

## ORIGINAL ARTICLE

# Quantificazione delle piastrine e dei leucociti nei concentrati piastrinici solidi del sangue per uso chirurgico: studio di una tecnica sperimentale

Alessandro CRISCI <sup>1, 2 \*</sup>, Tomoyuki KAWASE <sup>3</sup>, Raffaele D'ADAMO <sup>2</sup>, Michela CRISCI <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Scuola Medica Salernitana, Department of Medicine, Surgery and Dentistry, University of Salerno, Fisciano, Salerno, Italy; <sup>2</sup>Unit of Skin Surgery, Skin Transplants and Difficult Wounds, Villa Fiorita Nursing Home, Aversa, Caserta, Italy; <sup>3</sup>Division of Oral Bioengineering, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University, Niigata, Japan; <sup>4</sup>Department of Surgery, Faculty of Medicine and Surgery, Vasile Goldis Western University of Arad, Arad, Romania

\*Corresponding author: Alessandro Crisci, Scuola Medica Salernitana, Department of Medicine, Surgery and Dentistry, University of Salerno, Fisciano, Salerno, Italy. E-mail: [alcrisci@unisa.it](mailto:alcrisci@unisa.it)

## RIASSUNTO

**OBIETTIVO:** Granulociti neutrofili e piastrine sono chiave nella guarigione delle ferite e, in combinazione con i fattori di crescita/citochine secreti, facilitano la rigenerazione dei tessuti e la formazione di nuovi vasi sanguigni. Alcuni studi hanno mostrato un metodo per la stima diretta della conta piastrinica nel PRF tramite un t-PA ricombinante attraverso un metodo di digestione.

**METODI:** Gli autori hanno elaborato i dati ottenuti nelle figure e nelle tabelle relative al lavoro pubblicato dal gruppo dell'Università di Niigata (Niigata, Giappone) e hanno valutato lo scostamento percentuale tra "conta con t-PA" e valori di piastrine (PLT) e leucociti (WBC) con "conta per sottrazione" e con "conta per emocromo" con l'uso del "metodo statistico".

**RISULTATI:** Riducendo del 34,35% il valore dei leucociti ottenuti col metodo di sottrazione, si ottiene il valore riportato con il metodo con t-PA; riducendo del 19,69% il valore delle piastrine nella membrana di PRF ottenute con lo stesso metodo, si ottiene il valore riportato con il metodo con t-PA; riducendo del 34,12% il valore dei leucociti ottenuti dall'esame emocromocitometrico, si ottiene il valore riportato con t-PA; e riducendo del 15,12% il valore delle piastrine ottenute con lo stesso metodo, si ottiene il valore riportato con il metodo di digestione con t-PA.

**CONCLUSIONI:** Gli autori con questo esperimento hanno reso possibile validare un sistema semplice e poco costoso per calcolare il numero preciso di piastrine e leucociti presenti nei concentrati piastrinici di seconda generazione, rendendo facile valutare le singole matrici di PRF in modo tempestivo in ambito clinico.

**PAROLE CHIAVE:** Fibrina ricca di piastrine; piastrine nel sangue; Attivatore tissutale del plasminogeno.

## ABSTRACT

QUANTIFICATION OF PLATELETS AND LEUKOCYTES IN SOLID BLOOD PLATELET CONCENTRATES FOR SURGICAL USE: STUDY OF AN EXPERIMENTAL TECHNIQUE

**BACKGROUND:** Neutrophil granulocytes and platelets are key in wound healing and, in combination with secreted growth factors/cytokines, they facilitate tissue regeneration and the formation of new blood vessels. Some studies showed a method for direct estimation of platelet counts in the PRF by using a recombinant t-PA through a digestion method.

**METHODS:** Authors have elaborated the data obtained in the figures and tables related to the work published by the Niigata University (Niigata, Japan) group and have evaluated the percentage deviation between "counts with t-PA" and PLT and WBC values with "counts for subtraction" and with "counts for blood count" with the use of a "statistical method."

**RESULTS:** By reducing the value of leukocytes obtained by the subtraction method by 34.35%, the value reported with the t-PA method is obtained; reducing the value of the platelets in the PRF membrane obtained from the same method by 19.69%, the value reported with the t-PA method is obtained; reducing the value of leukocytes obtained from the blood count by 34.12%, the value reported with the t-PA method is obtained; and by reducing the value of the platelets obtained with the same method by 15.12%, the value reported with the method is obtained from digestion with t-PA.

**CONCLUSIONS:** With this experiment the authors made it possible to validate a simple and inexpensive system for calculating the precise number of platelets and leukocytes present in second-generation platelet concentrates, making it easy to evaluate individual PRF matrices in a timely manner in a clinical setting.

(Cite this article as: Crisci A, Kawase T, D'Adamo R, Crisci M. Quantificazione delle piastrine e dei leucociti nei concentrati piastrinici solidi del sangue per uso chirurgico: studio di una tecnica sperimentale. *Chirurgia* 2021;34:000-000. DOI: 10.23736/S0394-9508.20.05129-3)

**KEY WORDS:** Platelet-rich fibrin; Blood platelets; Tissue-plasminogen activator.

Il campo multidisciplinare dell'ingegneria tissutale mira a riparare, rigenerare o ripristinare in modo prevedibile i tessuti danneggiati.

Sviluppato da Choukroun, il PRF (fibrina ricca di piastrine [*platelet-rich fibrin*]) ha una tecnica semplice, veloce, economica e "ad accesso libero" che si traduce nella formazione di un coagulo di fibrina ricca di piastrine e leucociti intrappolati in esso. Il L-PRF differisce da altre forme di concentrati piastrinici (HPC) poiché il suo protocollo di produzione sfrutta le proprietà della coagulazione inerenti al sangue intero senza la necessità di modifiche biochimiche. Quindi nega l'uso di additivi come anticoagulanti, trombina, cloruro di calcio o conservanti sintetici. Il protocollo originale PRF richiede che il sangue venoso venga prelevato dal paziente e depositato in provette di vetro asciutto da 10 ml. Il coagulo PRF è intrinsecamente carico con piastrine, leucociti e fattori di crescita. Questi fattori di crescita iniziano a liberarsi dalla matrice PRF entro 5-10 minuti dalla formazione del coagulo e continuano a essere liberati per 60-100 ore.<sup>1</sup> Schär *et al.*<sup>2</sup> ha mostrato un rilascio costante di fattori di crescita e cellule staminali attive per un periodo di 28 giorni. Ciò indica che il coagulo PRF è un serbatoio di cellule inattive e attive in grado di interagire con le cellule e le molecole native del sito in cui è applicato. A-PRF™ (PRF avanzato; PRF Process; Nizza, Francia) ha uno sviluppo relativamente recente basato su un'ipotesi che afferma che una riduzione della forza di centrifugazione relativa (forza G), riducendo la velocità di centrifugazione, aumenterebbe il numero di leucociti (in particolare neutrofili e macrofagi) all'interno della matrice PRF (LSCC – concetto di centrifugazione a bassa velocità).<sup>3,4</sup>

Choukroun<sup>5</sup> afferma che A-PRF™ è stato sviluppato principalmente nel tentativo di includere i monociti all'interno della rete di fibrina poiché queste cellule svolgono un ruolo essenziale nella crescita delle ossa, dei vasi sanguigni e nella produzione di due chemiochine, quella del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e quello della proteina morfogenica dell'osso (BMP-2). Ghanaati *et al.*<sup>3</sup> hanno studiato questo concetto e hanno scoperto che A-PRF™ contiene significativamente più granulociti neutrofili e una loro distribuzione più ampia nel coagulo di fibrina rispetto a L-PRF. Il gruppo ha anche scoperto che, istologicamente, la distribuzione piastrinica è più omogenea in tutto il coagulo A-PRF™ rispetto al coagulo L-PRF. È stato dimostrato inoltre che A-PRF™ rilascia quantità totali significativamente maggiori di fattori di crescita rispetto a L-PRF preparato a 2700 rpm (325G) per 12 minuti.<sup>4</sup> Il protocollo di elaborazione di A-PRF™ sembra, però,

essersi evoluto all'interno della letteratura. Studi precedenti mostrano un protocollo di centrifugazione di 1500 rpm (252G) per 14 minuti,<sup>3,4</sup> mentre studi più recenti hanno utilizzato una velocità di centrifugazione di 1300 rpm (189G) per 14 minuti per la produzione di A-PRF™ e 1300 rpm (189G) per 8 minuti per produrre A-PRF+. L'attuale protocollo di elaborazione A-PRF™ prevede l'uso di una nuova centrifuga preprogrammata (PRF DUO®, PRF Process), un kit per la raccolta del sangue standardizzato e una provetta a vuoto brevettata da 10 ml in vetro. La centrifuga DUO è in grado di produrre il classico L-PRF, A-PRF™ e per ultimo anche i-PRF™ (iniezzabile PRF™).

