

CAPITOLUL 2. EXPLORAREA SERIEI ERITROCITARE

2.1. NUMĂRĂTOAREA ERITROCITELOR

Eritrocitul sau hematia este elementul final al seriei roșii. Denumirea eritrocitului vine de la cuvintele grecești „*erithros*” - roșu și de la „*kytos*” - celulă, denumire care a fost contestată de-a lungul timpului, datorită absenței nucleului. Metodele moderne de histochimie, citochimie și microscopie electronică, împreună cu argumente de filo și ontogenie au consacrat recunoașterea eritrocitului ca o celulă de sine stătătoare, dar cu o activitate metabolică restrânsă și o durată de viață limitată.

Rolul principal este transportul O_2 de la plămâni la țesuturi și a unei părți din CO_2 de la țesuturi la plămâni. În plus, prin sistemele tampon pe care le conține, eritrocitele participă la menținerea echilibrului acido-bazic.

Numărarea eritrocitelor se poate realiza prin:

- metode clasice, folosind camere de numărat;
- metode moderne, folosind analizoare automate.

Numărarea eritrocitelor prin metode moderne

- *Numărătorul automat bazat pe variațiile de impedanță electrică.*

Principiul metodei constă în trecerea unui volum definit de sânge, foarte diluat cu soluție NaCl 0,9% (1/20 000), printr-un orificiu având diametrul de ordinul zecilor de microni. Diluția mare și orificiul mic, nu permit trecerea a două hematii în același timp. Între cele două compartimente se stabilește un circuit electric prin doi electrozi și se măsoară impedanța. Trecerea hematiilor prin microorificiu determină creșterea bruscă a impedanței; variațiile de tensiune apărute sunt amplificate și numărate de un numărător de particule și sunt afișate digital. Pentru trasarea curbei Price-Jones aparatul este prevăzut cu un analizator multicanal care numără separat hematiile de diferite mărimi (diametre), reține datele în memorie și trasează curba pe un tub catodic.

- *Numărătorul automat bazat pe principiul reflectării luminii de către masa de hematii.*
- *Numărătorul automat cu sistem optic bazat pe scintilațiile fiecărei hematii.*

Hematiile aflate într-o soluție foarte diluată trec printr-un tub subțire, puternic luminat lateral. Scintilațiile particulelor sunt detectate de un fotomultiplicator, amplificate, numărate și afișate digital.

Lucrări practice de efectuat în laborator

Numărătoarea eritrocitelor prin metoda clasică

Principiul metodei: Se numără eritrocitele direct la microscop, cu ajutorul camerei de numărat, care permite evidențierea eritrocitelor dintr-un volum și o diluție cunoscute.

Materiale necesare

- *Alcool* pentru dezinfectarea pielii, vată, instrumentar de unică folosință, steril, pentru puncție venoasă sau capilară.
- Lichid de diluție: **Hayem** sau lichid **Withby**. În lipsa acestora se folosește ser fiziologic. Pe lângă rolul de diluție, acest reactiv lizează leucocitele și trombocitele, pentru ca în cameră să nu apară decât eritrocite.
- *Pipetă Potain* pentru eritrocite (figura 2.1.). Această pipetă este un tub capilar prevăzut cu o bulă de diluție în care se găsește o perlă roșie, pentru omogenizarea soluției. Pe pipetă se observă trei gradații: 0,5; 1; 101. În momentul folosirii se atașează un tub de cauciuc pentru aspirație.
- *Camere de numărat*. Orice cameră de numărat (figura 2.2.) are gravate înălțimea camerei (1/10 mm) și două cifre (1/400 și 1/25) care indică a câta parte dintr-un milimetru pătrat reprezintă pătratul mic și, respectiv, pătratul mare. Se folosesc următoarele tipuri de camere:

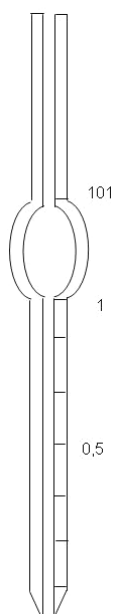


Figura 2.1. Pipeta Potain

La intersecția liniilor duble se delimitează pătrate cu suprafața de $1/400 \text{ mm}^2$, care pot fi folosite pentru numărătoarea eritrocitelor. Această cameră este destinată, în principal, numărătorii leucocitelor.

- *Camera Thoma* (figura 2.3): are o suprafață de 1 mm^2 divizată prin linii triple în 16 pătrate mari, cu suprafața de $1/25 \text{ mm}^2$; la rândul lor, acestea sunt divizate prin linii simple, în 16 pătrate mici cu suprafața de $1/400 \text{ mm}^2$. Această cameră este destinată numărătorii eritrocitelor.
- *Camera Bürker* (figura 2.4): are o suprafață de 9 mm^2 divizată prin linii triple în 9 pătrate cu suprafața de 1 mm^2 , la rândul lor fiind divizate prin linii duble, în 16 pătrate cu suprafața de $1/25 \text{ mm}^2$.

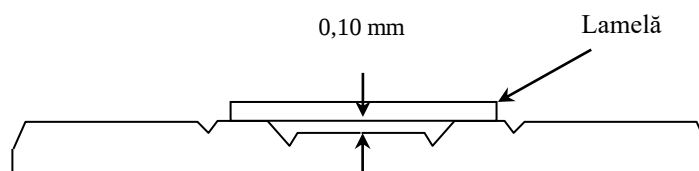


Figura 2.2. Profilul unei camere de numărat.

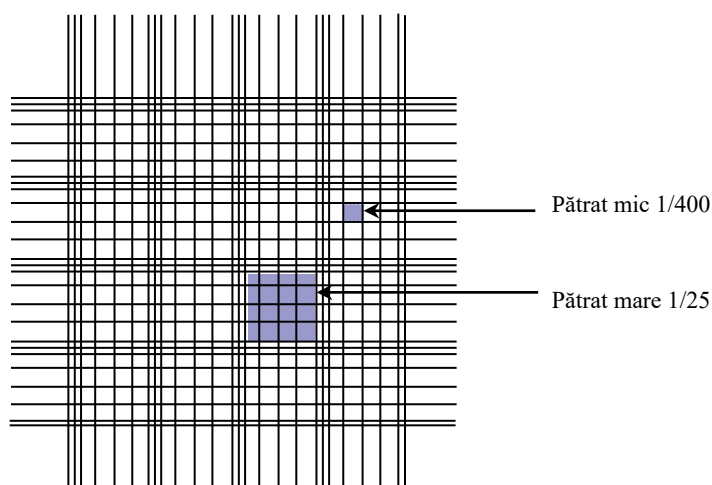


Figura 2.3. Rețeaua camerei Thoma.

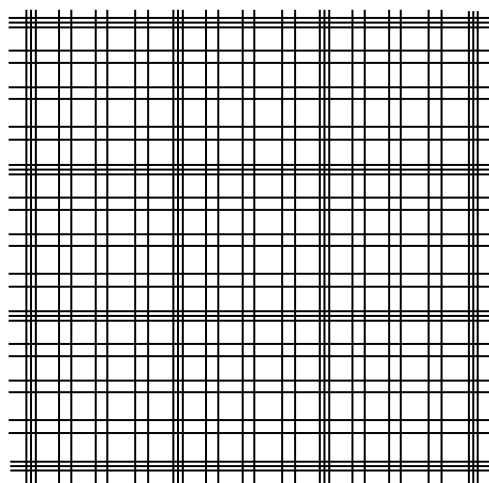


Figura 2.4. Rețeaua camerei Bürker.

- *Camera Bürker-Türk* (figura 2.5.): are o suprafață de 9 mm² divizată prin linii triple în 9 pătrate cu suprafața de 1 mm². Pătratul din mijloc are un caroiat tip cameră Thoma și este destinat numărării eritrocitelor. Restul pătratelor au un caroiat tip cameră Bürker și sunt destinate numărării leucocitelor.
 - *Camera Goreaev* (figura 2.6.): prezintă o alternanță de 16 pătrate cu suprafața de 1/400 mm², destinate numărării eritrocitelor, cu pătrate de 1/25 mm², destinate numărării leucocitelor.
- *Lamela* care acoperă camera trebuie să fie perfect plană și șlefuită, cu o grosime de aproximativ 0,3 – 0,5 mm.
 - *Microscop*. Se folosesc obiectivul 40 uscat, ocularul 10 sau 7 și lumină slabă.

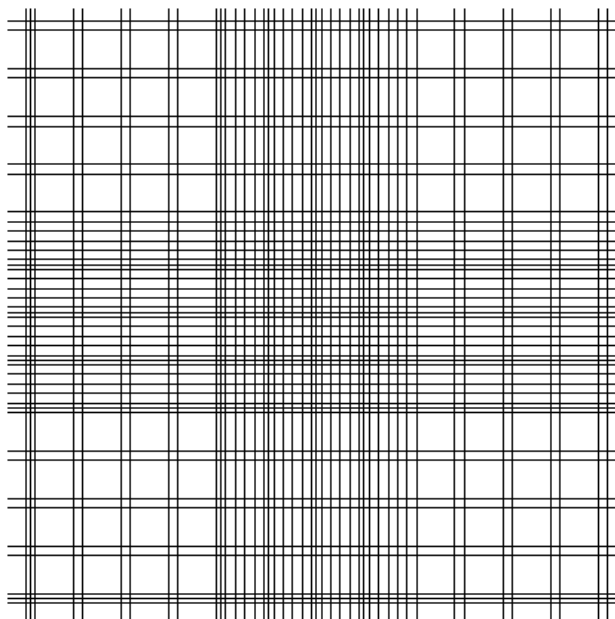


Figura 2.5. Rețeaua camerei Bürker-Türk.

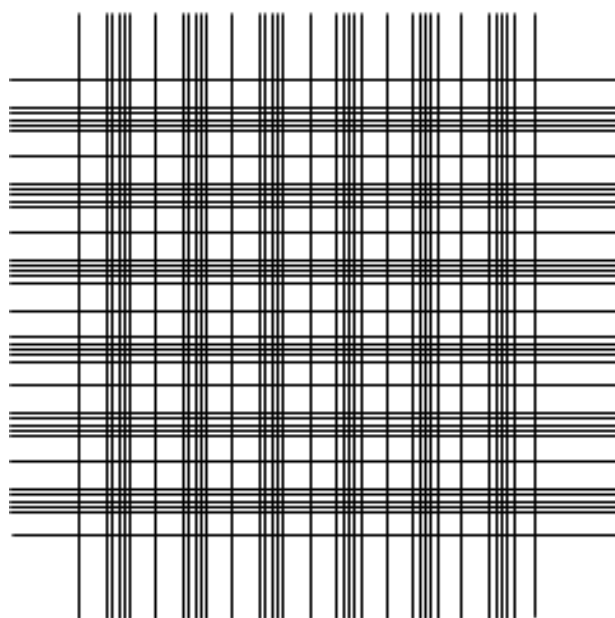


Figura 2.6. Rețeaua camerei Goreaev.

Tehnica de lucru. Metoda a fost concepută pentru numărarea eritrocitelor în sângele capilar. Se recomandă ca recoltarea sângelui să se facă prin puncționarea degetului mediu de la mână sau a lobului urechii la adult, sau puncționarea regiunii calcaneene la copil, numai în situația în care există pipetă Potain sterilă sau de unică folosință. Este preferabil să se recolteze sânge venos prin puncție venoasă, cu instrumentar steril, iar pipeta Potain să se încarce din eșantionul de sânge venos recoltat.

După dezinfectarea pielii, se înțepă cu acul steril, suficient de profund ca sângele să apară spontan la suprafața, fără a comprima zona puncționată. Se îndepărtează prima picătură de sânge și se aspiră în pipeta Potain a doua picătură de sânge până la diviziunea 0,5 (pentru diluția de 1/200) sau până la diviziunea 1 (pentru diluția 1/100). Se aspiră lichidul de diluție până la diviziunea 101 și se agită 2 – 3 minute cu pipeta în poziție orizontală, pentru omogenizare.

Umplerea camerei: se așează lamela peste cameră cu atenție, pentru a obține o bună aderență între lamelă și marginile camerei (figura 2.2). Lamela este corect fixată când apar inelele Newton (inele colorate de refracție). Se agită din nou pipeta Potain, se lasă să cadă primele 2 – 3 picături, după care se apropie vârful pipetei de marginea lamelei și se umple camera prin capilaritate. Se așteaptă câteva zeci de secunde pentru sedimentarea hematiilor. Se va evita: excesul de lichid, formarea bulelor de aer în cameră, pătrunderea lichidului în șanțurile laterale sau deplasarea lamelei; în aceste condiții se va repeta operația.

Numărătoarea eritrocitelor: se numără eritrocitele aflate pe suprafața a cinci pătrate mari ($1/25 \text{ mm}^2$) adică un total de 80 pătrate mici ($1/400 \text{ mm}^2$); pentru a nu se număra de două ori elementele situate pe liniile ce delimitează pătratele mici, se vor număra hematiile aflate numai pe două din laturile pătratului, de exemplu sus și stânga.

Calcul: numărul de eritrocite găsite pe cele cinci pătrate mari se împarte la 80 (numărul de pătrate mici din cele 5 pătrate mari) și astfel se află media pentru un pătrat mic ($1/400 \text{ mm}^2$). Media se înmulțește cu numărul total de pătrate mici cuprinse într-un milimetru pătrat (400), cu inversul diluției folosite (respectiv 100 sau 200) și cu inversul înălțimii camerei (10).

$$\text{Numar eritrocite/mm}^3 = \frac{\text{Eritrocite numarate}}{80} \times 400 \times 10 \times 100 (\text{sau } 200)$$

Surse de eroare:

- etalonare greșită a pipetelor de diluție, a camerei de numărat sau lamelă care nu are suprafața plană;
- spălare defectuoasă a materialelor;
- înțepătură superficială, afecțiuni vasculare ale degetelor (edem, cianoză etc.);
- apăsarea degetului pentru obținerea sângelui (sângele se diluează cu limfă);
- evaporarea, coagularea sau sedimentarea probei de sânge;
- intrarea bulelor de aer în pipetă;
- suspensie neomogenă datorată agitării insuficiente sau aglutinării patologice a elementelor celulare (autoanticorpi);
- introducerea în camera de numărat a unei cantități prea mici sau prea mari din probă;
- existența unor leucocitoze mari, care alterează precizia numărătorii;
- metoda folosită (numărătoarea la microscop) poate produce creșteri sau diminuări false ale numărului de eritrocite.

Factorii care pot modifica numărul de eritrocite

- Temperatura crescută a mediului determină deshidratarea subiectului urmată de scăderea volemiei și hemoconcentrație.
- Recoltarea sângelui venos imediat după staza venoasă, realizată prin aplicarea garoului, oferă un eșantion de sânge cu hemoconcentrație.
- Poziția corpului:
 - Ortostatism prelungit: prin creșterea presiunii hidrostatice în teritoriile situate sub nivelul inimii este favorizată trecerea apei din vase în interstițiu. Scăderea volemiei determină apariția hemoconcentrației.
 - Clinostatism prelungit - favorizează menținerea sau creșterea volemiei și, în consecință, determină un număr scăzut de hematii.

- Stresul produce vasoconstricție, mobilizarea sângelui din organele rezervor de sânge, ceea ce determină hemoconcentrație.
- Stări patologice care modifică volemia:
 - Scăderea volemiei (vărsături, diaree, transpirații, administrarea unor medicamente etc.) produce hemoconcentrație.
 - Creșterea volemiei (hiperhidratarea organismului prin ingestie excesivă de lichide, perfuzii etc.) produce hemodiluție.
- Tratamente cu medicamente care modifică numărul de hematii sau volemia.

Valori normale și variații fiziologice ale numărului de eritrocite (tabelul 2.1.)

Prin metoda clasică, valorile fiziologice sunt cuprinse între **4 000 000 – 6 000 000 /mm³**. Există **variații fiziologice** în funcție de vârstă, sex, altitudine, anumite perioade fiziologice (digestie, efort fizic) și temperatura mediului.

Persoanele care trăiesc la altitudine mare au valori mai mari ale numărului de eritrocite (poliglobulie fiziologică de altitudine) decât restul populației, datorită presiunii parțiale mai mici a oxigenului.

Variațiile zilnice ale numărului de hematii în legătură cu digestia, efortul fizic și termoreglarea, sunt de $\pm 10 - 15\%$. În efortul fizic, datorită splenoconstricției și trecerii crescute de lichide în interstițiu, crește numărul de hematii (poliglobulie de repartiție).

Valoarea normală a numărului de hematii este stabilită prin metode statistice, pe loturi de populație, în funcție de: altitudinea la care trăiesc, specificul morfofiziologic al unor etnii, expunerea prelungită la unele noxe etc.

Variații patologice

Creșterea numărului de eritrocite, în paralel cu creșterea concentrației de hemoglobină și a hematocritului, poartă numele de poliglobulie; vâscozitatea sângelui este crescută.

Poliglobuliile (eritrozele) se clasifică în:

- *relative* - poliglobulii prin hemoconcentrație datorită pierderii de apă (deshidratări prin transpirație, vărsături, febră, șoc, tratament cu diuretice etc.);
- *primare* – eritremia (policitemia vera sau boala Vaquez);
- *secundare* – apar prin creșterea secreției de eritropoetină, ca răspuns la hipoxia tisulară cronică, în cazul fumătorilor care au o concentrație de CO crescută în sânge, în boli pulmonare obstructive, insuficiență cardiacă, tumori secretoare de eritropoetină.

Scăderea numărului de eritrocite, în paralel cu scăderea hemoglobinei și hematocritului, poartă numele de anemie. Anemiile se clasifică în:

- **anemii prin pierderi de masă eritrocitară** – este grupul anemiilor posthemoragice acute și cronice;
- **anemii prin tulburări de producție eritrocitară** (disfuncție eritropoetică, mitotică sau de maturare și diferențiere):
 - **anemii carentiale** – apar în absența sau aportul redus al unor factori necesari hematopoezei.
 - Carența de fier, vitamina B6, vitamina C etc., determină producerea unor hematii mici (microcite), slab colorate (hipocrome), cu încărcare redusă de hemoglobină (VEM, HEM, CHEM scăzute). Aceste anemii se numesc și anemii hipocrome, microcitare.
 - Carența vitaminei B12 și/sau a acidului folic determină producerea unor hematii cu diametru și volum crescut. Aceste hematii se numesc macrocite sau megalocite și par mai intens colorate (hipercrome), din cauza redistribuirii uniforme a hemoglobinei. Indicii eritrocitari VEM și HEM cresc, iar CHEM rămâne normal. Aceste anemii se numesc anemii megaloblastice. În această categorie se încadrează și anemia pernicioasă Addison-Biermer.

