

# ALGORITME DIAGNÒSTIC EN EL LABORATORI. IMPACTE DELS NOUS ÍNDEX HEMATIMÈTRICS

**Anna Marull Arnall**

Per citar o enllaçar aquest document:  
Para citar o enlazar este documento:  
Use this url to cite or link to this publication:  
<http://hdl.handle.net/10803/675439>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**TESI DOCTORAL**

**ALGORITME DIAGNÒSTIC EN EL LABORATORI.  
IMPACTE DELS NOUS ÍNDEX HEMATIMÈTRICS.**

**ANNA MARULL ARNALL**

**2020**





**TESI DOCTORAL**

**ALGORITME DIAGNÒSTIC EN EL LABORATORI.  
IMPACTE DELS NOUS ÍNDEX HEMATIMÈTRICS.**

**ANNA MARULL ARNALL**

**2020**

Programa de Doctorat en Biologia Molecular, Biomedicina i Salut

Dirigida per:

Dr. David Gallardo i Giralt

Codirigida per :

Dra. Maria Teresa Serrando i Querol

Tutoritzada per:

Dra. Elisabeth Pinart i Nadal

**La present memòria es presenta en compliment dels requisits per  
optar al títol de Doctor per la Universitat de Girona**





**David Gallardo i Giralt**, professor associat del Departament de Ciències Mèdiques de la Universitat de Girona i cap de Servei d'Hematologia de l'Hospital Dr. Josep Trueta de Girona, **Maria Teresa Serrando i Querol**, professora associada del Departament de les Ciències Mèdiques de la Universitat de Girona i metge especialista de l'Institut català de la Salut, i **Elisabeth Pinart i Nadal**, professora titular de la Universitat de Girona al departament de Biologia

CERTIFIQUEN

Que el treball d'investigació titulat "*Algoritme diagnòstic en el laboratori. Impacte dels nous índex hematimètrics*", presentat per Anna Marull Arnall per optar al grau de Doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció i compleix tots els requisits per ser defensat públicament.

I perquè així consti a tots els efectes oportuns, firmem el present document a Girona a 22 d'abril de 2021

Dr. David Gallardo i Giralt   Dra. Maite Serrando i Querol   Dra. Elisabeth Pinart i Nadal

Anna Marull Arnall



*Als meus pares*





A la vida no hi ha coses a témer; només coses a comprendre

Marie Curie



## AGRAÏMENTS

Tinc la tesi de la meva mare al menjador de casa meva. 6 llibres escrits amb una màquina d'escriure d'unes 300 pàgines cadascun. Sempre que ho veia, pensava “ no seràs mai capaç de fer un treball d'aquesta envergadura; a quin nivell de coneixement has d'arribar per poder escriure fins al detall definicions, conceptes i resultats sobre un tema en concret; quant de sacrifici i esforç per poder transmetre anys d'investigació”. Realment els temps han canviat molt ,i les tesis ja no son tan llargues com ho eren fa 40 anys, però ara em trobo a la recta final d'un doctorat que mai vaig pensar que seria capaç de fer. No sé si he arribat al nivell de coneixement que jo em pensava que es requeria per poder defendre una tesi; el que sí sé és tot el que he après en fer-la. I ara entenc, que la tesi no és un punt final, sinó una manera de treballar, un *modus vivendi*. El que aprens en aquests anys és a ser curós, organitzat, a tenir paciència, a no tenir horaris, ni caps de setmana. A ajudar als altres i a rebre ajuda. És un aprenentatge que no el fas sol, tot un equip de gent t'acompanya, ja sigui de forma continuada o en moments puntuals.

En primer lloc, voldria agrair als meus directors de tesi, el Dr. David Gallardo per la direcció, dedicació i consell que han permès la finalització del projecte i la Dra Serrando, la Maite, directora, companya i amiga per obligar-me a donar xerrades, cursos que no volia, o sí que volia, o no sé si els volia fer... per treure'm el millor de mi. Per ensenyar a fer les millors presentacions de power point i la manera de portar una xerrada perquè la gent quedi entusiasmada amb el que els explico. Gràcies! Per fer de mi una millor professional, per aconseguir empenye'm fins a límits que ni jo mateixa podia imaginar.

La meva tutora de tesi, la Dra. Elisabeth Pinart per orientar-me durant aquests anys que ha durat el treball.

Al meu cap de secció, Orlando Jiménez, per ser capaç de transmetrem tranquil·litat, calma i seny en moments de nervis i donant-me totes les facilitats per poder dur a terme la tesi.

Als meus companys del Laboratori Clínic per donar-me suport i col·laborar en la realització d'aquesta tesi. Voldria fer una menció especial al meu equip de l'àrea d'Hematologia:, Maite Quintana, Mariona Hernandez, Joana Costa, Diana Pedrola , Virginia Cunquero i Rosa Maria Terradell.

En Manel Ramirez,i la Mimi Zurita perquè sempre que he necessitat alguna cosa, eren allà per ajudar-me, especialment en la recopilació de dades. A la Dúnia Perez i la Dra. Mercè Alsius, companyes del laboratori per la seva col·laboració en l'anàlisi de les dades d'autoimmunitat i en Javier Hernando per la seva col·laboració en l'anàlisi de les dades de les CPD.