Il numero delle piastrine è una quantità, ma è stato accettato come uno dei principali indici per garantire la qualità delle piastrine presenti.<sup>6</sup> Tuttavia, fino agli studi attuali, c'è mancanza di un metodo per la determinazione accurata della conta piastrinica nei vari tipi di gel.

Tra la maggior parte dei clinici studiosi della terapia rigenerativa tissutale, è stato generalmente accettato che le piastrine sono altamente concentrate nel *buffy coat* e sono difficilmente presenti in altre frazioni vicine, in particolare nella frazione dei globuli rossi (RBC), dopo il frazionamento attraverso la centrifugazione.

Questo concetto non si applica alla valutazione dell'efficacia delle concentrazioni piastriniche in campioni liquidi, i quali possono essere quantificati con un semplice emocromo, ma è specialmente esteso alla valutazione della conta piastrinica in concentrati piastrinici solidi auto-compressi (A-PRF, L-PRF, PRP e fattori di crescita concentrati [CSFG]). Poiché le piastrine non hanno nuclei, il loro conteggio non può essere determinato attraverso il contenuto di DNA. Pertanto, per determinare il conteggio delle piastrine nei coaguli di fibrina, al momento viene applicato un calcolo attraverso il "metodo di sottrazione"<sup>7,8</sup> o "di simulazione"<sup>9</sup> (Tabella I).<sup>7-10</sup>

Secondo il metodo di sottrazione, la conta piastrinica contenuta nei coaguli di fibrina viene effettuata sottraendo in numero di piastrine contenute nell'essudato del coagulo (Surface post-compression), nel siero supernatante (PPP) e nella frazione di globuli rossi (cioè il trombo rosso) da quelle presenti nel campione di sangue intero iniziale. Tuttavia, questo metodo non considera la possibilità della presenza di piastrine nella frazione RBC o la possibile perdita e il danneggiamento delle piastrine durante l'elaborazione per il conteggio delle cellule.

Nonostante l'uso clinico di PRF negli ultimi 15 anni nessuna ricerca fino ad oggi è riuscita a quantificare in modo diretto, semplice ed efficace il numero di piastrine e leucociti presenti in questo e negli altri concentrati pia-

TABELLA I.—Confronto tra la conta di piastrine, di leucociti e di eritrociti con i vari metodi.

Leucociti (WBC)	Dohan <i>et al.</i> <sup>7</sup> (2010) %		Crisci <i>et al.</i> <sup>8</sup> (J. Unexplored Med. Data 2017)* %		Watanabe <i>et al.</i> <sup>9</sup> (MDPI 2017) A-PRF %		Kitamura <i>et al.</i> <sup>10</sup> (2018) %	
Sangue intero	69×10 <sup>2</sup> /μl	100,00	51,5×10 <sup>2</sup> /μl	100,00	45,0×10 <sup>2</sup> /μl	100,00	36,22×10 <sup>2</sup> /μl	100,00
Coagulo rosso	35×10 <sup>2</sup> /μl	50,7	0,085×10 <sup>2</sup> /μl	0,16	1,0×10 <sup>2</sup> /μl	2,22	n.r.	n.r.
PRF	33,7×10 <sup>2</sup> /μl	48,8	51,1×10 <sup>2</sup> /μl	99,24	580,0×10 <sup>2</sup> /μl	?	26,73×10 <sup>2</sup> /μl	73,8
Siero sopra coagulo (PPP)	n.r.	n.r.	0,0002×10 <sup>2</sup> /μl	0,00	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Superficie post-compressione	n.r.	n.r.	0,3×10 <sup>2</sup> /μl	0,58	1,5×10 <sup>2</sup> /μl	3,33	n.r.	n.r.
Globuli rossi (RBC)								
Sangue intero	5,19×10 <sup>6</sup> /μl	100,00	7,65x 10 <sup>6</sup> /μl	100,00				
Coagulo rosso	5,8×10 <sup>6</sup> /μl	111,7	7,39×10 <sup>6</sup> /μl	96,6				
PRF	0×10 <sup>6</sup> /μl	0,0	0,216×10 <sup>6</sup> /μl	0,0028				
Siero sopra coagulo (PPP)	n.r.	n.r.	0,002×10 <sup>6</sup> /μl	0,00				
Superficie post-compressione	n.r.	n.r.	0,013×10 <sup>6</sup> /μl	0,16				
piastrine (PLT)								
Sangue intero	2,66×10 <sup>5</sup> /μl (266.000)	100,00	1,06×10 <sup>5</sup> /μl (106.780)	100,00	0,25×10 <sup>5</sup> /μl (25.000)	100,00	1,524×10 <sup>5</sup> /μl (152.400)	100,00
Coagulo rosso	0,06×10 <sup>5</sup> /μl (6.000)	0,02	0,005×10 <sup>5</sup> /μl (500)	0,47	0,00×10 <sup>5</sup> /μl (000)	0,0	n.r.	n.r.
PRF	2,6×10 <sup>5</sup> /μl (260.000)	97,7	1,05×10 <sup>5</sup> /μl (105.801)	99,00	3,2×10 <sup>5</sup> /μl (320.000)	?	1,27×10 <sup>5</sup> /μl (127.000)	83,3
Siero sopra coagulo (PPP)	n.r.	n.r.	0,0002×10 <sup>5</sup> /μl (2)	0,002	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Superficie post-compressione	n.r.	n.r.	0,0048×10 <sup>5</sup> /μl (479)	0,45	0,00×10 <sup>5</sup> /μl (000)	0,0	n.r.	n.r.
Metodo usato			Metodo per sottrazione		Metodo per simulazione		Metodo per conta con t-PA	

\*Valori nel cavallo.  
n.r.: non riportato.

strinici, in modo da metterlo in relazione al loro potenziale rigenerativo. La presenza di leucociti ha inoltre un grande impatto sulla biologia della guarigione delle ferite, non solo per il rilascio aggiuntivo di fattori di crescita e le loro implicazioni nella difesa immunitaria antibatterica, ma anche perché sono i regolatori chiave che controllano la guarigione delle ferite, attraverso la regolazione dei fattori di crescita locali.

La ricerca di base futura dovrebbe infatti concentrarsi specificamente sul contributo di queste cellule in specifici sistemi di *knock-down/knock-in* delle cellule per determinare i ruoli funzionali di ciascun tipo cellulare nel processo di guarigione della ferita quando viene utilizzato il PRF. Quindi, in teoria, il concetto di sviluppare nuovi protocolli modificati di PRF per aumentare ulteriormente il numero di globuli bianchi porterebbe, in linea di principio, ad aumentare la capacità di riparazione della ferita. Ciò nondimeno, una migliore comprensione dei singoli ruoli delle varie cellule trovate nel PRF potrebbe rivelarsi una scoperta importante per lo sviluppo di queste tecnologie, e porterebbe a cambiamenti moderni dei loro protocolli e ad aumentare ulteriormente il loro potenziale rigenerativo.

Per facilitare la realizzazione di ispezioni individuali di

qualità, Kitamura *et al.*<sup>10</sup> hanno sviluppato un metodo per determinare direttamente la conta piastrinica e di leucociti in una matrice di PRF insolubile utilizzando la procedura di digestione con tessuto-plasminogeno attivatore (t-PA alteplase) (GRTPA®; Mitsubishi Tanabe Pharma Corp., Osaka, Giappone) (Figura 1).<sup>10</sup> Tuttavia, con questo metodo è difficile valutare le singole matrici di PRF in modo tempestivo in ambito clinico. Al contrario, però, un'efficace standardizzazione della preparazione e dell'applicazione pratica pur non garantendo la qualità delle singole matrici di PRF, si prevede che possa minimizzare efficacemente la variabilità e massimizzare l'efficacia negli stessi campioni di sangue, coerentemente con altri tipi di protocolli di preparazione di concentrati piastrinici. I principali vantaggi del metodo proposto da Kitamura *et al.* sono: 1) alta precisione; 2) semplice procedura; 3) non abilità tecnica; e 4) nessuna limitazione ai tipi di matrice di fibrina. I principali svantaggi sono: 1) lunghi tempi di completamento; 2) costo del reagente (t-PA); 3) requisiti dell'incubatore; e 4) le provette aggiuntive necessarie per l'analisi dei fattori di crescita.

