

Protocol de lucru pentru concentrația medie de hemoglobină eritrocitară de peste 36 g/dl

Working protocol for mean corpuscular hemoglobin concentration greater than 36 g/dl

Rodica Păcurar^{1*}, Ellen Klontz², Lisa Connors², Marianne Chichak²

1 Secția de Hematologie – laborator, Spitalul Clinic Municipal de Urgență, Timișoara, România

2 Dynacare Kasper Medical Laboratories, Edmonton, Canada

Rezumat

Concentrația medie de hemoglobină eritrocitară (CHEM) exprimă cantitatea medie de hemoglobină dintr-un volum dat de eritrocite. Analizoarele automate calculează CHEM folosind valoarea obținută prin măsurarea directă a hemoglobinei și valoarea obținută prin calcul, a hematocritului. Cu excepția sferocitozei ereditare și a unor cazuri de drepanocitoză sau hemoglobinoză C homozigote, în practică nu se întâlnesc valori ale CHEM de peste 36 g/dl. De aici rezultă rolul foarte important al acestui indice eritocitar, nu atât ca valoare diagnostică, cât ca un semnal de alarmă asupra existenței unor condiții preanalitice ce pot duce la rezultate false ale parametrilor eritrocitari. În articol este prezentat protocolul de lucru utilizat în laboratoarele Dynacare Kasper din Edmonton, Canada, în situația în care CHEM are o valoare de peste 36 g/dl în urma analizei automate.

Cuvinte cheie: aglutinine, hemoliză, lipemie, turbiditate.

Abstract

Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) is the average concentration of hemoglobin in a given red cell volume. The automated analyzers calculate MCHC by using a direct measurement of hemoglobin and a calculated value of packed red cells. With the exception of hereditary spherocytosis and some cases of homozygous sickle cell or hemoglobin C disease, MCHC values do not exceed 36 g/dl. Thereby MCHC gains an important role, not in diagnosis but in signalling preanalytic situations that could lead to false values of the red cells' parameters. This article presents the working protocol used in Dynacare Kasper Laboratories, Edmonton, Canada, when an automated analyzer displays MCHC greater than 36 g/dl.

Keywords: agglutinins, hemolysis, hyperlipidemia, turbidity.

*Adresa pentru corespondență: Rodica Păcurar, Spitalul Clinic Municipal de Urgență Timișoara, Secția de Hematologie, Str. Gh. Dima nr. 5.
Tel.: +40256433081; Fax.: 0256432886; E-mail: pacrodi@yahoo.com

Introducere

Concentrația medie de hemoglobină eritrocitară (CHEM) reprezintă concentrația medie de hemoglobină dintr-un volum dat de eritrocite. Se exprimă în grame de hemoglobină la decilitru de eritrocite (g/dl) și se calculează conform formulei

$$\text{CHEM (g/dl)} = \frac{\text{hemoglobină (g/dl)}}{\text{hematocrit (L/L)}}$$

CHEM este utilă pentru clasificarea populației de eritrocite în normocromă (CHEM 32-36 g/dl) sau hipocromă (CHEM sub 32 g/dl). Termenul de hiperchromie (CHEM peste 36 g/dl) nu definește o situație reală. Singura celulă hiperchromă este sferocitul, dar valoarea crescută a CHEM în acest caz se datorează pierderii elasticității membranei și nu încărcării excesive cu hemoglobină (volumul eritocitar normal, suprafața eritocitară redusă). Din aceleași motive poate apare CHEM crescută în unele cazuri de drepanocitoză sau hemoglobinoză C homozigote.

Acuratețea determinării CHEM la analizoarele automate este afectată de factori ce influențează măsurarea hematocritului sau a hemoglobinei. Astfel, CHEM de peste 36 g/dl devine un indicator al prezenței unor asemenea factori care alterează valoarea parametrilor eritrocitari și care în absența CHEM ar putea trece neobservați în urma analizei automate. În continuare este prezentat protocolul de lucru urmat în laboratorul Dynacare Kasper din Edmonton, Canada. Acest laborator este acreditat de numeroase instituții specializate din Canada și America de Nord (Colegiul Medicilor și Chirurgilor din Alberta, Colegiul Medicilor Patologi Americani, SAMHSA) și este recunoscut pentru pregătirea medicilor rezidenți, a studenților, a tehnicienilor și a asistenților de laborator. Procedurile prezentate sunt efectuate de tehnicienii de laborator.