Al Xavi Nieto pels seus consells en el camp de l'estadística, per fer fàcil, l'impossible.

Al Dr. Harteveld per la seva dedicació durant la meva estada a Leiden i compartir el seu coneixement en el camp de les hemoglobinopaties. Varen ser unes setmanes intenses i que varen valdre molt la pena.

A la casa comercial Roche pel seu suport en facilitar-me informació sobre l'analitzador Sysmex, en el qual s'ha basat aquest treball.

L'agraïment més especial li voldria dedicar a la meva família: en Carles per la seva paciència infinita que ha tingut durant aquests anys i el recolzament incondicional que he rebut per part seva. Pels seus " ja sortirà, sinó d'aquesta manera, d'un altre.." I les meves filles, Júlia i Emma que amb la seva alegria i la seva felicitat han aconseguit que relativitzés els problemes que han anat sorgint.

I per últim, voldria dedicar unes paraules als meus pares, que varen aconseguir transmetre'm els valors de l'esforç, la constància, i la superació en els moments difícils. Sense ells no hauria arribat on sóc ara.

## ÍNDIX D'ABREVIATURES

<b>ADP</b>	Adenosin difosfat
<b>ARN</b>	Àcid ribonucleic
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfat
<b>B12</b>	Vitamina B12
<b>CID</b>	Coagulació intravascular disseminada
<b>CMH</b>	Complex major histocompatibilitat
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa-2
<b>CPA</b>	Cèl·lules presentadores antigen
<b>EC</b>	Electroforesis capil·lar
<b>EDTA</b>	Àcid etilendiaminotetracètic
<b>Fig</b>	Figura
<b>FvW</b>	Factor de von Willebrand
<b>Gr</b>	Grams
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HBP</b>	Hemoglobinopaties
<b>HCM</b>	Hemoglobina corpuscular mig
<b>HELLP</b>	Hemòlisis microangiopàtica, elevació enzims hepàtics i trombopènia
<b>HPFH</b>	Persistència hemoglobina fetal hereditària
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida d'alta resolució
<b>IFN</b>	Interferó gamma
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IPF</b>	Immature platelet fragment
<b>Limfòcits TH.</b>	Limfòcits T Helper
<b>LPS.</b>	Lipopolisacàrid
<b>MGG</b>	May Grünwald-Giemsa
<b>µL</b>	Microlitre
<b>mL.</b>	Mililitres

<b>MLPA.</b>	Amplificació múltiple depenent de la lligació de sondes
<b>mm<sup>2</sup></b>	Milimetre quadrat
<b>mm<sup>3</sup></b>	Milimetre cúbic
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NKF KDOQI</b>	National Kidney Foundation Kidney Disease Outcome Quality Initiative
<b>PAMP</b>	Pathogen associated Molecular Pattern
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa
<b>PLT</b>	Plaquetes
<b>PTI</b>	Púrpura trombopènica Idiopàtica
<b>QSOFA</b>	Quick Sepsis related Organ Failure Assesment
<b>SHU</b>	Síndrome Hemolític Urèmic
<b>SIRS</b>	Systemic Inflammatory response syndrome
<b>SOFA</b>	Sepsis related Organ Failure Assesment
<b>TAC</b>	Tomografia Axial computeritzada
<b>TI</b>	$\beta$ talassèmia minor
<b>TLR</b>	Receptor tipus TOLL
<b>VCM</b>	Volum corpuscular mig
<b>VEB</b>	Virus Epsteinn-Barr
<b>VIH</b>	Virus Immunodeficiència Humana

## ÍNDEX DE TAULES

Taula 1. Principals tipus d'hemoglobinopaties .....	18
Taula 2. Propietats afectades per algunes de les hemoglobinopaties.....	23
Taula 3. Manifestacions clíniques de la malaltia de les cèl·lules falciformes.....	25
Taula 4. Evolució de la població total i estrangera a la província de Girona del 2002 al 2018.....	29
Taula 5. Migracions externes per continent de procedència a l'àrea de Girona del 2004 al 2018 .....	30
Taula 6. Causes d'increment i disminució de l'HbA2. Interpretació dels valors .....	37
Taula 7. Causes d'increment i disminució d'Hb F i interpretació dels valors .....	38
Taula 8. Resultats de l'anàlisi de beta talassèmia minor realitzades al nostre laboratori del 1981 al 1984. ...	45
Taula 9. Alteracions de l'hemograma i frotis de sang perifèrica .....	57
Taula 10. Criteris de resposta inflamatòria sistèmica.....	66
Taula 11. Puntuació segons els criteri SOFA. ....	68
Taula 12. Criteris de q SOFA.....	69
Taula 13. Resum de les respostes bacterianes.....	71
Taula 14. Classificació dels biomarcadors de sèpsia més importants.....	83
Taula 15. Resultats publicats a l' <i>International journal of laboratory hematology</i> 39.4 (2017): e98-e101. amb el títol "Epidemiological distribution of hemoglobinopathies in the area of Girona over 10 years." .....	159
Taula 16. Número de pacients analitzats per estudi d'hemoglobines. ....	160
Taula 17. Distribució de les talassèmies detectades del 2004 al 2018 .....	163
Taula 18. Tipus d'α talassèmies diagnosticades al llarg de 15 anys.....	165
Taula 19. Distribució de les hemoglobines estructurals detectades al llarg de 15 anys .....	168
Taula 20. Descripció de les hemoglobines variants més minoritàries detectades en la nostra àrea geogràfica entre 2004-2018. ....	170
Taula 21. Incidència dels diferents tipus d'hemoglobines estructurals+ talassèmies detectades per any. ....	171
Taula 22. Valors de la mitjana i desviació estàndard dels resultats del Ret-He en els grups analitzats . ....	175
Taula 23. Test de Normalitat del paràmetre Ret-He analitzat per la població estudiada .....	176
Taula 24. Resultat del test de Kruskal-Wallis per analitzar si Ret-He presenta diferències significatives entre els grups estudiats. El resultat amb SPSS sí que presenta diferències significatives ( $p < 0.05$ ).....	177
Taula 25. Anàlisi pos-hoc on s'observa les diferències significatives entre els tres grups estudiats pel mètode de Tukey.....	178
Taula 26. Mitja del recompte de plaquetes entre els diferents grups estudiats.....	189
Taula 27. Test de Normalitat del paràmetre IPF.....	190
Taula 28. Valors IPF% en mostres amb presència d'agregats plaquetaris .....	197
Taula 29. Resultats de les 151 mostres analitzades amb trombopènia segons si presenten alarma de clumps i si s'observen agregats plaquetaris.....	198
Taula 30. Anàlisi descriptiu del valor de la mitja dels diferents grups estudiats .....	202
Taula 31. Anàlisi de la normalitat de la població pel paràmetre HFLC% .....	203