- Pot apărea anemii și prin carențe de cupru și cobalt. Frecvent, există carențe complexe, intricate (Fe, vitamina B12, acid folic, proteine, alte vitamine), acestea fiind întâlnite la pacienții neoplazici, gastrectomizați, denutriți, în boli cronice consumptive etc.;
- anemii aplastice – apar în hipoplazii sau aplazii medulare.
- **anemii prin distrucție eritocitară crescută (hipersplenism)** sau prin **scăderea duratei de viață a eritrocitelor (anemii hemolitice)**.

Tabelul 2.1. Variațiile fiziologice ale numărului de eritrocite, în funcție de vârstă și sex			
Vârsta			Eritrocite (mil / mm ³)
Zile	Luni	Ani	
1			5,1 ± 1
2 – 3			5,1
4 – 8			5,1
9 – 13			5,0
14 – 60			4,7 ± 0,9
	3 – 5		4,5 ± 0,7
	6 – 15		4,6
		1	4,5
		2	4,6
		3	4,5
		4	4,6 ± 0,6
		5	4,6
		6 – 10	4,7
		11 - 15	4,8
Adulți		bărbați	4,9 ± 0,7
		femei	4,3 ± 0,6



Studiu individual

Consultând un dicționar medical și materialele didactice recomandate, vă rugăm să explicați semnificația termenilor: volemie, diluție, deshidratare, poliurie, pubertate, climacteriu, hemoconcentrație, hemodiluție, anemie, poliglobulie, gastrectomie.

1. Asociați termenii: hemoconcentrație și hemodiluție, cu termenii: deshidratare, vărsături, transpirații, poliurie, ingestie de lichide în exces, volemie crescută.
2. Ce efecte au anemia și poliglobulia asupra vâscozității sângelui?
3. Explicați de ce sexul individului influențează numărul fiziologic de hematii. Aplicați această explicație la perioada prepubertară și postclimacteriu.
4. Explicați variațiile numărului de hematii la nou născut și sugar.
5. Explicați modificarea numărului de hematii la persoanele care se deplasează de la șes la altitudini de peste 2000 m, comparativ cu persoanele care trăiesc permanent la altitudini mari.
6. De ce sportivii de performanță se deplasează la munte pentru antrenamente?
7. Explicați modificarea numărului de hematii în condiții de stres.

FIȘĂ DE LUCRU ÎN LABORATOR

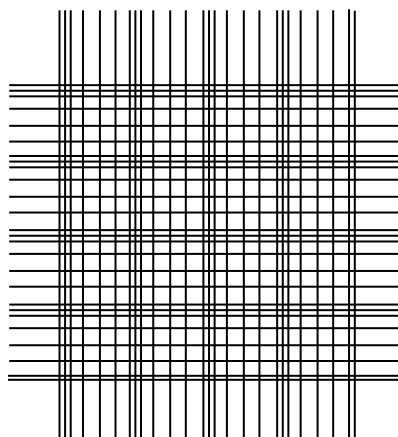
1. Prezentați principiul metodei de numărare a hematiilor folosind camera de numărat.

.....

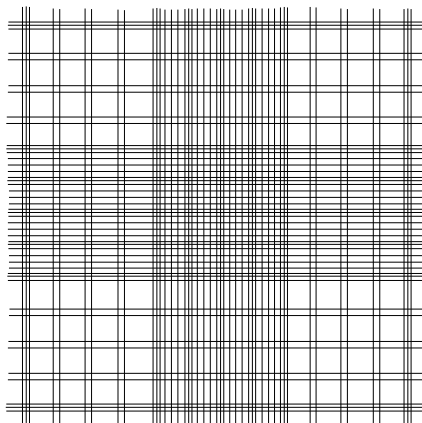
2. Ce rol are pipeta Potain și ce diluții poate realiza?

.....

3. Marcați pătratele cu suprafața $1/25 \text{ mm}^2$ și $1/400 \text{ mm}^2$ pe desenul reprezentând rețeaua camerei Thoma.



4. Marcați pătratele cu suprafața de 1 mm^2 , $1/25 \text{ mm}^2$ și $1/400 \text{ mm}^2$ în rețeaua corespunzătoare camerei Bürker-Türk.



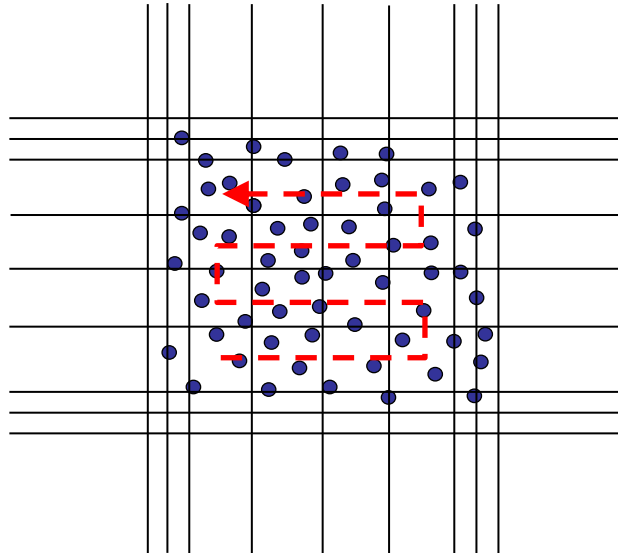
5. Ce înălțime au camerele de numărat Thoma și Bürker-Türk?

.....

6. Citiți notațiile de pe suprafața lamei de sticlă-suport al camerelor de numărat.

.....

7. Numărați hematiile (reprezentate prin cercuri) pe suprafața pătratului $1/25 \text{ mm}^2$ al camerei Thoma prezentat mai jos.



8. Enumerați soluțiile indicate ca lichid de diluție. Ce proprietăți trebuie să aibă lichidul de diluție?

.....

9. Care este formula de calcul a numărului de eritrocite? Explicați fiecare termen din formulă.

.....

10. Prin numărarea hematiilor pe suprafața a 5 pătrate de $1/25 \text{ mm}^2$ ale camerei Thoma s-au obținut următoarele rezultate: $P_1 = 180$ hematii; $P_2 = 215$ hematii; $P_3 = 190$ hematii; $P_4 = 220$ hematii; $P_5 = 195$ hematii. Diluția sângelui a fost $1/100$. Calculați numărul de hematii/ mm^3 și comentați rezultatul.

.....

11. Prin numărarea hematiilor pe suprafața a 5 pătrate de $1/25 \text{ mm}^2$ ale camerei Thoma s-au obținut următoarele rezultate: $P_1 = 58$ hematii; $P_2 = 60$ hematii; $P_3 = 57$ hematii; $P_4 = 63$ hematii; $P_5 = 62$ hematii. Diluția sângelui a fost $1/200$. Calculați numărul de hematii/ mm^3 și comentați rezultatul.

.....

12. Prin numărarea hematiilor pe suprafața a 5 pătrate de $1/25 \text{ mm}^2$ ale camerei Thoma s-au obținut următoarele rezultate: $P_1 = 150$ hematii; $P_2 = 165$ hematii; $P_3 = 170$ hematii; $P_4 = 143$ hematii; $P_5 = 172$ hematii. Diluția sângelui a fost $1/200$. Calculați numărul de hematii/ mm^3 și comentați rezultatul.

.....

13. Care sunt valorile normale ale numărului de hematii?

.....

2.2. NUMĂRĂTOAREA RETICULOCITELOR

Reticulocitul este o celulă-precursor eritrocitar, situată între stadiul de eritroblast oxifil și eritrocitul adult. Denumirea provine de la rețeaua granulo-filamentoasă formată din ribonucleo-proteine și organite celulare, care precipită în citoplasmă sub acțiunea colorantului, în colorațiile supravitale. Organitele celulare (mitocondrii, ribozomi etc.) și ribonucleoproteinele permit reticulocitului să aibă activitate metabolică intensă (sinteze, degradări) și să continue sinteza hemoglobinei de la aproximativ 90-95% (corespunzătoare momentului trecerii reticulocitului în sângele circulant) până la încărcarea completă a celulei cu hemoglobină. Odată cu maturarea celulei, această rețea dispare și reticulocitul devine hematie.

În funcție de aspectul și abundența rețelei, există patru grade de maturare: *gradul I - elemente tinere, cu rețea foarte evidentă, gradele II, III, la care rețeaua scade progresiv și gradul IV, la care există doar urme din rețeaua granulo-filamentoasă.*

Reticulocitul are o durată de viață de 2 – 4 zile în măduvă și 1 – 2 zile în sângele circulant. Trecerea reticulocitului din măduvă în sânge (eritrodiabaza) se face prin mișcări active de diapedeză, pe care reticulocitul le păstrează în sângele periferic și, din acest motiv, pot apărea celule cu diferite forme: ovalară, cu pseudopode, treflă, policiclică.

Transformarea reticulocitului în eritrocit este urmată de pierderea mișcărilor și a organitelor, completarea sintezei moleculelor de hemoglobină și dispariția antigenelor celulare HLA.

Criterii morfologice de recunoaștere a reticulocitelor: celule mai mari decât eritrocitele cu diametrul 8 – 9 microni, volum de 150 microni cubi, fără nucleu, cu citoplasmă de culoare roz și policromatofilie difuză sau zonală în cazul colorației panoptice. Din acest motiv, diferențierea reticulocitelor de eritrocite este dificilă în colorațiile uzuale, fiind necesară folosirea colorațiilor supravitale.

Se folosesc colorațiile: albastru brilliant de crezil, verde Janus, roșu neutru, albastru de metilen, care evidențiază în citoplasmă organite care lipsesc la eritrocitul adult (mitocondrii, ribozomi, mici mase de feritină, vacuole etc.), care se colorează metacromatic și ribonucleoproteine, care precipită în timpul colorării.

Metode de evidențiere și numărare. Numărul de reticulocite se poate determina folosind:

- Numărătoarea la microscop, pe frotiuri cu colorație supravitală, din sânge proaspăt.
- Numărătoarea automată: analizor automat, pe principiul citometriei în flux cu fluorescență și laser.

A. Metoda cu soluție alcoolică de albastru brilliant de crezil

Materiale necesare

- albastru brilliant de crezil, soluție 1% în alcool absolut;
- cameră umedă (cutie Petri cu hârtie de filtru umezită);
- microscop cu obiectiv cu imersie;
- instrumentar sterilizat pentru recoltat sânge;
- lamă pentru efectuarea frotiului.

Tehnica de lucru Pe lamă se întinde un strat subțire din soluția albastru brilliant de crezil și se lasă la uscat. Se întinde apoi un frotiu de sânge proaspăt recoltat peste stratul de colorant. Se plasează lama în camera umedă un minut, după care se usucă la aer. Se examinează la obiectivul cu imersie, numărându-se reticulocitele întâlnite la o mie de eritrocite.

B. Metoda cu albastru brilliant de crezil în ser fiziologic

Materiale necesare

- albastru brilliant de crezil, soluție 1% în ser fiziologic;
- oxalat de sodiu, soluție 1% în ser fiziologic;

- eprubete de centrifugă, eventual parafinate;
- microscop cu obiectiv cu imersie;
- instrumentar sterilizat pentru recoltat sânge;
- lamă pentru efectuarea frotiului.

Tehnica de lucru. Într-o eprubetă se pun trei picături de colorant, douăsprezece picături de oxalat de sodiu 1% (sau orice anticoagulant) și două picături de sânge proaspăt. După 30 de minute amestecul se centrifughează timp de 3 minute, iar din sediment se întind pe lamă frotiuri foarte subțiri. Metoda este mult mai sensibilă decât metoda anterioară, permițând decelarea reticulocitelor până la gradul IV. Număratoarea reticulocitelor se face cu obiectivul de imersie numărând reticulocitele întâlnite la 1000 de eritrocite.

Valori normale ale numărului de reticulocite. Numărul normal de reticulocite, la adult, este cuprins între **0,5 – 1,5 % de eritrocite, maximum 2 % eritrocite**. În cifre absolute, valorile normale sunt 20 000 – 80 000/mm³ (în medie 50 000 – 60 000 /mm³).

În practica medicală este necesară corectarea numărului de reticulocite în funcție de hematocrit. Numărul de reticulocite calculate procentual dintr-un număr scăzut de hematii (anemii) oferă un rezultat fals crescut.

$$\%Reticulocite\ corectat = (\%Reticulocite\ determinat) \times (Hematocrit\ pacient / Hematocrit\ normal).$$

Indicele de producție reticulocitară

Indicele de producție reticulocitară (IPR) este un indicator al capacității regenerative a măduvei hematogene, cu o bună semnificație clinică.

Indicele de producție reticulocitară (IPR) se calculează folosind:

- % Reticulocite corectat;
- Timpul de maturare a cărui valoare este funcție de hematocrit (tabelul 2.2.).

Tabelul 2.2. Relația hematocrit – timp de maturare a reticulocitelor	
Hematocrit	Timp de maturare [zile]
45 %	1
35 %	1,5
25 %	2
15 %	2,5

$$IPR = (\%Reticulocite\ corectat) / (Timp\ de\ maturare)$$

Valori normale:

- IPR = 2 – 3
- IPR > 2 corespunde anemiilor hiperregenerative
- IPR < 2 corespunde anemiilor hiporegenerative

Variații fiziologice

La copil, în prima zi de viață, valorile se situează la 6 % (300 000 /mm³) și reprezintă *reticulocitoza fiziologică a nou-născutului*. Din prima săptămână de viață, valorile scad rapid, pentru ca la 3 luni să ajungă la o valoare de 0,5 %. Existența unor valori mai mari în această perioadă de vârstă, pledează pentru o pierdere eritocitară (hemoragie sau hemoliză crescută).

Variații patologice

Determinarea numărului de reticulocite are o valoare practică mare, fiind indispensabilă în toate formele de anemii. **Numărul reticulocitelor reflectă activitatea proliferativă a măduvei hematogene.** În interpretarea cifrelor trebuie avut în vedere raportul existent între numărul de reticulocite și numărul de hematii și durata de viață a acestora. Un număr normal de reticulocite într-o anemie arată o producție medulară nesatisfăcătoare. Durata

de viață a hematiilor este scăzută în anemiile hemolitice și, în acest caz, un număr normal de reticulocite indică, de asemenea, o producție medulară scăzută.

- *Scăderea numărului de reticulocite (reticulopenie)* indică o producție medulară scăzută. Se întâlnește în:
 - Hipoplazie sau aplazie medulară de diverse cauze (iradiere, administrare de substanțe citotoxice, transformarea sau invazia malignă a măduvei, hemopatii).
 - Carența unor factori necesari hematopoezei (Fe, vitamina B12, acid folic, proteine, alte vitamine). În acest tip de anemii, administrarea elementului carențial duce la creșterea reticulocitelor în sângele periferic, fenomen numit **criză reticulocitară**, spre deosebire de tipul anterior de anemie, la care același tratament determină creșteri nesemnificative ale reticulocitelor (măduvă hiporeactivă, areactivă). Apariția crizei reticulocitare arată existența măduvei reactive cu potențial hematofactor bun (cauza anemiei este extra medulară) și eficiența tratamentului antianemic.
 - Anemiile din unele boli cronice.
 - Anemiile feriprive din infecțiile prelungite.
- *Creșterea numărului de reticulocite (reticulocitoză)* indică o activitate hematogenă crescută. Un număr mărit de reticulocite în sângele periferic apare:
 - în anemiile hemolitice;
 - în stări posthemoragii acute sau în hemoragii cronice;
 - după tratamentul anemiilor carențiale;
 - la femeile gravide izoimunizate prin sarcină;
 - în hipsplenism;
 - după tratamentul cu eritropoetină.

Importanța determinării numărului de reticulocite în practica medicală. Această investigație hematologică se recomandă în următoarele situații:

- Evaluarea capacității regenerative a măduvei hematogene în anemii hemolitice, anemii posthemoragice, anemii carențiale etc.
- Evidențierea răspunsului măduvei hematogene la tratament, în anemii carențiale prin fenomenul "criză reticulocitară".
- Evaluarea eritropoezei după transplant medular.
- Evaluarea eritropoezei după transplant renal.
- Evaluarea eritropoezei în tratamentele cu eritropoetină.
- Monitorizarea eritropoezei în cursul administrării medicamentelor toxice medulare.
- Monitorizarea hipoplaziilor și aplaziilor medulare.
- Stabilirea momentului optim pentru recoltarea celulelor stem după tratament cu factor de creștere sau chimioterapie.
- Diagnosticarea hemoragiilor oculte și anemiilor hemolitice corpusculare.



Studiu individual

1. Consultând un dicționar medical, cursul „Fiziologia sângelui” și materialele indicate în bibliografie, vă rugăm să definiți următorii termeni: ARN, ribozom, colorație supravitală, eozinofil, bazofil, antigene celulare HLA.
2. Care sunt colorațiile supravitale? Prin ce mecanism acționează acești coloranți?
3. Ce este reticulocitul? Ce modificări suferă reticulocitul în cursul maturizării sale?
4. Care sunt valorile normale ale numărului de reticulocite la copil și adult?
5. Ce semnificație au termenii: reticulocitoză, criză reticulocitară, reticulopenie?

FIȘĂ DE LUCRU ÎN LABORATOR

1. Ce este reticulocitul?

.....

2. Descrieți aspectul morfologic al reticulocitului pe care îl vedeți pe frotiul colorat cu albastru de metilen.

.....

3. În care compartimente ale sistemului hematologic se găsește reticulocitul și care este durata vieții acestuia?

.....

4. Care sunt metodele de identificare ale reticulocitului?

.....

5. Prezentați comparativ aspectul reticulocitului și al eritrocitului pe frotiul efectuat din sângele periferic și colorat M.G.G.?

.....

6. Care sunt componentele rețelei reticulare evidențiată prin colorații supravitale? Ce semnificație are dispariția acestora din citoplasma reticulocitului, în cursul transformării în eritrocit?

.....

7. Care sunt valorile normale ale numărului de reticulocite la copil și adult?

.....

8. În ce situație apare reticulocitoza? Dar reticulopenia?

.....

9. Ce este criza reticulocitară?

.....

10. Analizați și interpretați următoarele seturi de explorări hematologice la pacienții P1, P2 și P3. Calculați numărul de reticulocite exprimat ca număr reticulocite/mm³ și apreciați existența reticulocitozei sau a reticulopeniei.