Pertanto, in questo studio gli autori partendo, dai risultati ottenuti nel lavoro di Kitamura hanno voluto elaborare un sistema più semplice e poco costoso per calcolare il

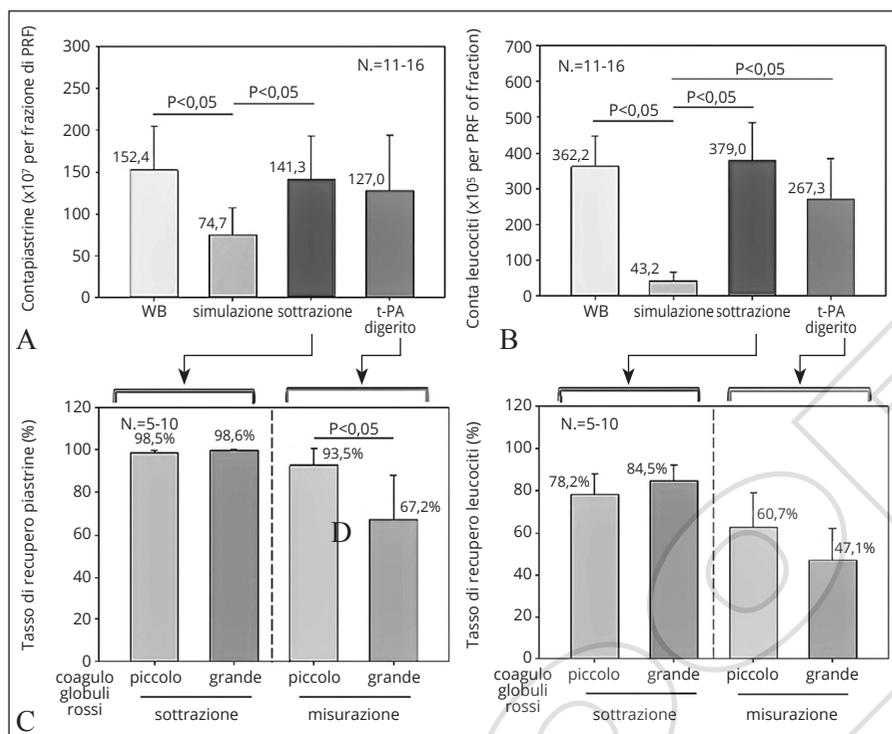


Figura 1.—Confronto tra i metodi di conteggio delle piastrine e dei globuli bianchi (simulazione vs. sottrazione vs. digestione). A, B) Conta piastrine e WBC in fibrina ricca di piastrine (coaguli PRF e le corrispondenti frazioni preparate da campioni di sangue intero [N.=11-6]). C, D) La relazione tra e WBC conta nei coaguli di PRF e le dimensioni dei trombi rossi (piccolo vs. grande) (N.=5-10). Modificato da Kitamura *et al.*<sup>10</sup>

numero preciso di piastrine e leucociti presenti nel PRF, rispetto a quello presente nel sangue intero, partendo sia dal “metodo di sottrazione” che da un semplice “esame emocromocitometrico”.

### Materiali e metodi

Partendo dallo studio di Kitamura *et al.* (Figura 1),<sup>10</sup> gli autori hanno voluto:

- valutare lo scostamento percentuale tra la conta con t-PA e i valori di PLT e WBC ottenuti con il “metodo di sottrazione”, per cui addizionando o sottraendo la differenza percentuale calcolata, al valore ottenuto con il metodo di sottrazione, si ipotizza di ottenere il valore derivato con metodo t-PA. Il procedimento per la conta con “metodo di sottrazione” è eseguito come descritto da Watanabe *et al.*<sup>9</sup> secondo l’equazione:

$$PLT/WBC \text{ in A-PRF e L-PRF} = PLT/WBC \text{ nel sangue intero} - [(PLT/WBC \text{ nel coagulo rosso}) - (PLT/WBC \text{ nel siero sopra il coagulo di PRF}) - (PLT/WBC \text{ nel soprannatante dopo compressione del coagulo PRF})]$$

- valutare lo scostamento percentuale tra la conta con t-PA e i valori di PLT e WBC ottenuti con un emocromo (W.B.), per cui addizionando o sottraendo la differenza

percentuale calcolata, al valore ottenuto con un esame emocromocitometrico, si può avere il valore ottenuto con metodo per conta con t-PA.

L’esame emocromocitometrico di base è eseguito utilizzando provette con EDTA K3E 5,4 mg (Vacumetrics Inc.; Ventura, CA, USA) e condotto con un Contaglobuli Cell Dyn 3500 R (Abbott Laboratories; Abbott Park, IL, USA).

La validità e la precisione delle misurazioni è stata valutata attraverso il Coefficiente di Variazione, considerando validi i valori se esso è <2% su almeno tre misurazioni.

L’ipotesi zero ( $H_0$ ) formulata è che non vi è differenza statisticamente significativa tra i valori misurati con “metodo t-PA” e i valori col “metodo di sottrazione”  $\pm X\%$  e tra i valori misurati con il “metodo t-PA” e i valori misurati con il “metodo per emocromo” (W.B.)  $\pm X\%$ , sia per PLT che WBC. Formalmente:

$$H_0: t-PA = \text{Met. Sottr. (PLT)(WBC)} \pm X\%; t-PA = \text{W.B. (PLT)(WBC)} \pm X\%$$

La relazione tra le variabili è stata valutata effettuato il calcolo del coefficiente di correlazione di Pearson-Bravais tra t-PA e Met.Sottr.  $\pm X\%$  e tra t-PA e W.B.  $\pm X\%$ , sia per PLT che WBC, nel PRF solido.

Il grado di concordanza osservato nel coefficiente di correlazione è stato generalmente classificato come: mo-

derato se il coefficiente  $r$  è compreso tra 0,65 e 0,8, buono se il valore è compreso tra 0,8 e 0,9 e ottimo se è  $>0,9$ . Come intervallo di Significatività Statistica viene utilizzato un intervallo di confidenza (IC) al 95%.

Per verificare l'ipotesi zero ( $H_0$ ) viene utilizzato il test della varianza a un criterio (ANOVA) tra t-PA e Met. Sottr.±X% e tra t-PA e W.B.±X% per PLT e WBC nel L-PRF e in altri tipi di concentrato piastrinico (PC) solidi autocomprimibili, successivamente sono stati utilizzati altri due test di significatività: il test  $t$  parametrico di Student e il  $\chi^2$ .

I dati grezzi rilevati con metodo di conta con t-PA, sono stati forniti dal gruppo di lavoro dell'Università di Niigata, Giappone. Da questi si è proceduto all'Analisi Statistica e ai Confronti col "metodo per sottrazione" e con il "metodo per emocromo"<sup>14</sup>.

Questo calcolo permetterà di giustificare statisticamente l'uso di Met.Sottr.±X% e W.B.±X% al posto di t-PA nella valutazione della conta di piastrine e di leucociti nel L-PRF e nei vari tipi di HPC solidi, però con differenze che sono statisticamente significative tra loro ( $P \leq 0,000$ ).

#### Analisi statistiche

I risultati sono stati calcolati come Media±deviazione standard (DS) e valutati per differenze significative in ogni

momento con l'analisi di Varianza a senso unico (ANOVA), il test parametrico di Student e il  $\chi^2$ , utilizzando il software di Statistica per Discipline Biomediche (New York, NY: Mc Graw Hill Education).

Le differenze sono state considerate con valori di P inferiori a 0,05 come significative e valori di P inferiori a 0,01, 0,001 e ( $P < 0,0001$ ) come altamente significative.

Si è proceduto a calcolare anche la significatività con i test di Wilcoxon e Friedman quando si sono avuti risultati con una bassa correlazione al test di Pearson-Bravis.

## Risultati

I dati forniti dalla Division of Oral Bioengineering, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University, (Niigata, Japan) sono riportati nelle Tabella II,<sup>10</sup> III,<sup>10</sup> IV<sup>10</sup> e sono stati analizzati statisticamente. È stata calcolata la deviazione percentuale tra i valori ottenuti dall'emocromo (W.B.) e quelli dello stesso paziente ottenuti con digestione con t-PA. Il valore ottenuto per PLT è una deviazione percentuale media pari a  $-10,85 \pm 26,01\%$ . Poiché i risultati dei valori di t-PA per alcuni sono risultati superiori al valore di W.B., questi valori sono stati esclusi da un secondo calcolo per la deviazione percentuale ( $\oplus$ ), ottenendo una deviazione media di  $-27,30 \pm 15,82\%$ .

