

Explorarea paraclinică în hematologie

Hemograma din sângele periferic Examinarea frotiului de sânge periferic este o parte importantă a evaluării bolilor hematologice. Frotiul de sânge constituie un mijloc valoros în diagnosticul și evaluarea anemiilor, a anomaliilor eritrocitare ereditare, a infecțiilor, inflamațiilor, leucemilor și a bolilor limfo- și mieloproliferative, etc. Se urmărește evaluarea eritrocitelor pe frotiu (verificarea valorilor indicilor eritrocitari, morfologia eritocitară), a trombocitelor (numărul de trombocite, morfologia trombocitară) și a leucocitelor.

Frotiul de sânge poate fi efectuat din proba de sânge venos recoltată pentru hemogramă (vacutainer cu K₂-EDTA) sau sânge capilar neanticoagulat. Cantitatea recoltată este o picătură de sânge de mărime medie. Frotiul se poate efectua pe lamele (22x22 mm) sau lame de sticlă (frotiul cu franjuri) care trebuie să fie bine uscate, degresate. Picătura de sânge este întinsă pe suprafața lamei/lamelei și este uscată la aer. Frotiurile efectuate pe lamela asigură o distribuție uniformă a sângelui pe suprafața lamelei.

Eritrocitele sunt evaluate pentru număr, variații de mărime, formă, distribuția hemoglobinei și prezența de incluzii intracelulare. În mod normal eritrocitele apar de formă rotundă, anucleate, uniforme ca mărime și formă, cu un diametru mediu de 7-8 micrometri, cu o zonă palidă centrală care nu depășește 1/3 din diametrul celulei, înconjurată de o ramă roșu-portocalie de hemoglobină. Scăderea numărului de eritrocite determină anemie. Anemia este definită din punct de vedere funcțional printr-o masă eritocitară insuficientă pentru asigurarea unei cantități adecvate de oxigen țesuturilor periferice. În practică, se consideră anemie atunci când concentrația de hemoglobină, hematocritul și/sau numărul de eritrocite sunt sub valorile de referință. În anemia acută datorată hemoragiei, numărul de eritrocite și concentrația de hemoglobină rămân nemodificate în primele ore datorită pierderii concomitente de plasmă; ele încep să scadă pe măsură ce se produce corecția deficitului volemic. În anemiile cronice volumul sanguin este aproape normal prin creșterea compensatorie a volumului plasmatic, iar numărul de eritrocite și hematocritul sunt de obicei scăzute. Creșterea numărului de eritrocite determină eritrocitoză fie prin reducerea volumului plasmatic sau prin creșterea masei eritocitare totale (policitemie/eritrocitoză absolută).

Hematocritul (Hct) are o semnificație clinică dependentă de masa eritocitară, volumul eritocitar mediu și volumul plasmatic. De exemplu în talasemie hematocritul scade deoarece hematiile microcitare ocupă un volum mai mic, în timp ce numărul de eritrocite poate fi normal sau crescut. Scăderea hematocritului se întâlnește în anemie sau în creșterea volumului plasmatic (sarcină). Creșterea hematocritului se observă în eritrocitoză/policitemie, hemoconcentrație, aport insuficient de lichide, copii mici sau vârstnici. Valorile critice sub 20% pot determina insuficiență cardiacă și deces și peste 60% se asociază cu coagulare spontană a sângelui.

Hemoglobina (Hb) reprezintă componentul principal al eritrocitelor (95% din proteinele citoplasmice eritocitare) și servește ca vehicul pentru transportul O₂ și CO₂. Hemoglobina este o proteina conjugată constând dintr-un tetramer format din 2 perechi de lanțuri polipeptidice (globina), fiecare dintre acestea fiind conjugat cu un grup hem, un complex al unui ion de fier cu pigment roșu, porfirină, care conferă sângelui culoarea roșie. Fiecare gram de Hb poate transporta 1,34 ml de O₂/100ml de sânge. Scăderea hemoglobinei sub nivelurile de referință determină apariția anemiei. Hb trebuie evaluată împreună cu Hct, numărul de eritrocite, indicii

eritrocitari și morfologia celulară pe frotiul de sânge pentru clasificarea anemiei. O valoare normală a concentrației de Hb nu exclude anemia datorată hemoragiei acute. În sarcină concentrația de hemoglobină scade cu 2-3 g/dL datorită unei creșteri disproporționate a volumului plasmatic față de masa eritocitară. La nou-născut masa eritocitară este mai mare la naștere decât la adult și scade continuu în prima săptămână de viață, Hb putând ajunge până la 9 g/dL în săptămânile 11-12 de viață (anemie fiziologică). Scăderea apare mai precoce și este mai pronunțată la prematuri. Nivelurile de la adult sunt atinse în jurul vârstei de 14 ani. La vârstnici apare o scădere graduală a concentrației de hemoglobină. Creșterea hemoglobinei apare în eritrocitoză (policitemie). După conviețuirea un timp îndelungat la altitudine survine o creștere a Hb corespunzătoare la 1 g/dL pentru 2000 m.

Valorile critice sunt la Hb <5g/dL când apare insuficiența cardiacă și poate surveni decesul sau la o concentrație de Hb >20 g/dL care poate duce la blocarea capilarelor ca urmare a hemoconcentrației.

Indicii eritrocitari Evaluarea eritrocitelor din punct de vedere al volumului și conținutului în Hb se realizează prin măsurarea sau calcularea VEM, HEM, CHEM și RDW.

VEM reprezintă volumul ocupat de un singur eritrocit. Metoda de determinare este:

$$\text{VEM} = \text{Hct}\% \times 10 / \text{Nr Er}$$

VEM se exprimă în micrometri cubi sau femtolitri (fL). La adult este între 80-100 fL valori mai mari la nou-născuți și la vârstnici, valori mai mici la copii până la 18 ani.

VEM este un indice util pentru clasificarea anemiilor și poate sugera mecanismul fiziopatologic al afectării eritrocitare. Împreună cu ceilalți indici eritrocitari, poate permite detectarea precoce a unor procese care vor cauza anemie. VEM normal se observă în anemia normocitară (dacă se asociază cu RDW <15). Anemiile normocitare se asociază fie cu un răspuns eritropoietic adecvat (anemia posthemoragică, anemia hemolitică), fie cu o secreție scăzută de eritropoietină (anemia din insuficiență renală, anemia din bolile hepatice, anemia din insuficiențele endocrine sau din malnutriția protein-calorică). Anemia din bolile cronice poate fi și normocitară și microcitară. Anemia asociată cu un răspuns medular inadecvat poate evolua cu VEM normal (anemia aplastică, boli medulare infiltrative, anemii mielodisplazice, anemii diserythropoietice).

VEM scăzut (<80 fL) se asociază cu anemia microcitară. Majoritatea anemiilor microcitare se datorează sintezei deficitare de hemoglobină, adesea asociată cu deficitul de fier sau cu alterarea utilizării fierului, precum și cu unele condiții ereditare. Datorită acestei deficiențe precursorii eritroizi parcurg mai multe diviziuni decât în mod normal, ducând la formarea de eritrocite mature de dimensiuni mai mici, RDW este >15.

Clasificarea anemiilor microcitare

I. Afecțiuni ale metabolismului fierului:

- Anemia feriprivă.
- Anemia din bolile cronice.
- Atransferinemia congenitală.
- Anemia microcitară hipocromă congenitală cu supraîncărcare cu fier (sindrom Shahidi-Nathan-Diamond).

II. Boli ale sintezei moleculelor de globină:

- Alfa - si beta-talasemia,
- Sindroamele de hemoglobina E (AE, EE, E-beta-talasemia).
- Sindroamele de hemoglobina C (AC, CC).
- Hemoglobinele instabile.

II. Boli ale sintezei de hem și porfirină:

- Anemia sideroblastică ereditară (X-linkată, autosomală).
- Anemia sideroblastică dobândită (anemia sideroblastică idiopatică cu sideroblaști inelari, anemia sideroblastică asociată cu boli mieloproliferative sau alte boli maligne).
- Anemia sideroblastică dobândită reversibilă (din alcoolism, indusă de medicamente: izoniazidă, cloramfenicol, din intoxicația cu plumb - de obicei normocitară).

Cea mai frecventă cauză este deficitul de fier, anemia feriprivă fiind cea mai întâlnită formă de anemie.

VEM crescut (>100 fL) este specific pentru anemia macrocitară. Pe baza criteriilor biochimice și morfologice anemiile macrocitare se pot împărți în două grupuri: anemii megaloblastice și non-megaloblastice. În anemiile megaloblastice marca morfologică este reprezentată de prezența precursorilor eritroizi anormali în măduva osoasă, caracterizați prin dimensiuni crescute și alterări specifice în aspectul cromatinei nucleare. Aceste celule distincte reprezintă expresia morfologică a unei anomalii biochimice, respectiv întârzierea sintezei de ADN. Rata sintezei hemoglobinei, respectiv sinteza ARN, nu este afectată în timp ce rata diviziunilor celulare este redusă, în consecință componentele citoplasmice, în special Hb sunt sintetizate în exces în timpul întârzierii între diviziunile celulare, ducând la formarea unor eritrocite de dimensiuni crescute. Cele două modificări caracteristice de pe frotiul de sânge care permit diferențierea anemiilor megaloblastice sunt prezența macroovalocitelor și a neutrofilelor cu nucleu hipersegmentat. În anemia megaloblastică VEM este de obicei >110 fL (110 - 130 fL, chiar până la 160 fL).

Clasificarea patogenică a anemiilor megaloblastice

1. Deficitul de vitamina B12:

A. Dietă deficitară (rară: vegetarieni)

B. Malabsorbție de vitamina B12:

- Anemia pernicioasă (boală autoimună caracterizată prin atrofie gastrică și pierderea factorului intrinsec).
- Deficiență ereditară de factor intrinsec (anemia pernicioasă ereditară).
- Malabsorbția vitaminei B12 din alimente (chirurgia gastrică, pacienți cu gastrită și aclorhidrie, infecția cu *Helicobacter pylori*).
- Insuficiență pancreatică.
- Sindromul Zollinger-Ellison.
- Competiția biologică pentru vitamina B12: proliferarea bacteriană a intestinului subțire (anomalii structurale: diverticuli, stricturi, fistule, ansă oarbă sau ale motilității: disfuncția autonoma din diabet), infestarea cu *Diphyllobothrium latum*.
- Boli ileale: sprue tropical, boli intestinale inflamatorii, boala celiacă, rezecții ileale, by-pass jejuno-ileal pentru obezitate, radioterapia cu afectarea ileonului, boli ileale infiltrative (limfom, sclerodermie).
- Malabsorbția familială selectivă a vitaminei B12 (sindrom Imerslund-Gräsbeck).
- Malabsorbția vitamine B12 indusă de toxice și medicamente: alcool, colchicină, metformin, neomicină, colestiramină, acid paraaminosalicilic.

C. Defecte în transportul și metabolismul intracelular al vitaminei B12:

- Boli genetice: mutații genetice care afectează metabolismul intracelular al cobalaminei (aciduria metilmalonice și hiperhomocisteinemia), deficiență de transcobalamina II.
- Toxicitatea oxidului nitros.

II. Deficitul de folați

A. Dietă deficitară (prematuri, dieta exclusiv lactată la sugari fără suplimentare cu folați,

dieta restrictiva din fenilketonurie, abuzul de alcool).

B. Nevoi crescute: sarcină, alăptare, copii în perioada de creștere, anemia hemolitică cronică, boli neoplazice, hipertiroidism.

C. Pierderi crescute: dializă cronică.

D. Malabsorbție de foliați:

- Boli intestinale: sprue tropical, boala celiacă, boli intestinale inflamatorii, rezeccii jejunale.
- Dermatită herpetiformă.
- Aclorhidria endogenă sau iatrogenică.
- Insuficiența pancreatică în care se administrează terapie de substituție orală

E. Deficit de foliați indus toxic/medicamentos: abuzul de alcool, sulfasalazină, anticonvulsivante (în special hidantoinele; acidul valproic), antifoliați (metotrexat, trimetoprim-sulfametoxazol, pirimetamină), contraceptivele orale.

F. Defecte moștenite ale transportului și metabolismului:

- Deficitul de tetradidrofolat reductază.
- Malabsorbția ereditară de folat.

Hemoglobina eritocitară medie (HEM) este o măsură a conținutului mediu de hemoglobină pe eritrocit.

HEM este calculat de analizorul automat conform formulei:

$$\text{HEM} = \frac{\text{Hb(g/dL)} \times 10}{\text{Nr.Er.(x109/L)}}$$

Valori de referință - HEM se exprimă în picograme ($\text{pg}/10^{-12}\text{g}$). Valorile normale la adult sunt 26–34 pg sau 0.4-0.53 fmol (valori mai mari la nou-născut).

În majoritatea anemiilor HEM se corelează cu VEM, astfel anemiile microcitare sunt de obicei hipocrome (uneori hipocromia poate preceda microcitoza), cele normocitare sunt de obicei normocrome, iar condițiile care cresc HEM determină în general VEM crescut, deoarece conținutul eritocitar normal de Hb este de 95% din concentrația de Hb maxim posibilă (anemiile macrocitare, anemia regenerativă observată de exemplu în timpul substituției cu fier a anemiei feriprive, la nou-născut).