<i>Taula 32. Resultat del test de Kruskal-Wallis per analitzar si HFLC% presenta diferències significatives entre els diferents grups estudiats. ....</i>	<i>204</i>
<i>Taula 33.. El test de Tukey ens informa que els pacients amb Epstein-Barr presenten uns valors d' HFLC% estadísticament significatius respecte la resta de grups estudiats. ....</i>	<i>206</i>
<i>Taula 34. Valors de les mitjanes de les Cell Population Data i la seva desviació estàndard.....</i>	<i>213</i>
<i>Taula 35. Anàlisi de la normalitat de la població per les diferents CPD.....</i>	<i>214</i>
<i>Taula 36. Resultats del test de U Mann-Whitney pels CPD.....</i>	<i>216</i>

## ÍNDIX DE FIGURES.

Figura 1. Càmera de Neubauer.....	10
Figura 2. Model A del comptador Coulter.....	12
Figura 3. Diagrama de la Hematopoesi.....	14
Figura 4. Representació esquemàtica de l'hemoglobina.....	16
Figura 5. Diagrama de flux per la detecció de portadors d'hemoglobines.....	44
Figura 6. Llibreta de l'any 1981 on s'anotaven els resultats de l'anàlisi de l'Hb A2.....	45
Figura 7. Resultats de les determinacions per anàlisi de beta talassèmia al nostre laboratori des de 1981 al 1984.....	46
Figura 8. Estructura de la plaqueta.....	48
Figura 9. Valoració clínica de la trombopènia un cop descartada la pseudotrombopènia.....	58
Figura 10. Les vies clàssica i alternativa del complement.....	72
Figura 11. Gràfiques de dispersió d'un pacient normal i d'un pacient amb limfòcits d'alta fluorescència (HFLC).....	85
Figura 12. Gràfica on s'observa l'ample de distribució dels limfòcits.....	87
Figura 13. Cadena Sysmex XN 9000 on es processen els hemogrames.....	102
Figura 14. Representació dels controls de la qualitat del control normal de l'hemograma.....	104
Figura 15. Microscopi digital Cella Vision DM 96.....	105
Figura 16. Analitzador d'hemoglobines BIORAD VARIANT II.....	107
Figura 17. Control patològic on es pot apreciar els pics de l'hemoglobina F, hemoglobina A, hemoglobina A2 i hemoglobina S.....	108
Figura 18. Analitzador COBAS 8000.....	110
Figura 19. Flascons aerobi, anaerobi i pediàtric BACT/ALERT.....	112
Figura 20. Imatge de Nova view on s'observen dues imatges a diferents longituds d'ona.....	118
Figura 21. Citòmetre de flux FC500 de Beckmann-Coulter.....	119
Figura 22. Imatge de limfòcits, (Cella vision®).....	127
Figura 23. Esquema on es mostra l'anàlisi per impedància per fer el recompte cel·lular.....	128
Figura 24. Esquema on es presenta la fórmula de l'hematòcrit.....	129
Figura 25. Mètode utilitzat per l'analitzador per fer el càlcul de l'hematòcrit.....	129
Figura 26. Etapes per l'anàlisi de la mesura de l'hemoglobina.....	131
Figura 27. Amplitud de distribució eritrocitària (ADE, RDW red cell Distribution width).....	132
Figura 28. Distribució de les poblacions cel·lulars mesurades en funció de la seva mida i de la seva intensitat fluorescent.....	133
Figura 29. Diagrama de dispersió de plaquetes en funció de la seva fluorescència i mida cel·lular.....	134
Figura 30. Procés que presenten els diferents elements cel·lulars en el canal WNR.....	135

