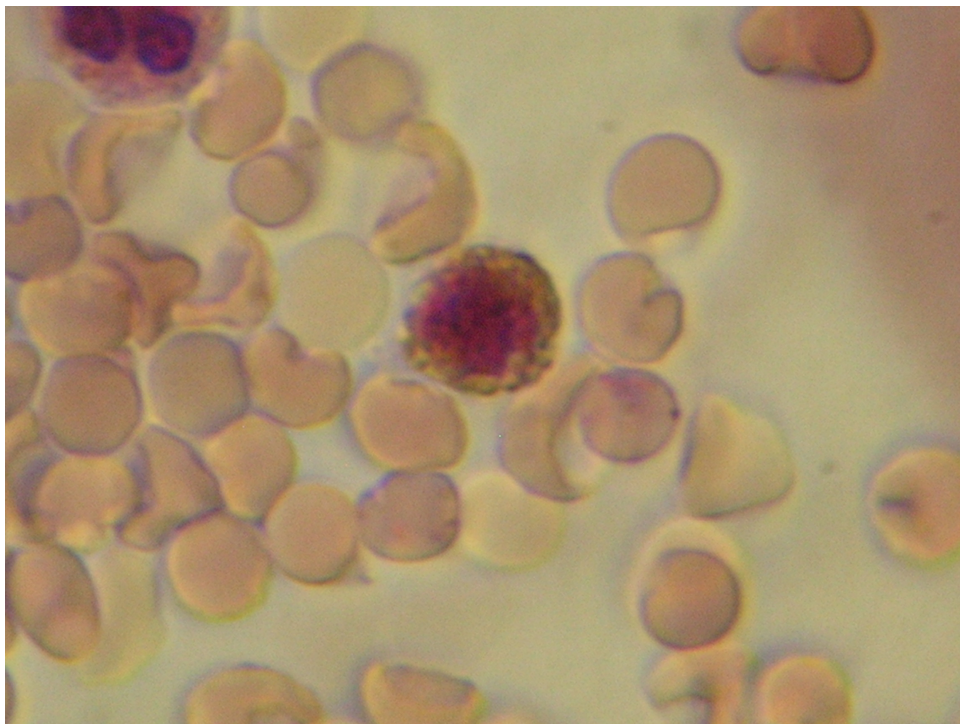


Figura 19. Un granulocita eosinofilo con le caratteristiche granulazioni arancioni. Un aumento percentuale degli eosinofili ematici induce il sospetto diagnostico di costituzione atopica o di parassitosi.