P1: Nr. hematii = 5 mil/mm³, Hb = 12 g %, Ht = 40 %, Nr reticulocite = 1 % hematii

P2: Nr. hematii = 3 mil/mm³, Hb = 9 g %, Ht = 30 %, Nr. reticulocite = 0,2 % hematii

P3: Nr. hematii = 4 mil/mm³, Hb = 10 g %, Ht = 36 %, Nr. reticulocite = 3 % hematii

.....

2.3. DETERMINAREA HEMATOCRITULUI

Definiție. Etimologic, *hematocrit* înseamnă volumul hematiilor. Hematocritul este fracțiunea din volumul total al sângelui, ocupată de hematii, exprimată procentual. Mai poate fi definit ca raportul dintre plasmă și elementele figurate ale sângelui, exprimat procentual, ținând cont că, în mod normal, volumul leucocitelor și trombocitelor nu depășește 1 %. Germanii exprimă acest parametru și în litri de eritrocite /litri sânge.

Este un triaj obligatoriu pentru investigația incipientă a oricărui bolnav împreună cu determinarea hemoglobinei și a numărului de hematii. Este o determinare de urgență în stările de șoc.

Hematocritul depinde de numărul total de eritrocite (masa eritrocitară), de volumul eritrocitar mediu și volumul plasmatic.

Principiul metodei. Prin centrifugarea sângelui recoltat pe anticoagulant se separă hematiile de plasmă și apoi se evaluează valoarea procentuală a masei de hematii.

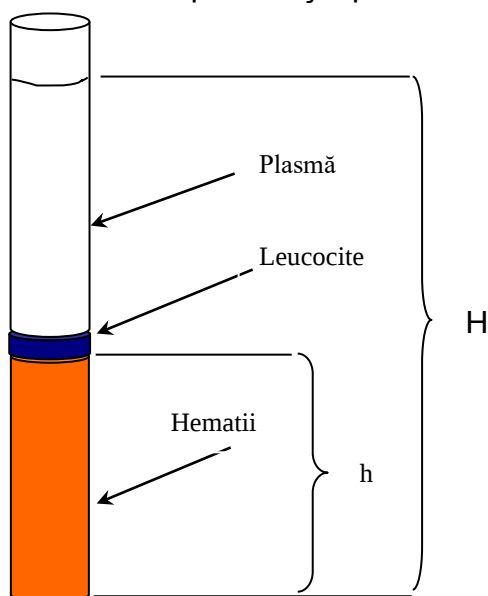


Fig. 2.7. Tub

Citirea rezultatelor. În tubul cu sânge centrifugat se observă (figura 2.7.):

- un strat inferior: masa eritrocitară;
- un strat mediu: leucocite și trombocite (se observă numai în patologie);
- un strat superior: plasma.

Uneori, între stratul de leucocite și eritrocite, se poate observa un strat negru – stratul Bramberger, format din eritrocite modificate de către enzimele leucocitare.

În anemiile hipocrome, limita dintre leucocite și eritrocite este ștearsă, puțin evidentă, pentru că eritrocitele hipocrome au greutate specifică mai mică decât cele normocrome și apropiată de cea a leucocitelor.

Pentru calcularea hematocritului, se măsoară înălțimea totală a coloanei de lichid și se notează cu H .

apoi se măsoară înălțimea coloanei de eritrocite și se notează cu h . Hematocritul se calculează cu ajutorul relației:

$$\text{Hematocrit} = \frac{h}{H} 100 \text{ [\%]}$$

Lucrări practice efectuate în laborator.

Determinarea hematocritului prin micrometodă. Se folosește echipamentul Janetzki (sau alte echipamente similare).

Materiale necesare:

- instrumentar steril de unică folosință pentru puncție venoasă sau puncție capilară;
- centrifugă (model TH-11 Janetzki sau similară) cu un rotor special pentru a putea cuprinde un mare număr de tuburi;
- tuburi de hematocrit (diametrul de 1 mm și lungime de 50 mm) din sticlă subțire, negradate, heparinate în interior;
- suport pentru păstrarea tuburilor de hematocrit între momentul recoltării și al centrifugării;
- riglă pentru citirea rapidă a hematocritului.

Tehnica de lucru

Se recoltează sânge capilar prin punționarea pulpei degetului sau sânge venos. După umplerea tubului, capetele se închid la flacără sau cu plastilină și se așează în suportul de păstrare până în momentul centrifugării. După terminarea recoltărilor, tuburile sunt așezate radial pe suportul special amenajat, fixat pe rotorul centrifugii. Se centrifughează timp de 30 de secunde la 3000 rot/min, după care tuburile se scot și se citesc cu ajutorul riglei ce însoțește aparatul (figura 2.8.).

Tubul de hematocrit se pune în ghidajul A al riglei de citire și se potrivește cu ajutorul butonului B, astfel ca limita inferioară a coloanei de hematii să coincidă cu linia de zero a riglei, iar limita superioară a plasmei să coincidă cu linia de 100.

Se citește limita superioară a coloanei de hematii, gradația corespunzătoare reprezentând valoarea hematocritului exprimată în procente.

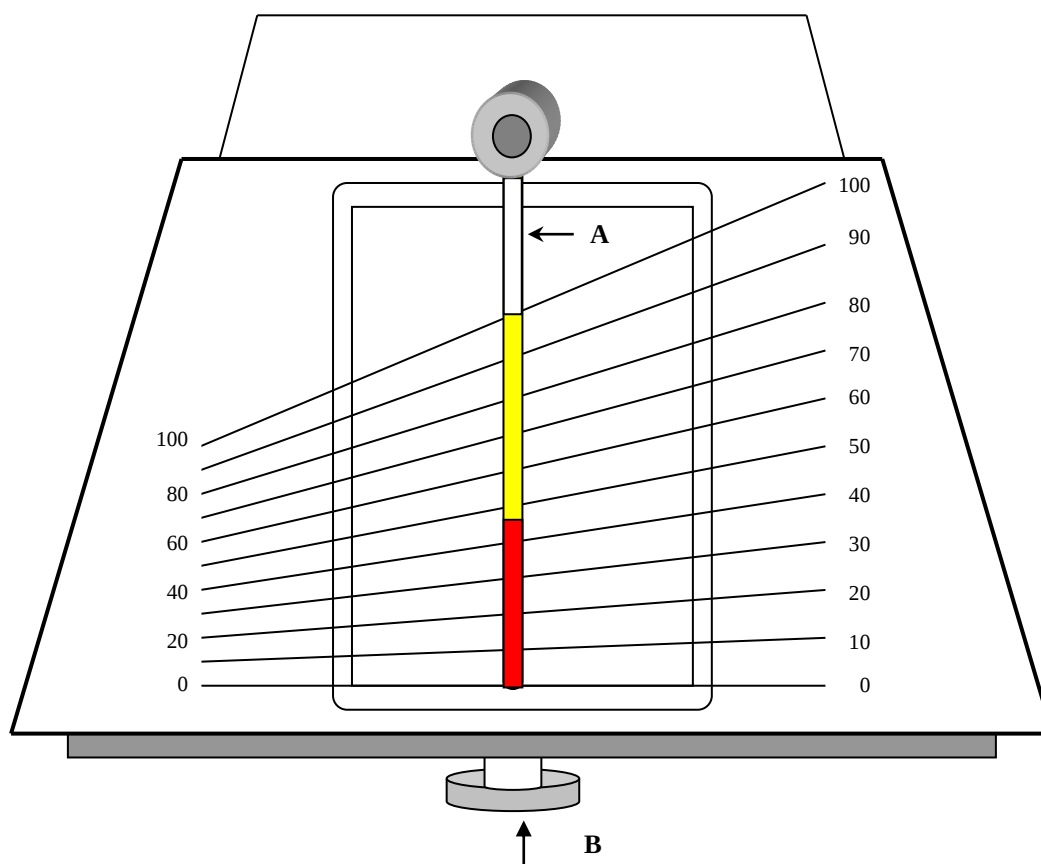


Figura. 2.8. Riglă pentru citirea hematocritului

Corectarea rezultatelor. Corectarea rezultatelor este necesară deoarece:

- după centrifugare, printre hematii rămâne un volum de plasmă reprezentând 5% din volumul eritocitar;
- în cazul unui număr crescut de leucocite și/sau trombocite este necesară scăderea grosimii acestui strat din valoarea hematocritului;
- hematiile din sângele venos au volum mai mare decât hematiile din sângele arterial;
- utilizarea unui alt anticoagulant (în afara heparinei și amestecului Wintrobe) poate produce ratatinarea hematiilor.

Pentru calculul hematocritului sângelui total se va corecta hematocritul venos găsit, conform formulei:

$$Ht\ somatic = Ht\ venos \times 0,96 \times 0,91 \times 1,09 \quad \text{în care:}$$

- 0,96 – factor de corecție pentru plasma aflată printre hematii după centrifugare;

- 0,91 – factor de corecție pentru volumul hematiei din sângele arterial față de hematia din sângele venos;
- 1,09 – factor de corecție pentru anticoagulantele care ratatinează hematiile (are valoarea 1 pentru heparină și amestecul Wintrobe).
- În cazul tehnicii prezentate de noi, factorul global de corecție este 0,87.

Determinarea hematocritului se poate realiza și prin metode moderne, cu un analizor automat. Se determină numărul de eritrocite/litru de sânge prin măsurarea intensității luminii reflectate de masa de eritrocite aflate într-un volum de sânge predefinit și se calculează folosind formula hematocritului.

Erori de determinare a hematocritului. Determinarea hematocritului poate fi afectată de:

- exces de anticoagulant;
- tipul de anticoagulant;
- sângele arterial are un Ht cu 2% mai mic decât Ht din sângele venos;
- analizoarele automate pot da valori fals crescute;
- situații patologice care cresc (în mod fals) valoarea hematocritului: reticulocitoză, leucocitoză mare, prezența de crioglobuline, macrotrombocite;
- situații patologice care scad (în mod fals) valoarea hematocritului: hemoliză in vitro, autoaglutinare, microcitoză.

Valorile normale și variațiile fiziologice ale hematocritului. Aceste valori sunt prezentate în tabelul 2.3.

Tabelul 2.3. Valorile normale și variațiile fiziologice ale hematocritului						
Sex	Vârstă	Teritoriul circulator	Efort fizic	Emoții, stres	Altitudine	Sarcină
Bărbați: 46 ± 5%	Nou născut: 56 %	Sânge arterial: 45 %	Ht crescut	Ht crescut prin contracția splinei	Ht crescut prin scăderea pO ₂ în aerul inspirat	Ht scăzut prin hemodiluție
	1 lună: 44,6 %					
	6 luni: 36,2 %	Sânge venos: 47 %				
Femei: 40 ± 5%	1 an: 32 %	Sânge splenic: 70 – 80 %	Ht crescut	Ht crescut prin contracția splinei	Ht crescut prin scăderea pO ₂ în aerul inspirat	Ht scăzut prin hemodiluție
	4 ani: 37 %					
	12 ani: 40 %					

Variații patologice ale hematocritului

- Scăderea hematocritului apare în anemii și în situațiile în care crește volumul plasmatic (hemodiluție).
- Creșterea hematocritului apare în poliglobulii și în situațiile în care scade volumul plasmatic.



Valorile extreme ale hematocritului se asociază cu stări patologice cu risc vital:

- Ht < 20% : se asociază cu hipoxie severă care determină insuficiență cardiacă și deces;
 - Ht > 60%: se asociază cu creșterea accentuată a vâscozității sângelui, tromboze locale și coagularea spontană a sângelui.
-

Importanța clinică a determinării hematocritului. Determinarea hematocritului se recomandă în:

- Stări patologice în care se modifică numărul de hematii (anemii, poliglobulii).
- Stări patologice în care se modifică volemia.
- Stări post hemoragie.
- Stări de șoc.



Studiu individual

1. Consultând un dicționar medical, cursul “Fiziologia sângelui” și materialele recomandate în bibliografie, vă rugăm să definiți următorii termeni: volemie, hipovolemie, hipervolemie, normocitemie, oligocitemie, policitemie, factor de corecție, coeficient, indice, raport, exprimare procentuală.
2. Ce variații fiziologice ale hematocritului cunoașteți? Cum se explică?
3. Cum influențează numărul de hematii valoarea hematocritului?

FIȘĂ DE LUCRU ÎN LABORATOR

1. Prezentați principiul metodei de determinare a hematocritului.

.....

2. Prezentați succesiunea etapelor corespunzătoare modului de lucru pentru determinarea hematocritului prin micrometodă.

.....

.

3. Explicați necesitatea corectării hematocritului citit. Care sunt indicii de corecție utilizați?

.....

4. Care sunt valorile normale ale hematocritului?

.....

5. Ce valoare are hematocritul plasmei?

.....

6. Care sunt parametrii biologici de care depinde hematocritul?

.....

7. Ce relații există între hematocrit și vâscozitatea sângelui?

.....

8. Explicați variațiile fiziologice ale hematocritului în funcție de vârstă și sex.

.....

9. Explicați variațiile hematocritului în funcție de altitudine.

.....

10. Explicați modificările hematocritului produse de efortul fizic.

.....

11. În ce situații concrete recomandați determinarea hematocritului la un pacient?

.....

12. Cum explicați importanța procedurii „de luare de sânge” pacientului, aplicată foarte frecvent în trecutul medicinei?

.....

2.4. DOZAREA HEMOGLOBINEI

Hemoglobina (Hb) reprezintă elementul esențial pentru principala funcție fiziologică a eritrocitului – funcția respiratorie, reprezentând aproximativ 95% din proteinele solubile ale hematiei, și aproximativ 35% din greutatea totală a acesteia. Hb este sintetizată în celulele nucleate ale seriei eritrocitare din măduva osoasă, în cursul celor 6 - 8 zile de maturare ale acestora; o mică cantitate se sintetizează și în reticulocit.

Hemoglobina este o cromoproteină cu greutate moleculară de 64.458 daltoni, formată dintr-o componentă proteică - **globina** și o grupare prostetică - **hemul**, o metaloporfirină ce conține fier bivalent (Fe^{2+}), de culoare roșie.

Începând din viața embrionară și până la adult se întâlnesc diferite tipuri de Hb (tabelul nr. 2.4.), care se deosebesc între ele prin structura lanțurilor polipeptidice ce alcătuiesc monomerii, grupul prostetic fiind identic.

Tabel nr. 2.4. Tipuri de hemoglobină				
Tipul de hemoglobină	Structura moleculară (lanțurile de globină caracteristice)	Vârsta la care apare	Proporția (%)	
			Nou născuți	Adulți
Portland	$\zeta_2\gamma_2$	Numai în viața embrionară	0	0
Gower I	$\zeta_2\varepsilon_2$		0	0
Gower II	$\alpha_2\varepsilon_2$		0	0
Fetală (F)	$\alpha_2\gamma_2$	Și la nou născut și la adult	80	< 1
A1	$\alpha_2\beta_2$		20	97
A2	$\alpha_2\delta_2$		< 0,5	~ 2,5

- HbA1 reprezintă aproximativ 95 - 98% din Hb adultului, este formată din 2 lanțuri α a câte 141 aminoacizi (aa) și din 2 lanțuri β a câte 146 aa.
- HbA2 este prezentă la adult în proporție de 1 - 3% din totalul Hb și este formată din 2 lanțuri α și 2 lanțuri δ , ultimile diferind de cele β prin ultimii 10 aa din secvența de 146.
- HbF persistă la populația de culoare (20 - 30% din totalul Hb), la populația greacă (11 - 19% din totalul Hb) și la tipul elvețian (1 - 6%). Persistența ei nu este asociată cu tulburări clinice. Lanțurile γ diferă de cele β prin secvența de 39 de aminoacizi de la capătul lanțului de 146.
- HbG1 are 4 lanțuri (2 ζ și 2 ε) și a fost evidențiată la embrionul foarte tânăr (în primele 25 - 30 zile); HbG2 este alcătuită din 2 lanțuri α și 2 lanțuri ε și persistă în primele 3 luni de viață embrionară. Cantitatea de HbG scade odată cu creșterea fătului; când acesta atinge 10 cm lungime, Hb embrionară dispare.

Molecula de Hb are o structură cuaternară, care rezultă din aranjarea a 4 monomeri, fiecare alcătuit dintr-o grupare hem, legată la un lanț polipeptidic, astfel încât formează o structură globulară compactă. Spre suprafața externă prezintă 4 cavități, numite pliurile sau pungile hemului, care adăpostesc câte o grupare hem.

Hemul este gruparea prostetică a Hb și reprezintă 4% din greutatea moleculară a Hb. Este alcătuit dintr-o protoporfirină (inel tetrapiloric) la care se leagă un atom de Fe^{2+} , în centrul inelului tetrapiloric.

Prezența și structura Hb în eritrocit conferă acestuia o serie de proprietăți fiziologice, printre care cea mai importantă este transportul O_2 . În mod normal, sângele conține în medie 15 g Hb/100 ml sânge. Capacitatea de fixare a O_2 de către Hb (în condiții de completă oxigenare) este de 1,34-1,35 ml O_2 pentru 1 g de Hb, deci cele 15 g% de Hb vor transporta 20,9 ml O_2 , din care numai 4,5 ml vor fi cedați țesuturilor.

Hb liberă în plasmă, rezultată din liza hematiilor, este transportată de haptoglobină (o α_2 glucoproteină sintetizată în ficat).

Metode de dozare a hemoglobinei

Metodele de măsurare a concentrației Hb în sânge sunt:

- metode colorimetrice directe - metoda Sahli, de colorimetrie vizuală;
- metode prin colorimetrie fotoelectrică - prin măsurarea culorii în funcție de puterea de absorbție a luminii de către o soluție, într-o regiune specifică a spectrului vizibil.
- metode computerizate

Dozarea spectrofotometrică a hemoglobinei

Principiul metodei: Fericianura de potasiu transformă fierul feros al hemoglobinei în fier feric, formând methemoglobina, care în combinație cu cianura de K formează cianmethemoglobina, a cărei extincție este citită la spectrofotometru.

Materiale necesare:

- instrumentar steril pentru recoltarea sângelui;
- pipetă pentru Hb cu gradația 20 mm³;
- pipeta Pasteur gradată;
- eprubete, stativ;
- spectrofotometru de tip spekol sau hemoglobinometru electronic;
- soluție etalon standard de Hb - soluție de cianmethemoglobină 0,06 g%, conform etalonului internațional și livrată de Centrul de Hematologie București;
- soluție Drabkin compusă din: fericianură de potasiu 0,2 g/l, cianură de potasiu 0,05 g/l și bicarbonat de sodiu 1 g/l.

