

Fisiopatologia Clinica

La patologia clinica si occupa delle malattie attraverso lo studio laboratoristico.

Prevenzione delle malattie: Ha lo scopo di conservare lo stato di salute e benessere ed evitare la comparsa di malattie.

Prevenzione primaria: Diretta a tutti i soggetti apparentemente in buona salute, si propone di mantenere le condizioni di benessere ed evitare la comparsa di malattie.

Medicina predittiva: Definisce il profilo di rischio individuale con l'obiettivo di ridurre il rischio (probabilità che si verifichi un evento avverso).

Prevenzione secondaria: Volta a realizzare una diagnosi precoce (spesso le alterazioni biochimiche precedono la comparsa dei sintomi). Es.

screening: alta sensibilità, produce falsi positivi ma è studiato per minimizzare i falsi negativi.

Prevenzione terziaria: Rivolta a soggetti malati, volta ad evitare complicanze e ricadute.

Diagnosi per attribuzione: Indici che quando alterati sono sufficienti per porre diagnosi. es. anticorpi anti-tTG di classe IgA per la diagnosi di celiachia (in combinazione alla titolazione delle IgA, se l'individuo ha deficit di IgA risulta negativo anche alle IgA anti-tTG ma non significa che non abbia celiachia). Oppure la misurazione di glicemia, emoglobina glicata e glicemia da carico per la diagnosi di diabete.

Diagnosi per esclusione: In molti casi si ricorre ad analisi di laboratorio per escludere ipotesi diagnostiche.

Monitorare l'andamento delle malattie: Indici correlati con l'evoluzione di una malattia. es. transaminasi. In alcuni casi permette di prevedere il decorso di una affezione. Alcuni parametri si normalizzano con la guarigione, alcuni rimangono permanentemente alterati, altri vanno tenuti sotto controllo.

Parametri per impostare la corretta terapia: Parametri che possono servire a guidare la terapia. Ad esempio antibiogramma prima di decidere terapia antibiotica oppure controllo della terapia anticoagulante (parametro PTT: Tempo di protrombina oppure ancora meglio INR: International Normalized Ratio). In alcuni casi importante anche valutare gli effetti collaterali prima che si manifestino tramite segni clinici. Parametri valutati tramite esami di laboratorio possono spiegare manifestazioni patologiche, es:

- petecchie → piastrinopenia.
- Ittero → bilirubinemia.
- Edemi periferici → ipoalbuminemia. (La carenza di proteine plasmatiche può essere dovuta a scarsa produzione, in caso di problemi a carico del fegato, oppure ad aumentata dispersione, in caso ad esempio di patologie renali come la nefrosi).

Appropriatezza prescrittiva: Si applica sia alla prescrizione di farmaci che alla prescrizione di esami di laboratorio. È preferibile limitare gli esami prescritti ad un numero ridotto ma mirati per indagare la sospetta diagnosi.

Ematologia di Laboratorio

Studia le cellule del sangue periferico sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, i precursori del midollo e gli analiti connessi con l'ematopoiesi. Studia anche l'emostasi.

I parametri emocromocitometrici possono costituire elementi decisionali per il percorso clinico.

Emocromo:

Lo studio delle cellule del sangue serve ad esempio nelle anemie (che possono avere una grande varietà di cause) e nelle malattie neoplastiche.

Comunque importante ma di rilevanza minore è lo studio delle piastrine.

Il **campione** è sangue venoso raccolto in anticoagulante (di solito EDTA, tappo lilla a Pisa, dipende dal fornitore perché non c'è standardizzazione sul colore delle provette). Il campione si conserva per poche ore a temperatura ambiente e deve essere conservato evitando scuotimenti e riscaldamento.

Parametri analizzati:

- Numerosità degli elementi: concentrazione delle singole componenti (unità per ul).
- Dati relativi ai globuli rossi:
 - Concentrazione di emoglobina (g/dl).
 - Ematocrito (%).
 - Volume degli eritrociti (fl. Sì, femtolitri) e RDW (Relativa distribuzione dei volumi, %).
 - Contenuto medio di Hb (MCH, pg/gr).
 - MCHC (???)
- Dati relativi ai globuli bianchi:
 - Numerosità delle diverse popolazioni.
 - Eventuale identificazione morfologica di cellule patologiche.
- Dati relativi alle piastrine:
 - Concentrazione.
 - Volume.