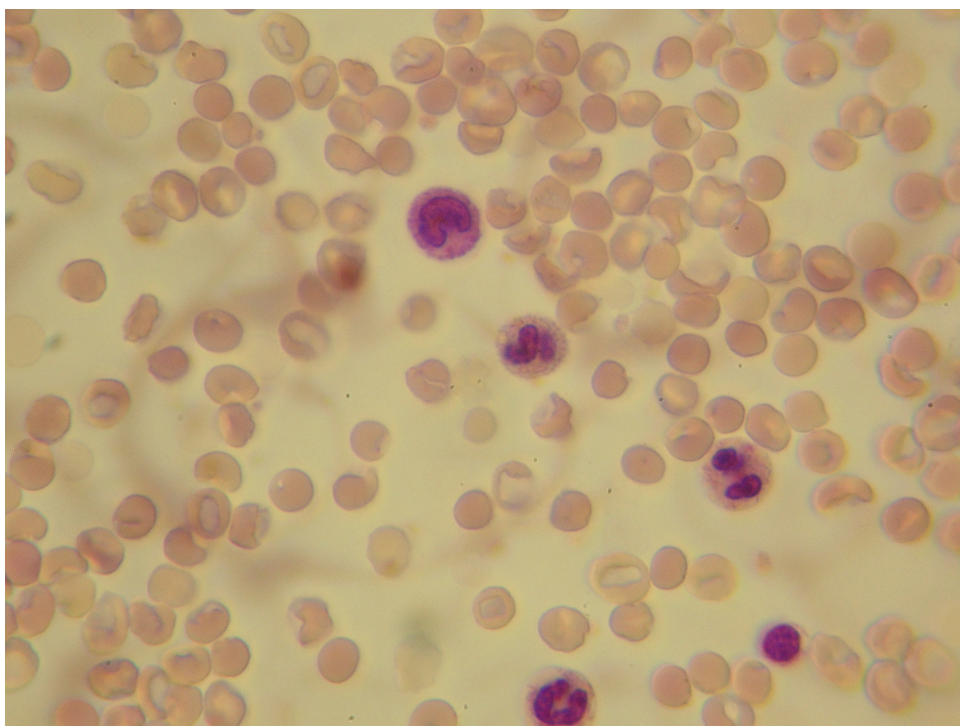


Figura 20. In alto un granulocita neutrofilo giovane con nucleo ancora non segmentato insieme a granulociti con nucleo plurisegmentato più “vecchi”. In basso a destra un piccolo linfocito.

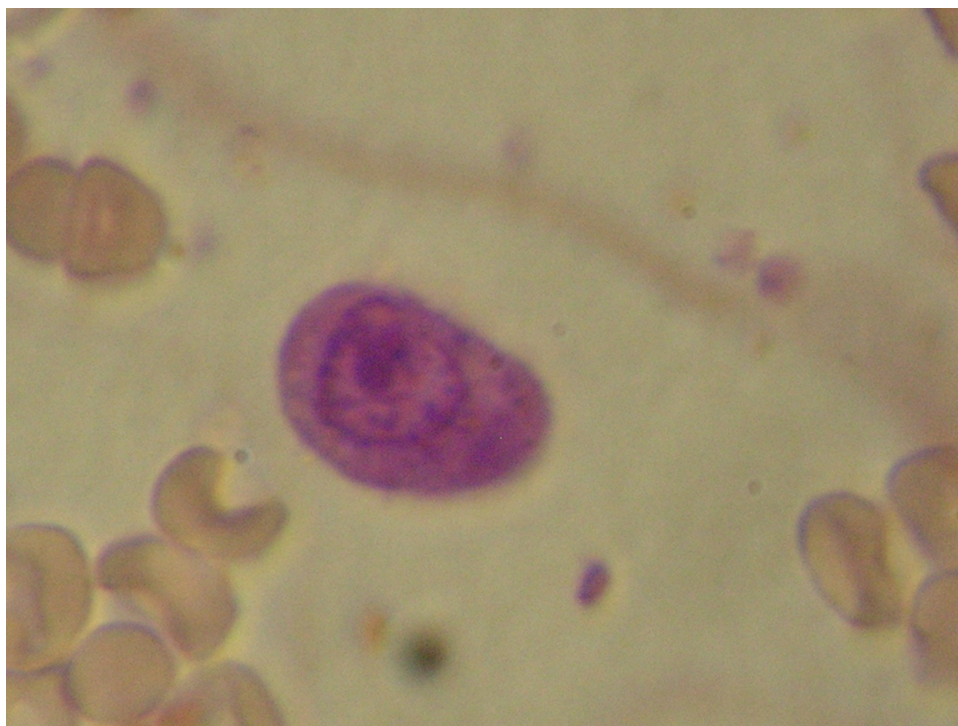


Figura 21. Linfocita atipico.

Tabella III. Comportamento dei leucociti in alcune patologie⁵.

neutrofilia	linfocitosi
Infezione batterica	Pertosse (piccoli linfociti non attivati)
Infezione da HH6 (esantema critico) solo neutrofilia moderata nei primissimi giorni poi neutropenia con linfocitosi relativa	Citomegalovirus (linfociti atipici)
Adenovirus (in grado di innalzare anche il valore di CRP)	Epstein Barr Virus (20-40% di linfociti atipici)
Enterovirus (coxackie ed echovirus)	TBC cronica (se acuta: neutrofilia)
Rotavirus	

I vetrini precolorati possono essere utilizzati anche per la valutazione del muco nasale nel sospetto di rinite allergica. Gli eosinofili risultano evidenti per le loro caratteristiche granulazioni arancioni e nidi di tali cellule diffusi nei campi di osservazione identificano una possibile diatesi allergica.