<i>Figura 31. Esquema de l'anàlisi per citometria de flux .....</i>	<i>136</i>
<i>Figura 32. Imatge del diferencial leucocitari analitzat en un pacient normal .....</i>	<i>137</i>
<i>Figura 33. Imatge del diagrama de dispersió dels diferents elements cel·lulars en funció de la seva localització i intensitat de fluorescència .....</i>	<i>137</i>
<i>Figura 34. Imatge del diferencial leucocitari analitzat en un pacient patològic. ....</i>	<i>138</i>
<i>Figura 35. Procés que presenten els diferents elements cel·lulars en el canal WDF. ....</i>	<i>139</i>
<i>Figura 36. Gràfica on s'observa les diferents mesures en funció de la posició, angle, longitud. ....</i>	<i>140</i>
<i>Figura 37. Esquema de la tècnica d'espectrometria utilitzada per detectar els analits bioquímics .....</i>	<i>141</i>
<i>Figura 38. Esquema gràfic de les etapes de la reacció en cadena de la polimerasa. ....</i>	<i>144</i>
<i>Figura 39. Exemple de resultat que emet el citòmetre de flux. ....</i>	<i>149</i>
<i>Figura 40. Exemples de diferents tipus de poblacions de distribució normal o Gaussiana. ....</i>	<i>150</i>
<i>Figura 41. Evolució dels estudis d'hemoglobines sol·licitats .....</i>	<i>161</i>
<i>Figura 42. Comparativa de la detecció d'hemoglobinopaties versus estudis normals entre l'any 2004 al 2018 .....</i>	<i>161</i>
<i>Figura 43. Evolució en la detecció de l'alfa talassèmia i de la beta talassèmia .....</i>	<i>164</i>
<i>Figura 44. Distribució de les <math>\alpha</math> talassèmies segons la mutació detectada .....</i>	<i>165</i>
<i>Figura 45. Evolució en la detecció HPFH (Persistència hereditària de la hemoglobina fetal, Hereditary Persistency Fetal Hemoglobin) .....</i>	<i>167</i>
<i>Figura 46. Distribució de les hemoglobines estructurals detectades a Girona entre 2004-2018. ....</i>	<i>168</i>
<i>Figura 47. Detecció d'hemoglobines estructurals a Girona entre 2004-2018. ....</i>	<i>169</i>
<i>Figura 48. Evolució del diagnòstic de l'hemoglobina S+alfa i hemoglobina C+alfa .....</i>	<i>172</i>
<i>Figura 49. Grups de pacients escollits per analitzar la magnitud de Ret-He .....</i>	<i>175</i>
<i>Figura 50. Histograma de distribució del paràmetre Ret-He en la població estudiada .....</i>	<i>176</i>
<i>Figura 51. Diagrama de caixes on s'observa que tant el grup de les talassèmies presenten diferències significatives respecte el grup control i el grup que presenta hemoglobines estructurals .....</i>	<i>179</i>
<i>Figura 52. Corbes ROC del Ret-He amb pacients amb algun tipus de talassèmia .....</i>	<i>180</i>
<i>Figura 53. Resultat de l'anàlisi prospectiu d'aquells valors de Ret-He &lt; 27,6 pg. ....</i>	<i>182</i>
<i>Figura 54. Resultat del test de Mann Whitney U en la distribució del valor del Ret-He pels dos grups de malalties (ferropènia, talassèmia) .....</i>	<i>183</i>
<i>Figura 55. Proposta d'algoritme pel cribratge de talassèmies .....</i>	<i>185</i>
<i>Figura 56. Grups de pacients seleccionats amb plaquetopènia per analitzar el marcador IPF. ....</i>	<i>189</i>
<i>Figura 57. Histograma de distribució del paràmetre IPF en la població estudiada .....</i>	<i>190</i>
<i>Figura 58. Resultat del test de Kruskal-Wallis .....</i>	<i>191</i>
<i>Figura 59. Distribució IPF% en tots els grups estudiats .....</i>	<i>191</i>
<i>Figura 60. Corba ROC on s'observa la sensibilitat i especificitat IPF% dels pacients amb PTI .....</i>	<i>192</i>
<i>Figura 61. Resultat de l'anàlisi de pacients amb IPF &gt; 13,5% .....</i>	<i>194</i>
<i>Figura 62. Resultat del test de Mann Whitney .....</i>	<i>195</i>

<i>Figura 63. Grups de pacients inclosos per l'estudi de l'HFLC%.....</i>	<i>202</i>
<i>Figura 64.Histograma de distribució del paràmetre HFLC% en la població estudiada .....</i>	<i>203</i>
<i>Figura 65.Valors de HFLC% en les diferents poblacions estudiades.....</i>	<i>204</i>
<i>Figura 66..Corba ROC on s'observa que un cut-off de 0,25 % amb un 92% sensibilitat i 88% d'especificitat per detectar una mononucleosi infecciosa.....</i>	<i>207</i>
<i>Figura 67.Resultat de l'anàlisi prospectiu per mostres amb HFLC &gt; 0,3%.....</i>	<i>209</i>
<i>Figura 68..Gràfica de barres de les mitjanes de les cell population data (CPD) respecte els dos grups estudiats. ....</i>	<i>213</i>
<i>Figura 69.Histograma de distribució dels paràmetres CPD en les poblacions estudiades .....</i>	<i>215</i>
<i>Figura 70.Corba ROC realitzada a la magnitud NE-WY amb un cut-off de 623,5 ( sensibilitat 92%, especificitat 80%).....</i>	<i>217</i>