TABELLA II.—Metodo per conta con digestione t-PA. Prima della coagulazione, i conteggi di PLT e WBC sono stati rilevati direttamente (con emocromo). Dopo la coagulazione, i conteggi di PLT e WBC sono stati determinati con la digestione di t-PA. Il secondo calcolo derivato dall'emocromo (W.B.) è stato eseguito eliminando i valori in grigio che sono valori positivi rispetto al W.B. Modificato da Kitamura et al.<sup>10</sup>

PLT conta	W.B. ematico	t-PA-digerito	% di deviazione	W.B. -10,85 ± 26,01%	W.B. -27,30 ± 15,82%	WBC conta	W.B. ematico	t-PA-digerito	% di deviazione	W.B. -22,74 ± 30,73%	W.B. -38,82 ± 16,03%
$\times 10^7$ /CGF	157,48	108,60	31,04	140,39	114,48	$\times 10^5$ /CGF	355,60	136,50	61,61	274,73	217,45
	89,27	107,10	16,65	79,58			331,80	242,60	26,88	256,35	202,89
	100,80	91,10	9,62	89,86	73,28		400,00	314,00	21,50	309,04	244,60
	116,80	90,20	22,77	104,12	84,91		376,00	310,00	17,55	290,49	229,92
	261,63	132,80	49,24	233,24	190,20		583,20	312,00	46,50	450,58	356,62
	152,60	81,70	46,46	136,04	110,94		287,00	184,00	35,89	221,73	175,50
	141,75	126,20	10,97	126,37	103,05		249,80	112,20	55,08	192,99	152,75
	190,76	217,80	12,42	170,06			342,00	431,80	20,80	264,22	
	197,34	251,10	21,41	175,92			343,20	451,50	23,99	265,15	
	96,60	76,30	21,01	86,11	70,23		378,00	205,00	45,77	292,04	231,14
	171,00	217,10	21,23	152,45			337,50	401,30	15,90	260,75	
Media	152,37	136,36	-10,85	135,83	106,73	Media	362,19	281,90	-22,74	279,82	
t-test Student		P>0,05		P>0,05	P>0,05	t-test Student		P>0,05		P>0,05	P>0,05
IC 95%		Da -35		Da -49,3	Da -43,9	IC 95%		Da -2,9		Da -81,8	Da -76,0
		a -67,01		a -48,3	a -32,4			a -163,6		a -85,9	a -77,4
		P=0,52		P=0,98	P=0,75			P=0,057		P=0,96	P=0,985
$\chi^2$		85,54		81,25	18,44	$\chi^2$		261,08		231,40	53,49
		P=0,000		P=1,000	P=0,005			P=0,000		P=0,000	P=0,000
ANOVA				4,128	115,4	ANOVA				23,69	1,84
				P=0,97	P=0,75					P=0,96	P=0,98

TABELLA III.—Conteggio di piastrine e leucociti con “metodo per conta con digestione t-pa” e “con metodo per sottrazione”. Prima della coagulazione, i conteggi di PLT (A sono stati rilevati direttamente [con emocromo]). Dopo la coagulazione, i conteggi di PLT sono stati determinati dalla digestione di t-PA e col metodo di sottrazione secondo Watanabe et al. e Crisci et al. Il secondo calcolo è stato eseguito eliminando i valori in grigio che sono valori risultati positivi rispetto al W.B. Modificato da Kitamura et al.<sup>10</sup>

PLT conta	W.B. ematico	t-PA-digerito	Metodo sottr.	% Deviazione tra WB e sottr.	W.B. -20,43 ± 21,44%	W.B. -25,09 ± 20,42%	% Deviazione tra t-PA e sottr.	Met. sottr. -19,69 ± 21,88%	Met. sottr. -24,31 ± 21,02%	
×10 <sup>7</sup> /CGF	155,00	126,20	154,50	18,58	123,33	116,11	18,32	124,07	116,90	
	132,50	108,60	130,90	18,04	105,40	99,25	17,04	105,10	99,07	
	117,80	107,10	112,40	9,08	93,73	88,24	4,72	90,26	85,07	
	228,40	217,10	227,90	4,95	173,30	171,09	4,74	183,03	172,49	
	245,60	217,80	245,60	11,32	195,42	183,97	11,32	196,72	185,89	
	248,50	251,10	247,60	1,04	197,73		1,39	198,32		
	126,70	132,80	125,50	4,59	100,81		5,50	100,52		
	104,60	91,10	103,00	12,91	83,23	78,35	11,55	82,50	77,96	
	100,70	81,70	100,00	18,87	80,12	75,44	18,30	80,10	75,69	
	108,20	34,10	108,20	68,48	86,09	81,05	68,48	86,66	81,89	
	136,60	76,30	136,60	44,14	108,69	102,33	44,14	109,41	103,39	
	144,90	80,40	144,90	44,51	115,29	108,54	44,51	116,06	109,67	
	Media	154,13	127,03	153,09	-20,43	121,93	110,44	-19,69	122,73	110,80
	t-test Student		P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
	IC 95%		Da -24,7 a -78,9	Da -45,6 a -47,7	Da -78,0 a -25,9	Da -42,4 a -42,6	Da -43,4 a -50,6	Da -43,7 a -52,4	Da -44,1 a -50,5	Da -44,1 a -50,5
χ <sup>2</sup>		54,14 P=0,000	0,118 P=1,000	55,29 P=0,000	51,345 P=0,000	38,731 P=0,000	50,972 P=0,000	40,024 P=0,000		
ANOVA					155,9 P=0,83	64,91 P=0,87		110,7 P=0,85	52,4 P=0,89	

TABELLA IV.—Conteggio di piastrine e leucociti con “metodo per conta con digestione t-pa” e “con metodo per sottrazione”. Prima della coagulazione, i conteggi di WBC sono stati rilevati direttamente (con emocromo). Dopo la coagulazione, i conteggi di WBC sono stati determinati dalla digestione di t-PA e col metodo di sottrazione secondo Watanabe et al. e Crisci et al. Il secondo calcolo è stato eseguito eliminando i valori in grigio che sono valori risultati positivi rispetto al W.B. Modificato da Kitamura et al.<sup>10</sup>

WBC conta	W.B. ematico	t-PA-digerito	Metodo Sottraz.	% deviazione tra W.B. e Sottr.	W.B. -45,9 ± 16,67%	% deviazione tra t-PA e Sottr.	Met.Sottr. -34,35 ± 16,67%	
×10 <sup>5</sup> /CGF	350,0	112,20	251,20	67,94	189,35	55,33	164,91	
	426,3	136,50	272,30	67,98	230,60	49,87	178,76	
	380,0	242,60	271,00	36,16	205,58	10,48	177,91	
	667,3	401,30	575,50	39,86	361,00	30,27	377,81	
	616,0	431,80	559,70	29,90	333,25	22,85	367,44	
	592,8	451,50	489,60	23,84	320,70	7,78	321,42	
	563,2	312,00	458,80	44,60	304,69	32,00	301,20	
	410,8	314,00	389,60	23,56	222,24	19,40	255,77	
	420,8	184,00	319,30	56,27	227,65	42,37	209,62	
	385,4	126,50	334,30	67,18	208,50	62,16	219,46	
	469,2	205,00	404,40	56,31	253,84	49,31	265,48	
	462,0	290,40	417,20	37,14	157,11	30,39	273,89	
	Media	478,65	267,32	395,24	-45,90	251,21	-34,35	259,47
	t-test Student		P>0,05	P>0,05		P>0,05	P>0,05	P>0,05
	IC 95%		Da -306,3 a -116,4	Da -174,5 a -7,659		Da -64,8 a -97,0	Da 30,73 a -225,1	Da -75,6 a -91,3
χ <sup>2</sup>		165,82 P=0,000	28,343 P=0,003		163,44 P=0,000	110,824 P=0,000	93,09 P=0,000	
ANOVA					3344,0 P=0,59		1413,0 P=0,73	

Il valore ottenuto per WBC è una deviazione percentuale media di  $-22,74 \pm 30,73\%$ . Poiché, anche in questo caso, sono risultati per alcuni valori di t-PA superiori al valore di W.B., questi valori sono stati esclusi dal calcolo ( $\oplus$ ) della deviazione percentuale ottenendo una deviazione media di  $-38,82 \pm 16,03\%$ .

Abbiamo effettuato il confronto tra t-PA e W.B.-10,85% e W.B.-27,3% per PLT e tra t-PA e W.B.-27,74% e W.B.-38,82% per WBC, effettuando i coefficienti di correlazione di Pearson-Bravis (Tabella V, VI).