Tehnica de lucru: Cu pipeta specială de Hb se recoltează sânge 0,02 ml (20 mm³) pe anticoagulat sau din pulpa degetului și apoi se adaugă peste 5 ml soluție Drabkin, pipetat în prealabil într-o eprubetă. Se lasă 30 minute la temperatura camerei pentru obținerea compusului de cianmethemoglobină.

Citirea și exprimarea rezultatelor: La un spectrofotometru se citește extincția standardului (preparat din hemoglobină umană) la lungimea de undă $\lambda = 540$ nm sau se citește după echilibrare cu apă distilată la hemoglobinometru electronic.

Concentrația soluției din eprubeta standard este cunoscută, fiind scrisă pe eticheta eprubetei. Se citește extincția probei și se introduce în formula:

$$\text{Hb (g\%)} = (\text{Ex. probei} \times \text{Conc. std}) / \text{Ex. std.}$$

Metodele computerizate de determinare a Hb se bazează pe determinări colorimetrice, cu diluție de 1/400 cu un diluent special. Agentul de lizare distruge hematiile și intră în reacție cu Hb, formând cianmethemoglobina, care are absorbție maximă la 540 nm. Timpul de lizare pentru Hb este dependent de agentul de lizare.

Lucrări practice de efectuat în laborator

1. Metoda colorimetrică SAHLI

Principiul metodei: Se compară colorimetric o soluție de clorhidrat de hemină, preparată din sângele de cercetat, cu un etalon de culoare al aparatului, stabilit dintr-o cantitate normală de Hb (16 g Hb/100 ml sânge).

Materiale necesare:

- materiale pentru puncția capilară: ace sterile, vată, alcool - eter;
- soluție HCl N/10;
- pipetă capilară pentru Hb, cu un singur reper la 20 mm³;
- apă distilată;

- hemoglobinometrul Sahli (figura 2.9.). Hemoglobinometrul Sahli este alcătuit dintr-un stativ dedicat, cu 3 eprubete:
- 2 eprubete laterale care conțin substanța etalon (clorhemină în glicerină) de culoare brună sau 2 baghete de sticlă de aceeași culoare;
- eprubeta centrală în care se lucrează proba și care este gradată de jos în sus de la 10 la 140 (unități Sahli). Diviziunea 100 corespunde, conform etalonării cu o concentrație de 16 g Hb%. Deseori eprubeta prezintă și o a doua scară de diviziuni, în g Hb%. Stativul de susținere al eprubetelor are un perete posterior de sticlă mată, facilitând compararea soluțiilor. Aparatului îi sunt atașate pe lângă pipeta de Hb și o pipetă pentru apă distilată și o baghetă pentru omogenizare.

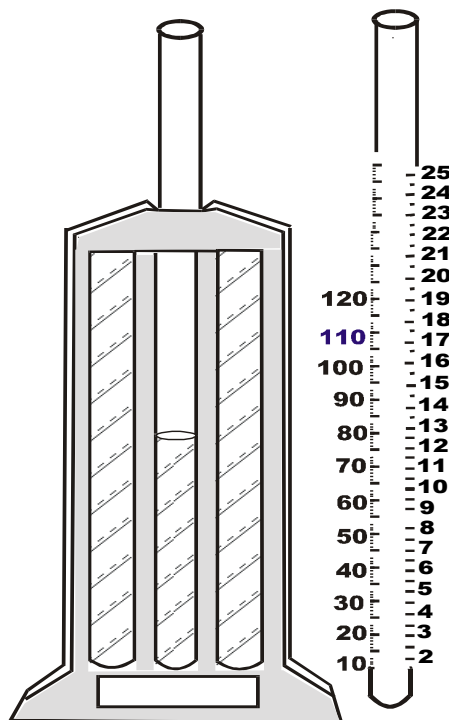


Figura 2.9. Hemoglobinometrul Sahli

Tehnica de lucru:

În eprubeta centrală se pipetează soluție de HCl N/10 până la prima diviziune, notată cu 10. Cu pipeta capilară de Hb se adaugă 20 mm³ sânge recoltat prin puncție capilară.

Se introduce pipeta la fundul tubului gradat și se dă drumul sângelui în HCl N/10. Se curăță capilarul pipetei de sânge prin aspirare și golire succesivă.

Se agită eprubeta pentru o bună omogenizare a amestecului. După 5 minute amestecul devine de culoare brună, datorită formării clorhidratului de hemină.

Se diluează treptat cu apă distilată, picătură cu picătură, omogenizând cu bagheta sau prin răsturnare, după adăugarea apei distilate, până în momentul când culoarea probei de cercetat este identică cu cea a etalonului. Se citește gradația de pe tub.

Citirea și exprimarea rezultatelor:

Citirea se face întotdeauna pe tub la nivelul meniscului inferior. Pentru eprubetele care nu au scara de diviziune în g%, calculul se face astfel: dacă diviziunea 100 corespunde conform etalonării cu 16 g Hb%, atunci cifra găsită (85 de exemplu) va corespunde la x g Hb.

$$\begin{array}{l}
 100 \dots\dots\dots 16 \text{ g} \\
 85 \dots\dots\dots x \text{ g} \\
 x = 85 \times 16 \text{ g} / 100 = 13,6 \text{ g Hb\% ml sânge.}
 \end{array}$$

Metoda poate prezenta o eroare de $\pm 15\%$, datorată:

- materialului deteriorat sau erori de etalonare ale aparatului;
- tehnicii deficitare;
- diluției incorecte prin cantitate mai mare de apă distilată;
- citirii la lumina artificială;
- acuității vizuale a examinatorului.

2. Dozarea hemoglobinei cu analizorul fotometric HemoCue

Analizorul fotometric HemoCue este un dispozitiv mic, "de buzunar", folosit în condiții de urgență, în ambulatoriu sau la domiciliu, care permite obținerea rapidă și corectă a concentrației de hemoglobină. Folosește cantități mici de sânge (10 μL) capilar, arterial sau venos, care se introduce într-o microcuvă din plastic, de unică folosință.

Principiul metodei. Este comun tuturor determinărilor fotometrice. În urma reacției dintre hemoglobină și reactivul uscat din microcuvă se formează un derivat al hemoglobinei (azid-methemoglobină), care absorbe lumina cu lungime de undă de 537 nm.

Metoda de lucru este simplă și rapidă. (figura nr. 2.10.). După obținerea unei picături de sânge, se aplică microcuva pe picătură, aceasta umplându-se prin capilaritate, la nivelul unei cavități mici a acesteia. Această cavitate, de dimensiuni foarte mici (μm) conține un reactiv care se dizolvă la contactul cu sângele. Se șterge orice exces de sânge din părțile laterale ale microcuvei, după care se introduce în suportul special din analizor. Rezultatul apare pe ecranul aparatului în aproximativ un minut.



Figura nr.2.10.

Sursa: <http://www.hemocue.com>

Folosind această tehnică se poate măsura nu numai concentrația hemoglobinei, dar și valoarea concentrației altor substanțe dizolvate în mediu lichidian (glucoză, lipide sanguine, albumină urinară).

Valori normale ale concentrației de Hb:

- Femei: 12 - 15 g/dl (121 - 151 g/l, sau 7.5 - 9.3 mmol/l)
- Bărbați: 13,8 – 18 g/dl (138 - 182 g/l, sau 8.5 - 10.6 mmol/l)
- Hb liberă (în plasmă): 1 - 5 mg/dl (0,01 - 0,05 g/l)

Variații fiziologice:

Există variații fiziologice în funcție de vârstă, sex, altitudine, anumite perioade fiziologice (digestie, efort fizic, sarcină) și temperatura mediului.

- în funcție de sex: mai mare la bărbați, după pubertate datorită hormonilor androgeni, care stimulează eritropoieza (estrogenii deprimă eritropoieza);
- în funcție de vârstă: nou-născutul are un număr mai mare de eritrocite datorită poliglobuliei fiziologice (transfuzia de sânge matern prin cordonul ombilical), după 6 – 12 săptămâni scade până la valori de anemie, datorită înlocuirii HbF cu HbA, iar după 6 luni crește, atingând valoarea de la adult la 12 ani. La bătrâni scade (chiar la valori de anemie) prin scăderea producției de eritropoietină, reducerea măduvei osoase hematogene etc.;

- în sarcină scade, prin hemodiluție, până la valori de 11 - 14 g/dl (110 -120 g/l, sau 6.8 - 7.4 mmol/l);
- persoanele care trăiesc la altitudine mare au valori mai mari ale concentrației hemoglobinei (prin poliglobulie fiziologică de altitudine, datorată presiunii parțiale mai mici a oxigenului);
- în efortul fizic moderat, concentrația Hb crește, datorită creșterii numărului de hematii, prin pierderea de apă în interstițiu și hemoconcentrație, splenoconstracție (hematocritul splenic este de 70 – 80%) și stimularea citodiabazei; în efortul fizic intens concentrația Hb scade datorită scăderii numărului de hematii, prin eritroliză (hemoglobinuria paroxistică de efort, cunoscută și ca hemoglobinuria de marș);
- activitatea intelectuală, stresul, emoțiile cresc temporar numărul de hematii, deci și concentrația Hb, ca urmare a secreției crescute de adrenalină și cortisol;
- creșterea temperaturii determină creșterea concentrației de Hb, consecutivă creșterii numărului de eritrocite, prin splenoconstracție
- variațiile zilnice ale numărului de hematii în legătură cu digestia, starea de repaus și postura sunt de maximum 10%.

Variații patologice

- **Creșterea concentrației de hemoglobină** și a hematocritului, în paralel cu a numărului de eritrocite, poartă numele de poliglobulie.
- **Scăderea concentrației de hemoglobină** și hematocritului, în paralel cu scăderea numărului de eritrocite, poartă numele de anemie.



Studiu individual

1. Consultând un dicționar medical, cursul “Fiziologia sângelui” și materialele recomandate în bibliografie, vă rugăm să definiți următorii termeni: cromoproteină, grupare prostetică, protoporfirină, legatură covalentă, legatură coordinativă, methemoglobină, extinție, măduvă osoasă hematogenă.
2. Cum influențează numărul de hematii valoarea concentrației hemoglobinei?
3. Care sunt parametrii sanguini care se modifică în anemii, și care este sensul acestei modificări?
4. Care este concentrația hemoglobinei la o fetiță de 9 ani, comparativ cu un băiat de aceeași vârstă?
5. Precizați în termeni de comparație, concentrația hemoglobinei la un bărbat de 80 de ani, comparativ cu unul de 30 de ani.

FIȘĂ DE LUCRU ÎN LABORATOR

1. Prezentați principiul metodei de dozare a hemoglobinei prin metoda colorimetrică Sahli.

.....

2. Care sunt tipurile de hemoglobină cunoscută, începînd cu viața embrionară?

.....

3. Care sunt valorile normale ale concentrației sanguine a hemoglobinei?

.....

4. Care este capacitatea de fixare a O₂ de către Hb (în condiții de completă oxigenare)?

.....

5. Care sunt variațiile patologice ale concentrației de hemoglobină?

.....

6. Explicați variațiile fiziologice ale concentrației hemoglobinei în funcție de vîrstă și sex.

.....

7. Explicați variațiile concentrației hemoglobinei în funcție de altitudine.

.....

8. Explicați modificările concentrației hemoglobinei produse de efortul fizic.

.....

9. În ce situații concrete recomandați determinarea concentrației hemoglobinei la un pacient?

.....

10. Ce modificări temporare ale parametrilor eritrocitari credeți că au loc în orele care urmează după ce ați donat o unitate (500 ml) de sânge?

.....

2.5. DETERMINAREA VITEZEI DE SEDIMENTARE A HEMATIILOR

Definiție. Viteza de sedimentare a hematiilor (VSH) este reprezentată de lungimea coloanei de cădere a hematiilor prin plasmă, într-un anumit interval de timp. V.S.H. este influențat de factori eritrocitari, plasmatici, fizici și chimici, care sunt prezentați în tabelul 2.5.

Tabelul 2.5. Factorii care influențează V.S.H.		
A. Factori eritrocitari	cresc V.S.H.	- creșterea volumului hematiilor - scăderea numărului de hematii
	scad V.S.H.	- creșterea suprafeței relative a hematiilor (platicite) - creșterea numărului de hematii (poliglobulii) - forma hematiilor (poikilocitoze)
B. Factori plasmatici	cresc V.S.H.	- creșterea cantității de globuline și fibrinogen - creșterea colesterolului în plasmă
	scad V.S.H.	- creșterea cantității de albumine - creșterea acizilor și sărurilor biliare în plasmă - creșterea lecitinei în plasmă
C. Alți factori	cresc V.S.H.	- înclinarea tubului - temperatura crescută
	scad V.S.H.	- citrat trisodic în cantitate mare produce diluție - temperatura scăzută

Lucrări practice efectuate în laborator.

Metoda Westergreen

Principiul metodei: se apreciază lungimea de cădere a hematiilor prin plasmă, într-un interval de timp de 1 oră și la 2 ore.

Materiale necesare:

- instrumentar de puncție venoasă: ac și seringă sterilă de unică folosință, garou, vată, alcool;
- eprubete, capsule de porțelan;
- pipete Westergreen (divizate de la 0 – 200 mm, cu diametrul de 2,5 – 3 mm);
- stativ pentru pipetele Westergreen (figura 2.11.), cu fir de plumb pentru verticalitate;
- pipete gradate de 1 și 2 ml;
- soluție anticoagulantă de citrat trisodic 3,8%.

Tehnica de lucru

- Într-o eprubetă cu 0,4 ml citrat trisodic 3,8% se adaugă 1,6 ml sânge recoltat prin puncție venoasă (fără stază realizată de garou).
- Se amestecă bine conținutul și se aspiră în pipeta Westergreen, până la diviziunea zero. Se închide cu indexul partea superioară a pipetei. Capătul inferior al pipetei se pune pe dopuri de cauciuc aflate la partea inferioară a stativului, iar capătul superior se fixează în dispozitivul de strângere.
- Se controlează verticalitatea stativului și se notează ora la care s-au fixat pipetele.
- Stativul va fi menținut la o temperatură constantă de 22°C.

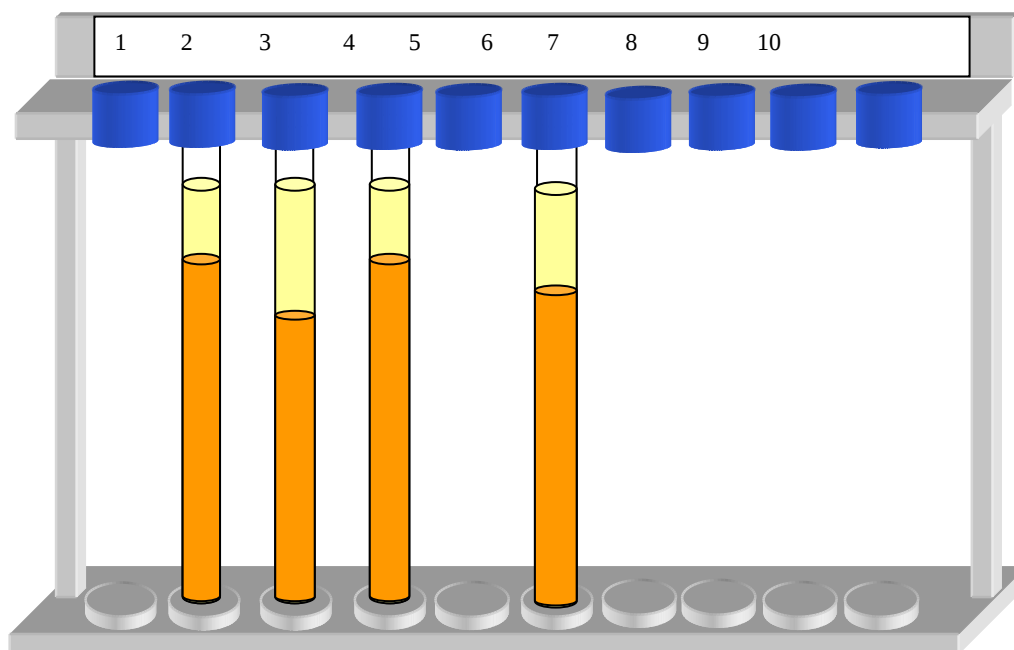


Figura 2.11. Dispozitivul Westergreen

Citirea rezultatelor

Se face la 1 oră și la 2 ore, urmărind limita de separare dintre hematiile sedimentate și plasmă. Se măsoară înălțimea coloanei de plasmă.

Surse de eroare în determinarea V.S.H.

- Creșterea temperaturii determină creșterea V.S.H. Între 20 – 27°C, variațiile sunt de mică importanță și determinarea se poate face la temperatura camerei. La temperaturi în afara acestor limite se recomandă ca stativul să fie introdus la termostat, la temperatura de 22°C.
- Înclinarea tubului față de verticală, la metoda Westergreen, poate modifica valorile reale.
- În cazul pacienților cu crioglobulinemie, temperatura camerei prea mică induce erori determinate de gelificarea plasmei, ceea ce împiedică sedimentarea hematiilor. Se recomandă efectuarea V.S.H.-lui la termostat, la 37°C.
- Păstrarea sângelui mai mult timp, determină modificări care se reflectă în valoarea V.S.H. Se recomandă efectuarea testului imediat după recoltarea sângelui.
- Proporția dintre anticoagulant și sânge trebuie respectată, pentru a nu dilua suplimentar proba.

Valorile normale și variațiile fiziologice ale V.S.H. Datele sunt prezentate în tabelul 2.6.

Tabelul 2.6. Valorile normale și variațiile fiziologice ale V.S.H.		
Valori normale	la 1 oră	la 2 ore
	bărbați: 7 – 9 mm femei: 8 – 10 mm	bărbați: 10 – 12 mm femei: 12 – 16 mm
Variații fiziologice	nou născut: 1 – 2 mm	datorită numărului crescut de hematii
	0 – 5 ani: 9 – 12 mm	-
	4 – 15 ani: 0 – 20 mm	-
	vârstnici: ușoară creștere	datorită numărului scăzut de hematii și concentrației crescute a fibrinogenului
	menstră: VSH crescut până la 35 mm	-
	sarcină: VSH crescut	datorită scăderii hematocritului și creșterii fibrinogenului și α -globulinelor
	vagotonici: VSH scăzut	-

Modificările patologice ale V.S.H. sunt prezentate în tabelul 2.7.