# ÍNDEX

<i>INTRODUCCIÓ</i> .....	7
<b>1.- HEMOGRAMA</b> .....	<b>9</b>
1.2. HEMOGRAMA ACTUAL .....	11
1.3 FORMACIÓ DELS ELEMENTS CEL·LULARS .....	13
<b>2.- ANÀLISI DE LA SÈRIE VERMELLA</b> .....	<b>15</b>
2.1.- HEMOGLOBINA I ANÈMIA.....	15
2.2 ESTRUCTURA DE L'HEMOGLOBINA.....	16
2.3 HEMOGLOBINOPATIES: CONCEPTE I CLASSIFICACIÓ .....	17
2.3.1 TALASSÈMIES .....	18
2.3.2. HEMOGLOBINES VARIANTS.....	22
2.4 - DISTRIBUCIÓ EPIDEMIOLÒGICA DE LES HEMOGLOBINOPATIES .....	26
2.5 LA IMPORTÀNCIA DEL CRIBRATGE D'HEMOGLOBINOPATIES .....	30
2.6.- DIAGNÒSTIC DE LES HEMOGLOBINOPATIES. ....	32
2.6.1 HEMOGRAMA .....	32
2.6.2 ANÀLISI DE LES FRACCIONS D'HEMOGLOBINES.....	34
2.6.3. MÈTODES PER L'ANÀLISI DE L'ADN .....	41
2.7.- RET-HE: UN PARÀMETRE PER AVALUACIÓ DE LES ANÈMIES .....	46
<b>3.- ANÀLISI DE LA SÈRIE PLAQUETÀRIA: TROMBOPÈNIES</b> .....	<b>48</b>
3.1.-TROMBOPÈNIES DE CAUSA CENTRAL.....	49
3.2.-TROMBOPÈNIES DE CAUSA PERIFÈRICA .....	50
3.2.1TROMBOPÈNIES IMMUNES.....	50

3.2.2. TROMBOPÈNIES NO IMMUNES.....	53
<b>3.3.- DIAGNÒSTIC TROMBOPÈNIES .....</b>	<b>56</b>
<b>3.4 - FRACCIÓ DE PLAQUETES IMMADURES (IPF%).....</b>	<b>59</b>
<b>3.5.- ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT I SENSIBILITAT DE L'ALARMA D'AGREGATS plaquetaris .....</b>	<b>61</b>
<b>4.- ESTUDI DE LA SÈRIE BLANCA: SÈPSIA.....</b>	<b>64</b>
4.1.- DEFINICIÓ DE SÈPSIA .....	64
4.2. EVOLUCIÓ DE LA DEFINICIÓ DE SÈPSIA.....	65
4.3 FISIPATOLOGIA DE LA SÈPSIA.....	69
4.4. BIOMARCADORS DE SÈPSIA .....	78
4.4.1. PROTEÏNA C REACTIVA (PCR) .....	80
4.4.2. PROCALCITONINA (PCT) .....	81
4.4.3.-LACTAT .....	82
4.4.4. ALTERACIONS DE LA COAGULACIÓ .....	84
4.4.5.ALTERACIONS DE L'HEMOGRAMA .....	84
<b>4.5.PARÀMETRES DE SÈPSIA EN INVESTIGACIÓ. CELL POPULATION DATA (CPD) I LIMFÒCITS ALTAMENT FLUORESCENTS (HFLC).....</b>	<b>84</b>
<b><i>HIPÒTESIS DE TREBALL I OBJECTIUS .....</i></b>	<b>89</b>
HIPÒTESI DE TREBALL .....	91
OBJECTIUS DE LA TESIS.....	93
<b><i>MATERIAL I MÈTODES .....</i></b>	<b>95</b>
<b>1. MOSTRES I DADES.....</b>	<b>97</b>
<b>1.1 GRUPS D'ESTUDI PER OBJECTIUS .....</b>	<b>97</b>

<b>1.2 CONFIDENCIALITAT DE LES DADES .....</b>	<b>99</b>
<b>1.3. TUBS DE SANG I MEDIS DE CULTIU .....</b>	<b>100</b>
<b>2. EQUIPS I REACTIUS .....</b>	<b>101</b>
<b>2.1 HEMOGRAMA.....</b>	<b>102</b>
<b>2.2. ANÀLISI MORFOLÒGICA DE SANG PERIFÈRICA .....</b>	<b>105</b>
<b>2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ .....</b>	<b>105</b>
2.3.1 BIORAD D10 DUAL PROGRAM.....	106
2.3.2 BIO RAD VARIANT II BETA THALASSÈMIA SHORT PROGRAM.....	106
2.3.3.ADAMS™ A1c HA-8180 (Menarini, Florència, Itàlia) .....	108
<b>2.4 MAGNITUDS BIOQUÍMIQUES.....</b>	<b>109</b>
2.4.1 COBAS C 8000/ e602 (Roche, Basilea, Suïssa).....	109
2.4.2 COBAS 502 .....	110
<b>2.5 DETECCIÓ MICROBIOLÒGICA .....</b>	<b>111</b>
2.5.1 HEMOCULTIU .....	111
2.5.2 REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA .....	112
<b>2.6 SEROLOGIA i AUTOIMMUNITAT.....</b>	<b>113</b>
2.6.1 LIAISON, Diasorin, Saluccia Itàlia.....	113
2.6.2 ARCHITECT, ABBOTT, Chicago, Illinois, Estats Units.....	116
2.6.3 QUANTALYSER 160 (INOVA DIAGNOSTICS, Sant Diego, Estats Units).....	117
2.6.4 NOVA VIEW.....	118
<b>2.7 IMMUNOFENOTIP.....</b>	<b>118</b>
<b>3. PROCÉS ANALÍTIC DE LES MOSTRES.....</b>	<b>119</b>
<b>3.1.PROCESSAMENT DE LES MOSTRES .....</b>	<b>121</b>
3.1.1. PROCESSAMENT DE LES MOSTRES A L'ÀREA D'HEMATOLOGIA .....	121
<b>4. MÈTODES ANALÍTICS.....</b>	<b>127</b>