Metodi: Prima si utilizzavano metodi manuali, ad esempio la conta delle cellule tramite vetrini speciali noti come camere di conta. La concentrazione di emoglobina si misurava per spettrofotometria dopo lisi dei globuli rossi e stabilizzazione del picco di assorbimento con reattivi chimici (Durkin...). Per le formule leucocitarie si usava lo striscio di sangue con colorazione May Grunwald – Giemsa.

I macchinari disponibili oggi spesso usano gli stessi metodi ma in maniera automatizzata. In presenza di allarmi della macchina (presenza di cellule che non è in grado di classificare) sul campione si indaga al microscopio.

Eritrociti:

- **Concentrazione:** tra 4.35 e 5.65 milioni per ul nell'uomo. Tra 3.92 e 5.13 milioni nella donna.
- **Emoglobina:** tra 13.5 e 17.5 g/dl nell'uomo. Tra 12.0 e 15.5 g/dl nella donna.
- **Ematocrito:** Uomo 40-50%, donna 37-47%. Teoricamente comprende sia globuli bianchi che rossi, ma data l'estrema prevalenza dei rossi in pratica indica la quantità di globuli rossi.
- **Volume globulare medio:** tra 80 e 98 fl. La diminuzione si dice **microcitosi**, può essere associata ad anemia sideropenica o talassemie. L'opposto si dice **macrocitosi** e può essere indice di anemia da carenza di folati, carenza di vitamina B12 o epatopatie.
- **Anisocitosi:** Differenza nelle dimensioni dei globuli rossi.
- **MHC:** Mean Cell Haemoglobin. 27-33 pg/RBC (Red Blood Cell).
- **MCHC:** Mean Cell Hemoglobin Concentration, tra 33 e 36 g/dl. Tiene conto delle dimensioni dei globuli rossi, a differenza del precedente. I globuli rossi in base al loro contenuto di emoglobina si dicono **normocromici** oppure **ipocromici**. L'**ipercromia** non è quasi mai riscontrata perché il globulo rosso è normalmente saturo di emoglobina, si riscontra ipercromia quasi solo in caso di sferocitosi.
- **Poichilocitosi:** Presenza nello stesso campione di globuli rossi di forma differente.
- **Reticolociti:** sono globuli rossi giovani, immessi in circolo prima del completamento della maturazione. Hanno all'interno ribosomi ed i meccanismi per la sintesi di emoglobina. Sono normalmente tra 0.5 e 1.5% dei globuli rossi. Esprimono la richiesta di globuli rossi al midollo osseo.

I metodi di riconoscimento dei reticulociti fanno uso di fluorocromi, sono state distinte 3 classi di reticulociti: LFR (maturi), MFR (caratteristiche intermedie) e HFR (immaturi). In base alla quantità di materiale che lega i fluorocromi (decrescente con la maturazione).

Anemia Sideropenica

Caratterizzata da diminuita emoglobina e microcitosi, ipocromia e anisocitosi. È l'ultima manifestazione di una carenza di ferro.

Parametri:

- **Transferrina:** Proteina plasmatica, trasporta il ferro in tutte le sedi dove è necessario.
- **Ferritina:** Proteina molto grande con funzione di accumulo intracellulare, si riscontra anche in circolo.

Esami:

- **Sideremia:** Poco rilevante (molto variabile), si presenta basso anche in altre patologie.
- **Transferrina:** In condizioni di carenza di ferro aumenta. È un parametro che si altera abbastanza tardivamente.
- **Ferritina:** Indica lo stato dei depositi precedenti. Tra 15 e 200 ng/ml. Diminuisce in carenza di ferro quando i depositi sono depauperati. Aumenta nel sovraccarico di ferro, per lesioni agli epatociti, in condizioni di flogosi o di patologia neoplastica.

Anemia da Malattia Cronica

Caratteristiche simili alla sideropenica, associata a condizioni di flogosi. IL-6 aumenta la produzione di epcidina (diminuisce l'assorbimento di ferro). Le cellule del SRE (Sistema reticolo-endoteliale?) sequestrano ferro e non lo rendono disponibile per eritropoiesi.

Caratterizzata da transferrina bassa e ferritina alta.

Sovraccarico di Ferro

Geneticamente determinato (emocromatosi) oppure secondario (trasfusioni). In entrambi i casi si hanno danni a fegato, cuore, pancreas, articolazioni.