Confrontando il metodo t-PA e l'emocromo % di scostamento per PLT, abbiamo ottenuto che sottraendo il 10,85% ai valori di W.B. abbiamo: test *t* di Student: 0,98 (differenza statisticamente non significativa) (NS);  $\chi^2=1,000$ ; ANOVA: 4,128 P=0,97 (NS); coefficiente di correlazione:  $r=0,573$ ;

P=0,065; che significa bassa concordanza tra i valori con differenza ST (n.s.).

Sottraendo, invece, il 27,3% ai valori di W.B.: test *t* di Student: 0,75 (NS);  $\chi^2=0,005$  (differenza statisticamente significativa) (S); ANOVA: 115,4; P=0,75 (NS); coefficiente di correlazione:  $r=0,745$ ; P=0,054; che significa moderata concordanza tra i valori (NS).

Se assumiamo, però, una significatività di 0,001, i valori di differenza tra t-PA e W.B.-27,3% risultano tutti statisticamente non significativi. Perciò si può utilizzare il valore di W.B. di PLT -27,3% per ottenere i valori di conta per t-PA con sufficiente appropriatezza statistica.

Confrontando il metodo t-PA e l'emocromo % di scostamento per WBC, abbiamo ottenuto che sottraendo il 22,74% ai valori di WB: test *t* di Student: 0,96 (NS);

TABELLA V.—Coefficiente di correlazione per PLT.

	Differenze statisticamente significative			Correlazione
	<i>r</i>	<i>t</i>	P	
Tra t-PA e % deviance	$r=0,687$	2,835	P=0,019*	Correlazione moderata
Tra t-PA e W.B.	$r=0,573$	2,097	P=0,065	Correlazione scarsa
Tra W.B e t-PA	$r=0,927$	7,824	P=0,000*	Correlazione ottima
Tra t-PA e W.B.-10,85%	$r=0,573$	2,096	P=0,065	Correlazione scarsa
Tra t-PA e W.B.-20,43%	$r=0,92$	7,655	P=0,000*	Correlazione ottima
Tra W.B. e W.B.-20,43%	$r=0,998$	61,22	P=0,00*	Correlazione ottima
Tra W.B. e W.B.-25,09%	$r=1,00$	999	P=0,000*	Correlazione ottima
Tra t-PA e M. sottr. -19,66%	$r=0,92$	7,504	P=0,000*	Correlazione ottima
Tra t-PA e M. sottr. -24,31%	$r=0,91$	6,288	P=0,000*	Correlazione ottima
Tra t-PA e W.B.-25,09%	$r=0,94$	8,679	P=0,000*	Correlazione ottima
Tra t-PA e % dev. tra WB e sott.	$r=0,71$	-3,19	P=0,009	Correlazione moderata negativa
Tra WB e % dev. tra WB e sott.	$r=0,40$	-1,403	P=0,19	Correlazione scarsa negativa
Tra M. Sottr e % dev. tra t-PA e sott.	$r=0,68$	-1,233	P=0,24	Correlazione scarsa
Tra M. Sottr e % dev. tra WB e sott.	$r=0,39$	-1,347	P=0,20	Correlazione scarsa negativa
Tra WB e % dev. tra t-PA e sott.	$r=0,38$	1,291	P=0,22	Correlazione scarsa
Tra W.B. e sottr.	$r=0,999$	121,6	P=0,000*	Correlazione ottima
Tra t-PA e sottr.	$r=0,927$	7,488	P=0,000*	Correlazione ottima
Tra t-PA e % dev. tra t-PA e Sott.	$r=0,689$	3,005	P=0,013*	Correlazione moderata
Tra t-PA e W.B.-15,12%	$r=0,77$	5,46	P=0,000*	Correlazione buona

\*Statisticamente significativi.

TABELLA VI.—Coefficiente di correlazione per WBC.

	Differenze statisticamente significative			Correlazione
	<i>r</i>	<i>t</i>	P	
Per W.B. e m. sott.	$r=0,94$	9,042	P=0,000*	Correlazione ottima
Per t-PA e m. sott.	$r=0,88$	5,921	P=0,000*	Correlazione buona
Per t-PA e t-PA	$r=0,85$	5,142	P=0,000*	Correlazione buona
Per W.B. e W.B.-45,9%	$r=0,73$	3,378	P=0,007*	Correlazione moderata
Per t-PA e W.B.-34,12%	$r=0,47$	2,477	P=0,022	Correlazione scarsa
Per t-PA e m. sottr. -34,35%	$r=0,88$	5,922	P=0,000*	Correlazione buona
Per t-PA e % dev. tra WB e sott.	$r=0,88$	-5,922	P=0,000*	Correlazione ottima negativa
Per t-PA e % dev. tra t-PA e sott.	$r=0,79$	-4,201	P=0,001*	Correlazione buona negativa

\*Statisticamente significativi.

$\chi^2=0,000$  (S); ANOVA: 23,69;  $P=0,96$  (NS); coefficiente di correlazione:  $r=0,269$ ;  $P=0,423$ ; che significa bassa concordanza tra i valori (NS).

Sottraendo, invece, il 38,82% ai valori di WB abbiamo: test  $t$  di Student: 0,98 (NS);  $\chi^2=0,000$  (NS); ANOVA: 1,84;  $P=0,98$  (NS).

Coefficiente di correlazione:  $r=0,695$ ;  $P=0,055$ ; che significa moderata concordanza tra i valori (NS).

Se assumiamo una significatività di 0,05, i valori di differenza tra t-PA e W.B.-38,82% risultano non significativi con una concordanza moderata. Perciò si può utilizzare il valore di W.B. di WBC -38,82% per ottenere i valori di conta per t-PA con sufficiente appropriatezza statistica.

L'esame a coppie di Wilcoxon tra t-PA e W.B.: -38,82% è  $W=-2,0$   $P>0,054$  (NS); test di Friedman  $P=1,000$  (NS).

Sono stati successivamente eseguiti sugli stessi pazienti<sup>10</sup> altri test per la conta con t-PA, W.B. e col metodo di sottrazione, i quali vengono riportati in Tabella III,<sup>10</sup> IV.<sup>10</sup>

Confrontando il metodo t-PA e l'emocromo -% di scostamento per PLT, abbiamo ottenuto che sottraendo il 20,43±21,44% ai valori di WB si riscontra: test  $t$  di Student: 0,83 (NS);  $\chi^2=0,000$  (S); ANOVA: 155,9  $P=0,83$  (NS); coefficiente di correlazione:  $r=0,92$ ;  $P=0,000$ ; il che significa ottima concordanza (S) (Tabella III).<sup>10</sup>

Confrontando, invece, il metodo t-PA e il metodo di sottrazione -% di scostamento per PLT, abbiamo ottenuto che riducendo del 19,69±21,88% i valori ottenuti con metodo di sottrazione si ha: test  $t$  di Student: 0,85 (NS);  $\chi^2=0,000$  (S); ANOVA: 110,7  $P=0,85$  (NS); Coefficiente di correlazione:  $r=0,92$ ;  $P=0,000$ ; il che significa un'ottima concordanza (S) (Tabella III)<sup>10</sup> (Figura 2). Per il calcolo di PLT le differenze tra t-PA e W.B.-20,43% e t-PA e Met. Sottr.: -19,69% si equivalgono. In tutti i casi il test  $t$  e ANOVA dimostrano differenze statisticamente non significative, mentre il  $\chi^2$  dimostra differenze statisticamente significative insieme al coefficiente di correlazione. Se assumiamo, però, una significatività di 0,0001 i valori di differenza risultano non significativi con una concordanza ottima.

Poiché sono risultati valori di t-PA per alcuni superiori al valore di W.B., questi valori sono stati esclusi dal calcolo della deviazione percentuale ottenendo una deviazione media di -25,09±20,42%.