Scop

O concentrație medie de hemoglobină eritrocitară de peste 36 g/dl poate apare când în proba de sânge analizată sunt prezente: aglutinine la rece, lipide sau bilirubină în cantitate crescută, sferocite, paraproteine, hipergammaglobulinemie, crioglobulinemie, anumite medicamente sau substanțe interferente.

CHEM de peste 36 g/dl impune investigarea probei de sânge în vederea prezenței de aglutinine la rece, lipemie/turbiditate/substanțe interferente și/sau sferocite.

Dacă mai multe probe au o CHEM crescută, instrumentul folosit necesită service.

Materiale necesare

- Sânge recoltat pe EDTA
- Analizor automat
- Baie de apă termostatăă la 37°C sau incubator
- Centrifugă
- Kit de colorare panoptică
- Tuburi Wintrobe sau eprubete
- Pipete Pasteur
- Lame

Proceduri

Pentru CHEM > 36 g/dl se efectuează cât mai multe dintre următoarele proceduri:

1. Se examinează macroscopic proba de sânge pentru prezența aglutininelor la rece (grunji în suspensie).
2. Se examinează plasma obținută prin centrifugare sau sedimentare spontană pentru o culoare anormală (hemoliză sau icter), turbiditate sau lipemie.
3. Se examinează un frotiu de sânge colorat panoptic pentru sferocite, aglutinare la rece sau modificări lipemice asupra eritrocitelor sau a leucocitelor.
4. Se consultă materiale de referință pen-

tru alte cauze rar întâlnite.

Procedura A (suspiciune de aglutinine la rece)

Aglutininele la rece duc la formarea unor agregate eritrocitare care în momentul măsurării pe analizoarele automate vor produce număr de eritrocite (E) și hematocrit (Ht) fals scăzute și volum eritocitar mediu (VEM), hemoglobină eritocitară medie (HEM) și CHEM fals crescute. În funcție de severitatea aglutinării, unii parametri pot fi în intervalul de referință dar CHEM va fi, în general, peste 36 g/dl. Pacienții cu microcite pot avea aglutinine la rece (hemoliză autoimună) rezultatul fiind o CHEM crescută și un VEM aparent (fals) normal.

Etape de lucru

1. Nu se raportează rezultatele inițiale cu CHEM crescută.
2. Se notează rezultatele inițiale și frotiul tras la temperatura camerei cu "TC".
3. Se încălzește proba de sânge la 37°C pentru 30-60 minute.
4. După 30 minute se examinează plasma pentru lipemie, icter sau hemoliză. Dacă plasma nu este icterică, lipemică sau hemolizată se omogenizează proba și se măsoară imediat pentru a obține un rezultat "cald". Se face și un frotiu pe care pe lângă nume și dată se notează "cald".
5. Se analizează rezultatul "cald".
6. Dacă CHEM a scăzut sub 36 g/dl, E a crescut și VEM a scăzut, se raportează rezultatul "cald", cu comentariul (1): "posibil aglutinine la rece, proba a fost încălzită la 37°C" în dreptul numărului de leucocite.
7. În cazul în care a) s-a cerut și formulă leucocitară sau b) rezultatul "cald" are CHEM sub 36 g/dl dar nu s-au modificat E sau VEM sau c) în rezultatul "cald" CHEM nu a scăzut sub 36 g/dl dar s-a redus semnificativ iar E a crescut comparativ cu rezultatul "TC" (situație ce sugerează prezența de aglutinine cu amplitudine termică mare), se analizează frotiu-

rile "TC" și "cald". Se confirmă aglutinarea de pe "TC". Dacă nu se poate demonstra, proba se răcește la 4°C o oră, apoi se face un frotiu notat "rece" pe care se urmărește aglutinarea. Se confirmă absența sau reducerea aglutinării pe frotiul "cald".

8. Dacă este confirmată aglutinarea eritocitară, se raportează rezultatul "cald", se adaugă comentariul (1) la numărul de leucocite și se adaugă comentariul (2): "aglutinare eritocitară". Dacă CHEM a rămas peste 36 g/dl iar frotiurile au demonstrat aglutinarea eritocitară și numărul de leucocite (L), hemoglobina (Hb) și numărul de trombocite (T) din rezultatul "cald" se corelează cu frotiul, se raportează din rezultatul "cald" doar L, Hb și T, se adaugă comentariul (3): "datorită autoaglutinării nu se pot raporta numărul de eritrocite și indicii eritrocitari. Numărul de leucocite ar putea fi inexact" și comentariul (1). Dacă CHEM a rămas peste 36 g/dl iar frotiurile nu au demonstrat aglutinare eritocitară, se trece la procedura E.

