**ANEMIILE HEMOLITICE**

 *Explorarea anemiilor hemolitice* urmăreşte prezenţa:

**Semnelor distrucţiei exagerate eritrocitare**:

-scăderea duratei de viaţă a hematiilor

- hiperbilirubinemie indirectă

- urobilinogenurie crescută

- bilirubinurie normală

- creşterea methemoglobinemiei, LDH, fierului seric

- scăderea haptoglobinei, hemoglobinei glicozilate.

**Semnelor de hemoliză intravasculară**:

-hemoglobinemie

- hemoglobinurie

- hemosiderinurie

***S*emnelor de regenerare compensatorie**:

-reticulocitoză

- macrocitoză moderată

- policromatofilie

- eritroblaşti şi hematii cu punctaţii bazofile pe frotiul periferic

- leucocitoză

- trombocitoză

- hiperplazie eritroblastică pe medulogramă.

**Teste speciale care sugerează etiologia hemolizei**:

- analiza morfologică a frotiului sanguin (sferocite, eliptocite, acantocite, drepanocite, schizocite)

- studiul rezistenţei osmotice

- testul de autohemoliză

- testul de siclizare

- testul Coombs direct si indirect

- testul Ham

- aglutinine la rece

- electroforeza de hemoglobină

- dozarea enzimelor eritrocitare.

***Testul de autohemoliză***

Evaluează hemoliza spontană a unei cantităţi determinate de sânge defibrinat, care a fost incubat în condiţii sterile, la 37°C, 48 de ore, în prezenţa sau absenţa glucozei. Cu ajutorul acestui test, anemiile hemolitice congenitale nesferocitare, au fost încadrate în două tipuri:

- tipul I - anemii în care autohemoliza este ameliorată sau suprimată prin adausul de glucoză în mediul de incubare;

- tipul II - anemii în care există un grad mare de hemoliză spontană la finalul testului, în ciuda adausului de glucoză în timpul incubării.

Autohemoliza se calculează după formula: Hbser x (100-Ht)/Hb sânge integral şi are valori normale: între 0,5 - 3,6% în absenţa glucozei

 între 0,1 - 2,9% în prezenţa glucozei

***Testul de siclizare a hematiilor***

 În condiţii de hipoxie HbS formează agregate lineare insolubile datorită cărora eritrocitul devine rigid şi ia forma caracteristică de seceră.

 Testul constă in realizarea stazei timp de 10 minute cu ajutorul unui garou la baza unui deget, după care se recoltează o picătură de sânge care se fixează între lamă şi lamelă, se parafinează şi se citeşte la microscop, din oră în oră, apoi din 6 în 6 ore (până la 38 ore) notându-se drepanocitele.

 Procentul de drepanocite peste 50% la una din citiri este pozitiv pentru siclemie.

***Electroforeza de hemoglobină***

Testul foloseşte hematii spălate hemolizate cu apă distilată, având ca suport gelul de amidon sau acetatul de celuloză, iar spoturile se identifică în funcţie de viteza de migrare comparativ cu alte hemoglobine care servesc ca reper. Pentru determinarea HbS se utilizează testul de siclizare, pentru hemoglobinele instabile testul formării corpilor Heinz sau testul denaturării termice.

In α-talasemie forma heterozigotă se decelează Hb Bart's (1-2%), înlocuită ulterior cu HbH instabilă (precipită sub formă de incluziuni).

În β-talasemia heterozigotă creşte HbA2 (5%) iar în forma homozigotă apare HbF, care poate fi evidenţiată prin testul alcalino-rezistenţei.

***Determinarea G-6-PD***

 Se realizează prin măsurarea formei reduse de NADH, un rezultat corect necesitând prezenţa a 20-30% eritrocite cu defect enzimatic.

 Un alt test, care decelează şi alte anomalii ale shunt-ului hexozomonofosfat şi ale metabolismului glutationului este testul cu cianură-ascorbat care măsoară capacitatea eritrocitelor de a preveni oxidarea hemoglobinei indusă de ascorbat.

***Testul de reducere a metHb (Brewer)***

 Oxidarea Hb în metHb cu ajutorul nitritului de sodiu este transformată reversibil în Hb în prezenţa albastrului de metilen. Acest proces de reversibilitate nu se mai produce când există un deficit de G-6-PD, toată Hb transformându-se în metHb.