Confrontando il metodo t-PA e l'emocromo -% di scostamento per PLT, abbiamo ottenuto che sottraendo il 25,09±20,42% ai valori di WB: test  $t$  di Student: 0,874 (NS);  $\chi^2=0,000$  (S); ANOVA: 64,91;  $P=0,87$  (NS); coefficiente di correlazione:  $r=0,94$ ;  $P=0,000$ ; che significa ottima concordanza (S) (Tabella III).<sup>10</sup>

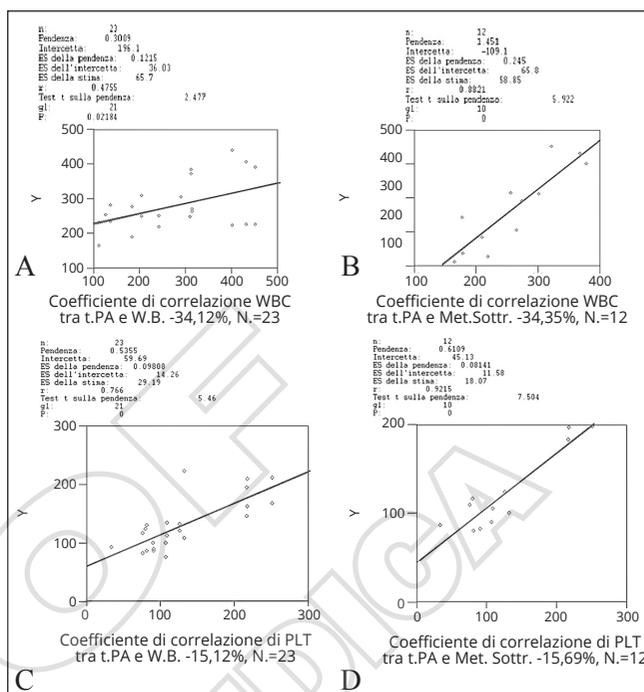


Figura 2.—Coefficiente di correlazione di PLT e WBC tra la conta con t-PA, W.B. e metodo per sottrazione.

Confrontando, invece, il metodo t-PA e il metodo di sottrazione -% di scostamento per PLT, abbiamo ottenuto che riducendo del 24,31±21,02% ai valori del met. di sottrazione: test  $t$  di Student: 0,88 (NS);  $\chi^2=0,000$  (S); ANOVA: 52,4;  $P=0,89$  (NS); coefficiente di correlazione:  $r=0,91$ ;  $P=0,000$ ; che significa ottima concordanza (S) (Tabella III).<sup>10</sup> Per il calcolo di PLT le differenze tra t-PA e W.B.-25,09% e t-PA e Met. Sottr. -24,31% si equivalgono. In tutti i casi il test  $t$  e ANOVA dimostrano differenze statisticamente non significative, mentre il  $\chi^2$  dimostra differenze statisticamente significative insieme al coefficiente di correlazione. Se assumiamo, però, una significatività di 0,0001 i valori di differenza risultano non significativi con una concordanza ottima.

Confrontando, inoltre, il metodo t-PA e l'emocromo -% di scostamento per WBC, abbiamo ottenuto che sottraendo il 45,9±16,67% ai valori di WB: test  $t$  di Student: 0,68 (NS);  $\chi^2=0,000$  (S); ANOVA: 3344,0;  $P=0,59$  (NS); coefficiente di correlazione:  $r=0,73$ ;  $P=0,007$ ; che significa moderata concordanza (S) (Tabella IV).<sup>10</sup>

Confrontando il metodo t-PA e il Metodo di Sottrazione -% di scostamento per WBC, abbiamo ottenuto che riducendo del 34,35±16,67% ai valori del Met. di Sottrazione: test  $t$  di Student: 0,84 (NS);  $\chi^2=0,000$  (S); ANOVA: 1413,0;

$P=0,73$ (NS); coefficiente di correlazione:  $r=0,88$ ;  $P=0,000$ ; che significa buona concordanza (S) (Tabella IV)<sup>10</sup> (Figura 2). Per il calcolo di WBC le differenze tra t-PA e W.B. -45,9% e t-PA e Met. Sottr. -34,3% si equivalgono. In tutti i casi il test  $t$  e ANOVA dimostrano differenze statisticamente non significative, mentre il  $\chi^2$  dimostra differenze statisticamente Significative insieme al coefficiente di correlazione. Se assumiamo, però, una significatività di 0,001 i valori di differenza tra t-PA e WB: -45,9% per WBC risultano non significativi con una concordanza moderata. Se, invece, assumiamo una significatività di 0,0001 i valori di differenza tra t-PA e sottrazione-34,35% per WBC risultano non significativi con una concordanza buona.

Per questo confronto l'esame a coppie di Wilcoxon tra t-PA e W.B. -45,9% è risultato  $W=16,0$   $P>0,052$  (NS); Test di Friedman  $P=0,564$  (NS).

Successivamente abbiamo sommato i valori ottenuti nelle II,<sup>10</sup> III,<sup>10</sup> IV<sup>10</sup> esclusivamente per i valori di confronto tra t-PA e W.B. e i risultati ottenuti sembrerebbero i più validi Statisticamente (t-PA e WB-15,12±24,87% per PLT e tra t-PA e WB-34,12±28,2% per WBC (Tabella VII).

Confrontando il metodo t-PA e l'emocromo -% di scostamento per PLT (Tabella VII), abbiamo ottenuto che

sottraendo il 15,12% ai valori di WB: test  $t$  di Student: 0,93 (NS);  $\chi^2=0,000$  (S); ANOVA: 10,45;  $P=0,953$  (NS); coefficiente di correlazione:  $r=0,766$ ;  $P=0,000$ , con buona concordanza tra i valori (S). Il test  $t$  e ANOVA dimostrano differenze statisticamente non significative, mentre il  $\chi^2$  dimostra differenze statisticamente significative insieme al coefficiente di correlazione. Se assumiamo una significatività di 0,0001 i valori di differenza tra t-PA e W.B.: -15,12% risultano tutti non significativi (Figura 2) (Tabella V, VIII, IX). Ciò significa che si può utilizzare il valore di WB di PLT- il 15,12% per ottenere i valori di conta per t-PA con sufficiente accuratezza statistica.

Confrontando il metodo t-PA e l'emocromo -% di scostamento per WBC (Tabella VII), abbiamo ottenuto che sottraendo il 34,12% ai valori di WB: test  $t$  di Student: 0,88 (NS);  $\chi^2=0,000$  (S); ANOVA: 217,6;  $P=0,88$  (NS); coefficiente di correlazione:  $r=0,47$ ;  $P=0,022$ ; che significa scarsa concordanza tra i valori (S). Il test  $t$  e ANOVA e il coefficiente di correlazione dimostrano differenze statisticamente non significative, mentre il  $\chi^2$  dimostra differenze statisticamente significative. Se assumiamo una significatività di 0,0001 i valori di differenza tra t-PA e W.B.-34,12% risultano tutti non significativi. Poiché il

TABELLA VII.—Confronto tra metodo per conta con digestione t-PA ed emocromo per WBC e PLT.

	WBC conta $\times 10^5$ /CGF				PLT conta $\times 10^7$ /C			
	t-PA-digerito	W.B. ematico	W.B-t-PA	W.B. -34,12±28,2%	t-PA-digerito	W.B. ematico	W.B-t-PA	W.B. -15,12±24,87%
Variabile	136,50	355,60	61,61	234,27	108,60	157,48	31,04	133,67
	242,60	331,80	26,88	218,59	107,10	89,27	-19,97	75,77
	314,00	400,00	21,50	263,52	91,10	100,80	9,62	85,56
	310,00	376,00	17,55	247,71	90,20	116,80	22,77	99,14
	312,00	583,20	46,50	384,21	132,80	261,63	49,24	222,07
	184,00	287,00	35,89	189,08	81,70	152,60	46,46	129,53
	112,20	249,80	55,08	164,57	126,20	141,75	10,97	120,32
	431,80	342,00	-26,26	225,31	217,80	190,76	-14,17	161,92
	451,50	343,20	-31,56	226,10	251,10	197,34	-27,24	167,50
	205,00	378,00	45,77	249,03	76,30	96,60	21,01	81,99
	401,30	337,50	-18,90	222,35	217,10	171,00	-26,96	145,14
	112,20	350,00	67,94	230,58	126,20	155,00	18,58	131,56
	136,50	426,30	67,98	280,85	108,60	132,50	18,04	112,47
	242,60	380,00	36,16	250,34	107,10	117,80	9,08	99,99
	401,30	667,30	39,86	439,62	217,10	228,40	4,95	193,87
	431,80	616,00	29,90	405,82	217,80	245,60	11,32	208,47
	451,50	592,80	23,84	390,54	251,10	248,50	-1,05	210,93
	312,00	563,20	44,60	371,04	132,80	126,70	-4,81	107,54
	314,00	410,80	23,56	270,64	91,10	104,60	12,91	88,78
	184,00	420,80	56,27	277,22	81,70	100,70	18,87	85,47
	126,50	385,40	67,18	253,90	34,10	108,20	68,48	91,84
	205,00	469,20	56,31	309,11	76,30	136,60	44,14	115,95
	290,40	462,00	37,14	304,37	80,40	144,90	44,51	122,99
Media±DS	274,29	422,95	34,12	278,64	131,49	153,28	15,12	130,11
	115,31	110,75	28,20	72,96	63,45	52,26	24,87	44,36