Concentrația eritocitară medie de hemoglobină (CHEM) măsoară concentrația medie de Hb dintr-un volum dat de eritrocite (sau raportul dintre masa de Hb și volumul de eritrocite).

CHEM este calculat de analizorul automat conform formulei:

$$\text{CHEM} = \frac{\text{Hb (g/dL)} \times 100}{\text{Hct (\%)}}$$

Valori de referință - CHEM se exprimă în g/dL. Valorile normale la adult sunt 32-36 g/dL (320-360g/L).

VEM este un indice extrem de valoros în clasificarea anemiilor. Datorită comportamentului similar al volumului eritocitar și conținutului în Hb al fiecărui eritrocit în parte CHEM rămâne constant în multe afecțiuni hematopoietice. CHEM scăzut ($<30\text{g/dL}$) apare în anemiile hipocrome (anemia feriprivă, unele talasemii). CHEM crescut cu valoarea peste 37 g/dL apare în sferocitoza ereditară și în formele homozigote de siclemie și hemoglobină C.

Lărgimea distribuției eritrocitare (RDW) este un indice eritocitar care cuantifică heterogenitatea volumului celular (gradului de anizocitoză).

Metoda de determinare - RDW este calculat de analizorul automat în funcție de prezența de anomalii ale frecvenței relative la anumite niveluri de discriminare, existența a două sau a mai multor peak-uri și lărgime de distribuție anormală.

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

Valori de referință 11.6-14.8 coeficient de variație (CV) a volumului eritrocitar.

RDW este util în clasificarea inițială a anemiilor, în particular a anemiei microcitare, deși alte teste sunt de obicei necesare pentru confirmarea diagnosticului. Astfel 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. De asemenea permite diferențierea între anemia din bolile cronice (VEM normal/scăzut, RDW normal) și anemia feriprivă incipientă (VEM normal/ scăzut, RDW crescut).

Reticulocitele (Rt) sunt eritrocite anucleate tinere, imature, care conțin acizi nucleici reziduali (ARN). După expulzarea nucleului eritrocitele rămân în măduvă până la 4 zile, timp în care are loc o scădere continuă a numărului de poliribozomi (care conțin ARN) și a sintezei de hemoglobină. Aceste eritrocite tinere se maturizează complet în circulația periferică în cca. 1-2 zile după ce părăsesc măduva osoasă, timp în care pierd complet capacitatea de sinteză proteică (respectiv poliribozomii care conțin ARN), iar sinteza de Hb încetează. Reticulocitele apar pe frotiul colorat Wright-Giemsa ca celule policromatofile (materialul nucleic reticular se colorează în albastru-gri) de volum mai mare decât cel al eritrocitelor mature. Materialul reticular se colorează cu coloranți supravitali ca albastru cresil brilliant/albastru metilen. În mod normal, în absența anemiei, un număr mic de reticulocite este prezent în circulație (în fiecare zi aproximativ 1% din eritrocite sunt înlocuite cu eritrocite tinere eliberate din măduvă). Determinarea numărului de reticulocite oferă informații despre capacitatea medulară de a sintetiza celule roșii ca răspuns la o suprasolicitare fiziologică, cum este anemia.

Semnificația clinică constă în diferențierea tipurilor de anemii în hiporegenerative, regenerative și hiperregenerative. De asemenea ajută la monitorizarea răspunsului la tratamentul de substituție cu fier, acid folic sau vitamina B12 și la evaluarea eritropoezei după transplantul medular.

Valori de referință

Adult 0.5-2% din nr. total de eritrocite.

Nou-nascut 2.5-6.5% din nr. total de eritrocite (scade la nivelul de la adult din a doua săptămână de viață

Nr. absolut = $30-120 \times 10^9/\text{L}$ sau $\times 10^9/\text{L}$.

Determinarea numărului relativ sau absolut de Rt reprezintă un indicator important al activității eritropoietice medulare, furnizând o apreciere inițială dacă anemia se datorează alterării producției eritrocitare sau pierderii de eritrocite în circulație (prin sângerare sau hemoliză). Un număr crescut de reticulocite (reticulocitoză) este indicator de eritropoeză regenerativă (creșterea producției eritrocitare medulare sub acțiunea eritropoietinei, sub stimulare maximă măduva poate produce eritrocite de 6-8 ori mai mult față de rata normală).

Tratamentul de substituție cu fier, acid folic sau Vit B12 al anemiilor deficitare în acești factori determină regenerarea eritropoezei (criza reticulocitară). Aceasta este evidențiată într-o săptămână de tratament de creșterea numărului de Rt. O reticulocitoză maximă de 10-20% apare după 2-4 săptămâni de tratament. Tratamentul cu eritropoietina determină o creștere ușoară a

numărului de Rt după 24 ore (cu eliberarea din maduvă de Rt imature, mari, cu conținut mare de ARN), nivelul maxim este atins după 4-6 zile, iar normalizarea survine după 8-10 zile. Un număr scăzut de reticulocite (reticulocitopenia) apare în anemiile non-regenerative, cum ar fi deficitul de fier/folat/vitamina B12, aplazia medulară (deficitul persistent de Rt sugerează un prognostic nefavorabil), anemia din bolile cronice, insuficiența medulară.

Numărul de trombocite (Numărul de plachete) Trombocitele sunt fragmente citoplasmice anucleate bogate în granule rotund-ovalare, plate, în formă de disc, cu diametrul de 2-4 micrometri. Trombopoieza are loc în măduva osoasă începând cu celula progenitoare multipotentă, continuă cu megakariocitopoieza care include proliferarea megakariocitară și maturarea megakariocitelor cu formarea de trombocite. În mod normal, două treimi din trombocite se găsesc în circulație, iar o treime sunt stocate în splină. Trombocitele sunt implicate în hemostază și în inițierea proceselor de reparare tisulară și vasoconstricție după injuria vasculară și în timpul proceselor inflamatorii. Aderarea și agregarea plachetară are ca rezultat formarea trombusului pachetar care astupă rupturile din pereții vaselor mici. Determinarea numărului de trombocite este utilă în investigarea unei sângerări neexplicate, a unei boli hemoragice sau a unei boli trombotice sau în evaluarea unui profil de coagulare. Se mai poate efectua în caz de monitorizare a bolilor asociate cu insuficiență medulară sau pentru monitorizarea în timpul tratamentelor care pot induce supresie medulară (iradiere, chimioterapie etc.).

Trombocitele sunt numărate de analizorul automat. O estimare a numărului de trombocite pe un frotiu de sânge bine efectuat constituie un control valoros al numărului de trombocite determinat prin metoda automată. În general, când frotiul este examinat cu obiectivul de 100x fiecare trombocit observat/câmp reprezintă aprox $10000 \text{ Tr } 10^6/\text{L}$. În consecință, un frotiu normal trebuie să prezinte în medie cel puțin 14 Tr/câmp.

Valori de referință - 150-450 x 10³/microL.

Semnificație clinică

1 Creșterea numărului de trombocite (trombocitoză/trombocitemie)

A Trombocitoza tranzitorie se datorează mobilizării trombocitelor din pool-ul extravascular, efort fizic, naștere, administrare de epinefrină.

B. Trombocitoză primară:

Trombocitemia ereditară (rară, autosomal dominantă determinată de o mutație a genei trombopoietinei de cromozomul 3).

Sindroamele mieloproliferative (hematopoieză clonală): trombocitemia esențială, policitemia vera, leucemia mieloidă cronică, metaplazia mieloidă cu mielofibroză.

C. Trombocitoză secundară/reactivă (producția persistentă a unuia sau mai multor factori trombopoietici, în special interleukina 6, care acționează asupra megakariocitelor):

- boli infecțioase;
- boli inflamatorii;
- boli maligne;
- regenerarea rapidă după hemoragie/anemie hemolitică;
- rebound după refacerea post-trombocitopenie;
- asplenia anatomică (splenectomie)/funcțională (de exemplu din siclemie);
- deficitul de fier;
- postchirurgical.

2. Scăderea numărului de trombocite (trombocitopenia) este cea mai frecventă cauză de sângerare. Trombocitopenia poate apărea prin mecanisme diferite:

A. Distrucția accelerată a trombocitelor este cea mai frecventă cauză de trombocitopenie. Poate fi datorată unor procese imunologice sau neimunologice.

Procese imunologice pot fi :

- autoimune: idiopatică/secundară (infecții, sarcină, boli vasculare de colagen, boli limfoproliferative, tumori solide, medicamente etc.); mecanismul este reprezentat de prezența de autoanticorpi anti-trombocitari de tip IgG și/sau IgA, mai rar IgM, care activează complementul și determină scurtarea duratei de viață a trombocitelor prin îndepărtarea din circulație de către sistemul fagocitic mononuclear splenic.
- aloimune: trombocitopenie neonatală, purpura posttransfuzională.

Procese non-imunologice cuprind:

- microangiopatii trombotice: coagulare intravasculară diseminată, purpură trombotică trombocitopenică, sindrom hemolitic uremic, sindromul HELLP din sarcina (hemoliză eclampsie, creșterea enzimelor hepatice și scăderea trombocitelor);
- alterarea trombocitelor prin suprafețe vasculare anormale (valvulopatii, ateroscleroză extensivă, proteze vasculare, catetere, circulație extracorporeală etc.);
- infecții: virusuri (rubeolă/oreion neonatal, citomegalovirus, parvovirus B19, vaccinuri), bacterii (septicemie, meningocemie, boală Lyme), Mycoplasma pneumoniae, protozoare (malaria)

B. Producție scăzută de trombocite:

- Hipoplazie megakariocitară: medicamente mielosupresive (agenți alchilanți, antimetaboliți, medicamente citotoxice), radiații ionizante, anemie aplastică, boli medulare infiltrative, medicamente care produc hipoplazie medulară prin mecanism idiosincrazic (cloramfenicol), substanțe care supresează selectiv megakariocitele (clorotiazide, estrogeni, etanol).
- Trombopoieză inefficientă: anemia megaloblastică,
- Alterarea mecanismului de reglare a trombopoiezei: deficit de trombopoietină, trombocitopenia ciclică.
- Trombocitopenii ereditare: trombocitopenia amegakariocitară congenitală, trombocitopenia cu absența radiusului, anomalia May-Hegglin, sindromul Wiskott-Aldrich (microtrombocitopenia X-linkată), macrotrombocitopenia X-linkată cu diseritropoieză, sindromul Bernard-Soulier, sindromul plachetelor gri etc.
- Purpura trombocitopenică amegakariocitară pură dobândită (rară)

C. Distribuție anormală a trombocitelor:

- Boli ale splinei (neoplazice, congestive, infiltrative, infecțioase); de obicei trombocitopenie ușoară = $50-100 \times 10^3/\text{microL}$.
- Hipotermia.
- Diluția trombocitelor prin transfuzii masive.

Trombocitopenia se asociază clinic cu sângerări cutaneo-mucoase: peteșii, purpură, gingivoragii, epistaxis, până la sângerări gastrointestinale, pulmonare și genitourinare. Sângerările spontane sunt rare la $>60 \times 10^3 \text{Tr/L}$ (pot apărea sângerări posttraumatice, postoperatorii).

Valori critice

1. Trombocitoza $>1.5 \times 10^9/\text{microL}$, precum și trombocitoza la pacienți vârstnici și/sau cu boli cardiovasculare prezintă risc de tromboză, mai rar de hemoragie.
2. Trombocitopenia $<20 \times 10^9/\text{L}$ se asociază cu risc de sângerări spontane interne/externe (risc 1% de hemoragii intracraniene).

Numărul de leucocite (Numărul de celule albe) și formula leucocitară

Leucocitele se împart în două grupe principale: granulocite și a-/non-granulocite. Granulocitele sunt denumite astfel datorită prezenței în citoplasmă de granulații distincte și se identifică trei tipuri de granulocite în funcție de afinitățile de colorare pe frotiul de sânge colorat Wright: neutrofile, eozinofile și bazofile. De asemenea, aceste celule sunt denumite și leucocite polimorfonucleare datorită nucleului multilobulat. Nongranulocitele care constau din limfocite și monocite nu conțin în general granulații citoplasmatic distincte și au nucleul nonlobulat, fiind denumite și leucocite mononucleare.

Evaluarea leucocitelor este utilă pentru evaluarea infecțiilor, inflamațiilor, necrozelor tisulare, intoxicațiilor, alergiilor, bolilor mieloproliferative și limfoproliferative acute și cronice, tumorilor maligne, depresiei medulare (iradiere, medicamente citotoxice, imunosupresoare, antitiroidiene etc.).

Leucocitele sunt determinate cu ajutorul analizorului automat (după ce hematiile sunt lizate, iar leucocitele sunt colorate cu o substanță fluorescentă cu afinitate pentru acizii nucleici) prin metoda de citometrie în flux cu fluorescență utilizând LASER semiconductor.

Valorile de referință la adult = 4000-10000/microL sau $4 \cdot 10^9/L$, iar la copii valorile sunt mai mari în funcție de vârstă.