***Testul antiglobulinic Coombs***

 Testul Coombs se bazează pe proprietatea anticorpilor incompleţi de a se fixa pe hematii, fără a determina aglutinarea acestora; eritrocitele învelite cu anticorpi sunt aglutinate cu un ser care are acţiune antiglobulină umană.

***Testul Coombs direct***

 Permite evaluarea prezenţei imunoglobulinelor sau complementului pe suprafaţa eritrocitelor, susţinând diagnosticul de distrugere eritrocitară mediată imun.

 Testul se realizează utilizând sânge venos recoltat pe EDTA, o parte din eritrocite fiind spălate de 3-4 ori cu soluţie salină după care se efectuează o suspensie eritrocitară în ser fiziologic steril. Testul se realizează prin hemaglutinare pe lamă, utilizându-se antiseruri polispecifice (care conţin anti-IgG, anti-C3d şi ocazional activitate anti-lanţ uşor) şi seruri monospecifice pentru C3b, C4b, C4d şi lanţ greu de IgG. Pentru a releva faptul că eritrocitele unui pacient sunt învelite cu imunoglobuline, complement sau ambele, se pune în contact o suspensie de eritrocite provenite de la pacient cu antiser care prezintă reactivitate faţă de moleculele de IgG şi/sau complement umane, producându-se aglutinarea lor. Se utilizează iniţial antiseruri polispecifice şi la nevoie antiseruri monospecifice.

 Testul Coombs direct este pozitiv în boala aglutininelor la rece (autoanticorpi IgM monoclonali cu specificitate anti-I/i), hemoglobinuria paroxistică la rece (autoanticorpi tip IgG policlonal, cu specificitate anti-P), anemia hemolitică autoimună (autoanticorpi IgG1, mai rar IgG3, uneori în asociere cu IgA sau IgM), anemia hemolitică cu autoanticorpi la cald şi la rece (IgM şi IgG), anemia hemolitică imună indusă medicamentos (IgG cu specificitate diferită în funcţie de tipul de medicament), eritroblastoza fetală (alloanticorpi tip IgG cu specificitate diferită în funcţie de tipul incompatibilităţii materno-fetale: anti-D, anti-c, anti-K etc), reacţii transfuzionale imediate (alloanticorpi IgM, mai rar IgG, de obicei anti-A sau anti-B) sau întârziate (alloanticorpi IgG anti-D).

***Testul Coombs indirect***

 Evidenţiază anticorpii în ser. Se realizează sensibilizarea eritrocitelor în 2 tuburi de hemoliză: în primul tub se pun 0,5 ml ser de cercetat; în al II-lea tub se pun 0,5 ml ser normal. In ambele tuburi se adaugă 0,25 ml suspensie de 25% eritrocite 0 (I) Rh+ după care se incubează o oră la 37 °C. Se repetă procesul cu o probă martor negativ de eritrocite O (I) Rh-. După incubare eritrocitele din fiecare tub se spală abundent cu ser fiziologic, apoi se resuspendă în suspensie 25%. Pe o lamă se amestecă o picătură de ser antiglobulinic adsorbit sau diluat cu o picătură de suspensie eritrocitară. Lama se mişcă permanent şi reacţia se citeşte până la 3-5 minute. Aglutinarea cu eritrocitele care provin din primul tub şi absenţa aglutinării cu eritrocitele din al doilea tub reflectă faptul că s-au fixat anticorpii, deci serul de cercetat conţine anticorpi neregulaţi, anti-Rh. Lipsa de aglutinare în ambele probe reflectă faptul că serul de cercetat nu conţine anticorpi neregulaţi. Eritrocitele din al II-lea tub şi cele Rh- nu trebuie să aglutineze. Rezultatul pozitiv este concludent, cel negativ nu este sigur, impunând efectuarea unor teste enzimatice (papaină, tripsină).

***Determinarea aglutininelor la rece***

Aglutininele la rece sunt anticorpi de tip IgM fixatori de complement a căror activitate este maximă la 2-4°C şi dispare la 30-32 °C. Titrul aglutininelor la rece este patologic la valori peste 1/32, fiind corelat de obicei cu severitatea simptomelor în AHAI la rece.

**PREZENTARI DE CAZURI ANEMII**