**Explorarea de laborator a leucemiilor cronice**

**Leucemia mieloidă cronică (LMC)**

reprezintă o proliferare malignă clonală în care stimulul leucemic acţionează la nivelul celulei progenitoare multipotente determinând apariţia unei mutaţii având ca efect proliferarea autonomă a liniei granulocitare. Se caracterizează prin prezenta translocatiei t(9;22)(q34;q11) şi/ sau a genei hibride BCR-ABL. Evoluează în 3 faze: cronică, accelerată, blastică.

Explorarea de laborator necesită efectuarea:

* Hemoleucograma + FSP
* Examen aspirat medular + examen citogenetic
* Genetica molecular a– RT-PCR pentru gena de fuziune BCR-ABL
* Biochimie uzuala

Criterii de *fază cronică:*

- cromozom Ph şi/sau gena BCR-ABL1

- anemie

- leucocitoză importantă cu neutrofilie, cu devierea la stânga a formulei leucocitare

- blaşti < 10%

- bazofilie 5-10%

- monocite < 3%

- număr trombocite normal sau crescut

- splenomegalie

 Criterii de  *fază accelerată* :

- cromozom Ph şi/sau BCR-ABL1

- blaşti între 10-19% în sângele periferic sau măduva osoasă hematogenă

- ≥ 10% bazofile în sângele periferic

- trombocitopenie sau trombocitoză persistente

- splenomegalie progresivă, rebelă la tratament

- accentuarea leucocitozei care nu răspunde la terapie

 -anomalii citogenetice suplimentare (dublu Ph+, 8+, izo 17q);

-fibroză medulară colagenică sau reticulinică gr.I/II

- febră neinfecţioasă persistentă, dureri osoase.

Criterii de *faza blastică*:

- cromozom Ph şi/sau BCR-ABL1

- blaşti ≥ 20% în sângele periferic şi/sau măduva osoasă hematogenă (MOH)

- tumori blastice extramedulare

***Fosfataza alcalină leucocitară***

Fosftaza alcalină se află în citoplasma neutrofilelor, limfocitelor, celulelor endoteliale, osteoblastelor. Determinarea activităţii fosfatazei alcaline leucocitare (FAL) permite diferenţierea leucemiei mieloide cronice de policitemia vera, mielofibroza acută, reacţiile leucemoide prezente în infecţii, neoplazii, reprezentând şi un factor de prognostic în LMC; diferenţierea policitemiei vera de poliglobuliile secundare; diferenţierea HCL forma stabilă (FAL normal) de formele active de HCL (FAL crescut).

 FAL catalizează hidroliza esterilor fosfaţi în mediu alcalin; 1-naftolul care se formează din 1-naftil-fosfat reacţionează cu o sare de diazoniu, formând precipitate brune de intensităţi diferite (de la 0-5), care se evaluează microscopic. Scor FAL normal: 10-100.

 Scor FAL crescut: policitemia vera, mielofibroza acută, LMC în remisiune, HCL, infecţii, inflamaţii, sarcină, efort fizic intens.

 Scor FAL scăzut: LMC, HPN, SMD.

***Examenul citogenetic clasic***

 Permite evidenţierea anomaliilor citogenetice numerice sau structurale în leucemii şi limfoame, unele caracteristice (cromozomul Philadelphia în leucemia mieloidă cronică).

 Se utilizează sânge periferic sau aspirat medular, probele fiind introduse direct în mediul de cultură (celulele din sânge şi măduva osoasă cresc în suspensie), măduva osoasă necesitând 1-2 zile de cultivare, iar limfocitele 3-4 zile. Analiza cromozomială din sânge parcurge mai multe etape: cultivarea limfocitelor, recoltarea cromozomilor în metafază, prepararea şi colorarea cromozomilor, examinarea microscopică asistată computerizat, generarea cariogramei şi evidenţierea anomaliilor cromozomiale.

***Real Time-PCR*** – transcript BCR-ABL

***Explorarea leucemiei limfocitare cronice (LLC)***

Leucemia limfocitară cronică (LLC) este o este o limfoproliferare malignă caracterizată prin proliferarea clonală şi acumularea de limfocite mici, aparent mature morfologic, dar imature funcţional, în MOH, sânge, ganglionii limfatici, splină, ficat şi uneori şi în alte organe (rinichi, tegument, glande salivare, glande lacrimale) determinând mărirea de volum şi disfuncţia acestora.

*Examenul sângelui periferic* evidenţiază limfocitoză absolută peste 5000/mm3 dacă este dovedit componentul monoclonal, cu limfocite mici, nucleu mai sărac în cromatină şi mai metacromatic decât al limfocitelor normale, umbre nucleare Gumprecht (resturi ale nucleilor limfocitari); anemie moderată, trombocitopenie tardivă.