Semnificație clinică

Variații fiziologice ale leucocitelor:

- la nou-născuți și copii numărul de leucocite este crescut cu scăderea treptată a valorilor, cu atingerea valorilor de la adult între 18-21 ani.
- în sarcină apare leucocitoză ușoară, iar neutrofilia se accentuează odată cu apropierea termenului; de asemenea, în timpul travaliului apare neutrofilie uneori pronunțată, cu normalizarea valorilor după 4-5 zile și asociată cu eozinopenie.

Majoritatea variațiilor fiziologice se explică prin stimularea cortexului adrenal. Administrarea de cortizon și hidro cortizon se asociază cu neutrofilie (datorată probabil scăderii efluxului din sânge și creșterii eliberării medulare), urmată de eozinopenie și limfopenie

Leucocitoza reprezintă $L > 10000/uL$ sau $> 10 \cdot 10^9/L$ datorată de obicei unei creșteri a numărului de neutrofile sau limfocite. Mai rar celelalte clase de leucocite determină creșterea numărului absolut de leucocite. O creștere proporțională a tuturor tipurilor de leucocite se datorează hemoconcentrației.

Infecțiile reprezintă cauza majoră de leucocitoză. O infecție acută tipică se caracterizează printr-o fază de atac neutrofilică, o fază reactivă monocitică și o fază de recuperare limfocitico-eozinofilică. În infecțiile cronice poate persista oricare din aceste trei faze. Infecțiile virale și unele infecții bacteriene (febra tifodă) nu urmează în mod normal acest curs. Gradul leucocitozei depinde de severitatea infecției, vârstă și rezistența pacientului, precum și de rezerva medulară. Alte cauze de leucocitoză sunt reprezentate de :

- Hemopatiile maligne,
- Hemoliza acută,
- Traumatismele sau injuriile tisulare, de exemplu intervenții chirurgicale, necroze tisulare,
- Tumorile maligne (în special carcinomul bronșic),
- Toxine,
- Medicamente: cloroform, chinină, factori de creștere, etc.
- Hemoragie acută,

- Postsplenectomie.

Leucopenia reprezintă valoarea leucocitelor $<4000/uL$ sau $<4 \times 10^9/L$ (valorile cuprinse între 2500-4000/L sunt considerate borderline, în timp ce valorile $<2500/uL$ sunt cert anormale). Se poate datora următoarelor cauze :

- Infecții virale, unele infecții bacteriene, infecții bacteriene severe,
- Hipersplenism,
- Depresie medulară produsă de intoxicația cu metale grele, benzen, radiații ionizante, medicamente: chimioterapice, barbiturice, antibiotice, antihistaminice, anticonvulsivante antitiroidiene, arsenic, diuretice, analgezice și antiinflamatorii;
- Boli medulare primitive: leucemie (aleucemică), anemie megaloblastică, sindroame mielodisplazice, anemie aplastică, boli congenitale (anemia Fanconi, discheratoză congenitală) și
- Boli medulare secundare unor granulocite sau metastaze.

Valori critice - număr de leucocite $<500/UL$, respectiv $>30000/PL$.

Formula leucocitară constă în diferențierea numărului total de leucocite circulante în cele cinci tipuri de leucocite, exprimate procentual și respectiv în număr absolut, fiecare dintre acestea îndeplinind o funcție specifică. Actualmente este de preferat raportarea fiecărui tip de leucocite în valori absolute. Formula leucocitară este efectuată automat de către analizor. Există anumite situații însă în care este necesară efectuarea manuală a formulei leucocitare cum sunt un număr de leucocite prea mic sau prea mare, prezența de celule anormale semnalizată de analizor prin anumite mesaje de avertizare și chiar eșecul analizorului de a indica formula leucocitară. În aceste cazuri se efectuează numărătoarea microscopică pe frotiu de sânge venos (recoltat pe EDTA; heparina poate produce deformări ale leucocitelor) sau pe frotiu de sânge capilar.

Neutrofilele (granulocitele polimorfonucleare neutrofile) reprezintă cel mai numeros tip de leucocite. Ele joacă un rol major în apărarea antiinfecțioasă primară a organismului prin fagocitarea și digestia microorganismelor, iar activarea lor necorespunzătoare poate duce la lezarea țesuturilor normale ale organismului prin eliberarea de enzime și agenți piogeni. În momentul apariției infecției sunt produși agenți chemotactici care determină migrarea neutrofilelor la locul infecției și activarea funcțiilor defensive ale acestora, cu fagocitarea agentului respectiv, urmată de eliberarea granulelor în vezicula de fagocitoză și distrugerea agentului infecțios. Acest efect este adesea asociat cu creșterea producției și eliberării neutrofilelor din măduva osoasă. Granulopoieza are loc la nivelul măduvei osoase, considerându-se că granulocitele neutrofile, eozinofile și bazofile urmează același model de proliferare, diferențiere, maturare și eliberare în sânge. Mieloblaștii, promielocitele și mielocitele reprezintă compartimentul mitotic, celulele fiind capabile de replicare, iar metamielocitele, neutrofilele nesegmentate și neutrofilele segmentate reprezintă compartimentul postmitotic sau de diferențiere. În afara măduvei osoase, granulocitele neutrofile se găsesc în țesuturi, sunt circulante la nivelul vaselor de sânge și marginale care aderă la endoteliul vascular. Creșterea neutrofilelor circulante se datorează fie eliberării din măduva osoasă, fie mobilizării neutrofilelor marginale. În cazul unei stimulări puternice metamielocitele și mielocitele pot ajunge în sângele periferic

Valori de referință: la adult = 2000-8000/PL sau $2-8 \times 10^9/L$: 45-80% din leucocite și la copii valorile sunt mai mici în funcție de vârstă.

Semnificație clinică

Neutrofilia reprezintă valori $>8000/uL$ sau $8 \times 10^9/L$ cuprinde:

- Pseudoneutrofilia (creșterea numărului de neutrofile circulante pe seama neutrofilelor marginate): efort fizic intens, stres (plânsul la copii), travaliu, menstruație.
- Infecțiile bacteriene acute localizate și generalizate determină neutrofilie până la 15000-20000/UL, foarte rar chiar până la 50000/uL. Pot apărea granulații toxice și devierea la stânga a formulei leucocitare, cu creșterea procentului de neutrofile nesegmentate (normal 1-4% din neutrofile), iar în cazul unui stimul puternic cu eliberarea de precursori medulari (metamielocite, mielocite)..
- Bolile inflamatorii cronice cum sunt vasculitele, artrita reumatoidă, bronșita, dermatitele cronice, pielonefrita cronică, pancreatita cronică.
- Bolile metabolice: coma diabetică, coma uremică, coma hepatică, atacul acut de gută, eclampsia, tireotoxicoza.
- Necroza tisulară: arsurile, infarctul miocardic.
- Tumorile maligne, în special carcinoamele (gastrointestinal, pulmonar): neutrofilia apare ca urmare a reacției inflamatorii, necrozei tumorale, producerii de factori de creștere granulopoietici de către tumoră.
- Bolile mieloproliferative cronice (leucemia mieloidă cronică, policitemia vera, trombocitemia esențială, metaplazia mieloidă cu mielofibroză)

Neutropenia se clasifică în ușoară (1000-1500/PL), moderată (500-1000/NL) și severă (<500/uL). Agranulocitoza reprezintă o formă severă de neutropenie cu absența totală a neutrofilelor circulante. Neutropenia severă se asociază cu risc crescut de infecții cu localizare orală (ulcere, periodontită), cutaneo-mucoasă (piele, perirectal, genital). În neutropenia prelungită apar infecții sistemice (pulmonare, gastrointestinale, hematogene).

Cauzele de neutropenie sunt:

A. Pseudoneutropenia care apare la efectuarea hemogramei după un timp îndelungat de la recoltare sau asociată cu prezența paraproteinemiei care produce aglutinarea sau marginarea neutrofilelor.

B. Neutropenia dobândită se asociază cu:

- Infecțiile bacteriene severe, septicemia în special cu bacterii Gram negativi, infecțiile virale în care neutropenia survine în primele 1-2 zile și persistă 3-7 zile, de obicei fără semnificație clinică. Neutropenia prelungită poate apărea în infecții cu virusul hepatitic B, virusul Epstein-Barr, HIV, infecții cu protozoare (malaria), fungi, rickettsii, substanțe chimice, toxice și medicamente.
- Neutropenia nutrițională apare în cașexie, stări debilitante, anorexia nervoasă, deficitul de vitamina B12 și folat și deficitul de cupru.
- Neutropenia imună asociată cu prezența de anticorpi anti-neutrofile,
- Hipersplenism,
- Bolile hematopoietice: leucemia (aleucemică), anemia aplastică.

C. Neutropenia congenitală și cronică

Valorile critice se asociază cu un număr de neutrofile <200/uL sau cu agranulocitoza care prezintă risc de infecții sistemice letale.

Limfocitele reprezintă o populație celulară heterogenă care diferă în funcție de origine, durată de viață, localizare la nivelul organelor limfoide și funcție. Deși unele caracteristici morfologice ca mărimea, granularitatea, raportul nucleu-citoplasmatic diferențiază populațiile limfocitare una de cealaltă, ele nu oferă indicii privind tipul și funcția lor. Majoritatea

limfocitelor din sânge sunt mici, deși sunt comune și forme mai mari, cum ar fi limfocitele mari granulare care conțin granulații azurofile în citoplasmă. Aproximativ 65-80% din limfocite sunt celule T. Restul de 8-15% sunt celule B, iar 10% sunt celule natural killer (NK) (celulele NK sunt morfologic distincte, unele dintre acestea fiind identice cu limfocitele mari granulare). Numai 2% din limfocite sunt prezente în sânge. Limfopoieza are loc la nivelul organelor limfoide. Organele limfoide primare sunt măduva osoasă și timusul, unde are loc diferențierea antigen-independentă a limfocitelor din precursorii imaturi (limfocitele B se maturează în măduvă, iar limfocitele T în timus unde migrează de la nivel medular). După acest stadiu precoce de diferențiere, limfocitele imunocompetente sunt eliberate și se localizează în arii specifice din organele limfoide secundare: splină, ganglionii limfatici, plăcile Peyer de la nivelul intestinului și inelul Waldeyer. Aici are loc stadiul final, antigen-dependent al diferențierii limfocitare și distribuirea de celule efectoare complet diferențiate și a produșilor acestora spre alte zone ale organismului.

Plasmocitele reprezintă celule B complet diferențiate, cu citoplasmă abundentă, intens bazofilă, uneori granulară și nucleu excentric, rotund-ovalar, cu cromatină densă cu aspect de spițe de roată. Plasmocitele nu sunt prezente în mod normal în sânge. Frecvent sunt întâlnite celule intermediare (limfoplasmocite), ca în infecțiile virale, inclusiv mononucleoza infecțioasă sau în bolile imunologice cu hipergamaglobulinemie. Celulele B controlează răspunsul imun umoral mediat de anticorpi specifici antigenului ofensator. Celulele cu memorie au durată lungă de viață și nu produc anticorpi până în momentul restimulării antigenice, când răspund la doze mult mai mici de antigen, proliferază clonal și produc o cantitate de anticorpi de 7-10 ori mai mare decât celule B neexperimentate antigenic. Celulele T sunt implicate în răspunsul imun mediat celular și includ celulele T helper CD4+, celulele T supresor CD8+ și celulele T citotoxice.

Valori de referință la adult: 1000-4000/uL sau $1-4 \times 10^9/L$; 20-55% din leucocite și la copii valori mai mari în funcție de vârstă.

Semnificația clinică este legată de etiologia limfocitozei și limfopeniei.

Limfocitoza reprezintă valori ale limfocitelor $>4000/UL$.

A. Cauzele benigne :

Infecții virale:

- Limfocitoza infecțioasă (apare în special la copii),
- Mononucleoza infecțioasă produsă de virusul Epstein-Barr, afectează în special adolescenții și adulții tineri, produce un tablou hematologic caracteristic cu limfomonocitoză și prezența pe frotiul de sânge de limfocite atipice, activate (celulele Downey).
- Alte infecții virale: infecții virale ale tractului respirator superior, infecții cu citomegalovirus, rujeolă, oreion, varicelă, hepatită acută virală, infecție acută cu HIV.
- Alte infecții: infecții cronice (tuberculoză, sifilis), tuse convulsivă, toxoplasmoză, febra tifoidă, bruceloză. Numărul de limfocite poate depăși 15000 /UL în limfocitoza infecțioasă, mononucleoza infecțioasă, tusea convulsivă.
- Boala Crohn, colită ulcerativă.
- Vasculitele.

B. Cauzele maligne

- Cu celulă B: leucemia limfocitară cronică, leucemia prolimfocitară cu celulă B, leucemia cu celule păroase, faza leucemică din limfoamele nonhodgkin, macroglobulinemia Waldenström.
- Cu celulă T: leucemia prolimfocitară cu celulă T, leucemia sau limfomul cu celulă T al adultului (sindromul Sézary), leucemia cu limfocite mari granulare.