CONCLUSIONI

Nell'ambito di un possibile futuro sviluppo della Medicina e della Pediatria nel territorio con la creazione di strutture ambulatoriali più evolute ed efficienti, la possibilità di poter disporre di metodi poco cruenti che permettano di ottenere con relativa facilità e poco tempo parametri laboratoristici importanti come la conta e la formula leucocitaria, penso possano essere molto interessanti soprattutto per il Pediatra di famiglia.

Con un minimo di formazione e di impegno, ogni Pediatra può, con una spesa relativa, dotarsi di questi strumenti per migliorare la propria diagnostica ambulatoriale.

Acquisita una certa esperienza, il tempo impiegato per valutare questi parametri può essere valutato in 5 minuti circa, compatibile con una normale attività ambulatoriale.

Una alternativa può essere rappresentata dai contaglobuli automatici sempre da sangue capillare, gravati da un costo elevato e da una valutazione meccanica che non potrà mai eguagliare una visione microscopica diretta, estremamente suggestiva e positivamente soggettiva.

MESSAGGI CHIAVE

- Un valore di conta e di formula leucocitaria può essere ottenuto ambulatorialmente da pochi microlitri di sangue capillare utilizzando kit standardizzati e certificati per la raccolta, la processazione e la colorazione del campione, in aggiunta a strumenti quali la camera contaglobuli e il microscopio.
- Conoscere tali parametri ematologici è utile nel bambino con febbre da causa sconosciuta e stato generale compromesso, quando abbiamo un sospetto di appendicite (ma so-

lo per aumentare la probabilità diagnostica in caso di leucocitosi) e in tutta quella serie di patologie in cui la conoscenza del numero totale dei leucociti e la formula percentuale, possono aiutarci nella formulazione della diagnosi e/o per decidere una terapia.

- Il tempo necessario per l'esecuzione di questi esami è variabile in funzione dell'esperienza acquisita: in condizioni ottimali in non più di 5 minuti si ottengono la conta e la formula leucocitaria.
- I due esami possono essere eseguiti singolarmente, ma non è possibile eseguire una formula leucocitaria in camera contaglobuli (se non approssimativa e con difficoltà) e non è possibile eseguire una conta con i vetrini precolorati (se non una stima approssimativa a campo di osservazione).
- Il potenziamento di una struttura pediatrica ambulatoriale sul territorio comprende anche un miglioramento delle possibilità diagnostiche. Tali procedure devono però essere semplici, poco cruenti, accurate, rapide e non troppo costose. I metodi descritti per la valutazione della conta e della formula leucocitaria rispondono in modo più che sufficiente a tali requisiti.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

Cincinnati Children's Hospital Medical Center. Evidence based clinical practice guideline for fever of uncertain source in children in 2 to 36 months of age. Cincinnati (OH): Cincinnati Children's Hospital Medical Center; 2003 Oct 27. 12 p. [53 references] reviewed August 2006

Feverish illness in children. Assessment and initial management in children younger than 5 years NICE clinical guideline 47 May 2007 <http://www.nice.org.uk/nicemedia/pdf/CG47NICEGuideline.pdf>

Cincinnati Children's Hospital Medical Center. Evidence based clinical practice guideline for emergency appendectomy. Cincinnati (OH): Cincinnati Children's Hospital Medical Center; 2002 Oct. 9 p. [81 references]

The use of white blood cell count and left shift in the diagnosis of appendicitis in children. Wang LT, Prentiss KA, Simon JZ, Ryan DP. *Pediatr Emerg Care*. 2007 Feb;23(2):69-76

L'interpretazione dei leucociti nell'esame emocromocitometrico. Russo Mancuso G, La Spina M, Ragusa R, Miraglia V *Area Pediatrica N1* anno 5 Gen 2004 29-38