Anemia da ridotta produzione di globine

Anemia da varianti globiniche

(Vedi Corti e Pompella).

Esami: Corsa elettroforetica, HPLC su colonna, assetto emoglobinico.

Anemie Macrocitiche

([Meglio qui](#))

Possono essere dovute a carenza di vitamina B12 o folati. La carenza di B12 può anche essere dovuta a malassorbimento (es. gastrite autoimmune, atrofia gastrica, resezione gastrica), può causare anche danni neurologici (ad esempio negli anziani in cui avviene comunemente atrofia gastrica).

In carenza di B12 possono essere presenti neutrofili ipersegmentati (numero di lobi del nucleo superiore a 5).

Gastrite Autoimmune

Autoanticorpi contro pompa potassio-idrogenioni di membrana o anti fattore intrinseco.

Si rilevano autoanticorpi controlla parete in immunofluorescenza e contro ATPasi con test ELISA. Possono essere presenti anche anticorpi contro fattore intrinseco.

Macrocitosi in corso di Epatopatia

Si presenta con o senza anemia, in concomitanza si presentano alterati altri esami in corso di epatopatia cronica.

Strumenti diagnostici: MCV > 100 fl, Hb e GR diminuiti, MCH aumentato con MCHC normale. Si riscontrano neutrofili ipersegmentati.

B12 < 200 pg/ml, folati < 2 ng/ml.

Anemia da aumentata produzione di Globuli Rossi

(Vedi Corti)

Anemie emolitiche

Possono dipendere da malformazioni strutturali del globulo rosso, oppure da anticorpi contro antigeni propri del globulo rosso.

Autoanticorpi: anticorpi anti-self.

Alloanticorpi: anticorpi diretti contro proteine espresse da altri alleli presenti nella specie ma non nell'individuo (es. risposta immunitaria contro sangue trasfuso di gruppo diverso).

L'emolisi è in genere extravascolare, spesso data da IgG.

Metaemoglobinemia

Emoglobina legata a Fe(III) invece che Fe(II), non è capace di legare ossigeno. Quando supera il 10% si ha cianosi, in prevalenza alle estremità.

È indice di malfunzionamento dei sistemi riducenti interni all'eritrocita o di avvelenamento da sostanze che distruggono i sistemi riducenti, come ad esempio cianuro.

Può essere dovuta a fattori genetici (deficit di citocromo B5 riduttasi).

Carbossiemoglobina

Emoglobina legata a CO, colora di rosso ciliegia le mucose.

Metaemoglobina e carbossiemoglobina si determinano con **emogasanalisi**.

Globuli bianchi

Si riconoscono al microscopio dopo colorazione. Tra 1000 e 4000 ul⁻¹ (TODO da rivedere).

Granulociti neutrofili: dal 40 al 70% del totale.

Eosinofili: Presenti in allergie e parassitosi. Tra 0 e 5% del totale.

Basofili: Simili ai mastociti, tra 0 e 1%.

Linfociti: Tra 19 e 48% del totale.

Monociti: Tra il 3 ed il 9% del totale.

Leucocitosi neutrofila

Può essere dovuta a de-marginazione, rilascio in circolo di neutrofili precedentemente legati alle pareti. Succede in caso di stress o somministrazione di cortisone.

Tra le cause legate ad eventi patologici si hanno infiammazioni di varia origine, infezioni (prevalentemente batteriche), necrosi tissutali (traumi, ustioni, infarti). Tumori.

Tra le cause non patologiche abbiamo esercizio fisico e gravidanza.

Eosinofilie

patologie allergiche, infezioni parassitarie, produzione stimolata da IL-5.

Linfocitosi

Numero più alto nei bambini, virus con tropismo per linfociti (EBV, CMV). Tossine (BT) che promuove la fuoriuscita da midollo e milza.

Si presentano aumentati in malattie linfoproliferative come leucemia o linfoma.

Leucemie

processo neoplastico a carico del tessuto emopoietico, solitamente con invasione del sangue. Tropismo preferenziale per fegato, milza e linfonodi (metastasi).

Verranno trattate meglio in altri corsi.

Esami: emocromo, esame morfologico del sangue periferico o del midollo, immunofenotipizzazione, caratterizzazione molecolare (aberrazioni cromosomiche).

Il laboratorio nelle leucemie

Emocromo, esame morfologico del sangue periferico e del midollo, immunofenotipizzazione, caratterizzazione molecolare (aberrazioni cromosomiche).