Limfopenia reprezintă valori ale limfocitelor $<1000/L$. Se asociază cu:

- Imunodeficiențe congenitale: sindroame de imunodeficiență combinată.
- Infecția HIV (scăderea selectivă a celulelor CD4+).
- Chimioterapia (în special analogii nucleozidici: fludarabină, cladribină produc scăderea marcată a celulelor CD4*, care poate persista ani de zile), radioterapia, medicația imunosupresoare.
- Lupusul eritematos sistemic (sunt prezenți anticorpi anti-limfocitari care produc liza complement mediată a limfocitelor), boala mixtă de țesut conjunctiv, dermatomiozita.
- Tuberculoza avansată (miliară) care determină scăderea marcată a celulelor CD4.
- Virusul gripal (limfopenia apare tipic după rezolvarea infecției).
- Boala Hodgkin și alte malignități.
- Anemia aplastică.

Plasmocitele nu sunt prezente în mod normal în sânge. Ele sunt crescute în:

- Mielomul multiplu, leucemia cu plasmocite,
- Cancerul de ficat, sân, prostată,
- Ciroză,
- Artrita reumatoidă, lupusul eritematos sistemic,
- Boala serului și
- Unele infecții bacteriene, virale, parazitare.

Valorile critice se asociază cu un număr de limfocite $<500/\text{microL}$ care crește riscul de infecții, în special virale. Un număr de celule CD4 sever scăzut este cel mai bun indicator de infecții oportuniste.

Monocitele sunt cele mai mari celule din sânge. Fac parte din sistemul fagocitic mononuclear sau reticuloendotelial compus din monocite, macrofage și precursorii lor medulari. Monocitele sunt eliberate în sânge și, după un scurt timp în circulație, migrează în diferite țesuturi, întâmplător sau specific, ca răspuns la diferiți factori chemotactici. În țesuturi, ca răspuns la diferiți stimuli solubili, ele se diferențiază în macrofage tisulare, cu calități morfologice și funcționale caracteristice, proces care a fost denumit activare și care este reversibil (proces denumit dezactivare). Celulele sistemului fagocitic mononuclear sunt primitive filogenetic, nici un animal neputând trăi fără ele. Îndeplinesc o varietate largă de funcții importante în organism, incluzând îndepărtarea particulelor străine și celulelor senescente moarte sau alterate, reglarea funcțiilor altor celule, procesarea și prezentarea de antigene în reacțiile imune, participarea în diferite reacții inflamatorii, distrugerea bacteriilor și celulelor tumorale. Monocitele și macrofagele produc numeroși factori bioactivi: enzime, factori ai complementului, factori de coagulare, specii reactive de oxigen și azot, factori angiogenici, proteine de legare (transferina, transcobalamina II, fibronectina, apolipoproteina E, lipide bioactive derivați ai acidului arahidonic), factori chemotactici, citokine și factori de creștere (IFN α și γ , IL 1, 3, 6, 8, 10, 12, FGF, PDGF, TNF, M-CSF).

Valori de referință reprezintă 0-1000/ μL sau 0-1 $\times 10^9/L$: 0-15% din leucocite.

Semnificația clinică se referă la creșterile și scăderile fiziologice sau patologice.

Monocitoza reprezintă valori $>1000/\mu\text{L}$ care apar în:

- Cele mai frecvente cauze sunt infecțiile bacteriene, tuberculoza, endocardita bacteriană subacută, sifilisul, bruceloza.
- Leucemia mielomonocitară cronică, leucemia monoblastică acută, boli mieloproliferative cronice.

- Carcinoame: stomac, sân, ovar.
- Boala Hodgkin, limfoame.
- Bolile gastrointestinale: colita ulcerativă, enterita regională, sprue, ciroza hepatică.
- Bolile de collagen, sarcoidoza.

Monocitopenia reprezintă valori ale monocitelor $<100/uL$ (condiție extrem de rară). Apare în:

- Tratamentul cu prednison (tranzitoriu),
- Leucemia cu celule păroase,
- Infecțiile severe care determină și neutropenie,
- Infecția HIV,
- Anemia aplastică.

Eozinofilele (granulocitele eozinofile) au fost inițial descrise pentru granulațiile lor intracitoplasmatic caracteristice care manifestă afinitate crescută pentru coloranții acizi, cum ar fi eozina, și care apar colorate roșu-strălucitor în microscopia optică. Eozinofilele sunt celule mobile, cu originea în măduva osoasă, urmând același model de proliferare, diferențiere, maturare și eliberare în sânge ca și granulocitele neutrofile. Nucleul lor este de obicei bilobat, dar sunt adesea observați și trei sau mai mulți lobi. La indivizii sănătoși se găsesc în număr mic în sânge, dar devin predominante în sânge și țesuturi în asociere cu diferite boli alergice, parazitare sau boli maligne. Prezența eozinofilelor în căile respiratorii și mucoasa intestinală, numărul cât și starea lor de activare, a fost asociată atât cu manifestările IgE-dependente cât și IgE-independente ale bolilor alergice. Totuși, rolul imunologic și importanța eozinofilului în patogeniza astmului nu sunt pe deplin clarificate. Eozinofilele conțin cel puțin cinci tipuri diferite de granulații intracitoplasmatic. Granulațiile cristaloid conțin cea mai mare parte a proteinelor cationice cu încărcătură mare, incluzând proteina bazică majoră, peroxidaza, proteina cationică eozinofilică și neurotoxina derivată din eozinofil, implicate în alterările tisulare observate în astm și alte boli alergice. Eozinofilia indusă de alergeni sau paraziți este dependentă de celula T și este mediată de citokine eliberate de limfocitele sensibilizate. Eozinofilul produce și stochează până la 29 de mediatori cunoscuți, citokine, chemokine și factori de creștere, importante în reacțiile inflamatorii în care este implicată această celulă (produși ai acidului arahidonic, interleukine 10-6, 8, 9-13, 16, IFN γ , TNF, TGF α , TGF β 1, NGF, PDGF-B, SCF, GM-CSF, eotaxina, MIP-1 α , RANTES).

Valori de referință: 0-700/L sau 0-0.7x10⁹/L (0-7% din leucocite); valori mai mici la copiii până la 1an.

Semnificație clinică

Eozinofilia reprezintă valori $>700/microL$. Apare în:

Boli alergice:

- Astmul bronșic: există o corelație între hiperreactivitatea bronșică și gradul eozinofiliei. Biopsia bronșică identifică prezența eozinofilelor în căile respiratorii. În astmul intrinsec sau nonatopic în care lipsește dependența de un răspuns imun independent de IgE, există o creștere similară a eozinofilelor în căile aeriene.
- Dermatita atopică, urticaria, edemul angioneurotic, sensibilizarea la aspirină, alergii medicamentoase (trimetoprim-sulfametoxazol, penicilină, tetraciclină, nitrofurantoin), febra fânului.
- Esofagita eozinofilică (posibil asociată cu alergie la alimente), gastroenterita eozinofilică, proctocolita eozinofilică (asociată cu alergia la laptele de vacă, deși poate apărea și la copii hrăniți cu formule de soia sau alimentați la sân).

Asocierea dintre infiltratele pulmonare și eozinofilie apare în:

- Sindromul Löffler (infiltrat eozinofilic pulmonar tranzitoriu) care se poate asocia cu infestarea cu specii de Ascaris.
- Angeita alergică și granulomatoasă (sindromul Churg-Strauss astmatiform, eozinofilie și vasculită sistemică).
- Boala Hodgkin și limfoamele maligne,
- Bolile mieloproliferative cronice,
- Carcinomul bronșic (prin producție excesivă de IL5).
- Boli gastrointestinale: boala Crohn, colită ulcerativă.

Cele mai mari valori ale numărului de eozinofile $>1500/pL$) apar în sindromul hipereozinofilie idiopatic, leucemia cu eozinofile, trichineloză și dermatita herpetiformă

Eozinopenia se datorează în general unei producții crescute de steroizi, care acompaniază majoritatea condițiilor de stres și se asociază cu:

- Sindromul Cushing.
- Medicamente: ACTH, corticosteroizi, epinefrină, tiroxină, prostaglandine.
- Infecțiile acute.

Bazofilele (granulocitele bazofile) și mastocitele sunt două populații de leucocite bazofile care prezintă multe asemănări, dar și unele diferențe. Ambele tipuri de celule conțin granulații intracitoplasmatică care se colorează metacromatic cu coloranți bazici. De asemenea, ambele exprimă pe suprafața lor o isoformă tetramerică ($\alpha\beta\gamma 2$) a receptorului cu afinitate mare pentru IgE. Când acest receptor cu afinitate mare este legat de alergenul sensibilizant sau de anticorpii anti-IgE atât bazofilele, cât și mastocitele sunt activate, fiind indusă sinteza și secreția de mediatorii. Prin aceste mecanisme bazofilele și mastocitele sunt factori importanți în inflamațiile alergice și alte fenomene imune și inflamatorii.

Valori de referință - bazofile = 6-200/ul sau $0-0.2 \times 10^9/L$ (0-2% din leucocite).

Semnificația clinică

Bazofilia reprezintă valori ale bazofilelor $>200/\text{microL}$. Se observă în:

- Boli alergice: rinită alergică polipoza nazală, sinuzită cronică, astm, dermatită atopică, alergii medicamentoase.
- Leucemia mieloidă cronică și alte sindroame mieloproliferative cronice (policitemia vera, metaplazia mieloidă cu mielofibroză). Nivelul bazofiliei are valoare prognostică, iar criza bazofilică anunță faza blastică terminală din leucemia mieloidă cronică.
- Mastocitoză sistemică.
- Boala Hodgkin.
- Anemia hemolitică cronică, postsplenectomie.

Bazopenia reprezintă valori ale bazofilelor $<20/PL$. Se observă în:

- Infecții în faza acută.
- Reacții de stres (sarcină, infarct miocardic).
- După tratament prelungit cu steroizi, chimioterapie, iradiere.

Prezența de precursori mastocitari în sânge apare în:

- Urticarie, astm.
- Șoc anafilactic.
- Mastocitoză sistemică, urticaria pigmentosa, leucemia cu mastocite.
- Macroglobulinemie, limfoame cu invazie medulară.

Medulograma (examenul citologic al măduvei osoase)

Diagnosticul și monitorizarea multor boli hematologice depinde de examinarea măduvei osoase în special în condițiile în care procesul patologic are originea în măduvă. De multe ori studiul citologic al măduvei trebuie corelat cu examenul histologic al biopsiei osteo-medulare care aduce informații suplimentare cantitative și arhitecturale. De asemenea, în unele cazuri, examenul măduvei osoase este completat cu efectuarea de colorații specifice necesare pentru evaluarea depozitelor de fier (colorația Perl's sau cu albastru de Prusia), diagnosticul diferențial al leucemiilor acute (colorații citochimice pentru mieloperoxidază, esterase nespecifice, PAS), diagnosticul lipidozelor (colorația PAS în boala Gaucher) sau cu studii citogenetice sau moleculare.

Indicațiile medulogramei:

- Diagnosticul anemiei megaloblastice;
- Diagnosticul mielomului multiplu;
- Diagnosticul lipidozelor: boala Gaucher, boala Niemann-Pick;
- Investigarea unei citopenii fără o cauză aparentă, pentru confirmarea/infirmarea unei leucemii, sindrom mielodisplazic, hipo-/aplazie medulară, agranulocitoză;
- Diagnosticul, clasificarea și monitorizarea leucemiilor acute;
- Diagnosticul și monitorizarea sindroamelor mielodisplazice;
- În leucemia mieloidă cronică, pentru examen citogenetic și pentru diagnosticul de fază accelerată sau puseu blastic;
- Rar în investigarea unei anemii microcitare hipocrome, pentru diferențierea anemiei feriprivate de anemia din bolile cronice, prin cercetarea depozitelor de fier (hemosiderinei medulare);
- Diagnosticul bolii Waldenström;
- În anemiile hemolitice pentru diagnosticul crizelor aplastice.

Testul Coombs direct (testul antiglobulinic direct)

Demonstrarea prezenței de imunoglobuline sau a complementului pe suprafața hematiilor susține diagnosticul de distrucție eritrocitară mediată imun. Există două clase majore de anticorpi care reacționează cu eritrocitele. Anticorpii compleți sau salini aglutinează eritrocitele suspendate în soluție salină. Aceștia sunt de obicei de tip IgM (cel mai bun exemplu de aglutinare salină la temperatura camerei este cea utilizată în grupajul ABO). In vivo anticorpii IgM fixează complementul și produc hemoliză imediată intravasculară. A doua categorie de anticorpi reacționează vizibil în mediul salin și produc reacții de aglutinare numai prin utilizarea de tehnici speciale. Ei sunt numiți aglutinine incomplete și sunt de obicei de tip IgG (cel mai bun exemplu sunt anticorpi anti-Rh, care, dacă sunt prezenți în serul primitorului de sânge incompatibil și produc o reacție hemolitică transfuzională întârziată, extravasculară).

Indicațiile metodei:

- Investigarea reacțiilor transfuzionale acute sau întârziate (demonstrarea fixării pe suprafața eritrocitelor de la donator a aloanticorpilor prezenți în serul pacientului);
- Suspiciunea de hemoliză autoimună;
- Boala hemolitică a nou-născutului;
- Hemoliza imună indusă de medicamente.