Tabelul 2.7. Modificările patologice ale V.S.H.		
Variații patologice	Creșteri ale V.S.H.	- stări infecțioase acute (infecții acute localizate, septicemii) - stări infecțioase cronice (reumatism, TBC) - stări inflamatorii acute - necroze (infarct miocardic) și distrucții tisulare - anemii - stări post-iradiere - colică renală - boli maligne (tumori, boală Hodgkin etc.)
	Scăderi ale V.S.H.	- policitemie - stază cardiacă - stări alergice - stări cașectice grave - anemie drepanocitară - icter prin hepatită, hiperbilirubinemii

Semnificația biologică a vitezei de sedimentare a hematiilor (V.S.H.)

- V.S.H. este o metodă cu sensibilitate și fidelitate relative, fiind un **indicator clinic nespecific**. Este un semnalizator al stării patologice, în mod special al proceselor inflamatorii și are semnificație în contextul clinic.
- Organismul răspunde la o afecțiune acută (infecție, traumatism etc.) sau la acutizarea unei afecțiuni cronice prin eliberarea rapidă, în câteva ore, a citokinelor inflamatorii. Sub influența acestora, ficatul sintetizează și secretă proteine suport pentru răspunsul organismului la traumă. V.S.H.-ul este modificat predominant de

structura proteică a plasmei (exemplu: creșterea c% fibrinogenului) și secundar de numărul, forma și suprafața hematiilor.

- Ca element de urmărire în dinamică a unui proces patologic, creșterea V.S.H. semnifică acutizarea bolii, iar scăderea sa semnifică regresia bolii.
- În bolile acute, creșterea V.S.H. are valoarea unei evoluții favorabile a reacției imunologice, iar absența creșterii sale se corelează cu un sistem imunitar areactiv.
- În bolile cronice, creșterea V.S.H. arată că procesul inflamator este activ. În bolile cașectice, scăderea sa poate indica epuizarea mecanismelor reactive.
- Prin urmare, V.S.H. nu evidențiază prezența infecției, a inflamației sau a altor stări patologice, **ci modul în care organismul răspunde la acestea, fiind un test nespecific.**



Importanța determinării V.S.H. în practica medicală.

Creșterea V.S.H. reprezintă răspunsul nespecific al organismului și indică:

- Răspunsul organismului în prezența unui proces inflamator.
- Severitatea inflamației.
- Acutizarea unei afecțiuni cronice.
- Evoluția în dinamică a răspunsului organismului la o traumă.



Studiu individual

1. Consultând un dicționar medical și materialele didactice, vă rugăm să definiți următorii termeni: sedimentare, hematie, eritrocit, globulă roșie, inflamație, infecție, infestare, citokine, boală malignă, cașexie.
2. Caracterizați mărimile fizice: viteză și densitate.
3. De ce sedimentează hematiile?
4. Cum influențează numărul de hematii valoarea VSH-ului?

FIȘĂ DE LUCRU ÎN LABORATOR

1. Prezentați principiul metodei Westergreen pentru determinarea vitezei de sedimentare a hematiilor și modul de lucru.

2. Care sunt valorile normale ale V.S.H. ?

3. Enumerați factorii eritrocitari care modifică V.S.H.

4. Explicați mecanismul prin care fiecare factor eritocitar modifică V.S.H.

5. Enumerați factorii plasmatici care modifică V.S.H.

6. Explicați mecanismul prin care fiecare factor plasmatic modifică V.S.H.

7. Explicați de ce valoarea V.S.H. la bărbați este mai mică decât la femei.

8. Explicați de ce temperaturile scăzute pot modifica unele componente ale plasmei cu repercusiuni asupra valorii V.S.H. și vâscozității sângelui.

9. Explicați cum se modifică valoarea V.S.H. și valoarea hematocritului în cazul expunerii organismului la temperaturi crescute.

10. Explicați creșterea valorii V.S.H. în infecții și inflamații.

11. În cazul infestării organismului cu paraziți, creșterea valorii V.S.H.-ului este specifică?

12. Prezentați și comentați semnificația clinică a valorii V.S.H.

2.6. DETERMINAREA DIAMETRULUI ERITROCITAR.

CURBA PRICE - JONES

Majoritatea eritrocitelor (2/3) au diametrul de aproximativ **7,2 μm** , restul prezintă o ușoară deviere peste și sub această valoare (între 6,6 - 7,7 μm). Se pot observa unele hematii cu un diametru mai mare de 9 μm (macrocite) sau mai mic de 6 μm (microcite); fenomenul este numit **anizocitoză fiziologică**.

Diametrul eritrocitar poate fi *apreciat* de către un examinator experimentat printr-o simplă inspecție a frotiului; *determinarea cu exactitate* se face, însă, cu ajutorul micrometrelor (ocular și obiectiv).

- **Micrometrul ocular** (figura nr. 2.12.) este o lentilă de sticlă care are inscripționată o scală gradată și care poate fi plasată în ocularul microscopului. Se utilizează pentru a măsura dimensiunile obiectelor mărite de către microscop. Mărimea fizică a diviziunilor de pe scală depinde de gradul de mărire al microscopului.
- **Micrometrul obiectiv** (figura nr. 2.13.) este utilizat pentru etalonarea celui ocular (se plasează pe măsuta microscopului și se suprapun cele două scale) (figura. 2.14.).

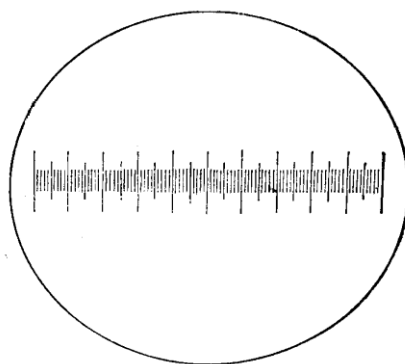


Figura 2.12. Micrometrul ocular

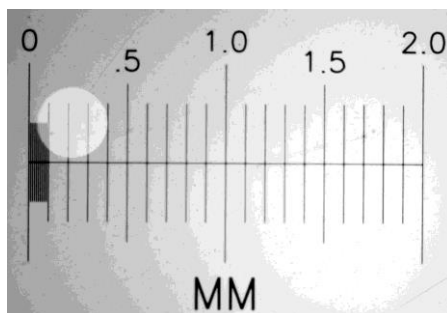


Figura 2.13. Micrometrul obiectiv

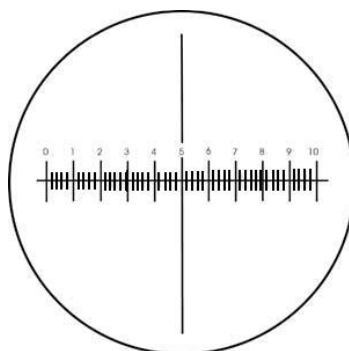


Figura 2.14. Suprapunerea celor două scale



Figura 2.15. Etalonarea micrometrului ocular
(sursa Creative Commons)

Utilitatea practică a determinării diametrului eritrocitar

Determinarea diametrului eritrocitar are utilitate practică pentru că numeroase anemii sunt însoțite de modificarea diametrului și, în consecință, a volumului eritrocitar.

Alături de dozarea hemoglobinei, a numărului de eritrocite, leucocite, trombocite și dozarea hematocritului (volumul total al hematiilor), determinarea diametrului eritrocitar face parte din examinarea sanguină completă, care furnizează informații despre celularitatea sanguină a pacienților.

Lucrări practice efectuate în laborator.

1. Determinarea diametrului eritrocitar

Principiul determinării

Cu ajutorul unui micrometru ocular se măsoară diametrul unui număr cunoscut de eritrocite (cel puțin 100), pe un frotiu colorat prin tehnica May-Grünvald-Giemsa.

Materiale necesare:

- micrometru ocular;
- micrometru obiectiv sau o cameră de numărat cu caroiaj Thoma;

- frotiu de sânge colorat;
- microscop cu obiectiv cu imersie.

Tehnica de lucru:

Etalonarea micrometrului ocular se poate face în două feluri:

- cu ajutorul micrometrului obiectiv, pe care îl așezăm pe platina microscopului.
- Se introduce micrometrul ocular în ocularul microscopului; se observă câte diviziuni de pe micrometrul ocular se suprapun peste diviziunile micrometrului obiectiv, avându-se în vedere că o *diviziune de pe micrometrul obiectiv are 10 μm* . Valoarea unei diviziuni de pe micrometrul ocular se află aplicând regula de trei simplă.
- cu ajutorul camerei Thoma - se folosește același procedeu, avându-se în vedere că o **latură a unui pătrat mic are 50 de μm** .

Măsurarea diametrului eritocitar. Se păstrează micrometrul ocular, etalonat, în ocularul microscopului; pe platina microscopului se pune frotiul de cercetat; se examinează cu obiectivul cu imersie, punând ulei de cedru și schimbând câmpurile în sens vertical; se măsoară diametrul a cel puțin 100 de hematii.

Rezultate și interpretare:

Se transformă diviziunile oculare în μm . Diametrul eritocitar mediu (DEM) se calculează făcând media aritmetică a diametrelor găsite.

Valoarea normală a mediei este de **7,2 μm** , cu limite între 6,6 – 7,7 μm .

2. Curba Price-Jones

Cecil Price-Jones (1863 – 1943), hematolog britanic, a dezvoltat în 1910 o metodă pentru măsurarea directă a diametrelor eritocitare pe un frotiu de sânge periferic și redarea rezultatelor sub forma unui grafic care exprimă distribuția acestora. În 1924 a raportat prezența anizocitozei în anemia pernicioasă, iar în 1933 a publicat un studiu despre diametrul eritocitar.

Curba reprezintă un grafic obținut din variațiile de mărime ale eritrocitelor sanguine. Actualmente, curba este realizată automat de către analizorul de hematologie.

Înscrierea curbei se face cu ajutorul unui sistem de coordonate: pe abscisă notăm diametrul, cu diviziuni din 0,5 în 0,5 μm , iar pe ordonată notăm numărul procentual de eritrocite corespunzător fiecărui diametru. Este recomandabil să se determine diametrul unui număr mai mare de 100 de eritrocite (figura nr. 2.16.).

Baza curbei se întinde, în mod normal, între 5 și 9 μm , curba având aspectul unui turn central a cărui arie reprezintă 60 – 70% din totalitatea eritrocitelor, flancat de două zone laterale care reprezintă 30 – 40% din totalitatea eritrocitelor (15–20% pentru fiecare zonă). Vârful turnului central se situează la 7,2 μm și corespunde diametrului eritocitar mediu (DEM).

Variații fiziologice ale diametrului eritocitar

La nou-născut, în primele două săptămâni, majoritatea eritrocitelor au diametrul de 8 – 8,2 μm . La un an, diametrul eritrocitelor scade la 7 μm , pentru a atinge valorile adultului între 2 și 9 ani. Curba Price-Jones este, deci, deviată la dreapta la nou-născut (*macrocitoza fiziologică a nou-născutului*).

Variații patologice ale diametrului eritocitar

Scăderea diametrului eritocitar mediu, cu devierea curbei Price-Jones la stânga și cu vârful în jurul valorii de 6 μm , se întâlnește în microcitozele din: anemia cu sferocite (microsferocitoza ereditară sau boala Minkowski-Chauffard), anemia feriprivă etc.

Creșterea diametrului eritocitar mediu, cu devierea curbei Price-Jones la dreapta, cu vârful în jurul valorii de 9 μm , se întâlnește în macrocitozele și megalocitozele din: anemiile megaloblastice cum ar fi anemia Biermer, anemiile din nefropatii cronice, anemia

aplastică, anemia gravidică, intoxicații cu benzen sau aur (în urma tratamentelor cu săruri de aur), expunere la radiații.

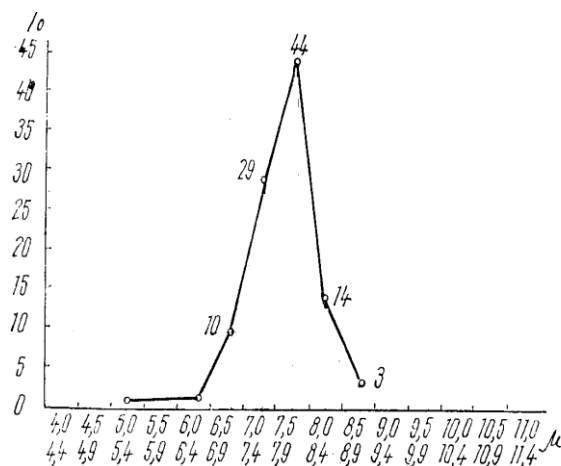


Figura 2.16. Curba Price-Jones

Curbă Price-Jones cu două vârfuri, unul la stânga și altul în zona normală, întâlnită în microcitoze transfuzate (adică la care s-au făcut transfuzii cu sânge normal), sau unul la dreapta și altul în zona normală, întâlnită în macrocitoze sau megalocitoze transfuzate.

Curbă Price-Jones cu implantare largă – apare în anizocitozele secundare anemiilor grave, în care diametrul eritrocitar poate varia între 5 și 10 μm sau mai mult, de ex. în thalasemia majoră, anemia Biermer, anemia hemolitică congenitală.



Studiu individual

1. Consultând un dicționar medical sau materialele didactice, vă rugăm să definiți următorii termeni: macrocit, microcit, anizocitoză, micrometru, etalonare, anemie pernicioasă, anemie aplastică, anemie hemolitică.

FIȘĂ DE LUCRU ÎN LABORATOR

1. La etalonarea micrometrului ocular, presupunem că 20 de diviziuni ale acestuia se suprapun peste o diviziune a celui obiectiv. Ce diametru are o hematie la care s-au măsurat 15 diviziuni oculare?

2. Se determină diametrul eritocitar la 45 de hematii și se defectează microscopul. Pentru a realiza o curbă Price-Jones vrem să determinăm diametrul a 100 hematii. Este suficient să mutăm frotiul de sânge periferic la un alt microscop și să continuăm măsurarea diametrelor?

3. Se măsoară diametrul a 100 hematii și se obțin următoarele valori:

- 10 hematii - 7,3 μm
- 5 hematii - 6,7 μm
- 3 hematii - 5,8 μm
- 1 hematie - 5 μm
- 1 hematie - 5,6 μm
- 25 hematii - 7,8 μm
- 30 hematii - 8 μm
- 20 hematii - 8,9 μm
- 5 hematii - 9,5 μm

În spațiul liber din dreapta schițați curba Price-Jones.

Este o curbă fiziologică?

4. Ce informații vă oferă un diametrul eritocitar mediu de 9,3 μm ?

5. Ce informații vă oferă un diametru eritocitar mediu de 6 μm ?

6. Cu ce alte constante eritocitare directe puteți corela diametrul eritocitar, pentru un eventual diagnostic?

7. Care este constanta eritocitară directă cu care se corelează perfect diametrul eritocitar? Dar cea indirectă?

8. Ce înțelegeți prin macrocitoza fiziologică a nou-născutului?

9. Ce este anizocitoza fiziologică? Cum ați explica prezența ei?

10. Care sunt limitele fiziologice ale diametrului eritocitar mediu?

2.7. INDICII ERITROCITARI INDIRECTI

După modul de determinare, indicii sau constantele eritrocitare pot fi **directe** (măsurabile prin metode specifice): diametrul hematiei, hematocritul, numărul de hematii, concentrația de hemoglobină etc., sau **indirecte** (derivate), cum ar fi volumul eritocitar mediu, hemoglobina eritocitară medie etc., obținute prin calcul matematic, pe baza constantelor eritrocitare directe.

Indicii eritrocitari reprezintă o formă de exprimare a constantelor eritrocitare prin raportarea valorii găsite la valoarea considerată normală. Valorile anormale indică prezența anemiei și îi pot identifica tipul morfologic.

Constantele și indicii eritrocitari dau informații utile asupra **tipul morfologic și cromatic** al unei anemii. În practică sunt folosiți numai o parte dintre ei, restul fiind utilizați doar în cercetarea științifică.

Deoarece se calculează pe baza valorilor obținute la numărătoarea eritrocitelor, la determinarea hematocritului și a hemoglobinei, rezultă că gradul de exactitate al lor depinde de preciziile determinărilor anterioare.

Indicii eritrocitari indirecti sau derivați

a) **Volumul eritocitar mediu (VEM)** – reprezintă volumul ocupat de un singur eritrocit. Se obține după formula:

$$\text{VEM} = \frac{\text{Ht} \times 10}{E}$$

Unde Ht = hematocritul %, E = numărul de eritrocite/mm³ (în milioane);

Prin metoda automată, VEM este determinat prin împărțirea sumei volumelor eritrocitare la numărul de eritrocite.

- Rezultatele se exprimă în microni cubi (μ³) sau femtolitri (fl).
- La adult, valorile normale sunt cuprinse între 80 – 100 fl (valori mai mari la nou-născuți, precum și la vârstnici; valori mai mici la copii și adolescenți până la 18 ani).

Valori patologice se întâlnesc în:

- **macrocitoză** (peste 100 μ³): sarcină, alăptare, copii în perioada de creștere etc.);
- **megalocitoză** (120 – 140 μ³): deficit de vitamină B₁₂ sau de acid folic;
- **microcitoză** (valori sub 80 μ³): anemia feriprivă hipocromă, anemia din infecțiile cronice etc.

Dezavantajul calculării VEM constă în folosirea numărului de eritrocite, a cărui determinare implică eroarea inerentă metodei (± 11%).

b) **Hemoglobina eritocitară medie (HEM)** reprezintă încărcarea medie cu hemoglobină a unui eritrocit. Se exprimă în micro-micrograme (μμg) sau picograme (pg). Se calculează după formula:

$$\text{HEM} = \frac{\text{Hb} \times 10}{E}$$

- Unde Hb = hemoglobina în g % ml sânge, E = numărul de eritrocite/mm³ (în milioane).

Valori normale: 30 μμg (pg), cu variații între 26 – 34 μμg.

Valori patologice se întâlnesc în:

- megalocitoză, anemia regenerativă (observată, de exemplu, în timpul tratamentului cu fier a anemiei feriprive), la nou-născut - HEM peste 34 μμg = „hipercromie” (vezi explicația de la pagina 59);

- anemii microcitare - HEM sub 26 µg = hipocromie;
- anemii normocitare - sunt, de obicei, normocrome.

Această constantă este mai puțin exactă, fiindcă se calculează din hemoglobină și număr de eritrocite, a căror determinare este supusă erorilor.

c) **Concentrația de hemoglobină eritrocitară medie (CHEM)** reprezintă concentrația medie a hemoglobinei în procente, sau grame de hemoglobină conținute în 100 ml masă eritrocitară. Se calculează după formula:

$$\text{CHEM} = \frac{\text{Hb} \times 100}{\text{Ht}}$$

Valori normale: 34 % (34 g la 100 ml masă eritrocitară cu variații între 32 – 36 %), sau se pot exprima în g/dL (32 – 36 g/dL sau 320-360 g/L).