9. Pacienții noi sunt raportați medicului de laborator, acestuia prezentându-i-se frotiurile "cald", "TC" și/sau "rece" și copii ale rezultatelor "TC" sau "rece" (vezi procedura E).

Procedura B (lipemie, turbiditate, substanțe interferente)

S-a arătat că valorile Hb, HEM și CHEM sunt fals crescute în prezența lipemiei, a hiperbilirubinemiei marcate (plasma icterică), a emulsiilor de nutriție parenterală, a paraproteinelor, hipergammaglobulinemiei, crioglobulinemiei și a unor medicamente. Trigliceridele conținute în chilomicroni produc o turbiditate crescută ce interferează cu citirea Hb în timp ce trigliceridele din lipoproteinele cu densitate foarte joasă nu au acest efect. Nici colesterolul nu influențează citirea Hb deoarece nu produce turbiditate.

În funcție de substanță și concentrație, plasma poate lua orice culoare de la clar până la brun-închis, alb sau lactescent. Plasma lipemică sau foarte icterică poate produce suficientă tur-

biditate pentru a crește Hb. În plus, lipemia poate interfera cu liza eritrocitelor. Foarte rar, o substanță interferentă poate crește CHEM dar plasma va fi clară. Pentru a corecta turbiditatea trebuie efectuat un martor (*blanc*) al plasmiei.

Etape de lucru (trebuie aplicate rapid, până nu apare hemoliza ce va interfera cu plasma-*blanc*)

1. Nu se raportează rezultatul cu CHEM crescută.

2. Se omogenizează proba asigurându-se că este la temperatura camerei și că nu se produce hemoliză prin agitare excesivă.

3. Se prepară o probă pentru centrifugare. Se umple un tub Wintrobe cu sânge sau se pipetează 1 ml într-o eprubetă de dimensiuni reduse. Se acoperă cu parafilm.

4. Se centrifughează 10 minute la 1500 – 1800 g (rcf).

5. Se examinează plasma supernatantă.

6. În cazul în care este lipemică sau icterică fără a fi hemolizată, se transferă într-o eprubetă separată.

7. Se analizează “plasma-*blanc*” la analizorul automat.

8. Se înregistrează rezultatul pe o foaie de lucru specială pentru probele lipemice sau icterice. Aici se vor înregistra ambele rezultate, și cel inițial și cel al plasmiei-*blanc*.

9. Se calculează Hb corectată din formula: $Hb \text{ corectată} = Hb \text{ originală} - [Hb \text{ dată de plasma-}blanc \times (1 - Ht \text{ original})]$.

10. Se recalculează HEM și CHEM: $HEM = Hb \text{ corectată}/E$; $CHEM = Hb \text{ corectată}/Ht$.

11. Se raportează rezultatele. Dacă CHEM este în intervalul 32 - 36 g/dl, se raportează rezultatele și se adaugă comentariul corespunzător: (4)“Hb corectată pentru lipemie”; (5)“probă icterică, Hb corectată”; (6)“Hb corectată pentru substanțe interferente”. Dacă CHEM este sub 32 g/dl iar indicii se corelează cu frotiul, se raportează rezultatul și se adaugă comentariul corespunzător (4), (5) sau (6). Dacă CHEM este sub 32 g/dl iar indicii nu se corelea-

ză cu frotiul, se raportează doar L, Hb și T din rezultat și se adaugă comentariul corespunzător (4), (5) sau (6). Dacă CHEM a rămas peste 36 g/dl se raportează doar L, Hb și T și se referă rezultatele (copia rezultatului original, foaia de lucru pentru lipemie, frotiul de sânge) către medicul de laborator pentru verificare și eventuale comentarii suplimentare.

12. În cazul în care se suspectează prezența de paraproteine sau gammaglobuline, în loc de procedura cu plasmă *blanc* se poate înlocui plasma originală: se ia o parte din probă, se centrifughează, se notează pe eprubetă meniscul supernatant și meniscul sediment, se scoate supernatantul și se înlocuiește cu o cantitate egală de diluent de la analizorul automat (soluție salină echivalentă serului fiziologic). Se omogenizează și se citește la aparatul automat.