Metoda de determinare este imunochimică cu detecție prin electrochemiluminiscență (ECLIA)

Studiul metabolismului fierului

Sideremia Cantitatea totală de fier din organism diferă în funcție de vârstă și sex. Nou-născuții la termen au aproximativ 75 mg Fe/kgc provenit în principal de la mamă în timpul trimestrului al treilea de sarcină. Depozitele de fier scad în timpul perioadei de creștere. După adolescență nevoia de fier scade, bărbații prezentând o creștere graduală a depozitelor de fier pe parcursul vieții (au un minim de 50mg Fe/kgc). În schimb, femeile prezintă o pierdere continuă de fier până la menopauză (au aproximativ 35mg Fe/kgc). După menopauză femeile acumulează fier, într-un mod liniar, ajungând la un nivel asemănător bărbaților. Cea mai mare parte a fierului din organism se găsește în compușii hem, în special hemoglobină și mioglobină. O cantitate foarte mică este conținută în enzimele care utilizează fierul în schimbul de electroni: peroxidaze, catalaze și ribonucleotid reductaze. Cea mai mare parte a fierului non-hemic este depozitat sub formă de feritină sau hemosiderină în macrofage și hepatocite. Numai o fracțiune foarte mică (0.1%) circulă în plasmă sub formă de Fe^{3+} legată de o proteină de transport numită transferină. Fierul este absorbit din intestinul subțire proximal sub formă de fier hemic și fier feros (Fe^{2+}), absorbția sa fiind influențată de aciditatea gastrică (scade în aclorhidie sau gastrectomie), factori potențiatori și inhibitori alimentari. Excreția de fier are loc prin pierderile celulare la nivel gastrointestinal, cutanat, urinar și pierderile menstruale la femeie. Cea mai mare parte a fierului funcțional din organism provine din reutilizarea fierului deja existent provenit din eritrocitele senescente distruse la nivelul sistemului reticuloendotelial, în principal din splină.

Indicații pentru determinarea sideremiei (în combinație cu transferină/saturația transferinei și feritina):

- Diagnosticul diferențial al anemiilor în special microcitare și/sau hipocrome;
- Evaluarea anemiei feriprive, talasemiei, anemiei sideroblastice;
- Diagnosticul supraîncărcării cu fier și hemocromatozei;
- Diagnosticul intoxicației cu fier.

Tabelul nr. Valorile de referință ale sideremiei în funcție de vârstă

VÂRSTĂ	VALORI (MG/DL)	
	BĂRBAȚI	FEMEI
<1 luna	32-112	29-127
1-12 luni	27-109	25-126
1-3 ani	29-91	25-101
4-6 ani	25-115	28-93
7-9 ani	27-96	30-104
10-12 ani	28-112	32-104
13-15 ani	26-110	30-109
16-18 ani	27-138	33-102
>18 ani	59-158	37-145

Factori de conversie: $\mu\text{mol/L} \times 5.59 = \mu\text{g/dL}$; $\mu\text{g/dL} \times 0.179 = \mu\text{mol/L}$.

Interpretarea rezultatelor

Creșteri ale sideremiei apar în:

- Talasemie,
- Anemii sideroblastice,

- Anemii hemolitice,
- Hemocromatoză idiopatică (sideremia crescută poate indica supraîncărcarea cu fier mai devreme decât creșterea feritinei) și secundară (transfuzii multiple, tratament inadecvat cu fier, sunt porto-cav, dializă cronică etc.),

Scăderi ale sideremiei apar în:

- Anemia feriprivă,
- Anemia din bolile cronice (boli inflamatorii, infecții cronice, boli renale etc.),
- Sindromul nefrotic (pierderea urinară a proteinei de legare a fierului),
- Remisiune după anemia pernicioasă.

Valori critice 280-2550 $\mu\text{g/dL}$ sau 50-456 $\mu\text{mol/L}$ la copii cu intoxicație acută cu fier.

Valori letale >1800 $\mu\text{g/dL}$ sau >322 $\mu\text{mol/L}$.

Simptomele intoxicației cu fier includ: vărsături, diaree, melenă, șoc, dispnee, letargie, comă.

Feritina Fierul intracelular este depozitat în doi compuși, feritina și hemosiderina. Apoferritina (feritina fără fier) are o GM de 440 kD, forma unei sfere goale, cu diametrul de 13 nm, cu o cavitate centrală cu diametrul de 6 nm, unde este depozitat fierul, care comunică cu exteriorul prin 6 canale (prin care intră și iese fierul) și un înveliș proteic format din 24 molecule, reprezentate de două subunități distincte: H (heavy) și L (light), cu GM de 21, respectiv 19 KD și codificate pe cromozomii 11 (H), respectiv 19 (L). O singură moleculă de apoferritină poate păstra 4500 atomi de fier, greutatea moleculară depășind în acest caz 800 kD, însă, de obicei se găsesc molecule de feritină cu cel mult 2000 atomi de fier. Fierul intră în moleculă sub formă de Fe^{2+} și este oxidat sub acțiunea catalitică a apoferritinei (lanțurile H au un centru feroxidazic) și este păstrat ca polimer trivalent de hidroxid fosfat feric, învelișul proteic protejând celula de efectele toxice ale ionilor de fier. Sinteza apoferritinei este stimulată de expunerea la fier. Există cel puțin 20 proteine de isoferitină distincte, cu proporții variabile de lanțuri H și L, care diferă prin încărcătura de suprafață. Isoferitina acidă conține o proporție crescută de lanțuri H și predomină în țesutul cardiac, renal, placentă, limfocite, monocite, precursorii eritroizi, dar și în țesuturile tumorale. Isoferitina bazică este bogată în lanțuri L, este mai stabilă și se găsește în ficat, splină, precum și în ser. Feritina se găsește în plasmă în cantități mici și concentrația sa se corelează cu depozitele de fier. Feritina serică este glicozilată (sugerând secreția de către celulele sistemului fagocitic) și relativ săracă în fier. În deficitul de fier, feritina scade înaintea apariției anemiei sau altor modificări hematologice.

Indicații pentru determinarea feritinei:

- Diagnosticul diferențial al anemiilor.
- Evaluarea anemiei feriprive și monitorizarea tratamentului de substituție cu fier (punctul final este reprezentat de umplerea depozitelor de fier) și a complianței la tratament.
- Monitorizarea categoriilor de pacienți cu risc de deficit de fier (detectarea deficitului de fier latent): femei însărcinate, donatori de sânge, copii mici, pacienți hemodializați etc.
- Monitorizarea statusului fierului la pacienții cu boli renale cronice, dializați sau nedializați.
- Diagnosticul și monitorizarea tratamentului de depleție în sindroamele de supraîncărcare cu fier.

Pregătirea pacientului recoltarea se face à jeun (pe nemâncate) sau postprandial (după masă) cu evitarea medicației radioactive cu 3-4 zile înaintea testării și abținerea de la alcool.

Tabelul nr. Valorile de referință ale feritinei în funcție de vârstă și sex

Vârstă (ani)	Valori (ng/mL)
--------------	----------------

<1 an		12-327
1-3 ani		6-67
4-6 ani		4-67
7-12 ani	FETE	7-84
	BĂIEȚI	14-124
13-17 ani	FETE	13-68
	BĂIEȚI	14-152
Adulți <60 ani	FETE	13-150
	BĂIEȚI	30-400

Limita de detectie - 0.50 ug/L (ng/mL).

Interpretarea rezultatelor

Creșteri ale feritinei >400 pg/L apar în:

- Supraîncărcarea cu fier.
- În hemocromatoza ereditară sideremia și saturația transferinei cresc înaintea feritinei (chiar în prezența de conținut crescut de fier la nivel hepatic). Creșterea feritinei constituie indicație de biopsie hepatică.
- În sindroamele de supraîncărcare cu fier secundare (transfuzii, eritropoieză inefficientă, hemodializați etc.) feritina este întotdeauna crescută.
- Porfirie cutanea tardă.

Feritina nu are valoare în evaluarea depozitelor de fier în prezența unei afectări hepatice parenchimatoase.

Scăderi ale feritinei Deși nu manifestă întotdeauna o relație lineară cu depozitele de fier, feritina este cel mai bun parametru seric de măsurare a depozitelor de fier. În anemia feriprivă necomplicată, feritina este 12microg/L. În anemia feriprivă secundară hemoragiei acute feritina serică scade după 1-2 săptămâni.

Capacitatea totală de legare a fierului (CTLF)

Conținutul total de fier al organismului este de aproximativ 3-3.5 g. Din acesta aproximativ 2.5 g este conținut în eritrocite și în precursorii acestora din măduva osoasă. Gruparea prostetică a hemoglobinei este alcătuită din complexul fier-protoporfirină (hem) în care atomul de fier localizat central acționează ca un stabilizator al oxihemoglobinei. Numeroase enzime și coenzime necesită fier: peroxidaze, catalaze, citocromi, multe din enzimele ciclului Krebs, monoaminoxidaza. Fierul ingerat este absorbit în principal la nivelul tractului intestinal și este stocat temporar la nivelul enterocitelor sub forma de Fe^{3+} -feritină, un complex de hidroxid feric-fosfat feric atașat de proteina apoferitină. În funcție de necesitățile organismului fierul este eliberat în circulația sangvină unde este transportat sub forma de Fe^{3+} legat de proteina

plasmatică transferină, care la pH-ul fiziologic prezintă o afinitate crescută pentru fier. Fiecare moleculă de transferină prezintă două situsuri de legare a fierului. În mod normal, numai o treime din situsurile de legare ale transferinei sunt ocupate.

Recomandări pentru determinarea CTLF (în combinație cu sideremia și feritina):

- Diagnosticul diferențial al anemiilor, în special microcitare și/sau hipocrome.
- Evaluarea anemiei feriprive, talasemiei, anemiei sideroblastice.
- Diagnosticul supraîncărcării cu fier și hemocromatozei.

Valori de referință

CTLF (TIBC): 228-428 $\mu\text{g/dL}$.

Limita de detecție (pentru UIBC) – 16.8 $\mu\text{g/dL}$ (0.17 mg/L; 3 $\mu\text{mol/L}$).

Semnificația clinică se referă la creșterile sau scăderile valorilor de referință.

Creșterile CTLF apar în:

- Deficitul de fier,
- Sarcină,
- Contraceptive orale,
- Sângerări acute sau cronice,
- Hepatită acută.

Scăderile CTLF apar în:

- Bolile inflamatorii cronice,
- Procesele maligne,
- Hemocromatoză,
- Ciroza hepatică,
- Afecțiuni renale,
- Talasemie.

Transferina reprezintă proteina de legare plasmatică a fierului. Este o glicoproteină de 79.57 kD, gena sa fiind localizată pe cromozomul 3q21. Este generată, în principal, de celulele parenchimatose hepatice, dar cantități mai mici sunt sintetizate și în sistemul nervos central, ovar, testicul, celule T helper. Rata de sinteză este invers proporțională cu depozitele de fier. Transferina are două situsuri de legare a fierului, fiecare dintre acestea legând un ion feric (Fe^{3+}), iar în sânge există atât transferină monoferică, cât și diferică. 1g de transferină poate lega 25.1 μmol sau 1.4 mg de fier. În mod normal, numai o treime din situsurile de legare ale transferinei sunt ocupate. Spre deosebire de sideremie, care prezintă variații diurne mari, nivelul transferinei serice este mult mai constant. Transferina furnizează fier către precursorii eritroizi și alte celule prin legarea de receptori specifici de pe suprafața celulară. Cantitatea de fier furnizată este reglată printr-un mecanism de feedback negativ în funcție de nevoile celulare pentru sinteza de hemoglobină.

Indicațiile pentru determinarea transferinei (în combinație cu sideremia și feritina) sunt:

- Diagnosticul diferențial al anemiilor, în special microcitare și/sau hipocrome.
- Evaluarea anemiei feriprive, talasemiei, anemiei sideroblastice.
- Diagnosticul supraîncărcării cu fier și hemocromatozei.

Saturația transferinei poate fi calculată conform formulei:

$$\text{TfS (\%)} = \frac{\text{Sideremia (\mu mol/L)}}{\text{Transferina (mg/dL)}} \times 398 \quad \text{sau} \quad \text{TfS (\%)} = \frac{\text{Sideremia (\mu g/dL)}}{\text{Transferina (mg/dL)}} \times 70.9$$

Valori de referință

Transferina 2.0-3.6 g/L sau 200-360 mg/dL sau 25.2-45.4 $\mu\text{mol/L}$

Saturația transferinei 16-45%

Factori de conversie: $\text{mg/dL} \times 0.126 = \mu\text{mol/L}$; $\mu\text{mol/L} \times 7.96 = \text{mg/dL}$.

Limita de detecție – 0.1 g/L (10mg/dL; 1.26 $\mu\text{mol/L}$)⁶.

Interpretarea rezultatelor

Creșteri ale transferinei apar în:

- Anemia feriprivă,
- Sarcină,
- Anticoncepționalele orale (TfS este normală).