<b>4.1 HEMOGRAMA.....</b>	<b>127</b>
4.1.1 CANAL RBC/PLT .....	128
4.1.2 MESURA DEL VOLUM CORUPUSCULAR MIG (VCM).....	128
4.1.3 MESURA DE L'HEMATÒCRIT.....	129
4.1.4 MESURA DE L'HEMOGLOBINA .....	130
4.1.5 PARÀMETRES CALCULATS ERITROCITÀRIS .....	131
4.1.6 CANAL DE MESURA ÒPTICA (RET) I PLT-O.....	132
4.1.7 CANAL PLT-F .....	133
4.1.8 CANAL DE WNR (WHITE NUCLEATED CELLS).....	134
4.1.9 DIFERENCIAL LEUCOCITARI: CANAL WDF (WHITE DIFFERENTIAL LEUKOCYTE) .....	135
<b>4.2 QUANTIFICACIÓ DE LES FRACCIONS DE L'HEMOGLOBINA .....</b>	<b>140</b>
<b>4.3 DETERMINACIÓ DE MAGNITUDS BIOQUÍMIQUES .....</b>	<b>141</b>
<b>4.4 DETECCIÓ DE MICROORGANISMES .....</b>	<b>143</b>
4.4.1. HEMOCULTIUS .....	143
4.4.2. BIOLOGIA MOLECULAR .....	144
4.4.3. SEROLOGIA.....	145
<b>4.7 IMMUNOFLUORESCÈNCIA INDIRECTE. ....</b>	<b>147</b>
<b>4.8 IMMUNOFENOTIP.....</b>	<b>148</b>
<b>5. TRACTAMENT DE LES DADES: ANÀLISI ESTADÍSTICA.....</b>	<b>149</b>

## ***RESULTATS I DISCUSSIÓ .....*** 153

<b>1. DISTRIBUCIÓ EPIDEMIOLÒGICA HEMOGLOBINOPATIES A LA PROVINCIA DE GIRONA I ESTUDI DEL PARÀMETRE RET-HE EN EL DIAGNÒSTIC DE LES HEMOGLOBINOPATIES .....</b>	<b>155</b>
1.1 DISTRIBUCIÓ EPIDEMIOLÒGICA HEMOGLOBINOPATIES A LA PROVINCIA DE GIRONA ..	155
1.2 ANÀLISI DEL PARÀMETRE RET-HE COM A CRIBATGE PER DETECTAR LES TALASSÈMIES.	175

<b>2.- ANÀLISI DE LA FRACCIÓ DE LES PLAQUETES IMMADURES (IPF%) I ESTUDI DE SENSIBILITAT I ESPECIFICITAT DE L'ALARMA D'AGREGATS PLAQUETARIS.....</b>	<b>187</b>
---	------------

2.1 ANÀLISI DE LA FRACCIÓ DE PLAQUETES IMMADURES (IPF%) EN EL DIAGNÒSTIC DE LES TROMBOPENIES .....	187
--	-----

2.2. ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT I SENSIBILITAT DE L'ALARMA D'AGREGATS PLAQUETARIS AMB PACIENTS AMB TROMBOPÈNIA .....	197
---	-----

### **3.- ESTUDI MARCADORS LEUCOCITARIS PEL DIAGNÒSTIC DE SÈPSIA... 201**

3. 1 AVALUACIÓ DEL MARCADOR HFLC% (HIGH FLUORESCENCE LYMPHOCITES COUNT) EN CASOS DE SÈPSIA .....	201
--	-----

3.2. ANÀLISI DE LES CELL POPULATION DATA EN EL DIAGNÒSTIC DE SÈPSIA .....	211
---	-----

<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>219</b>
-------------------------	------------

CONCLUSIONS .....	221
-------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>223</b>
---------------------------	------------

BIBLIOGRAFIA .....	225
--------------------	-----



## RESUM

Actualment disposem de comptadors automatitzats basats en mètodes d'alta precisió, que determinen de manera ràpida i fiable una gran varietat de paràmetres hematològics bàsics de gran utilitat per a la detecció d'anomalies de les cèl·lules sanguínies. En laboratoris amb alta càrrega assistencial com el nostre (1800 hemogrames/dia) es fa imprescindible la creació d'algoritmes diagnòstics que ajudin a augmentar la sensibilitat i l'especificitat en la detecció de patologies. El propòsit d'aquesta tesi ha estat analitzar tres paràmetres d'investigació provinents de les tres sèries cel·lulars de l'hemograma: eritrocitària, plaquetària i leucocitària.