*Medulograma* evidenţiază un aspect monoton, monomorf, de ″măduvă limfocitară″ (infiltraţia cu limfocite fiind peste 30%). Tabloul este dominat de limfocite mici, mature; rare prolimfocite şi limfoblaşti

Reacţiile citochimice arată o reacţie PAS pozitivă.

*Citometria în flux* relevă prezenţa specifică a antigenului CD5;

 - în 95% din cazuri limfocitele aparţin liniei B, prezentând markeri specifici: sIg, CD19, CD20, CD21;

 - în 5% din cazuri markerii sunt specifici liniei T: CD2, CD3, CD4, CD7, CD8;

*Dozarea imunoglobulinelor serice*: - hipogamaglobulinemie policlonală;

 - prezenţa anticorpilor antieritrocitari, antitrombocitari, autoanticorpi (FR,AAN); inversarea raportului Th/Ts (T4/T8); % redus de celule NK - redus;

*Studiul cariotipului* - evidenţiază anomalii citogenetice în 50% din cazuri:

 - în LLC-B: trisomia 12, 14, t(11;14)(q13;q32);

 - în LLC-T: inv (14)(q11;q32) şi t(11;14)(p13;q11).

*Analiza moleculară* – status mutational al portiunii variabile a genei pentru lanturile grele ale imunoglobulinelor

Imagistica – Rx, CT, RMN –in cazuri selectionate

Biopsie ganglionara – in caz de suspiciune de sindrom Richter.

Biochimie uzuala

***Planul de investigaţie al limfoamelor maligne***

Necesită OBLIGATORIU **biopsie ganglionară, examen histopatologic şi imunohistochimic** pentru stabilirea diagnosticului corect de boala Hodgkin (cu cele 5 subtipuri) sau LMNH (cu subtipurile din clasificarea WHO), prognosticului şi schemei terapeutice.

 *Imunohistochimia* precizează apartenenţa la un anume tip celular prin markerii specifici.

 Anomaliile hematologice şi bioumorale se apreciază prin: hemoleucogramă, VSH, fibrinogen, PCR, transaminaze, FA, γGT, uree, creatinină, acid uric seric;

Aprecierea extensiei bolii şi stadializarea necesită explorări imagistice (Rx toracică, ecografie abdominală, CT, RMN, scintigrafie, PET) şi endoscopii cu biopsii.

 Anomalii imunologice: electroforeza proteinelor, imunelectroforeza

 Aprecierea volumului tumoral: LDH seric

 β2microglobulina

 Examenul citogenetic este util în aprecierea prognosticului.

***Explorarea mielomului multiplu***

*Hemoleucograma*: ]n sângele periferic se observă:

* anemie moderată, normocromă, normocitară; hematii în fişicuri; reticulocite;
* VSH crescut;
* leucocite normale sau leucopenie; uneori limfocitoză relativă;
* rareori pe frotiu apar plasmocite (plasmocitoza periferică peste 20% defineşte leucemia cu plasmocite);
* numărul de trombocite este normal sau apare trombocitopenia;

PCR creşte proporţional cu nivelul IL6.

*Medulograma* evidenţiază măduvă hipercelulară, plasmocitoză variabilă între 10-90%. Plasmocitul mielomatos este o celulă mare, cu diametru de 15-30μm, rotundă sau ovalară, cu nucleu sferoidal situat excentric, cromatina nucleară nu prezintă dispoziţia caracteristică ″în spiţă de roată″ a plasmocitului normal; frecvent apare un halou clar perinuclear, iar biopsia osteomedulară arată infiltrate nodulare sau placarde de plasmocite, plasmablaşti.

*Biopsie formaţiune tumorala solitara*

*Electroforeza* evidenţiază hiperproteinemie (în medie 9g/dl) şi creşterea componentului monoclonal specific fiecărui tip de mielom.

*Imunelectroforeza* – dozarea imunoglobulinelor serice: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.

*Imunofixare* proteine serice şi urinare, dozare lanturi usoare in ser si urina.

*Imagistica:* examenul radiologic calota, bazin, oase lungi, coaste, coloana vertebrala, arată leziuni osteolitice localizate sau diseminate; CT, RMN.

Examenele bioumorale evidenţiază:

* hiperuricemie
* Hipercalcemie
* creşterea β2-microglobulinei, LDH-ului;
* alterarea testelor de coagulare;
* prezenţa proteinuriei Bence –Jones;
* uree, creatinina, acid uric seric, GPT, GOT, BRT, BRD, LDH

*Citometria in flux* relevă markeri de tip cIg, CD38 , CD19, PCA-1, CD56, CD45 RO.

*Studiul citogenetic* arată anomalii numerice (trisomia 9, monosomia 13) sau structurale: t(11;14), t(8;14), t(14,18) iar biologia moleculară*,* alterări ale genelor c-myc, ras, p53.