Scăderi ale transferinei apar în:

- Anemia din bolile cronice (uneori transferina poate fi normală),
- Anemiile sideroblastice (uneori transferina poate fi normală),
- Anemiile hemolitice (uneori transferina poate fi normală),
- Deficit proteic: malnutriție sau pierderi crescute (arsuri, sindrom nefrotic, boli hepatice),
- Boli hepatice acute,
- Sindroame de supraîncărcare cu fier, hemocromatoză (ușor scăzută).

Creșteri ale saturației transferinei apar în:

- Anemiile sideroblastice,
- Anemiile hemolitice,
- Talasemie,
- Sindroame de supraîncărcare cu fier hemocromatoză (foarte crescută, înainte ca feritina să fie foarte crescută).

Scăderi ale saturației transferinei apar în:

- Anemii feriprive (<10% în deficitul instalat),
- Anemia din infecții și boli cronice (uneori, poate fi normală).

Vitamina B12 (Cobalamina) este formată dintr-un tetrapirrol plan cu un atom de cobalt central, o grupare nucleotidică (5,6-dimetilbenzimidazol) sub nivelul planului și o parte prostetică deasupra planului. Consecința deficitului este apariția anemiei megaloblastice care se poate asocia cu leziuni ireversibile ale SNC (prin deficit de metilare a proteinelor SNC). Sursa alimentară de vitamina B12 este reprezentată de produsele animale (carne, lactate, ouă). Cobalamina este eliberată de proteinele de legare din alimente de către pepsină la pH-ul acid din Stomac și apoi se leagă de transcobalamina (TC) I salivară. În duoden cobalamina este eliberată sub acțiunea proteazelor pancreatice și se leagă de factorul intrinsec (FI) (inclusiv cobalamina excretată biliar produsă de celulele parietale gastrice). Complexul cobalamină-FI este endocitat la nivelul celulelor ileale prin intermediul cubilinei și megalinei, apoi este splitat și cobalamina se leagă de TC II (sintetizată în ficat), acest complex părăsind bazolateral celulele ileale și intrând în circulație la câteva ore după ingestie. O parte din cobalamină este internalizată la nivelul ficatului prin intermediul receptorilor pentru TC II, iar clearance-ul continuă în circulația sistemică, mai ales la nivelul rinichiului, cu un timp de înjumătățire de 90 minute. Aproximativ 70% din cobalamina plasmatică este legată de leucocite, acest complex nefiind preluat de țesuturi (timp de înjumătățire 9-10 zile).

Conținutul total de cobalamină al organismului este de 2.5 mg la adult, în timp ce pierderile zilnice (biliare și urinare) sunt de numai 1 pg. Deficitul alimentar de vitamina B12 este extrem de

rar, exceptând vegetarianismul strict, copiii născuți din mame cu deficiență sau în cazul dietei restrictive din fenilcetonurie. Absorbția intestinală insuficientă reprezintă principala cauză de deficit de vitamina B12.

Indicațiile pentru determinarea vitaminei B12 serice sunt:

- Anemia megaloblastică,
- Gastrita atrofică cronică,
- Gastrectomia,
- Boli ale ileonului terminal (boala Crohn, limfom, rezecție etc.),
- Alcoolismul cronic,
- Dieta vegetariană prelungită (ani),
- Ingestia prelungită (ani) de inhibitori ai pompei de protoni/blocanți de receptori H₂,
- Pacienți cu SIDA.

Metodă - imunochimică cu detecție prin electrochemiluminiscentă (ECLIA).

Valori de referință - 191-663 pmol/L (pentru populația europeană).

Limita de detecție - 22 pmol/L (30 pg/mL)

Interpretarea rezultatelor

Creșteri ale vitaminei B12 apar în:

- Insuficiența renală,
- Tratamentul cu Vitamina B12,
- Leucemia mieloidă cronică, leucemia acută promielocitară, leucemia limfatică cronică, unele cazuri de leucemie monocitară,
- Policitemia vera,
- Cancerul metastatic adesea cu reacție leucemoidă sau afectare hepatică,
- Hepatomul (creștere marcată a TC I),
- Hepatita acută sau cronică, ciroza hepatică,
- Insuficiență cardiacă congestivă severă, diabet, obezitate, BPOC,
- Autoanticorpii anti-TC II (rar).

Scăderi ale vitaminei B12 apar în deficitul de cobalamină subclinic (biochimic) sau în deficitul de cobalamină clinic (simptomatic) cu manifestările clinice ale anemiei megaloblastice cu manifestări neurologice. Cauze:

- Deficitul nutrițional (rar).
- Anemia pernicioasă (boală autoimună caracterizată prin atrofia corpului și fundului gastric).
- Pierderea factorului intrinsec și prezența de autoanticorpi anti-celule parietale gastrice și anti-factor intrinsec.
- Deficiența ereditară de factor intrinsec (anemia pernicioasă ereditară), malabsorbția vitaminei B12 din alimente (chirurgie gastrică, pacienți vârstnici cu gastrită atrofică cronică și aclorhidrie, infecția cu *Helicobacter pylori*).
- Insuficiență pancreatică, · sindromul Zollinger-Ellison, competiția biologică pentru vitamina B12, proliferarea bacteriană a intestinului subțire (anomalii structurale: diverticuli, stricturi, fistule, ansă oarbă, sau ale motilității: disfuncția autonomă din diabet), infestarea cu *Diphyllobothrium latum*.
- Boli ileale: sprue tropical, boli inflamatorii intestinale, boala celiacă, rezecții ileale, by-pass jeuno-ileal pentru obezitate, radioterapie cu afectarea ileonului, boli ileale infiltrative (limfom, sclerodermie).

- Malabsorbția familială selectivă a vitamine B12 (Sindromul Imerslund-Gräsbeck).
- Malabsorbția vitaminei B12 indusă de toxice și medicamente: alcool, colchicină, metformin, neomicina, colestiramina, acid paraaminosalicilic.
- Deficiența ușoară de tanscobalamină I.

Electroforeza hemoglobinei Hemoglobina reprezintă elementul esențial pentru principala funcție fiziologică a eritrocitului și anume funcția respiratorie. Hemoglobina este o cromoproteină porfirinică care conține fier, în structura sa intrând o parte proteică și anume globina și o parte prostetică reprezentată de hem. Globina diferă ca structură de la o hemoglobină la alta, ea imprimând specificitate diverselor hemoglobine cunoscute.

În cursul dezvoltării organismului de la embrion la adult se succedă mai multe tipuri de Hb. Hemoglobinele embrionare Gower 1, Gower 2 și Portland sunt înlocuite începând cu cea de-a 3-a lună de gestație de către Hb fetală (HbF), care reprezintă 70-80% din totalul Hb la nou-născut, după care sinteza sa scade rapid, ajungând la sfârșitul primului an de viață la valori sub 2% din totalul Hb. Hb A și Hb A2 sunt caracteristice perioadei adulte de dezvoltare. Sinteza lor începe încă din perioada fetală, iar după naștere ele înlocuiesc rapid Hb F. La adultul normal Hb A reprezintă 97-98%, Hb A2 2-3%, iar Hb F sub 1%. Lanțurile polipeptidice α , β , γ și δ ale globinei alcătuiesc hemoglobinele fiziologice (fiecare moleculă de hemoglobină conține două perechi de lanțuri polipeptidice), lanțul α fiind comun celor trei hemoglobine.

HbA = $\alpha_2 \beta_2$

HbA2 = $\alpha_2 \delta_2$

HbF = $\alpha_2 \gamma_2$.

Ca și în cazul celorlalte proteine structura spațială a hemoglobinei precum și alte proprietăți moleculare depind de tipul și secvența de aminoacizi care intră în alcătuirea hemoglobinei. Substituția unor aminoacizi din lanțurile polipeptidice ca urmare a mutațiilor genetice generează variante anormale de hemoglobină ce prezintă o încărcare electrică diferită și în consecință mobilități electroforetice diferite. Pe de altă parte, scăderea ratei de sinteză a unui tip de lanț al globinei dă naștere la anomalii cantitative denumite sindroame talasemice.

Metodele electroforetice sunt utilizate de rutină în screening-ul anomaliilor hemoglobinei. Dintre acestea cea mai cunoscută este electroforeza Hb în mediu alcalin (pH 8.2-8.6) folosind ca suport de migrare gelul de agaroză. La pH alcalin hemoglobina prezintă o sarcină electrică negativă și va migra către anod. Prin această metodă pot fi separate și identificate hemoglobinele fiziologice Hb A, Hb A2, Hb F și migrează de asemenea o serie de variante de hemoglobină, cum ar fi Hb S, Hb D, Hb G, Hb Lepore, Hb C, Hb O-Arab, care generează majoritatea hemoglobinopatiilor cunoscute.

Indicațiile pentru efectuarea electroforezei hemoglobinei sunt date de diagnosticul hemoglobinopatiilor și sindroamelor talasemice și anume:

- Anemia hemolitică cronică,
- Criza ocluzivă vasculară de cauză necunoscută la un pacient provenit din zone cu niveluri crescute ale Hb S și/sau Hb C,
- Sindrom de hidrops fetal de cauză necunoscută,
- Aspect sugestiv al hemogramei, cu microcitoză și hipocromie mai severe decât ar fi de așteptat pentru gradul anemiei și număr de eritrocite la limita superioară a normalului sau chiar crescut, asociate cu un număr mare de hematii în țintă și punctații bazofile pe frotiul de sânge. În această situație, pentru diferențierea de deficitul de fier, sunt utile indicii Mentzer și indicii RDW.

Indicele Mentzer = $VEM / nr. \text{ de eritrocite } (x10^6)$

>14 sugestiv pentru deficit de fier;

12-14 echivoc

<12 sugestiv pentru tara talasemică.

Indicele RDW = Indicele Mentzer x RDW (lărgirea distribuției eritrocitare).

< 220: sugestiv pentru talasemie;

≥ 220: sugestiv pentru anemia feripriva.

Tabelul nr. Valorile de referință ale electroforezei hemoglobinei în funcție de vârstă

VÂRSTĂ	Hb A %	Hb F %	Hb A2 %
<1 luna	8.1 – 62.7	49.9 – 98.4	0.0 – 1.8
1 – 3 luni	37.3 – 88.8	10.3 – 64.6	0.3 – 2.4
3 – 6 luni	67.0 – 96.7	5.2 – 34.5	1.7 – 2.7
6 – 9 luni	82.4 – 98.8	1.1 – 28.5	2.0 – 3.0
9 – 15 luni	91.9 – 98.7	0.2 – 9.9	2.2 – 3.2
15 luni – 2 ani	94.9 – 97.8	0.0 – 5.5	2.4 – 3.1
2 – 6 ani	95.9 – 97.9	0.0 – 1.6	2.2 – 3.2
6 – 17 ani	96.4 – 98.2	0.0 – 0.0	1.9 – 3.3
≥18 ani	96.7 – 97.8	≤0.5	2.2 – 3.2

Interpretarea rezultatelor

- În β-talasemia minimă și minoră valorile Hb A2 este crescută (3.2%- 7%), iar Hb F este ușor crescută (0.5-6%) în peste 50% din cazuri, restul fiind reprezentat de Hb A.
- În β-talasemia intermedia, procentul de Hb A2 este variabil, iar Hb F = 20-80%.
- În β-talasemia majoră, valorile de Hb F sunt foarte crescute, situate obișnuit între 20-90% din totalul Hb, restul fiind format de Hb A (valori foarte scăzute) și HbA2 (valori normale sau crescute). Clinic apare tabloul clasic al anemiei Cooley.
- În forma heterozigotă de siclemie (sickle cell trait), electroforeza capilară evidențiază o Hb anormală în Z5, Hb S, în proporție de 25-45%. Hb A2 este în cantitate normală, iar restul fiind reprezentat de Hb A. Cei mai mulți pacienți cu tara de siclemie sunt asimptomatici, cu un frotiu de sânge normal sau ușor modificat (microcitoză sau hematii în țintă). Coexistența tarei Hb S cu anumite tipuri de talasemii sau alte hemoglobinopatii modifică tabloul clinic și hematologic precum și electroforeza Hb.
- În forma homozigotă de siclemie (sickle cell anemia), electroforeza Hb indică prezența Hb S în proporție de 90-95%, restul fiind reprezentat de Hb A2 și Hb F. Tabloul hematologic este normal la naștere și începe să se modifice după vârsta de 6 luni, pe măsură ce Hb F este înlocuită de Hb S.

Glucozo 6 fosfat dehidrogenaza (G6PD) Deficitul eritocitar de G-6-PD este o afecțiune ereditară X-linkată caracterizată prin diminuarea în grad variabil a activității acestei

enzime care catalizează transformarea glucozo-6-fosfatului în 6-fosfo-gluconat (6-PG), prima etapă a ciclului pentozelor. Este cea mai frecventă enzimopatie umană afectând aproximativ 400 milioane de persoane din întreaga lume. Circuitul metabolic în care este implicată G-6-PD asigură un potențial reducător sub forma NADP care protejează structurile funcționale ale eritrocitului de procesele de oxidare. Deficitul de G-6-PD este inclus într-un grup heterogen de anemii hemolitice ereditare nonsferocitare, alături de deficitul de piruvatkinază, Hb Zürich și deficitul de glutatation. Gena care codifica sinteza de G-6-PD se găsește pe cromozomul X, dar există și o pseudogenă (apărută prin duplicație genetică) situată pe cromozomul 17.