TABELLA VIII.—*Test di significatività.*

	Differenze statisticamente significative				Seconda misurazione			
	t-test	$\chi^2$	P	Intervallo di confidenza al 95%	ANOVA	D.S.		
Per W.B. e t-PA	P>0,05	85,54	P=0,000*	Da -35 a -67,01	P=0,52*			
Per t-PA e W.B.-10,85%	P>0,05	81,25	P=1,000	Da -49,35 a -48,28	P=0,98*	4.128	P=0,97	±26,01%
Per t-PA e W.B.-27,30%	P>0,05	18,44	P=0,005*	Da -43,91 a -32,42	P=0,005	115,4	P=0,75	±15,82%
Per W.B. e t-PA*	P>0,05	54,14	P=0,000*	Da -24,71 a -78,91	P=0,29*			
Per t-PA e W.B.-20,43%	P>0,05	51,34	P=0,000*	Da -42,42 a -52,61	P=0,83*	155,9	P=0,83	±21,44%
Per t-PA e W.B.-25,09%	P>0,05	38,73	P=0,000*	Da -43,4 a -50,61	P=0,87*	64,91	P=0,87	±20,42%
Per t-PA e sottr. -19,66%	P>0,05	50,97	P=0,000*	Da -43,76 a -52,36	P=0,85*	110,7	P=0,85	±21,88%
Per t-PA e sottr. -24,31%	P>0,05	40,02	P=0,000*	Da -44,06 a -50,54	P=0,85*	52,4	P=0,89	±21,02%
Per W.B. e sottr.	P>0,05	0,118	P=1,000	Da -45,63 a -47,69	P=0,85*			
Per t-PA e sottr.	P>0,05	40,02	P=0,000*	Da -78,05 a -25,91	P=0,31*			
Per t-PA e W.B.-15,12%	P>0,05	133,01	P=0,000*	Da -31,14 a -33,92	P=0,93*	10,45	P=0,953	±24,87%

\*Statisticamente significativi.  
Intervallo di confidenza: 95% per PLT.

TABELLA IX.—*Risultati ottenuti tra i metodi di conta con t-PA, sottrazione e simulazione.*

Leucociti (WBC)	N.	%		N.	%		N.	%	
Sangue intero	36,22×102/μl (3.622/mm <sup>3</sup> )	100,00	Diff.% -34,12%	47,86×102/μl (4.786/mm <sup>3</sup> )	100,00	Diff.% -34,35%	36,22×102/μl (3.622/mm <sup>3</sup> )	100,00	Differenza tra PRF con conteggio per simulazione e il conteggio con t-PA
Coagulo rosso PRF	n.r. 26,73×102/μl (2.673/mm <sup>3</sup> )	n.r. -26,2%	t-test=0,88* $\chi^2=0,000$ ANOVA=0,88*	n.r. 37,90×102/μl (3.790/mm <sup>3</sup> )	n.r. -20,8%	t-test=0,84* $\chi^2=0,000$ ANOVA=0,73*	n.r. 4,32×102/μl (432/mm <sup>3</sup> )	n.r. -88,1%	
Siero sopra coagulo (PPP)	n.r.	n.r.	Coeff. Corr. r=0,47 P=0,022	n.r.	n.r.	Coeff. Corr. r=0,88 P=0,000	n.r.	n.r.	
Superficie post- compressione	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		n.r.	n.r.	
Globuli rossi (RBC)						+29,47%			-83,83%
Sangue intero	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		n.r.	n.r.	
Coagulo rosso	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		n.r.	n.r.	
PRF	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		n.r.	n.r.	
Siero sopra coagulo (PPP)	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		n.r.	n.r.	
Superficie post- compressione	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		n.r.	n.r.	
piastrine (PLT)									
Sangue intero	1,524×105/μl (152.400/mm <sup>3</sup> )	100,00	Diff.% -15,12%	1,541×105/μl (154.100/mm <sup>3</sup> )	100,00	Diff.% -19,69%	1,524×105/μl (152.400/mm <sup>3</sup> )	100,00	Differenza tra PRF con conteggio per simulazione e il conteggio con t-PA
Coagulo rosso PRF	n.r. 1,27×105/μl (127.000/mm <sup>3</sup> )	n.r. -16,7%	t-test=0,93* $\chi^2=0,000$ ANOVA=0,95*	n.r. 1,413×105/μl (141.300/mm <sup>3</sup> )	n.r. -8,3%	t-test=0,85* $\chi^2=0,000$ ANOVA=0,85*	n.r. 0,747×105/μl (74.700/mm <sup>3</sup> )	n.r. -50,9%	
Siero sopra coagulo (PPP)	n.r.	n.r.	Coeff. Corr. r=0,77 P=0,000	n.r.	n.r.	Coeff. Corr. r=0,92 P=0,000	n.r.	n.r.	
Superficie post- compressione	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		n.r.	n.r.	
Metodo usato	Metodo per conta con t-PA			Metodo per sottrazione		+10,12%	Metodo per simulazione		-41,2%

\*P>0,05 differenza statisticamente non significativa.  
Un valore di P<0,05 è stato considerato una differenza statisticamente significativa.  
n.r.: non riportato.

confronto tra il metodo t-PA e W.B.: -34,12% per WBC ha una bassa correlazione al coefficiente di correlazione ( $r=0,47$ ;  $P=0,022$ ) con differenza statisticamente significativa (Figura 2) (Tabella VI, IX, X), si è proceduto a cal-

colare la significatività con i test di Wilcoxon e Friedman tra i valori di t-PA e W.B.: -34,12%, W.B.: -45,9% e W.B.: -38,82%.

Sulla base del confronto con i test di Wilcoxon e Fri-

TABELLA X.—*Test di significatività.*

	Differenze statisticamente significative			Seconda misurazione				
	t-test	$\chi^2$		Intervallo di confidenza al 95%			ANOVA	D.S.
per W.B. e t-PA	P>0,05	261,08	P=0,000*	Da -2,99 a -163,6	P=0,057*			
per t-PA e W.B.-22,74%	P>0,05	231,40	P=0,000*	Da -81,79 a -85,94	P=0,98	23,69	P=0,96	±30,73%
per t-PA e W.B.-38,82%	P>0,05	53,49	P=0,000*	Da -76,01 a -77,37	P=0,005*	1,84	P=0,98	±16,03%
per W.B. e t-PA*	P>0,05	165,82	P=0,000*	Da -306,3 a -116,4	P=0,29			
per t-PA e W.B.-45,90%	P>0,05	163,44	P=0,000*	Da -64,81 a -97,03	P=0,00*	3344,0	P=0,59	±16,67%
per t-PA e sottr. -34,35%	P>0,05	93,09	P=0,000*	Da -75,61 a -91,3	P=0,87	1413,0	P=0,73	±16,67%
per W.B. e sottr.	P>0,05	28,343	P=0,003*	Da -174,5 a -7,659	P=0,071			
per t-PA e sottr.	P>0,05	110,82	P=0,000*	Da -30,73 a -225,1	P=0,012*			
Per t-PA e W.B.-34,12%	P>0,05	439,73	P=0,000*	Da -61,69 a -52,99	P=0,88	217,6	P=0,88	±28,20%

\*Statisticamente significativi.

Intervallo di confidenza: 95% per WBC.

edman si considera valido statisticamente il calcolo di W.B.: -34,12% per WBC.

Da ciò si può dedurre che si può utilizzare il valore di WB di WBC- il 34,12% per ottenere i valori di conta per t-PA con sufficiente accuratezza statistica.

### Discussione

I concentrati piastrinici sono mezzi sicuri, affidabili e convenienti per accelerare la guarigione dei tessuti e migliorare l'efficienza della riparazione dei tessuti dopo una lesione.

Le piastrine, la fibrina e i leucociti contenuti in essi agiscono, naturalmente, in sinergia per promuovere la guarigione delle ferite e la rigenerazione dei tessuti. Il concetto di concentrato piastrinico per uso chirurgico è di moltiplicare questo effetto di coagulazione/rigenerazione su un sito chirurgico o una ferita.

I concentrati piastrinici, compresi L-PRF e A-PRF, sono stati utilizzati, infatti, per procedure rigenerative in vari campi della medicina, tra cui l'odontoiatria, la chirurgia plastica ricostruttiva e la dermochirurgia, per fornire concentrazioni sopra fisiologiche di fattori di crescita autologhi direttamente ai tessuti ospiti. Questi fattori di crescita hanno dimostrato di essere chemiotattici per vari tipi di cellule, compresi monociti, fibroblasti, cellule endoteliali, cellule staminali mesenchimali (MSC) e fibroblasti, creando microambienti tissutali e influenzando direttamente la proliferazione e la differenziazione delle cellule progenitrici (cellule staminali CD34+).