De la sèrie eritrocitària hem estudiat el paràmetre Ret-He, que és la quantitat d'hemoglobina present en els reticulòcits. L'objectiu és analitzar si aquesta magnitud és útil en el cribratge de les talassèmies. Hem comparat el valor de Ret-He en diversos grups de diferents tipus d'hemoglobinopaties i un grup control. El resultat ha estat que un Ret-He <27,6 pg pot ser d'utilitat pel cribratge de les talassèmies un cop descartada la ferropènia. No és un paràmetre útil per fer el cribratge d'hemoglobines estructurals. Dins del mateix objectiu hem considerat necessari fer una anàlisi detallada de la distribució poblacional d'hemoglobinopaties en la nostra regió, ja que no consta cap estudi al respecte. Hem fet una anàlisi poblacional dels pacients amb aquest tipus de desordres del 2004 al 2018. El resultat ha estat que l'hemoglobinopatia més freqüent és la beta talassèmia, seguida de l'hemoglobina S heterozigot. Hem observat un augment considerable tant en el nombre de sol·licituds com de deteccions de l'alfa talassèmia els últims dos anys.

De la sèrie plaquetària hem estudiat el paràmetre IPF, que és la fracció de plaquetes immadures. L'objectiu és analitzar si aquesta magnitud pot ser d'utilitat en l'orientació diagnòstica de les trombopènies immunes. Per fer-ho, hem seleccionat pacients amb diferent tipus de trombopènies (malaltia hepàtica, pacients amb tractament amb quimioteràpia, pacients amb trombopènia immune idiopàtica i un grup control). El resultat ha estat que l'IPF dels pacients amb trombopènia immune idiopàtica presenta diferències significatives al ser comparat amb la resta de patologies d'origen central i el grup control. El punt de tall més òptim és un IPF del 13,55%. Davant la interferència descrita a la literatura

que el valor de l'IPF pot estar falsament augmentat en presència d'agregats plaquetaris, hem considerat oportú ampliar l'estudi i analitzar la sensibilitat i especificitat de l'alarma d'agregats plaquetaris que presenta l'analitzador Sysmex.

De la sèrie leucocitària, hem estudiat si hi havia algun paràmetre que ens pogués ajudar en el diagnòstic precoç de la sèpsia. Considerant que els leucòcits són les cèl·lules que s'encarreguen de la funció immunitària, hem pensat que potser hi havia alguna mesura d'aquestes cèl·lules que s'alterés davant d'aquesta malaltia tan greu. Hem analitzat la magnitud limfòcits d'alta fluorescència, HFLC (high fluorescence lymphocytes count), que són aquells limfòcits que emeten més fluorescència degut a que contenen més ARN en l'interior de les seves cèl·lules. Hem analitzat els valors de HFLC en diferents grups de malalties que produeixen síntesi d'anticossos, ja que alguns estudis relacionaven valors alts d'HFLC amb la síntesi d'anticossos i aquests estan involucrats amb la resposta immunitària de la sèpsia. Els resultats han estat que HFLC% no és un bon paràmetre pel diagnòstic precoç de sèpsia. També hem estudiat les Cell Population Data (CPD). Són magnituds que ens donen informació sobre les variacions de posició, forma, dispersió i ubicació dels neutròfils, limfòcits i monòcits. En el cas de l'estudi de les CPD es va utilitzar pacients control i pacients diagnosticats de sèpsia. Els resultats han estat que hi ha diversos CPD que presenten diferències significatives entre el grup control i el grup de pacients amb sèpsia. De totes les Cell Population Data estudiades, l'amplitud de dispersió dels neutròfils fluorescents (NE-WY) és el que presenta millor marcador pel diagnòstic precoç de sèpsia amb un punt de tall de 623,50 amb una sensibilitat del 92% i una especificitat del 80%.

## RESUMEN

Actualmente disponemos de contadores automatizados basados en métodos de alta precisión que determinan de manera rápida y fiable una gran variedad de parámetros hematológicos básicos que son de gran utilidad para la detección de anomalías de las células sanguíneas. En laboratorios con alta carga asistencial como el nuestro (1800 hemogramas/día) se hace imprescindible la creación de algoritmos diagnósticos que ayuden a aumentar la sensibilidad y especificidad en la detección de patologías. El objetivo de esta tesis es analizar tres parámetros de investigación de cada una de las series celulares del hemograma: eritrocitaria, plaquetaria y leucocitaria.

De la serie eritrocitaria hemos estudiado el parámetro Ret-He que representa la cantidad de hemoglobina presente en los reticulocitos. El objetivo es analizar si esta magnitud es útil en el cribado de talasemias. Hemos comparado el valor del Ret-He en distintos grupos de hemoglobinopatías y un grupo control. Según nuestros resultados un Ret-He  $< 27,6$  pg podía ser de utilidad para el cribado de las talasemias una vez descartada la ferropenia. No es un parámetro útil para el cribado de hemoglobinas estructurales. Dentro del mismo objetivo hemos considerado necesario hacer un análisis detallado de la distribución poblacional de las hemoglobinas en nuestra región desde el año 2004 al 2018, ya que no nos consta ningún estudio al respecto. Según nuestros resultados, la hemoglobinopatía más frecuente es la beta talasemia, seguida de la hemoglobina S heterocigota. Se ha observado un aumento considerable tanto en el número de solicitudes como de detecciones de alfa talasemia en los últimos dos años.