Femeile heterozigote nu prezintă manifestări clinice de anemie hemolitică deoarece cromozomul X normal menține o activitate suficientă a G-6-PD. La aceste persoane deficitul heterozigot oferă o oarecare protecție împotriva parazitului *Plasmodium falciparum*. Femeile homozigote pentru G-6-PD vor avea manifestări clinice de anemie hemolitică după ingestia de substanțe oxidante. Bărbații care au moștenit de la mamă cromozomul X purtător al genei deficitare (hemizigoți) vor prezenta un deficit de G-6-PD exprimat complet. În țara noastră deficitul de G-6-PD reprezintă 10% din totalul anemiilor hemolitice, frecvența generală fiind de aproximativ 0.01%.

Fenomenele hemolitice pe care le poate determina deficitul de G-6-PD sunt declanșate de:

- Diverse medicamente: antimalarice (clorochin, mepacrin, primachin), antipiretice și analgezice (aspirină în cantități mari, fenacetin), sulfamide, PAS, acid nalidixic, furazolidon, nitrofurantoin, chinidina, albastru de metilen, vitamina K, acid ascorbic în cantități mari, cloramfenicol, probenecid;
- Alimente: boabe de vicia fava;
- Infecții virale;
- Infecții bacteriene;
- Modificări ale pH-ului sanguin în cursul unor tulburări metabolice (diabetice sau de alta natură).

Incapacitatea șuntului pentozelor de a genera în absența G-6-PD o cantitate suficientă de glutatation redus (GSH) facilitează oxidarea proteinelor, formarea de glutatation oxidat (GSSG) și de methemoglobină (MetHb). Agregatele de hemoglobina denaturată care se fixează pe suprafața internă a membranelor eritrocitare determină rigidizarea și deformarea acestora, ceea ce duce la distrugerea eritrocitelor la nivelul splinei.

Simptomatologia clinică a deficitului eritrocitar de G-6-PD se rezumă la manifestări caracteristice pentru anemia hemolitică de tip intrinsec. Este important de menționat că acestea sunt întâlnite numai la acele persoane cu activitatea enzimatică mai mică de 20% din valoarea normală. După o perioadă de 2-3 zile de la expunerea la factorul declanșator apar febră, durerile abdominale, diareea, iar urina devine roșie până la maronie (hemoglobinurie), ca urmare a hemolizei intravasculare. Anemia hemolitică este moderată până la severă. Reticulocitele și celulele roșii tinere au activitate enzimatică mai mare decât cele mai bătrâne și prin urmare sunt mai rezistente la hemoliză. Episodul hemolitic stimulează eritropoieza și induce hiperplazia maduvei osoase eritroide. Hemograma efectuată în puseele hemolitice indică o anemie normocromă normocitară cu reticulocitoză marcată și posibilă prezență în hematii a corpiilor Heinz, punctațiilor bazofile, corpiilor Howell-Jolly. Corespunzător cu hemoliza apar crescute bilirubina indirectă și activitatea LDH. Rezistența osmotică este normală. Evoluția este de obicei autolimitantă. Mai rar, deficitul de G-6-PD se prezintă ca o anemie hemolitică cronică de intensitate ușoară sau medie ce se exacerbează cu ocazia infecțiilor. Aproximativ 5% din nou-născuții cu deficit enzimatic pot dezvolta icter neonatal după primele 24 ore de la naștere

Diagnosticul este stabilit prin dozarea G-6-PD eritrocitare. Pacienții afectați trebuie să fie avertizați asupra riscului legat de consumul medicamentelor menționate mai sus. Sfatul genetic are importanță deosebită atunci când într-o familie apare un băiat afectat și mama este heterozigotă. Riscul de transmitere a bolii este de 50% la fiecare sarcină cu făt de sex masculin.

Valori de referință – 8.0-13.0 U/gHb.

Limita de detecție – 0.8 U/gHb.

Interpretarea rezultatelor

Clasificarea OMS a variantelor genetice de G-6-PD:

Clasa I: activitatea G-6-PD este mai mică de 10% din cea normală (deficit sever). Această variantă este asociată cu anemia hemolitică cronică nesferocitară.

Clasa II: activitatea G-6-PD este mai mică de 10% din cea normală (deficit sever). Această variantă este asociată cu hemoliza acută intermitentă.

Clasa III: activitatea G-6-PD reprezintă 10 – 60% din cea normală (deficit moderat). Există un risc de hemoliză acută după expunerea la factori declanșatori.

Clasa IV: activitatea G-6-PD este aproape de normal și pacienții sunt asimptomatici.

Clasa V: activitate G-6-PD crescută, fără implicații clinice.

Piruvat-kinaza eritocitară este enzima căii glicolitice ce catalizează conversia fosfoenol piruvatului (PEP) în piruvat, una din cele două reacții ce au ca rezultat producerea de ATP. Deficitul de PK ocupa locul doi ca frecvență după deficitul de G-6-P DH, fiind întâlnit mai ales în Europa, SUA și Japonia. Se transmite ereditar autosomal recesiv și are ca efect reducerea capacității de metabolizare a glucozei, scăderea concentrației de ATP din eritrocite și apariția unei anemii hemolitice cronice, non-sferocitare, de severitate variabilă.

Anemia hemolitică asociată cu deficitul de PK este rezultatul mutațiilor (au fost identificate aproximativ 200) ce apar la nivelul genei PKLR.

Caracteristicile enzimatice și modificările hematologice asociate deficitului de PK se manifestă prin anemie hemolitică de severitate variabilă (forme ușoare, compensate, forme moderate, forme severe), hepatosplenomegalie, macrocitoză, poichilocitoză, relativ puține reticulocite. Formele silențioase din punct de vedere clinic pot fi de asemenea întâlnite, cu excepția nou-născuților care pot prezenta hiperbilirubinemie.

Valori de referință – 5.3 – 17.3 U/g Hb

Factori de conversie : $\text{U/gHb} \times 0.34 = \text{U/ml de eritrocite}$.

Interpretarea rezultatelor și implicații clinice

PK este scăzută în:

- deficitul congenital de PK din anemia hemolitică non-sferocitară, icter neo-natal prelungit,
- deficitul dobândit de PK din sindroame mielodisplazice, leucemii acute și alte anemii.

În cazul deficitului congenital de PK, hemoliza intravasculară poate fi accentuată pe perioada sarcinii sau în urma tratamentului cu contraceptive orale.

Cromozomul Philadelphia (Gena de fuziune BCR-ABL1) Leucemia mieloidă cronică (LMC), prototipul afecțiunilor leucemice, constituie o boală clonală a celulei stem din măduva osoasă ce conduce predominant la hiperproliferarea elementelor granulocitare în toate stadiile de maturare. LMC se caracterizează prin prezența translocăției cromozomiale t(9;22)(q34;q11) care a fost considerată inițial ca o anomalie 22 q- (un cromozom 22 cu bratul lung scurtat) și denumită cromozomul Philadelphia (Ph).

Indicațiile pentru efectuarea testului sunt:

- Diagnosticul LMC și LAL Ph pozitive,

- Monitorizarea răspunsului molecular la tratament și stabilirea prognosticului,
- Detectarea bolii minime reziduale.

Se folosesc doua tipuri de testari și anume detecția calitativă a produșilor de transcripție ARNm BCR-ABL1 (în scop diagnostic) și detecția cantitativă a produșilor de transcripție ARNm BCR-ABL1 (în scop de monitorizare). Va fi determinată expresia produșilor de fuziune (nr. copii BCR-ABL) raportată la expresia unei gene de control intern (ABL) prin Real-Time PCR cantitativ LightCycler cu o conversie finală în procente.

Raportarea și interpretarea rezultatelor

Detecția calitativă

Un rezultat negativ indică absența unui transcript (ARNm) BCR-ABL.

Un rezultat pozitiv indică prezența unui produs transcripție BCR-ABL al cărui tip va fi comunicat.

Detecție cantitativă

Rezultatul va fi exprimat ca procent BCR-ABL din totalul ABL, astfel:

$[\text{Nr. copii BCR-ABL} / \text{Nr. copii ABL}] \times 100$

Nivelul produșilor de transcripție BCR-ABL reflectă numărul celulelor leucemice reziduale.

O reducere progresivă a nivelului produșilor de transcripție în cursul tratamentului cu Imatinib reprezintă criteriul actual pentru răspunsul molecular în leucemia mieloidă cronică.

Testele de imunitate umorală sau celulară (Imunofenotiparea limfocitară – profilul tumoral) La adult, răspunsul imun înăscut are rolul de a recunoaște celulele stresate sau conținutul celular nedigerat atunci când celulele devin nonapoptotice sau nonautofagocitice. Răspunsul imun adaptativ (dobândit) joacă un rol crucial, fiind o sursă bogată

de celule T efectoare CD4 și CD8 cu rol în recunoașterea proteinelor aberante ce apar la nivelul tumorii, în același timp reprezentând sursa unor celule reglatoare și a unor factori cu rol important în limitarea abilității celulelor NK și a celulelor T de a media eradicarea cancerului.

Imunofenotiparea limfocitară sau profilul tumoral În cadrul profilului tumoral sunt determinate atât procentual cât și în valoare absolută următoarele subseturi de limfocite, prin identificarea markerilor de suprafață specifici (moleculele CD):

- limfocitele T totale (CD3+);
- celulele T naive CD45RA+, celulele T de memorie CD45RA-;
- celule CD31+ (rezerva timică);
- limfocitele T helper (CD3+/CD4+);
- celule Treg (CD25++/CD127-);
- celule T CD8+, celule T CD8+/CD28+ (citotoxice), celule T CD8+/CD28- (reglatoare);
- raport CD4+/CD8+;
- celule T imature (CD4+/CD8+);
- celule T activate (CD3+/HLA DR+);
- celule B (CD19+)
- celule NK (CD16+/CD56+) și NK activate.

Testul este indicat pentru monitorizarea statusului imun la pacienți cu diverse afecțiuni maligne, mai ales dacă sunt aplicate tratamente de imunostimulare.

În cursul evoluției neoplaziilor, se instalează constant un status de imunodeficiență (ce trebuie urmărit în dinamică) de intensitate diferită în funcție de tipul tumorii, stadiul procesului malign și mijloacele de apărare ale organismului.

Celulele T naive CD4+CD31+ reprezintă o subpopulație a celulelor T CD4+ naive recent eliberate din timus. Statusul CD28 diferențiază limfocitele CD8 cu proprietăți citotoxice. Numărul celulelor T citotoxice nu dă informații despre funcția lor, acest lucru fiind posibil prin teste funcționale (teste de citotoxicitate). Celulele T CD8+ pot fi împărțite în funcție de expresia pe suprafața lor a receptorului co-stimulator CD28 în CD28+ (aproximativ 50% din celulele CD8+) și CD28-, fiecare din cele două populații limfocitare având proprietăți biologice și secretoare diferite. Populația de celule T CD28+ predomină la indivizii sănătoși și proliferază în timpul infecțiilor virale primare. S-a observat că celulele T reglatorii CD8+ CD28- sunt prezente aproape constant în infiltratul limfocitar tumoral, fiind un potent factor supresor față de răspunsul imun, putând inhiba, prin intermediul IL 10, atât proliferarea celulelor T cât și citotoxicitatea specifică anti-tumorală. Celulele T CD8+ CD28- sunt prezente în procent mai mare în sângele periferic al bolnavilor de cancer decât la voluntarii sănătoși. Superfamilia CD28 este formată din molecule receptoare cu acțiune co-stimulatoare (CD28 și costimulatorul inductibil – ICOS) sau inhibitoare (CTLA-4, PD-1 și BTLA) asupra celulelor T. Se consideră că CD28 este prezent pe aproape toate celulele T CD4+ și doar pe jumătate din celulele CD8+.

Metoda – citometrie în flux.

Valori de referință, comunicarea și interpretarea rezultatelor Orientativ, prezentăm câteva modele patologice de imunofenotipare asociate unor afecțiuni maligne:

- epiteliom al buzei (operabil): scăderea valorilor procentuale pentru celulele T totale (CD3+), T activate (CD3+/HLA DR+) și NK (CD16+/CD56+);
- adenocarcinom de col uterin (stadiul I – II): scăderea proporției de celule T CD8+ (probabil T citolitice) și, inconstant, scăderea celulelor NK (CD16+/CD56+);
- adenocarcinom mamar (stadiul II): limfopenie, scăderea celulelor T totale (CD3+), B totale (CD19+), scăderea raportului CD4+/CD8+, creșterea celulelor T CD8+ (probabil T supresoare);
- adenocarcinom pulmonar (operabil): limfopenie, scăderea celulelor T totale (CD3+), T activate (CD3+/HLA DR+), inconstant scăderea celulelor B (CD19+).

Creșterea celulelor T reglatoare în cursul terapiei imunostimulatoare este nefavorabilă.

Testele de hemostază

Timpul de sângerare (TS) este un test de investigare a hemostazei primare, fiind astfel un indicator al eficienței fazelor vasculară și plachetară. TS depinde de funcția și numărul trombocitelor, prezența proteinelor plasmatiche de adeziune și de integritatea matrixului peretelui vascular.