13. Pentru pobe care după centrifugarea inițială sunt lipemice și hemolizate, se raportează doar L, Hb și T din rezultat, se adaugă comentariul (7): “nu s-a putut corecta Hb pentru lipemie datorită hemolizei. Hb poate fi crescută datorită lipemiei. Nu se pot raporta numărul de eritrocite și indicii”.

Procedura C (suspiciune de hemoliză “in vivo”)

Acest fenomen apare foarte rar, iar când este detectat trebuie anunțat imediat medicul de laborator.

Într-o probă de la un pacient cu hemoliză “in vivo”, rezultatul de Hb reprezintă atât Hb din plasmă cât și Hb din eritrocite. Importantă pentru pacient și medicul curant este Hb eritocitară ce reprezintă hemoglobina funcțională.

Etape de lucru

14. Se examinează frotiul de sânge, urmărindu-se prezența de schizocite și/sau sferocite. Absența acestora exclude hemoliza “in vivo”, nu se raportează rezultatul. În cazul în care sunt prezente se continuă:

1. Se centrifughează o parte din probă 10 minute la 1500 – 1800 g (rcf).

2. Se transferă plasma într-o eprubetă

separată.

3. Se analizează “plasma – *blanc*”.

4. Se înregistrează rezultatele pe o foaie de lucru de lipemie. Se înregistrează ambele rezultate, cel original și cel al plasmei-*blanc*. Se notează că este vorba de rezultat corectat pentru hemoliză.

5. Se calculează Hb corectată după formula: $Hb \text{ corectată} = Hb \text{ originală} - [Hb \text{ dată de plasma-blanc} \times (1 - Ht \text{ original})]$.

6. Se recalculează HEM și CHEM: $HEM = Hb \text{ corectată}/E$; $CHEM = Hb \text{ corectată}/Ht$.

7. Se raportează rezultatele corectate și se adaugă comentariul (8): “Hb corectată pentru hemoliză”.

8. Se raportează rezultatele originale pentru L, E, VEM, Ht, RDW și formula leucocitară.

9. Se raportează T după verificarea frotiului de sânge.

Procedura D (suspiciunea de sferocite)

În cazul în care sunt prezente sferocite pe frotiu, se verifică rezultatele anterioare ale pacientului, se raportează CHEM, se anunță medicul de laborator în cazul în care este vorba de un pacient nou și se trimite frotiul medicului de laborator pentru verificare, la nevoie.

Procedura E (CHEM rămâne > 36 g/dl)

Dacă pe frotiul de sânge nu sunt sferocite, modificări lipemice sau nu este prezentă aglutinare la “TC”, iar proba centrifugată nu arată lipemie, hemoliză sau icter, trebuie exclusă aglutinarea la rece.

Etape de lucru

1. Se refrigerează proba 30 minute.

2. Se omogenizează imediat, se face un frotiu notat “rece”.

3. Se analizează pe analizorul automat proba “rece”.

4. Se examinează frotiul “rece” colorat

panoptic. Se determină dacă refrigerarea a produs aglutinare la rece.

5. Se compară CHEM “rece” cu CHEM original. Aglutinarea la rece va produce creșterea CHEM și a VEM și scăderea E.

Dacă a fost demonstrată aglutinarea la rece se urmează procedura A.

Dacă CHEM rămâne > 36 g/dl și au fost excluse lipemia, icterul, substanțele interferente, aglutininele la rece, sferocitele și hemoliza “in vivo”, se raportează doar L, Hb și T din rezultat. Se referă frotiul de sânge și rezultatele la medicul de laborator pentru revizuire și eventuale comentarii suplimentare dacă este necesar.

Mulțumiri

Documentația prezentată a fost oferită de Laboratoarele Dynacare Kasper, Edmonton, Canada.

Accesul la protocoalele de lucru a fost posibil ca urmare a unei burse oferite de Laboratoarele Dynacare Kasper și familia Higgins din Edmonton, prin intermediul Asociației Laboratoarelor Medicale din România în perioada 23 septembrie – 17 octombrie 2006.

Ellen Klontz este manager al departamentului de hematologie.

Abrevieri

E: număr de eritrocite;

T: număr de trombocite;

L: număr de leucocite;

Ht: hematocrit;

Hb: hemoglobină;

VEM: volum eritrocitar mediu;

HEM: hemoglobina eritrocitară medie;

CHEM: concentrația medie de hemoglobină eritrocitară;

RDW: indicele de distribuție eritrocitar;

TC: temperatura camerei

Bibliografie

1. *** Coulter Hematology Analyzers, Hematology Procedures for Abnormal Blood, April, 1999