Citofluorimetria: Lavora su elementi cellulari, esegue valutazioni qualitative e quantitative su popolazioni cellulari. Sfrutta lo scattering e la fluorescenza degli elementi ematici marcati da fluorocromi che legano molecole di superficie in risposta ad un raggio luminoso (laser).

Principali applicazioni: definizione del fenotipo ed enumerazione dei linfociti circolanti, enumerazione dei linfociti CD4+ nell'infezione da HIV, immunofenotipo delle leucemie acute, immunofenotipo delle patologie linfoproliferative croniche.

In un tipo particolare di leucemia si ha aumento di presenza dei linfociti che esprimono sia CD19 che CD4.

Piastrine

Elementi fondamentali nell'emostasi, valori normal 150 000-350 000 unità/ul.

Si valuta anche il volume: è più alto appena immesse in circolo e gradualmente diminuiscono in volume invecchiando.

Piastrinopenie (o trombocitopenie):

Possono essere causate da ridotta produzione oppure aumentata distruzione, si dividono in **immunomEDIATE**, date da autoanticorpi o alloanticorpi contro antigeni di superficie delle piastrine o antigeni adsorbiti su di esse, oppure **piatrinopenie non immunomEDIATE**, causate ad esempio da farmaci immunosoppressori.

Segni: emorragie mucocutanee, petecchie, ecchimosi, gengivorragie, epistassi.

Piastrinosi (o trombocitosi): Da infiammazione (fino a 1 mln per ul) oppure neoplastiche (trombocitemia essenziale, molto alti i numeri ma sono piastrine poco funzionali).

Emostasi

Insieme di meccanismi che evita la perdita di sangue da discontinuità vasali e permette al sangue di mantenersi fluido. Esiste un equilibrio tra attività anticoagulante e sistema procoagulante. Se si verifica uno squilibrio si verificano trombosi o emorragie.

La risposta alla lesione del vaso deve essere rapida, localizzata e controllata. La lesione del vaso provoca rilascio di agenti vasocostrittori, l'adesione, attivazione ed aggregazione delle piastrine circolanti nella sede del danno, il rinforzo del trombo piastrinico con l'attivazione della coagulazione.

Fattore di von Willebrand: frammentato dalla proteasi ADAMTS-13.

Patologie quantitative: analisi numerica e volume medio nel sangue periferico oppure dei megacariociti nel midollo (se si sospetta disfunzione della produzione midollare).

Piastrinopenia da eparina: esempio di piastrinopenia da farmaco

- Tipo I: transitoria, di entità modesta e spontaneamente regredibile.
- Tipo II: severa, può essere associata a fenomeni trombotici. Legame di eparina a FP4, il complesso si lega alle piastrine, un anticorpo diretto verso il complesso determina aggregazione ed amplificazione.

Piastrinopenie da diminuita produzione: Da disordini geneticamente determinati, da occupazione midollare tumorale, da aplasia midollare, da atrombocitopenia inefficace.

Pseudopiastrinopenie: artefatto dell'analisi che fa apparire il numero di piastrine più basso del valore vero, può essere causato da EDTA (sequestro di calcio, scopre epitopi che legano Ac già presenti che agglutinano), da agglutinine temperatura-dipendenti o da satellitosi piastrinica (piastrine aderiscono ai neutrofili).

Patologie a carico delle piastrine: piastrine presenti ma poco funzionali. Scarsa adesività o scarsa capacità di aggregazione.

Valutazione complessiva della funzionalità piastrinica: tempo di sanguinamento, PFA (platelet function assay, fa correre un campione di sangue su membrane ricoperte da collagene e si misura il tempo di occlusione di una apertura centrale).

Valutazione della capacità di aggregazione piastrinica: Sul plasma ricco di piastrine (ottenuto per centrifugazione calibrata in modo da far precipitare gli elementi più pesanti ma non le piastrine) si valuta l'aggregazione dovuta all'aggiunta di agenti aggreganti come ADP, adrenalina, collagene, ristocetina, acido arachidonico. È possibile che con agenti aggreganti diversi si abbiano risultati diversi. Si valutano: **tempo di aggregazione, aggregazione massima e tempo di latenza tra aggiunta dell'aggregante ed inizio dell'aggregazione.**

Valutazione del fattore di von Willebrand: Valutato come proteina tramite ELISA, oppure viene valutata la sua attività legata alle piastrine (attività di cofattore ristocetinico, capacità di legame del collagene). Oppure ancora analisi dei multimeri tramite risoluzione in SDS-agarosio e immunoblotting.