Tehnica de efectuare – se dezinfectează lobul urechii cu eter (nu cu alcool), se incizează ferm lobul cu lanteta de 1.5 mm lățime și reglată la o adâncime de 3 mm, declanșându-se concomitent cronometrul. Din 30 în 30 de secunde se absorb picaturile de sânge pe o hârtie de filtru până la oprirea sângerării (metoda Duke).

Valori de referință – 1-4 minute (metoda Duke).

Valori critice – TS > 15 minute.

Semnificație clinică

TS este crescut în:

- Trombocitopenii: pentru 80000/μl, TS va fi ~10 minute, pentru 40000/μl TS va fi ~20 de minute, pentru mai puțin de 10000/μl, TS va fi > 30 de minute dacă funcția trombocitară este normală.

- Afectări ale funcției trombocitare ereditare (boala von Willebrand, trombastenii Glanzmann, sindrom Bernard-Soulier, sindrom Wiskott-Aldrich, sindrom Chediak-Higashi) sau dobândite (uremie, mielom multiplu, macroglobulinemia Waldenström, sindroame mieloproliferative acute și cronice, infecții virale, insuficiența hepatică severă, medicamente).
- Tulburări ale hemostazei secundare: la 20% din pacienții cu hemofilie, 30% din pacienții cu deficit de factor V, în unele cazuri de afibrinogenemie.
- Unele boli de țesut conjunctiv: sindrom Ehlers-Danlos.

TS crescut în prezența unui număr normal de trombocite indică prezența bolii von Willebrand sau a unei disfuncții trombocitare. Afectiunile vasculare cum sunt vasculitele alergice sau teleangiectaziile hemoragice ereditare nu se însoțesc de obicei de prelungirea TS, deși uneori pot apărea sângerări spontane. TS scăzut poate fi observat la unii pacienți cu hiperlipoproteinemie, diabet zaharat sau ateroscleroză. La acești pacienți semnificația clinică nu este precizată.

Timul de tromboplastină parțială activat (aPTT) este un test funcțional care evaluează calea intrinsecă (prekalicreina, kininogenul cu greutate moleculară mare – HK, factorii XII, XI, IX, VIII) și comună a coagulării (factorii X, V, II, I). Deficiența sau inhibiția HK, prekalikreinei sau factorilor XII, XI, IX și VIII determină prelungirea aPTT cu PT normal, în timp ce deficiențe ale factorilor căii comune a coagulării (X, V, II, fibrinogen) pot prelungi atât aPTT cât și PT. aPTT nu este influențat de deficiențe ale FVII sau FXIII.

Indicațiile pentru efectuarea testului sunt:

- Detectarea deficiențelor congenitale sau dobândite ale factorilor de coagulare menționați mai sus și suspiciunea de hemofilie sau boala von Willebrand.
- Monitorizarea tratamentului cu heparină nefracționată și inhibitori trombinici (hirudin, argatroban).
- Suspectarea prezenței de inhibitori factor-specifici sau nespecifici ai coagulării (ex. anticoagulantul lupic). Prezența anticoagulanților lupici se asociază cel mai frecvent cu tendința clinică spre tromboză.
- Evaluarea preoperatorie a riscului hemoragic.

Exprimarea rezultatelor – în secunde, domeniul măsurabil: 20-240s.

Valori de referință

–Normal: <40s

– Interval terapeutic: în cursul heparinoterapiei: **1.5-2.5 ori** valoarea nivelului de control.

Heparina administrată intravenos potențează efectul inhibitor al antitrombinei asupra factorilor XII, XI, IX, X și II (efectul se exercită mai ales asupra factorilor X și a trombinei). Efectul anticoagulant apare imediat. Deoarece timpul de înjumătățire al heparinei este de 3 ore, proba de sânge pentru aPTT se recoltează la 3 ore după sau cu o oră înainte de administrarea heparinei.

Valori critice – aPTT >70s (risc de sângerare spontană).

Interpretarea rezultatelor

- Prolungirea aPTT apare în toate deficiturile congenitale ale căii intrinseci (inclusiv hemofilia A și B, boala von Willebrand), tratamentul cu heparină nefracționată, inhibitori trombinici (hirudin, argatroban), streptokinaza, urokinaza, tratament cu anticoagulante orale, deficit de vitamina K, malnutriție, hipofibrinogenemie, afecțiuni hepatice, CID, prezența produșilor de degradare a fibrinei, prezența anticoagulanților circulanți factor-specifici (sunt observați cel mai adesea la 5-10% din pacienții cu hemofilie ca anti-factor VIII sau anti-factor IX; de asemenea Ac anti-FVIII pot apărea la vârstnici sau în sarcină)

sau nespecifici – anticoagulanții lupici (primari sau secundari în: LES și alte boli autoimune, boli maligne, ca reacție la medicamente, după transfuzii multiple, în tuberculoză, glomerulonefrita cronică).

Rezultatele aPTT se coroborează cu valorile PT:

- PT normal cu aPTT prelungit: sugerează deficitul HK, prekalkreinei sau unuia din factorii VIII, IX, XI și/sau XII.
- PT prelungit cu aPTT normal: sugerează un posibil deficit de factor VII. FVII având un timp de înjumătățire scurt comparativ cu factorii dependenți de vitamina K ai căii intrinseci, deficiențele nutriționale sau terapeutice ale factorilor dependenți de vitamina K pot determina uneori PT prelungit cu aPTT normal.
- PT și aPTT prelungite: sugerează deficitul unuia din factorii I, II, V sau X.

Timpul de protrombina QUICK (PT, timpul Quick) include INR. Timpul de protrombină (PT) evaluează activitatea factorilor implicați pe calea extrinsecă și comună a coagulării : FVII-proconvertină, FX-factorul Stuart-Prower, FV-proaccelerină, FII-protrombină și FI-fibrinogenul. Factorii coagulării II, VII, IX și X sunt sintetizați în ficat sub forma inactivă (PIVKA). Ca urmare PT evaluează atât activitatea factorilor de coagulare dependenți de vitamina K (mai puțin FIX), a factorului V și a fibrinogenului, cât și funcția de sinteză proteică a ficatului, cu implicații diagnostice și terapeutice. Un PT prelungit indică deficiența unuia sau mai multor factori de coagulare (I, II, V, VII, X) sau prezența unui inhibitor.

Indicații pentru efectuarea testului

- PT este testul cel mai comun utilizat pentru monitorizarea terapiei anticoagulante orale (warfarină), acesta fiind sensibil la trei din cei patru factori de coagulare dependenți de vitamină K.
- Screeningul deficiențelor congenitale sau dobândite ale factorilor II, V, VII, X și fibrinogenului.
- Disfibrinogenemii.
- Prezența inhibitorilor față de factorii de coagulare.
- Deficitul de vitamina K.
- Monitorizarea funcției de sinteză proteică a ficatului.
- Screeningul preoperator al hemostazei.

Exprimarea rezultatelor

- Ca timp de coagulare – în secunde;
- Ca procent (%) din activitatea normală = activitatea protrombinică (AP); domeniul măsurabil = 10-100%;
- Ca raport protrombinic ($PR = PT \text{ pacient în sec} / PT \text{ plasma normală în sec}$);
- Ca INR (International Normalized Ratio).

Numeroase studii internaționale au arătat că în faza stabilă a terapiei cu anticoagulate orale (ACO) rezultatele pot varia semnificativ în funcție de țesutul de origine a tromboplastinei cât și de instrumentul folosit pentru determinarea acestora. Pentru a rezolva această problemă, Organizația Mondială a Sănătății a introdus din 1982 o procedură internațională standardizată de validare a tromboplastinelor. Rezultatele obținute prin această procedură, în timpul unui tratament anticoagulant stabilizat, nu depind de reactivul folosit. Astfel raportul protrombinic este convertit în INR (International Normalized Ratio) conform formulei:

$$INR = (PT_{\text{pacient}} / PT_{\text{plasma normală}})^{ISI}$$

ISI = indice internațional de sensibilitate (International Sensitivity Index) a tromboplastinei folosite, calculat în raport cu tromboplastina de referință pentru care ISI=1. Valorile ISI ale tromboplastinelor folosite în lume variază între 1 și 3 și sunt stabilite de producători pentru fiecare lot de reactivi. Cu cât valoarea ISI este mai apropiată de 1, cu atât sensibilitatea reactivului la terapia cu ACO este mai mare.

INR este util numai pentru pacienții cu terapie anticoagulantă orală stabilă și nu are nici o valoare pentru diagnosticul sau tratamentul celor cu PT prelungit din alte motive. INR are acuratețe mai mică atunci când este utilizat la debutul tratamentului cu ACO. Totuși acesta este mai de încredere decât raportul PT neconvertit și se recomandă a fi folosit atât la inițierea cât și în timpul tratamentului de întreținere cu ACO.

Valorile de referință :

– Normal, activitatea de protrombină > 70%; valorile > 100% nu prezintă semnificație clinică.

– Intervalul terapeutic:

- **INR=2.0–3.0 (2.5):** pentru majoritatea situațiilor clinice: profilaxia și tratamentul trombozei venoase; tratamentul embolismului pulmonar; profilaxia emboliei sistemice la pacienții cu fibrilație atrială, infarct miocardic (daca se asociază aspirină), boală valvulară mitrală reumatică, prolaps de valvă mitrală, calcificare inelară mitrală, trombus mobil de arc aortic, valve cardiace biologice sau proteze mecanice bivalvulare aortice; chirurgia șoldului și genunchiului; tromboză de sinus venos; sindrom antifosfolipidic.
- **INR=2.5-3.5 (3.0):** valve cardiace mecanice, episoade tromboembolice repetate la pacienți anticoagulați cu INR terapeutic.
- **INR=3.0-4.0 (3.5):** infarct miocardic, pacienți cu tromboză remisă de proteză valvulară mecanică aortică.
- **INR=3.5-4.5 (4.0):** pacienți cu tromboză remisă de proteză valvulară mecanică mitrală.
- **INR=1.5-1.9:** pacienți cu un prim episod neprovocat de tromboză venoasă profundă sau embolism pulmonar, după primele 3 luni de tratament, în cazul în care nu este posibilă testarea INR la interval de 4 săptămâni pentru monitorizarea tratamentului; prevenția primară a infarctului miocardic la pacienți cu risc crescut.

Valori critice: INR > 6 – risc hemoragic (mai ales la pacienții cu boli gastro-intestinale, HTA, boli renale, cerebro-vasculare, tratament antiagregant, alte medicamente potențatoare).

Interpretarea rezultatelor:

- PT prelungit (AP scăzută): tratament cu anticoagulate orale, deficit congenital sau dobândit de factori II, V, VII, X, deficit de vitamina K la nou născuți, diateze hemoragice la nou născuți, afecțiuni hepatice, obstrucție biliară, tulburări de absorbție intestinală a grasimilor (de ex.: sprue, boală celiacă, diaree cronică), malnutriție, CID, sindrom Zollinger-Ellison, hipofibrinogenemie (fibrinogen <60mg/dL), disfibrinogenemie, prezența de anticoagulanți circulanți (inhibitorii specifici față de factorii căii extrinseci sunt foarte rari), unii pacienți cu anticoagulant lupic cu Ac care leagă și cresc clearance-ul FII, amiloidoză (prin niveluri scăzute de FX).

Timpul de trombină (TT) Setul inițial de teste efectuate pentru investigarea unei anomalii hemostatice include PT, aPTT și numărul de trombocite, pentru evaluarea largă a componentelor majore ale sistemului hemostatic. PT și aPTT pot fi prelungite în multe situații și efectuarea unei baterii de teste de coagulare este adesea necesară pentru determinarea cauzei anomaliei

hemostatice, unul dintre aceste teste fiind TT. Astfel TT reflectă în principal funcțiile și interacțiunea dintre trombina exogenă și fibrinogenul endogen.

Recomandări pentru efectuarea testului:

- Investigarea cauzei unui PT sau aPTT prelungit,
- Diagnosticarea CID,
- Disfibrinogenemii, hipo-/afibrinogenemii,
- Monitorizarea tratamentului cu activatori ai plasminogenului (streptokinaza și urokinaza).

Exprimarea rezultatelor – în secunde; domeniul măsurabil: 13 - 240 s.

Valori de referință – ≤ 21 s.

Valori critice: >60 s.

Interpretarea rezultatelor

- Prolungirea TT apare în hipo-/dis-/afibrinogenemii, terapie cu heparină, argatroban, hirudină, CID, mielom multiplu (prin prezența paraproteinei), prezența în plasmă a anticorpilor anti-trombină (ca de ex. în amiloidoză), prezența produșilor de degradare ai fibrinogenului/fibrinei (PDF), uremie, afecțiuni hepatice severe, boli maligne, tratamentul cu activatori ai plasminogenului (streptokinaza, urokinaza, activatorul tisular al plasminogenului).
- TT va fi prelungit când nivelul de fibrinogen funcțional va fi <100 mg/dL.
- Un TT prelungit nemăsurabil este în general rezultatul prezenței heparinei sau, mai rar, al prezenței anticorpilor antitrombină sau al afibrinogenemiei.