Semnificație clinică – VEM este un indice extrem de valoros în clasificarea anemiilor, dar HEM și CHEM, de obicei, nu aduc în plus informații relevante clinic. Totuși, au un rol important în controlul de calitate al laboratorului, deoarece acești indici variază foarte puțin de la o zi la alta pentru un specimen dat, dacă pacientul nu este transfuzat.

Datorită comportamentului similar al volumului eritrocitar și conținutului în Hb al fiecărui eritrocit în parte, CHEM rămâne constant în multe afecțiuni hematopoietice.

În practică se preferă utilizarea acestei constante, la al cărei calcul se folosește hematocritul.

Valori patologice se întâlnesc în:

- anemiile microcitare, hipocrome (anemia feriprivă, unele talasemii) în care CHEM scade sub 32 %, ceea ce exprimă o încărcare redusă a eritrocitului cu hemoglobină;
- *creșteri peste 36 % nu se pot întâlni*, eritrocitul având, în mod normal, o saturație maximă cu hemoglobină (creșterea în continuare a concentrației de Hb ar duce la precipitarea acesteia). În plus, creșterea volumului eritrocitului influențează și creșterea hematocritului, valoarea raportului rămânând constantă. Rezultă că noțiunea de „hipercromie”, prin prisma acestei constante, este falsă.

d) **Grosimea eritrocitară medie (GEM):**

Valorile normale sunt: 1,7 – 2,5 µ. Valori patologice se întâlnesc în sferocitoză (peste 2,5 µ) și în platicitoză (sub 1,7 µ). Are valoare practică redusă.

e) **Suprafața eritrocitară medie (SEM):**

Valori patologice: scade în microcitoză, crește în macrocitoză. Este utilizată în cercetarea științifică.

f) **Lărgimea distribuției eritrocitare (RDW – red blood cell distribution width)** este un indice eritrocitar care cuantifică heterogenitatea volumului celular (*gradul de anizocitoză*). RDW este calculat de analizorul automat, atunci când există două sau mai multe “peak”-uri (vârfuri) și lărgime de distribuție anormală pe curba de distribuție eritrocitară. Distribuția VEM într-o probă este prezentată sub forma unui grafic în care pe abscisă se proiectează volumul eritrocitar, iar pe ordonată frecvența relativă.

$$\text{RDW} = \frac{\text{Deviația standard a mărimii eritrocitelor} \times 100}{\text{VEM}}$$

Valori normale: 11,5-14,5 % coeficient de variație (CV) a volumului eritrocitar.

RDW este util în caracterizarea inițială a anemiilor, în particular a anemiei microcitare.

- RDW este util în diferențierea beta-talasemiei minore necomplicate, în care VEM este scăzut, iar RDW normal, de anemia feriprivă, în care VEM este scăzut, iar RDW crescut (creșterea RDW este un semn precoce în deficitul de fier).

- RDW este ușor crescut în beta-talasemia minoră cu anemie ușoară .
- RDW permite diferențierea între anemia din bolile cronice (VEM normal/scăzut, RDW normal) și anemia feriprivă incipientă (VEM normal/scăzut, RDW crescut).

RDW crescut: anemia feriprivă, anemia megaloblastică, diferite hemoglobinopatii (ex. β -talasemia), anemia hemolitică imună, reticulocitoza marcată, prezența de fragmente eritrocitare, aglutinare, dimorfism eritrocitar (inclusiv pacienții transfuzați sau cei tratați recent pentru deficiențe nutriționale).

RDW normal: anemia din bolile cronice, β -talasemia heterozigotă, anemia hemoragică acută, anemia aplastică, sferocitoza ereditară, boala cu Hb E, siclemia.

Nu există o cauză cunoscută pentru RDW scăzut.

g) Indicele de culoare (IC) este cunoscut și sub denumirea de valoare globulară. Reprezintă conținutul mediu în hemoglobină al unui eritrocit în comparație cu conținutul în hemoglobină al unui eritrocit normal.

- Valorile normale: 0,85 – 1,15.
- Valori patologice: sub 0,85 indică o hipocromie, peste 1,15 indică o hiperchromie (noțiune falsă: o încărcare suplimentară cu hemoglobină are loc odată cu creșterea volumului eritrocitar, concentrația rămânând, însă, aceeași).

h) Indicele de sfericitate (IS) este raportul dintre DEM și GEM.

- Valori normale: 3,1 – 3,7.
- Valori patologice: peste 3,7 indică o platicitoză; sub 3,1 indică o sferocitoză.

Alți indici folosiți în cercetarea științifică: indicele de volum, indicele de saturație, indicele de elipticitate etc.

Importanța practică a indicilor eritrocitari

Permit precizarea tipului morfologic și cromatic al unei anemii, atât prin valorile găsite, cât și prin confruntarea acestor valori cu aspectul eritrocitelor pe frotiul de sânge.

Întrucât determinarea hematocritului și a hemoglobinei comportă cele mai mici erori, putem considera **CHEM ca cea mai precisă dintre constantele eritrocitare.**



Studiu individual

Consultând un dicționar medical sau materialele didactice, vă rugăm să definiți următorii termeni: cromie, morfologie, sferocitoză, platicitoză, a cuantifica, analizor automat, deviație standard, talasemie, aglutinare, dismorfism, deficiență nutrițională.

FIȘĂ DE LUCRU ÎN LABORATOR

1. Care este cea mai precisă dintre constantele eritrocitare? De ce?

.....

2. De ce este falsă noțiunea de hipercromie prin prisma CHEM?

.....

3. Copil în vârstă de 10 ani, prezintă $Ht = 43\%$, $E = 4,2 \text{ mil/mm}^3$, $VEM = 102,3 \mu^3$. Valorile sunt fiziologice? Vă gândiți să-i recomandați și alte teste hematologice?

.....

4. Care este indicele eritocitar care vă cuantifică gradul de anizocitoză?

.....

5. Ce constante și indici eritrocitari ar fi utili pentru a diferenția o anemie post-hemoragică de una feriprivă?

.....

6. Sugar în vârstă de 11 luni, alimentat exclusiv lactat (diversificarea alimentației se face, normal, între 4 și 6 luni de viață), prezintă discretă paloare. Ce teste hematologice recomandați? Dar regim alimentar?

.....

7. Ce înțelegeți prin anemie normocromă normocitară? În ce situații ar putea să apară?

.....

8. Tânăr motociclist, fără probleme de sănătate în antecedente, în urma unui accident rutier pierde aproximativ 1 litru de sânge; este transfuzat imediat, conform grupei și Rh-ului. La 2 zile după transfuzie i se recoltează sânge pentru teste sanguine uzuale. Cum credeți că vor fi rezultatele testelor?

.....

9. Cum denumiți o hematie normală din punct de vedere al culorii, formei și mărimii?

.....

10. Dacă la un pacient găsiți valori ale : $HEM = 24 \mu\text{g}$ și $CHEM = 33\%$, cum le interpretați?

.....

11. Pacientă cu vârsta de 65 ani, prezintă valori ale $Hb = 10 \text{ g\%}$, $Ht = 33\%$, $E = 3,3 \text{ mil/mm}^3$. Sunt valori fiziologice? Recomandați și alte analize de laborator? Este cazul să instituți vreun tratament?

.....

2.8. DETERMINAREA REZISTENȚEI OSMOTICE A HEMATIILOR

Definiție. Hemoliza reprezintă distrugerea eritrocitelor și eliberarea consecutivă a conținutului (hemoglobină) în fluidul de dispersie (plasma). Termenul provine din cuvintele grecești “aima” (aima, haema, hemo), care înseamnă sânge și “lusis” (lusis, lysis, liză) care înseamnă a elibera, termen acceptat și ca distrugere.

Hemoliza fiziologică este un proces fiziologic prin care hematiile îmbătrânite sunt fagocitate și dezintegrate de sistemul monocit-macrofag, iar constituenții eritrocitari eliberați sunt metabolizați și eliminați sau refolosiți. Pe parcursul vieții intravasculare, solicitările permanente la care sunt supuse eritrocitele (fizice sau chimice) determină modificări structurale și funcționale care permit recunoașterea lor de către fagocite printr-un fenomen de chimiotactism pozitiv. Apar:

- modificări de formă (tendință la sfericitate, scăderea ATP);
- scăderea deformabilității, care nu-i mai permite eritrocitului să reziste trecerii prin capilar, în special cel splenic;
- scăderea rezistenței osmotice și mecanice;
- alterări biochimice care interesează structura și funcționalitatea membranei sau metabolismului celular.

Mecanismele exacte prin care sunt recunoscute eritrocitele îmbătrânite sunt încă incerte. Distrugerea hematiilor îmbătrânite are loc preponderent extravascular (90%), în special la nivelul capilarelor măduvei osoase hematogene și, în proporție mai mică la nivelul splinei și ficatului (datorită particularităților anatomice – diametrul mic al capilarelor și traseu sinuos). Elementele eritrocitare eliberate urmează căi diferite de metabolizare: globina se transformă în aminoacizii constituenți care intră în fondul comun metabolic, iar hemul este convertit în pigmenți biliari (bilirubină neconjugată).

Hemoliza patologică reprezintă liza prematură a hematiilor cu defecte. Consecința distrucției eritrocitare premature este anemia hemolitică, aceasta având multiple cauze:

Anemii hemolitice de cauză eritocitară (intracorpulară) pot fi cauzate de:

- alterării structurale ale membranei eritrocitare;
- unor defecte enzimatice;
- alterării hemoglobinei (hemoglobine patologice).

Anemii hemolitice de cauză extraeritocitară (extracorpulăre) pot fi cauzate de:

- unor agenți infecțioși (malaria);
- administrării unor medicamente (sulfonamide, penicilină);
- factori traumatici (proteze valvulare);
- alterării endoteliului vascular (vasculite);
- alterării mediului de suspensie prin substanțe chimice (toxine animale și vegetale);
- hipersplenism;
- anticorpi antieritrocitari (anemii hemolitice autoimune, erori transfuzionale).

Evaluarea hemolizei.

Dezintegrarea experimentală a eritrocitelor a fost efectuată in vitro, prin procedee dintre cele mai diverse:

- agenți fizici: agitare mecanică, ultrasunete, încălzirea sângelui la 48°C;
- agenți fizico-chimici: scăderea presiunii osmotice a mediului de suspensie;
- agenți chimici: acizi, baze, săpunuri, cloroform, alcool;
- agenți biologici: anticorpii antieritrocitari.

Dintre metodele folosite la ora actuală, pentru evaluarea hemolizei, cele mai utilizate sunt: determinarea rezistenței mecanice, a rezistenței acide (testul Ham), teste care pun în evidență prezența anticorpilor antieritrocitari precum și determinarea rezistenței osmotice.

Lucrări practice de efectuat în laborator.

Determinarea rezistenței osmotice a hematiilor

Eritrocitele își mențin forma de disc biconcav și integritatea într-o soluție izoosmotică (izotonică), care are aceeași presiune osmotică cu a plasmei (figura. 2.17.). Suspendarea eritrocitelor într-o soluție hipotonă (presiune osmotică mai mică decât a plasmei) este urmată de hemoliză, deoarece mediul fiind hipotonic, iar conținutul eritrocitar hipertonic, egalizarea presiunii osmotice se face prin pătrunderea apei în eritrocite (gradient de apă). Ca urmare, acestea se umflă, devin sferice, membrana se rupe și hemoglobina este eliminată în soluție. Suspendarea eritrocitelor într-o soluție hipertonică (presiune osmotică mai mare decât a plasmei) este urmată de ieșirea apei din hematii, care se ratatinează (se zbârcesc).

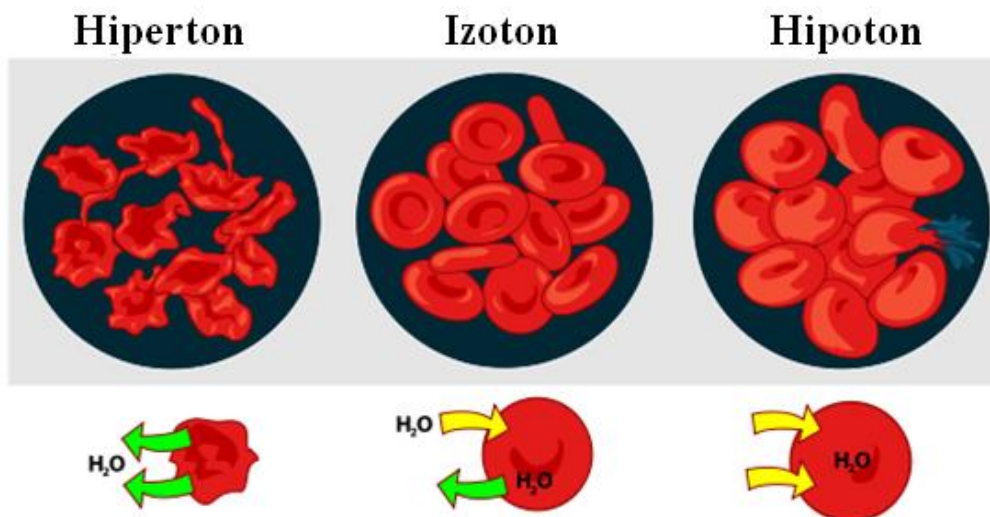


Figura. 2.17. Comportamentul unor celule (eritrocite), în funcție de presiunea osmotică a mediului în care sunt suspendate

Principiul determinării. Hemoglobina iese prin membrana lezată a hematiilor, când acestea sunt puse într-un mediu hipoton. Determinarea rezistenței osmotice a hematiilor înseamnă identificarea concentrației unei soluții de NaCl (grame %) la care hemoglobina începe să părăsească hematiile mai puțin rezistente (rezistența minimă) și concentrației unei soluții de NaCl (grame %) la care toate hematiile sunt hemolizate (rezistența maximă).

În acest scop se folosesc soluții de NaCl de concentrații descrescânde (cu 0,05%) cuprinse între 0,9 gr NaCl% și 0,05 gr NaCl%.

Materiale necesare: stativ cu eprubete de hemoliză, pipete gradate, sânge defibrinat, soluție de NaCl 0,9%, apă distilată.

Tehnica de lucru

- se iau 18 eprubete mici de hemoliză, se numerotează de la 1 la 18 și se așează în stativul de eprubete;
- în fiecare eprubetă se pune un amestec de soluție de NaCl 0,9 grame % și apă distilată, după protocolul din tabelul 2.7.;
- se omogenizează prin agitare;
- se lasă eprubetele în repaus absolut timp de 1 oră la temperatura camerei.

Citirea rezultatelor:

- În primele eprubete hematiile sedimentează (zonă roșie opacă la fundul eprubetei), iar supernatantul este incolor, transparent, datorită faptului că ele rezistă la o ușoară scădere a presiunii osmotice.

- Prima eprubetă în care supernatantul este ușor colorat în roz, indică hemoliza primelor hematii, cele mai puțin rezistente; este identificată astfel **rezistența minimă**, exprimată în concentrația în gr% a soluției de NaCl din eprubeta respectivă.
- Se caută în continuare eprubeta care nu mai prezintă sediment, în care tot conținutul este intens colorat în roșu, ceea ce indică hemoliza tuturor hematiilor, chiar și a celor mai rezistente; este identificată astfel **rezistența maximă**, exprimată în concentrația în gr% a soluției de NaCl din eprubeta respectivă.

Tabelul 2.7. Protocolul de diluție a soluției de NaCl 0,9 grame %								
Nr. Eprubetă	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	E ₅		E ₁₇	E ₁₈
NaCl 0,9g% (ml)	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4		0,2	0,1
Apă distilată (ml)	-	0,1	0,2	0,3	0,4		1,6	1,7
Sânge	2-3 picături în fiecare eprubetă							

Interpretarea rezultatelor

Valori normale:

- Hemoliza începe la concentrația de 0,45 gr% NaCl (0,40 - 0,50 gr% NaCl), când hemolizează hematiile cele mai puțin rezistente (hematiile îmbătrânite), reprezentând R_m (rezistența minimă).
- Hemoliza se termină la o concentrație de 0,35 gr% NaCl (0,30 - 0,40 gr% NaCl), când toate hematiile sunt hemolizate, reprezentând R_M (rezistența maximă). Între R_m și R_M se întinde câmpul rezistenței globulare.

Valori patologice:

Rezistența osmotică scăzută (fragilitate eritrocitară crescută) o întâlnim în:

- anemiile hemolitice congenitale (anemia Minkowski-Chauffard sau sferocitoză ereditară);
- anemiile hemolitice dobândite (din hepatita epidemică, intoxicații cu benzen, stări de acidoză).

Rezistența osmotică crescută (fragilitate eritrocitară scăzută) se întâlnește în:

- platicitoză (anemia Cooley);
- anemia feriprivă;
- mai rar, în anemia pernicioasă, după transfuzii de sânge, după splenectomie, în icterul obstructiv, în afecțiuni hepatice.

Stabilirea unei curbe de hemoliză

Se face prin dozarea spectrofotometrică a hemoglobinei din fiecare eprubetă, considerând martor negativ eprubeta în care nu există hemoglobină în supernatant, iar martor pozitiv eprubeta cu hemoliză completă. Se determină extincția și se stabilește cantitatea de hemoglobină existentă în fiecare supernatant, în intervalul martor negativ – martor pozitiv. Pe ordonată se înscriu concentrațiile în hemoglobină, iar pe abscisă concentrația în gr% NaCl (figura 2.18.).