Malattie di von Willebrand

Difetti quantitativi:

- **Tipo 1:** il più frequente, lieve difetto quantitativo, qualitativamente normale.
- **Tipo 3:** Difetto quantitativo da gene non funzionale (associato anche a funzionalità ridotta del fattore 8 della coagulazione).

Difetti qualitativi:

- **Tipo 2:** molti sottotipi, 2A: pochi multimeri prodotti per difetto nella polimerizzazione o aumentata sensibilità ad ADAMTS-13. 2B: multimeri sottratti al circolo (superiore capacità di legame alle PLT).

Pseudo von Willebrand: stessa sintomatologia, diminuita quantità di vWF ad alto peso molecolare, associato a piastrinopenia. Il difetto è a carico del recettore GP1b che ne aumenta l'affinità.

IMPORTANTE: prima di condurre qualunque indagine sulla funzionalità coagulativa è bene sospendere i farmaci con azione anticoagulativa (anticoagulanti specifici ma possono interferire anche FANS, alcuni beta-lattamici e altro).

Patologie funzionali delle piastrine:

Sindromi mieloproliferative acute o croniche.

Uremia.

Malattia di von Willebrand acquisita (es. comparsa di fenomeni autoimmuni che rimuovono fattore di von Willebrand dal circolo, più frequente di ciò che si pensa).

Porpora trombotica trombocitopenica:

Distruzione non immunologica delle piastrine dovuta a ridotta attività di ADAMTS-13.

Trombocitopenia e anemia emolitica microangiopatica.

Eziologia: anticorpi anti-ADAMTS-13.

Associata ad evidenze di emolisi: reticolociti aumentati, aptoglobina diminuita, bilirubina e LDH aumentati. Test di Coombs (anticorpi anti-emazie) negativo.

I fattori della coagulazione devono subire gamma-carbossilazione in fase post-traduzionale per raggiungere la conformazione definitiva, questo processo richiede vitamina K, infatti molti anticoagulanti funzionano da antagonisti della vitamina K.

Test per la coagulazione:

Test di screening: tempo di protrombina (PT) e aPTT (activated partial tromboplastin time).

Dosaggio del fibrinogeno.

PT: valuta la via estrinseca (e della via comune). Serve anche per monitorare le terapie anticoagulanti. Dato che i reattivi usati hanno attività diversa sono espressi anche con valore normalizzato INR.

APTT: valuta la via intrinseca, serve a monitorare la terapia con eparina.

Se i primi test risultano alterati si eseguono test di approfondimento.

Ricerca di fattori interferenti (test di correzione):

In presenza di tempi allungati PT o aPTT. Si mescola 1:1 con plasma normale e si ripete il test, se si corregge il problema il plasma normale ha fornito un componente che risultava mancante nel plasma iniziale, se invece il test rimane alterato si sospetta la presenza di un interferente.

Esempio: LLAC (auto-anticorpi contro fosfolipidi), si individua un allungamento dei tempi di coagulazione in un test fosfolipide-dipendente. In presenza di eccesso di fosfolipidi si corregge (gli autoanticorpi sono saturati).

Dosaggio di singoli fattori:

test complesso, si esegue in seguito di altri test anormali.

Test genetici: utili nella determinazione di patologie dell'emostasi geneticamente determinate. Eseguiti in caso di ripetuti eventi trombotici o familiarità.

Patologie emorragiche:

Es. emofilia A: deficit di fattore 8, caratterizzata da emorragie profonde. Si presenta con aPTT allungato e PT e funzionalità piastrinica normali.

L'aggiunta di plasma corregge l'allungamento. Si dosano fattori della via intrinseca.

Emofilia B: deficit di fattore 9, simile alla A, vari gradi di severità.

Patologie trombotiche:

Trombofilie acquisite: paziente chirurgico o APS (sindrome da anticorpo anti-fosfolipide).

Trombofilie ereditarie: Fattore V di Leyden (non è un typo, è olandese arcaico) (una volta attivato il fattore mutato non viene degradato dalla proteina C), mutazione 20210 protrombina (mutazione del promotore che induce la produzione di maggiori quantità di proteina), MTHFR (metil-tetraidrofolato-reduttasi, accumulo di omocisteina).