L'effetto benefico delle membrane PRF nella guarigione delle ferite complesse può essere spiegato con l'alta concentrazione di piastrine e leucociti insieme al rilascio a lungo termine di fattori di crescita specifici.

È chiaro che i coaguli di fibrina ricchi di piastrine costituiscono un serbatoio bioattivo. Pertanto, un ematocrito alto o un basso numero di piastrine, possono essere un fattore limitante ed è per questo che ulteriori ricerche sono necessarie per stabilire il numero ottimale di piastrine per la loro utilizzazione clinica. Le citochine prodotte dalle piastrine e dai leucociti sono, quindi, una parte importante nel ruolo di questo biomateriale, ma sia la matrice di fibrina, che gli elementi contenuti in essa, sono responsabili del reale potenziamento terapeutico del PRF.

Fino ad oggi era quasi impossibile da contare e regolare il numero di piastrine nelle preparazioni di PRF prima del loro utilizzo clinico, in modo da metterlo in relazione al risultato per ogni paziente. Pertanto, il modo clinicamente più efficace per controllare la qualità dei risultati, era quello di utilizzare la regione di PRF più vicina al coagulo di RBC.<sup>3</sup>

Le piastrine attivate rilasciano un'intera gamma di chemiochine e promuovono l'assunzione, l'adesione e la proliferazione di cellule staminali adulte, incluse le cellule progenitrici CD34-positivo, le MSC, le progenitrici di SMC, e le progenitrici endoteliali. I leucociti presenti nella PRF non sono solo cellule infiammatorie, in quanto essi presentano anche effetti antinocicettivi attraverso diverse chemiochine, citochine antinfiammatorie (IL-4, IL-10, IL-13) e peptidi oppioidi ( $\beta$ -endorfine, dimorfina-A ecc.) e quindi possono promuovere una inibizione clinicamente rilevante anche del dolore patologico. Le quantità rilasciate di VEGF e TGF- $\beta$ 1 sono prodotte dai leucociti massicciamente. È stata rilevata una correlazione significativa tra numero di piastrine e rilascio di TGF- $\beta$ 1 (P=0,005) e di PDGF-BB (P=0,04).

Wend *et al.*<sup>11</sup> ha mostrato che una diminuzione della velocità di centrifugazione del PRF porta a un numero

maggiore di leucociti, linfociti, neutrofilii, monociti e piastrine in esso, rispetto al PRF generato a RCF (forza centrifuga applicata) più alta. Pertanto, la quantità di fattore di crescita e il rilascio di citochine dalle matrici PRF aumenta con la diminuzione delle forze RCF. Anche l'effetto pro-angiogenico di PRF è significativamente maggiore quando viene utilizzato un PRF a basso-RCF rispetto al PRF con RCF alto e può essere correlato alla presenza di un gran numero di neutrofilii e neutrofilii extracellulari (NET) intrappolati che vengono rilasciati, è stato quindi introdotto il concetto di bassa velocità di centrifugazione (LSCC).

### Limiti dello studio

Le limitazioni, però, riscontrate nell'uso clinico di questi concentrati piastrinici solidi sono quindi: 1) a causa del fatto che la PRF è un prodotto autologo, la disponibilità di questo biomateriale in quantità maggiore è difficoltoso. Quindi, il suo utilizzo in procedure chirurgiche deve essere ben controllato; 2) il PRF possiede cellule immunitarie circolanti e molecole antigeniche che impediscono il suo uso come materiale allogenico, pertanto, vi è un aumentato rischio di trasmissione di agenti infettivi; 3) il numero di cellule (piastrine, leucociti e cellule staminali) contenute può essere molto variabile.

A questo punto della nostra conoscenza, tra i parametri importanti da tenere in considerazione abbiamo quindi: la concentrazione di piastrine, la concentrazione dei leucociti e la proporzione tra i vari tipi di leucociti. Per quanto riguarda la concentrazione di piastrine, dei leucociti e la loro formula, la loro influenza sull'effetto clinico dei concentrati piastrinici di seconda generazione, deve ancora essere studiata con attenzione, in quanto la loro presenza più o meno abbondante può spiegare i risultati contraddittori che si sono osservati nei lavori pubblicati.

### Conclusioni

In questo studio si potrà dedurre che, riducendo del 34,35% il valore della conta delle piastrine col metodo di sottrazione e del 15,12% al valore dall'emocromo, e del 19,69% il valore della conta dei leucociti con metodo per sottrazione e del 34,12% il valore dell'emocromo, si otterrà il valore ottenuto col metodo della digestione con t-PA con un sistema molto più semplice. Da questo studio si potrà quindi validare un sistema semplice e poco costoso per calcolare il numero preciso di piastrine e leucociti presenti nei concentrati piastrinici solidi auto compressi. Il presente studio ha dimostrato che è possibile, infatti, quantificare

il numero di cellule nei biomateriali, un sistema cellulare complesso per la presenza di piastrine, leucociti, cellule staminali ecc., utilizzando un metodo clinico applicabile in modo rapido (max 15 minuti) e sicuro (metodo statistico).<sup>12-14</sup> Con ciò si potrà valutare quindi, il livello minimo/massimo di piastrine e leucociti utile per avere un risultato clinico nell'utilizzo dei concentrati piastrinici di seconda generazione. Altri studi sperimentali e clinici devono essere però condotti per fornire una migliore comprensione della diafonia tra il numero di piastrine, di leucociti e i meccanismi che controllano la riparazione dei tessuti, caratterizzati da processi come il reclutamento di cellule con potenziale rigenerativo e la regolazione dell'apoptosi/sopravvivenza cellulare.

### Bibliografia

1. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Jimbo R, Barbé G, Del Corso M, Inchingolo F, *et al.* Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13:1145–52.
2. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clin Orthop Relat Res* 2015;473:1635–43.
3. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, *et al.* Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol* 2014;40:679–89.
4. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, *et al.* Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Invest* 2016;20:2353–60.
5. Choukroun J. Advanced-PRF and i-PRF: platelet concentrates or blood concentrates? *J Periodont Med Clin Pract* 2014;1:1–3.
6. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001;10:225–8.
7. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol* 2010;81:546–55.
8. Crisci A, Lombardi D, Serra E, Lombardi G, Cardillo F, Crisci M. Standardized protocol proposed for clinical use of L-PRF and the use of L-PRF Wound Box®. *J Unexplor Med Data* 2017;2:77–87.
9. Watanabe T, Isobe K, Suzuki T, Kawabata H, Nakamura M, Tsukioka T, *et al.* An Evaluation of the Accuracy of the Subtraction Method Used for Determining Platelet Counts in Advanced Platelet-Rich Fibrin and Concentrated Growth Factor Preparations. *Dent J (Basel)* 2017;5:7.
10. Kitamura Y, Watanabe T, Nakamura M, Isobe K, Kawabata H, Uematsu K, *et al.* Platelet Counts in Insoluble Platelet-Rich Fibrin Clots: A Direct Method for Accurate Determination. *Front Bioeng Biotechnol* 2018;6:4.
11. Wend S, Kubesch A, Orlowska A, Al-Maawi S, Zender N, Dias A, *et al.* Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. *J Mater Sci Mater Med* 2017;28:188.
12. Crisci A, Kawase T, D'Adamo R, Crisci M. Experimental research on a technique for quantification of platelets and leukocytes in second-generation platelet concentrates. *International Journal of Current Medical and*

Pharmaceutical Research; 2019 [Internet]. Available from: <http://www.journalcmpr.com/issues/experimental-research-technique-quantification-platelets-and-leukocytes-second-generation> [cited 2021, May 24].

13. Crisci A, Barillaro MC, Lepore G, Cardillo F. L-PRF Membrane (Fibrin Rich in Platelets and Leukocytes) and Its Derivatives (A-PRF, i-PRF)

are Helpful as a Basis of Stem Cells in Regenerative Injury Treatment: Trial Work on the Horse. *Int Blood Res Rev* 2020;10:1–14.

14. Crisci A, Kawase T, D'Adamo R, Crisci M. Utilità dei derivati del sangue di seconda generazione nella terapia rigenerativa delle ferite complesse delle estremità. *Chir Del Piede* 2020;44:3–13.

---

*Conflicts of interest.*—The authors certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript.

*Authors' contributions.*—All authors read and approved the final version of the manuscript.

*History.*—Manuscript accepted: July 1, 2020. - Manuscript received: March 27, 2020.

PROOF  
MINERVA MEDICA