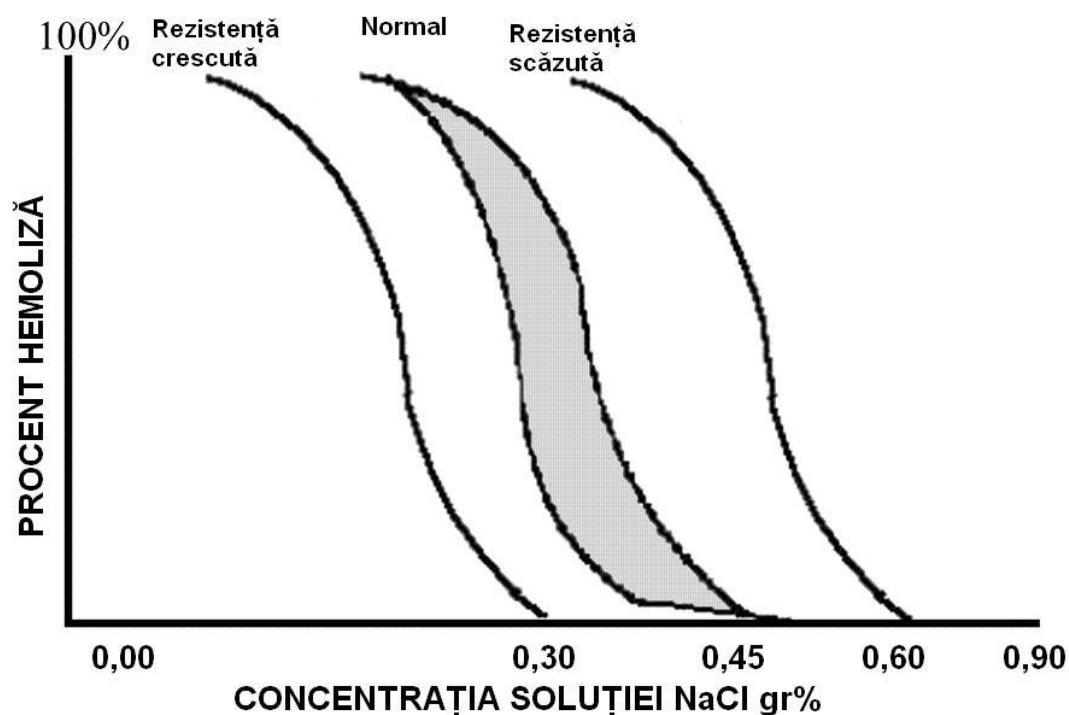


Figura nr. 2.18. Curba de hemoliză normală și patologică



Studiu individual

1. Consultând un dicționar medical sau materialele didactice, indiferent de disciplina de la care provin, vă rugăm să definiți următorii termeni: chimiotactism, presiune osmotică, malarie, hipersplenism, splenectomie, spectrofotometrie, supernatant, fragilitate eritocitară, fragilitate capilară, anticorpi antieritrocitari.
2. Calculați concentrația de NaCl în gr% din fiecare eprubetă (1-18) folosită.
3. Asociați următorii termeni: rezistența osmotică crescută, rezistența osmotică scăzută, fragilitate eritocitară crescută, fragilitate eritocitară scăzută.

FIȘĂ DE LUCRU ÎN LABORATOR

1. Ce reprezintă hemoliza fiziologică? Dar cea patologică?

.....

2. Unde are loc distrugerea hematiilor îmbătrânite?

.....

3. Indicați câteva cauze ale hemolizei patologice.

.....

4. Ce se întâmplă cu hematiile suspendate într-o soluție hipotonă? Dar hipertonă?

.....

5. Ce reprezintă rezistența osmotică minimă? Dar cea maximă?

.....

6. Care sunt valorile rezistenței osmotice eritrocitare minime? Dar cea maximă?

.....

7. În ce situație apare creșterea rezistenței osmotice?

.....

8. În ce situație apare scăderea rezistenței osmotice?

.....

9. Ce valori ale rezistenței osmotice minime și maxime asociați cu: rezistența osmotică crescută, rezistența osmotică scăzută, fragilitate eritrocitară crescută, fragilitate eritrocitară scăzută?

.....

10. Interpretați următorul buletin de analiză: VEM = $80 \mu^3$, HEM = $27 \mu\mu\text{g}$, Rm = 0,70 gr% NaCl și RM = 0,50 gr% NaCl.

.....

2.9. GRUPELE SANGUINE.

Definitie. Societatea Internațională de Transfuzie (International Society of Blood Transfusion –ISBT) definește un sistem de grup sanguin prin prezența unuia sau mai multor antigene, codificate de o genă situată într-un singur locus, sau pe mai multe gene omologe, strâns legate între ele.

SISTEMUL OAB și Rh

La om au fost identificate, până acum, 30 de sisteme de grup sanguin și au fost descrise peste 600 de antigene. Dintre acestea, cele mai importante sunt sistemele **OAB și Rh**. Importanța lor derivă din puterea antigenică mare, care se poate exprima prin accidente posttransfuzionale, în cazul sistemului OAB, sau incompatibilitate materno-fetală, în cazul sistemului Rh.

În anul 1901, Landsteiner descoperă că aglutinarea și hemoliza hematiilor în accidentele transfuzionale se datorează prezenței pe membrana hematiilor a unor polizaharide cu proprietăți antigenice. Landsteiner a descris pe hematiile speciei umane trei antigene notate cu: **A și B, cu o capacitate antigenică mare** și un antigen 0 numit și **H**, cu o capacitate antigenică foarte redusă. Grupele sanguine cărora le corespund aceste antigene au fost notate cu 0, A și B. Grupa AB a fost descoperită în anul 1902 de Decastelle și Struli și confirmată în 1907 de Janski, care notează grupele cu I, II, III, IV. Astăzi cele 2 nomenclaturi au fost unificate, sistemul OAB fiind notat cu **0(I), A(II), B(III) și AB(IV), literele reprezentând antigenele fixate pe membrana hematiilor.**

Introducerea în sângele unui individ a unor antigene străine generează un conflict imun, în urma căruia se formează **anticorpi**. Atacul acestora asupra hematiilor care conțin antigenul străin duce la aglutinarea și liza hematiilor. Din acest motiv, antigenele respective se mai numesc și **aglutinogeni**, iar anticorpii - **aglutinine**.

Anticorpii din sistemul OAB sunt **naturali**, adică nu se formează în urma unui conflict imun, ci în urma unor reacții de sensibilizare la substanțe asemănătoare din alimente, bacterii, virusuri, în cursul primului an de viață. Anticorpii sunt imunoglobuline din clasa M, cu greutate moleculară mare, **care nu traversează placenta** și nu determină incompatibilitate materno-fetală. Anticorpii din sistemul OAB se numesc **anti-A** sau **alfa** și **anti-B** sau **beta**; prezența lor în plasma unor indivizi ai speciei umane respectă regulile serologice ale lui Landsteiner:

- **Legea excluderii reciproce** - la același individ **NU** pot coexista antigenul și anticorpusul **omolog** (specific sau corespunzător), de exemplu: antigenul A cu anticorpusul anti-A (alfa). Prezența lor ar duce la aglutinarea hematiilor și distrugerea acestora prin hemoliză, situație incompatibilă cu viața.
- În sistemul OAB, anticorpusul **compatibil cu antigenul este întotdeauna prezent în ser**, de exemplu: antigenul A cu anticorpusul anti-B (beta).

De cele mai multe ori, anti-A și anti-B sunt detectabili **la 3-6 luni după naștere**, iar la vârsta de 5 ani, titrul acestora atinge un maximum care se menține în toată perioada adultă.

În funcție de prezența (sau absența) pe membrana eritocitară a antigenelor, indivizii speciei umane se împart în 4 grupe: 0, A, B și AB (tabel 2.8.).

Subgrupele sistemului sanguin OAB. Antigenele A și B au mai multe variante determinate genetic, adică mai multe subgrupe. Aceste variante apar ca urmare a unor mutații la nivelul genelor A și B, determinate de substituții de aminoacizi la nivelul transferazelor. Se traduc printr-o slabă exprimare a antigenelor A și B. Cele mai importante sunt subgrupele A, notate **A₁** și **A₂**. Mai există și alte subgrupe A, de importanță mai mică: Aint., A₃, Am, Ax etc. Și grupa B poate să aibă mai multe subgrupe: B₁, B₂, B₃ etc.

Tabel 2.8. Grupele sanguine în sistem OAB			
Grupa sanguină	Antigene pe eritrocit	Anticorpi în plasmă	Frecvența medie în România
0	-	Anti-A (alfa), anti-B (beta)	36%
A	A	Anti-B (beta)	41%
B	B	Anti-A (alfa)	16%
AB	A,B	Nu au	7%

Subgrupa A₁ – se întâlnește la 80% dintre subiecții de grupă A. Este formată dintr-un antigen comun A și un antigen propriu A₁, care împreună constituie un complex antigenic AA₁. Factorul A₁ are antigenitatea cea mai puternică și a mai fost numit și “A tare”.

Subgrupa A₂ – este prezentă la 20% dintre subiecții de grup A. Are antigenitate scăzută, motiv pentru care se mai numește și “A slab”. Nu provoacă boală hemolitică prin imunizare maternă și nici accidente posttransfuzionale în cazul unor transfuzii repetate administrate celor cu grupă A₁ sau A₁B.

Cele două atribute, “tare” și “slab” se referă la modul în care aglutinina anti-A (alfa) din plasma indivizilor de grup B sau 0 reacționează cu cele 2 antigene: aglutinare puternică și rapidă cu A₁ = A “tare” și slabă și lentă cu A₂ = A “slab”.

Existența subgrupelor A₁ și A₂ duce la existența a 2 subgrupe principale și pentru grupa AB, respectiv A₁B și A₂B.

Cunoașterea subgrupelor are *importanță teoretică și practică*: un antigen A sau B slab poate să nu dea reacție de aglutinare cu serurile test anti-A sau anti-B. Din acest motiv:

- un individ A₂ sau A₃ devine fals 0;
- un individ A₂B sau A₃ B devine fals B.



Pentru a exclude un accident posttransfuzional prin incompatibilitate de subgrup se impune:

- determinarea grupelor sanguine prin ambele metode: de determinare a antigenelor de pe eritrocite și de evidențiere a anticorpilor din plasmă;
- executarea probei majore de compatibilitate in vitro Jeanbreaux.

Importanța determinării grupelor din sistemul OAB

Stabilirea compatibilității transfuzionale între donator și primitor, cu scopul evitării accidentelor posttransfuzionale imediate. Este necesar ca, sângele administrat să nu conțină antigene în plus față de sângele primitorului. Aceste antigene ar putea provoca aloimunizare și accidente cu ocazia unor transfuzii ulterioare.

- Pentru efectuarea unei transfuzii sigure s-a impus respectarea a două reguli, cunoscute și sub numele de **legi ale transfuziei**. În cazul transfuziilor **sub 500 ml** (până la 1/10 din volumul sanguin al primitorului), trebuie să existe compatibilitate între antigenele donatorului și anticorpii primitorului. Pentru această situație, donatorul care îndeplinește condiția este cel cu grupă 0RhD-, deoarece pe eritrocitele sale nu se găsesc antigene. Anticorpii anti-A și anti-B ai donatorului de grup 0 sunt ignorați, deoarece aceștia se diluează în proporție de peste 1/10 în sângele primitorului, ceea ce duce la scăderea sau pierderea activității lor.

Compatibilitatea pentru transfuzia sub 500 ml este redată în figura nr. 2.19., schema fiind stabilită de Ottenberg. Din această schemă se observă că **grupa 0 este considerată donator universal, iar grupa AB primitor universal**.

În cazul în care se administrează doar plasmă, compatibilitatea trebuie să fie inversă față de schema Ottenberg, adică între anticorpii donatorului și antigenele primitorului. În această situație, grupa AB este donator universal, deoarece nu are anticorpi, iar grupa 0 este primitor (figura 2.20)

- În cazul transfuziilor care necesită **cantități mai mari de 500 ml**, compatibilitatea trebuie să fie inversă, adică între anticorpii donatorului și antigenele primitorului, deci sângele transfuzat trebuie să fie izogrup. În tabelul 2.9. sunt prezentate schematic caracteristicile grupelor sanguine din sistemul OAB, precum și aplicabilitatea celor două legi.

Pentru studiul și prevenirea bolii hemolitice a nou născutului, datorată incompatibilității antigenice între eritrocitele mamei și eritrocitele fătului.

Incompatibilitatea materno-fetală în sistem OAB este foarte rară și mai puțin gravă decât cea produsă prin izoimunizare anti-Rh. În această situație apar, în urma unor procese de aloimunizare, anticorpii de tip imun sau aloanticorpii anti-A sau anti-B, de exemplu, mama 0 cu un făt A sau B. Acești anticorpi sunt imunoglobuline (Ig) de tip G, cu GM mică, asemănătoare celor din sistem Rh, care pot trece bariera placentară.

Pentru a facilita donarea de sânge și transplantul de organe

În medicina legală:

- pentru stabilirea paternității sau maternității;
- pentru identificarea victimelor sau agresorilor. În aceste situații, determinarea grupelor sanguine este înlocuită tot mai mult cu analiza ADN.

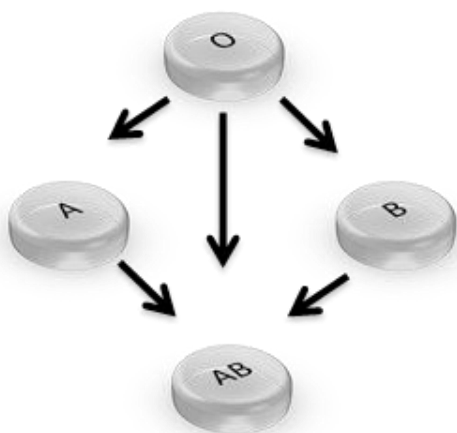


Figura 2.19. Schema Ottenberg
Posibilități de transfuzie în sistemul OAB - cantități mai mici de 500 ml sânge.
Grupa 0 este donator universal, deoarece nu are antigene.
Grupa AB este primitor universal deoarece nu are anticorpi.

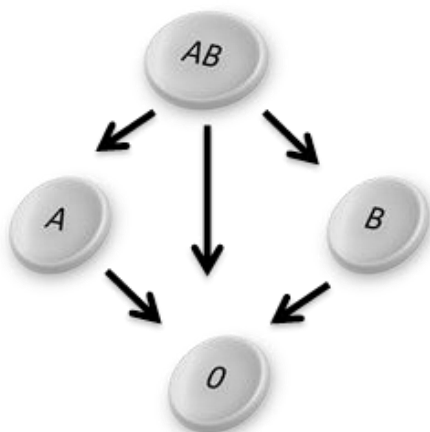


Figura 1.20. Schema compatibilității plasmatice.

În cazul administrării plasmei compatibilitatea trebuie să fie inversă față de schema Ottenberg, adică între anticorpii donatorului și antigenele primitorului. În această situație, grupa AB este donator universal, deoarece nu are anticorpi, iar grupa 0 este primitor

Tabelul 2.9. Profilul imunologic al grupelor sanguine din sistemul OAB. Compatibilitatea transfuzională.

Grupa	Antigene pe eritrocit (aglutinogene)	Anticorpi în plasmă (aglutinine)	Cui donează?	De la cine primesc?
0	-	Anti-A (α) Anti-B (β)	Grupei 0 Sub 500 de ml la toate grupele = <i>donator universal</i>	De la 0
A	A	Anti-B (β)	Grupei A Sub 500 de ml, la AB	De la A Sub 500 de ml, de la 0
B	B	Anti-A (α)	Grupei B Sub 500 de ml, la AB	De la B Sub 500 de ml, de la 0
AB	A, B	-	Grupei AB	De la AB Sub 500 de ml, de la toate grupele = <i>primitor universal</i>



Înainte de orice transfuzii:

- Se determină grupa primitorului în sistemul OAB și Rh.
- Se alege un donator izogrup în sistemul OAB și Rh.
- Se face obligatoriu proba de compatibilitate directă, chiar dacă se cunosc grupele donatorului și primitorului.

SISTEMUL Rh

Până la descoperirea sistemului antigenic Rh, se produceau multe accidente posttransfuzionale, chiar în cazul în care exista compatibilitate donator-primitor în sistemul OAB. De asemenea, nu se știa de ce, unele femei nașteau copii cu anemie hemolitică și tulburări neurologice severe. Cauza acestor anomalii a fost elucidată prin descoperirea de către Landsteiner și Wiener a unui **antigen** prezent pe hematiile de maimuță *Macacus Rhesus*, pe care l-au numit Rh și care, ulterior, a fost evidențiat și pe hematiile umane.

Sistemul Rh cuprinde 6 antigene notate C, D, E, c, d, e. Din punct de vedere practic, cel mai important este antigenul D, deoarece are cea mai mare putere antigenică, fiind răspunzător de unele accidente posttransfuzionale și de 95% dintre cazurile de incompatibilitate materno-fetală. Persoanele care au acest antigen pe hematii sunt **RhD⁺**, proporția lor fiind de cca. 80-85% din totalul populației albe. La populația neagră, procentul de RhD pozitiv se apropie de 100%.

Spre deosebire de sistemul OAB, în sistemul Rh **nu se găsesc în plasmă anticorpi naturali**. Ei sunt de tip **imun** și numai în cazuri excepționale - deleție parțială sau totală - sunt de tip natural. Sunt imunoglobuline G cu GM mică, care trec prin membrana placentară și atacă hematiile fetale. Cea mai mare frecvență o au anticorpii cu specificitate anti-D, deoarece factorul D este cel mai imunogen.

Sinteza de anticorpi anti-Rh apare în următoarele situații:

- **Mamă RhD⁻ care are o sarcină cu făt RhD⁺** (caracterul Rh⁺ este dominant și se moștenește de la tată). În această situație, dacă mama este la prima sarcină și nu a

avut în antecedente nici transfuzii cu sânge Rh⁺, nici avort în lună mare (>4 luni), copilul se naște fără nicio suferință datorată sistemului Rh. În timpul nașterii, ruperea vilozităților coriale face posibilă pătrunderea hematiilor Rh⁺ ale fătului în circulația maternă. Deoarece este un antigen străin, sistemul imunitar al mamei va reacționa prin sinteză de anticorpi anti-D, de tip Ig G. La următoarea sarcină cu făt Rh⁺, anticorpii din sângele mamei trec bariera placentară, se fixează pe eritrocitele fătului și produc aglutinarea și hemoliza acestora. Boala care apare prin incompatibilitate materno-fetală se numește eritroblastoză fetală sau boala hemolitică a nou-născutului și se caracterizează prin anemie hemolitică, icter și hepatomegalie.

- **Imunizarea mamei RhD⁻ care pierde o sarcină după luna a patra** (imunizarea mamei prin avort).
- **În urma unei transfuzii de sânge RhD⁺ la persoane RhD⁻.** În acest caz, accidentul posttransfuzional nu va avea loc la prima transfuzie incompatibilă. După prima transfuzie se va declanșa un răspuns imun cu producerea de anticorpi anti – D (în 7 - 10 zile). La o nouă transfuzie incompatibilă, anticorpii formați anterior vor ataca hematiile RhD⁺ ale donatorului și va apărea hemoliza.



Profilaxia eritroblastozei fetale

- Se determină Rh-ul gravidei, iar dacă acesta este negativ, și Rh-ul tatălui biologic.
- Mamei RhD⁻ i se va administra ser anti-RhD în primele 48 – 72 de ore după naștere. Anticorpii se fixează pe hematiile fetale pătrunse în circulația maternă, le aglutinează și le hemolizează, inhibând astfel sinteza de anticorpi anti-Rh, de către sistemul imun al mamei.
- Femeile RhD⁻ izoimunizate prin sarcină pot da naștere la mai mulți copii sănătoși, dacă li se face profilaxia corectă.



Cum evităm incompatibilitatea transfuzională în sistemul Rh?

- Se determină prezența sau absența factorului D la primitor.
- Se va executa, obligatoriu, și proba de compatibilitate directă, Jeanbreaux.

Lucrări practice efectuate în laborator.

Recomandări pentru determinarea grupului sanguin 0AB

- înainte a unei transfuzii;
- înainte a unei proceduri invazive sau chirurgicale potențial asociate cu complicații hemoragice care ar putea necesita transfuzii;
- monitorizarea imunohematologică antepartum și postnatală a mamei și copilului;
- la donatorii de sânge;
- pentru compatibilitatea de grup 0AB în transplantul de rinichi și inimă.

Determinarea corectă a grupelor sanguine presupune atât evidențierea antigenelor prin metoda **Beth-Vincent**, cât și a anticorpilor prin metoda **Simonin**.

1.Determinarea antigenelor. Metoda Beth-Vincent.

Principiul metodei. Se evidențiază reacția de aglutinare dintre antigenul (aglutinogenul) și anticorpul (aglutinina) corespunzătoare, folosind **ser hemotest care conține aglutinine cunoscute și sânge de la persoana testată.**

Materiale necesare:

- seruri hemotest care conțin **anticorpi anti-A, anti-B, anti-AB**, preparate și controlate de centre speciale, prezentate în flacoane închise, cu etichete sau conținut diferit colorat;
- lame de sticlă cu godeuri;
- baghete de sticlă, pipete, ace de unică folosință, alcool, vată;
- sânge de cercetat.

Tehnica de lucru.

- pe o lamă cu godeuri, uscată și curată se pune, de la stânga la dreapta, câte o picătură de ser în fiecare godeu, întotdeauna în ordinea anti-A, anti-B, anti-A,B. Sunt de preferat lamele cu godeuri marcate cu grupa respectivă. Marcajul se poate face și cu un creion special;
- se recoltează sânge din pulpa degetului sau din vena de la plica cotului, după dezinfectarea prealabilă cu alcool;
- se ia o mică picătură de sânge cu bagheta sau cu colțul unei lame și se amestecă cu serul test anti-A;
- se ia o altă picătură de sânge - cu altă baghetă sau alt colț al lamei și se amestecă cu serul test anti-B, operația repetându-se și pentru serul test anti-A,B. Când se folosește sânge din venă, se pune cu pipeta câte o picătură de sânge pe lamă, lângă fiecare picătură de ser hemotest și se omogenizează cu baghete diferite sau colțuri diferite ale unei lame de sticlă. Raportul de volum între picătura de sânge și serul hemotest trebuie să fie de 1/10 - 1/20. Aceste precauții sunt necesare pentru a evita artefactele de aglutinare: pseudoaglutinarea dată de fibrinogen, când se folosește mult sânge sau inhibiția aglutinării prin exces de eritrocite.
- se agită lama prin mișcări de basculare, după care se face citirea în următoarele 3 - 4 minute, cel mult 10 minute.

La citire **se apreciază prezența aglutinării**, adică adunarea în grupe a hematiilor sau absența acesteia, în acest caz amestecul rămânând uniform colorat, netransparent (figura 2.21.).

Rezultate și interpretare

1. **Aglutinare în picăturile cu ser anti-A și anti-AB.** Aglutinina anti-A aglutinează hematiile care conțin antigen omolog, adică A. Indivizii care au pe hematii doar antigen A fac parte din grupa A.
2. **Aglutinare în picăturile cu ser anti-B și anti-AB.** Aglutinina anti-B aglutinează hematiile care conțin antigen omolog, adică B. Indivizii care au pe hematii doar antigen B fac parte din grupa B.
3. **Aglutinarea în toate picăturile** denotă prezența ambelor antigene. Indivizii care au pe hematii ambele antigene fac parte din grupa AB.
4. **Absența aglutinării în cele trei picături:** sângele testat nu are niciun antigen omolog aglutininelor anti-A și anti-B. Indivizii care nu au antigene pe hematii sunt de grupa 0.



Pentru această metodă prezența aglutinării în ultima picătură trebuie să fie însoțită de aglutinare în cel puțin încă o picătură. Serul anti-AB este folosit ca martor.

Anticorpii conținuți de serul hemotest			Grupa rezultată în urma determinării
Anti-A	Anti-B	Anti-A, Anti-B	
			Grupa A
			Grupa B
			Grupa AB
			Grupa O

Figura 2.21. Determinarea antigenelor prin metoda Beth-Vincent.

2. Determinarea anticorpilor (aglutininelor). Metoda Simonin.

Principiul metodei. Se evidențiază reacția de aglutinare dintre antigenul (aglutinogenul) și anticorpul (aglutinina) corespunzătoare, folosind **hematii test** 0, A, B și **ser** de la subiectul al cărui sânge trebuie testat. Deoarece hematiile test 0 nu conțin antigene, se folosesc ca martor negativ sau pot lipsi din această determinare.

Materiale necesare.

- plasmă sau ser care trebuie testat;
- hematii test 0, A și B;
- lamă godată;
- lame de sticlă sau baghete pentru omogenizare, pipete.

Tehnica de lucru.

- pe o placă se pun cu o pipetă 3 picături de plasmă sau ser de cercetat, lângă care se adaugă câte o picătură de hematii test, în ordinea 0, A, B. Și la această metodă, picătura de hematii trebuie să fie de 10 - 20 ori mai mică decât cea de ser.
- se omogenizează pe rând toate picăturile, folosind de fiecare dată alt colț al lamei sau altă baghetă.
- citirea rezultatelor se face după 2 - 4 minute evidențiindu-se prezența sau absența aglutinării (figura 2.22.).

Interpretarea rezultatelor urmează aceeași logică ca la determinarea antigenelor, cu mențiunea că acum se cunosc antigenele și urmează să fie identificați **anticorpii**.

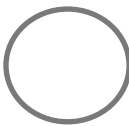
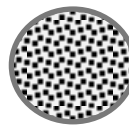
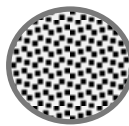
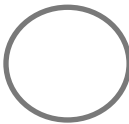
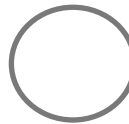
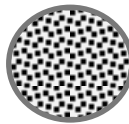
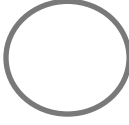
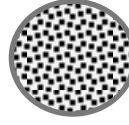
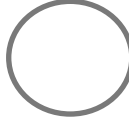
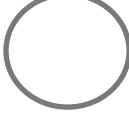
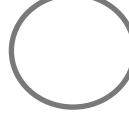
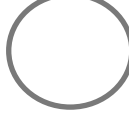
Antigenele prezente pe hematiile test			Grupa rezultată în urma determinării
-	A	B	
			Grupa 0. Antigenele A și B sunt atacate de anticorpii omologi, adică de anti-A și anti-B. Grupa care are în plasmă ambii anticorpi este 0.
			Grupa A Antigenul B este atacat de anticorpus omolog, adică de anti-B. Grupa care are în plasmă acest anticorp este A.
			Grupa B Antigenul A este atacat de anticorpus omolog, adică de anti-A. Grupa care are în plasmă acest anticorp este B.
			Grupa AB Cele două antigene nu interacționează cu nici un anticorp. Înseamnă că în plasma acestor indivizi nu există anticorpi omologi.

Figura 2.22. Determinarea antigenelor prin metoda Simonin.

3. Determinarea compatibilității sanguine directe - proba Jeanbreau.

Proba este obligatorie în orice transfuzie, chiar dacă se cunosc grupele sanguine ale donatorului și primitorului, precum și în cazuri de urgență când nu dispunem de seruri hemotest pentru determinarea grupei.

Importanța ei este dată de faptul că sângele transfuzat poate conține și alte antigene sau alți anticorpi, în afara celor din sistemul OAB și Rh, care nu se determină în mod curent.

Principiul metodei. Se stabilește compatibilitatea între donator și primitor prin punerea în contact a hematiilor donatorului cu serul sanguin al primitorului.

Tehnica de lucru. Metoda serologică.

- din sângele primitorului se obține ser prin centrifugare;
- pe o lamă de sticlă se pune o picătură de ser de la primitor și o picătură de 10 - 20 ori mai mică de sânge de la donator;
- se omogenizează cu colțul unei lame de sticlă și se citește după 3 - 4 minute.

Rezultate și interpretare.

- absența aglutinării (amestec omogen) – există compatibilitate între donator-primitor și transfuzia se poate face;
- prezența aglutinării înseamnă incompatibilitate între donator-primitor și transfuzia NU se face.

Dacă citirea este incertă, testul se repetă după 8 - 10 minute!

Pentru determinarea subgrupelor A₁, A₂ și A₁B, A₂B se utilizează alte metode, bazate fie pe neutralizarea parțială a aglutininei anti-A din serul de grup B, cu ajutorul peptonei Witte (conține substanțe specifice grupei A), fie prin folosirea unor substanțe specifice anti-A extrase din plante (fitoaglutinine).

4. Determinarea factorului RhD.

Recomandări pentru determinarea factorului Rh:

- înainte a unei transfuzii;
- înainte a unei proceduri invazive sau chirurgicale potențial asociate cu complicații hemoragice care ar putea necesita transfuzii;
- monitorizarea imunohematologică antepartum și postnatală a mamei și copilului;
- la donatorii de sânge.

În testarea de rutină a grupului sanguin nu se indică determinarea altor antigene Rh în afara factorului RhD. Determinarea fenotipului Rh complet este indicată la donatorii de sânge, trebuie luată în considerare în cazul transfuziilor la fete și femei aflate la vârsta la care sunt fertile și la pacienții transfuzați.

Metode de determinare

- hemaglutinare pe lamă cu ser anti-D monoclonal;
- aglutinare și gel-filtrare pe carduri cu microtuburi care conțin un gel impregnat cu reactivul specific antigenului eritocitar de determinat.

Principiul lucrării. Se pun în contact aglutininele anti-RhD cu sângele de cercetat și se urmărește prezența sau absența aglutinării.

Materiale necesare:

- ser test anti-RhD;
- hematii martor de grup 0, RhD⁺;
- hematii martor de grup 0, RhD⁻;
- sânge de testat;
- lamă godată;
- lamă de sticlă sau baghetă pentru omogenizare.

Tehnica de lucru (figura 2.23.)

- se pune câte o picătură de ser anti-RhD⁺ pe o lamă, în toate cele 3 godeuri.
- se adaugă o picătură de 10 ori mai mică de sânge, în ordinea:
 - sânge cu hematii martor de grup 0, RhD⁺ în primul godeu;
 - sânge cu hematii martor de grup 0, RhD⁻, în al 2-lea godeu;
 - sânge care conține hematiile de cercetat, în ultimul godeu.
- se omogenizează cele două picături cu colțul unei lame sau cu vârful unei baghete de sticlă.

Interpretarea rezultatelor: prezența aglutinării = RhD⁺; lipsa aglutinării = RhD⁻

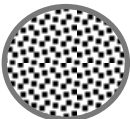
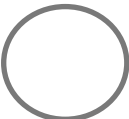
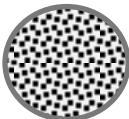
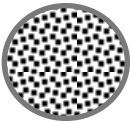
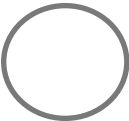
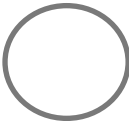
Ser anti-RhD ⁺ Hematii martor grup 0, RhD ⁺	Ser anti-RhD ⁺ Hematii martor grup 0, RhD ⁻	Ser anti-RhD ⁺ Hematii de cercetat	Rh rezultat în urma determinării
			Rh(D) ⁺
			Rh(D) ⁻

Figura 2.23. Determinarea grupului sanguin în sistemul Rh



Dacă un nou-născut prezintă anemie hemolitică și Rh-ul mamei nu se cunoaște (teoretic o asemenea situație nu ar trebui să existe), explorarea imunologică urmărește evidențierea în serul mamei a anticorpilor anti-RhD. **Evidențierea anticorpilor anti-RhD** se face prin testul Coombs indirect.

Erori în determinarea grupelor din sistemul 0AB. Determinarea corectă a grupelor sanguine este un act de mare responsabilitate umană și medicală, erorile fiind urmate de grave accidente posttransfuzionale care pot duce la decesul pacientului transfuzat. Cele mai frecvente erori sunt:

- nerespectarea ordinii în care se pun picăturile de ser test sau eritrocite test;
- folosirea unor seruri hemostat de proveniență nesigură sau alterate; hemotestul alterat aglutinează eritrocitele tuturor grupelor sanguine, fenomen numit panaglutinare;
- nerespectarea raportului volumetric;
- neomogenizarea picăturilor de sânge și ser imediat după aplicare;
- neomogenizarea continuă prin înclinarea lamei până la apariția hemaglutinări pentru a evita pseudoaglutinarea;
- citirea rezultatelor la mai mult de 8 - 10 minute (uscarea lamei poate duce la pseudoaglutinare);
- temperatura scăzută produce aglutinarea „a frigore”, fals pozitivă.



Studiu individual

1. Consultând un dicționar medical sau materialele didactice, indiferent de disciplina de la care provin, vă rugăm să definiți următorii termeni: godeu, antigen, anticorp, aloimunizare, aloanticorpi, izoimunizare, hemaglutinare, pseudoaglutinare, „a frigore”, fitoaglutinină, metodă serologică, conflict imunologic, ser hemotest, panaglutinare.
2. Următorii subiecți au grupele sanguine:
 - subiectul 1: 0, Rh D⁺
 - subiectul 2: AB, Rh D⁺
 - subiectul 3: A, Rh D⁺
 - subiectul 4: A, Rh D⁻
 - subiectul 5: B, Rh D⁺Să se stabilească cui poate dona sânge, fiecare dintre acești subiecți.
3. În tabelul de mai jos înscrieți cu DA sau NU compatibilitatea dintre donator și primitor, în cazul administrării de plasmă.

Primitor	Donator			
	0	A	B	AB
0				
A				
B				
AB				

FIȘĂ DE LUCRU ÎN LABORATOR

1. Care sunt produsele de sânge pe care le-ați folosit pentru identificarea antigenelor?

.....

2. Care este principiul metodelor de identificare a grupelor sanguine?

.....

3. Pe lamele de mai jos, notați serurile adăugate pe fiecare godeu. Hașurați godeurile corespunzătoare grupelor A și 0, determinate prin metoda Beth-Vincent. Argumentați de ce aveți aglutinare în godeurile respective.



.....



.....

4. Hașurați godeurile în care ați avut aglutinare la determinarea în laborator a propriei grupe sanguine.



.....

5. Care sunt produsele de sânge pe care le-ați folosit pentru identificarea anticorpilor?

.....

6. Pe lamele de mai jos, notați hematiile test adăugate pe fiecare godeu. Hașurați godeurile corespunzătoare grupelor A și 0, determinate prin metoda Simonin. Argumentați de ce aveți aglutinare în godeurile respective.



.....

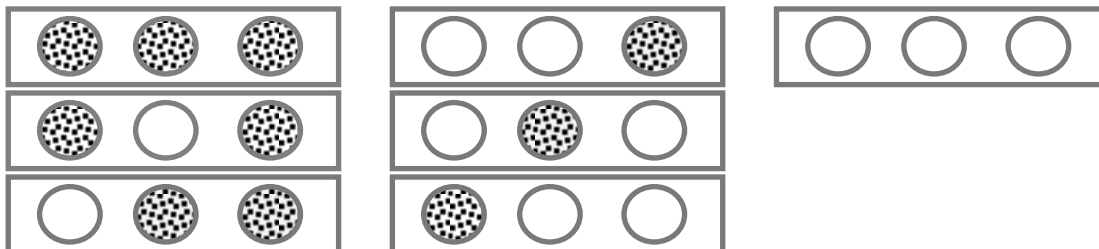


.....

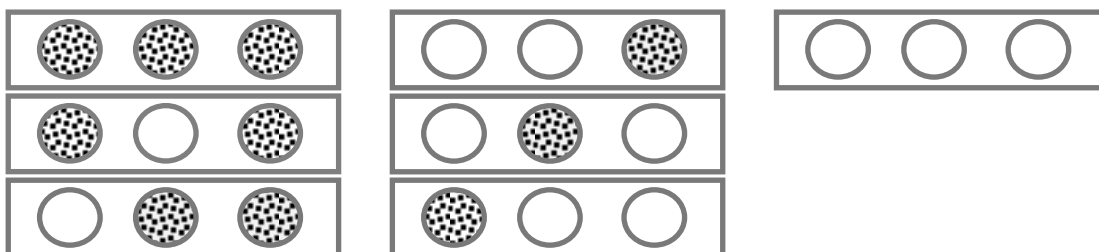
7. Care grupă este considerată donator universal, în ce condiții și de ce?

8. Care grupă este considerată primitor universal, în ce condiții și de ce?

9. Dintre lamele de mai jos alegeți-le pe acelea care corespund grupelor B și AB, determinate prin metoda Beth-Vincent.



10. Dintre lamele de mai jos alegeți-le pe acelea care corespund grupelor B și AB, determinate prin metoda Simonin.



11. Un subiect cu grupa sanguină A, RhD⁻ are nevoie urgentă de transfuzie în cantitate de cel puțin 1 l de sânge. Ce sânge alegeți ?

12. În godeurile lamei de mai jos adăugați materialele necesare pentru determinarea Rh-ului. Hașurați cercurile în care ar apărea aglutinare, dacă Rh-ul ar fi pozitiv.



13. În ce situații apar anticorpii din sistemul Rh?

14. Ce fel de imunoglobuline sunt anticorpii din sistemul Rh? Ce consecințe are prezența lor?

15. În tabelul de mai jos înscrieți cu DA sau NU compatibilitatea dintre donator și primitor în sistemul OAB și Rh.

Primitor	Donator							
	0 Rh ⁻	0Rh ⁺	A Rh ⁻	A Rh ⁺	B Rh ⁻	B Rh ⁺	AB Rh ⁻	AB Rh ⁺
0Rh ⁻								
0Rh ⁺								
A Rh ⁻								
A Rh ⁺								
B Rh ⁻								
B Rh ⁺								
AB Rh ⁻								
AB Rh ⁺								

.....