De la serie plaquetaria hemos estudiado el parámetro IPF, que es la fracción de plaquetas inmaduras. El objetivo era analizar si esta magnitud podía ser de utilidad en la orientación diagnóstica de las trombocitopenias inmunes. Para ello, hemos seleccionado pacientes con diferentes tipos de trombocitopenias (patología hepática, pacientes en tratamiento con quimioterapia, pacientes con trombocitopenia inmune idiopática y un grupo control). Las conclusiones son que el IPF de los pacientes que presentaban una trombocitopenia inmune idiopática presenta diferencias significativas cuando es comparado con el resto de las patologías de origen central y con el grupo control. EL punto

de corte óptimo es un IPF de 13,55%. Ante la interferencia descrita en la literatura que el valor del IPF puede estar falsamente elevado ante la presencia de agregados plaquetarios hemos considerado oportuno ampliar el estudio y analizar la sensibilidad y especificidad de la alarma de agregados plaquetarios que presenta el analizador Sysmex

Respecto a la serie leucocitaria queríamos estudiar si existía algún parámetro de investigación que pudiera ayudar al diagnóstico precoz de la sepsis. Hemos analizado la magnitud de linfocitos de alta fluorescencia, HFLC (high fluorescence lymphocytes count) que son aquellos linfocitos que emiten más fluorescencia debido a que contienen más ARN en el interior de sus células. Hemos analizado los valores de HFLC en diferentes tipos de enfermedades donde se produce una síntesis de anticuerpos ya que algunos estudios relacionaban valores elevados de HFLC con la síntesis de anticuerpos. Los resultados han sido que HFLC% no es un buen parámetro para el diagnóstico precoz de sepsis. También hemos estudiado las Cell population Data (CPD). Son magnitudes que dan información sobre las variaciones de posición, forma, dispersión y ubicación de los neutrófilos, linfocitos y monocitos Para el estudio de las CPD se utilizaron pacientes control y pacientes diagnosticados de sepsis. Según los resultados existen diferentes CPD que presentan diferencias significativas entre el grupo control y el de los pacientes con sepsis. De todas las CPD estudiadas la amplitud de dispersión de los neutrófilos fluorescentes (NE-WY) es el que presenta un mejor resultado para el diagnóstico precoz de sepsis un con un punto de corte de 623,50 y una sensibilidad del 92% y una especificidad del 80%.

## SUMMARY

Currently, automatic analyzers based on highly accurate methods can determine hematologic parameters in a fast and reliable way which is important to detect abnormalities in blood cells. In laboratories with a high care burden such as ours (1800 cell blood counts/day) the development of diagnostic algorithms that help to improve the sensitivity and specificity of the detection of pathologies is indispensable. In this paper, we aim to elucidate three parameters of analysis for each one of the three hematological cellular criteria: erythrocytes (red blood cells), platelets, and leukocytes (white blood cells).

In the analysis of erythrocytes, we studied the Ret-He variable, which is the quantity of hemoglobin present in reticulocytes. The goal was to analyze whether this criterion can be useful in the screening of thalassemias. We compared the Ret-He values in different groups of hemoglobinopathies and in a control group. The results showed that a Ret-He  $<27.6$  pg could be useful for the thalassemia screening once you have ruled out iron deficiency. It is not useful, however, for the structural hemoglobinopathies. Our study also included an analysis of the population and distribution of hemoglobinopathies in our region from 2004 to 2018, as no previous study has done this for our patient population. The most prevalent hemoglobinopathy was beta-thalassemia followed by hemoglobin S heterozygote. In addition, we have observed a sharp increase in the number of alpha-thalassemias detected.

In the analysis of platelets, we examined the immature platelet fraction (IPF) parameter. The goal was to analyze if this element could be useful in the diagnosis of immune thrombocytopenias. To do this, we selected patients with different pathologies (liver pathology, patients undergoing chemotherapy, patients with idiopathic immune thrombocytopenia), and a control group. Our results revealed that the IPF in idiopathic immune thrombocytopenia presents significant differences when compared with other pathologies, with the optimal cut-off IPF at 13.55%.

Some studies have described platelet clumps as a potential source of interference yielding high IPF values. Thus, we were concerned whether IPF values may be falsely high



in the presence of platelet aggregates. We adjusted the sensitivity and specificity parameters of the platelet aggregates alarm flagged by the Sysmex analyzer in order to account for this noise.

With reference to the white blood cells, we investigated whether a parameter of analysis existed that could aid in the diagnosis of early sepsis. Owing to the fact that white blood cells are responsible for immune function, we proposed that determining a criterion related to leukocyte count may be helpful in detecting this severe pathology. We analyzed white blood cells using a high fluorescence lymphocyte count (HFLC), which measures lymphocytes with RNA in their cytoplasm that release more fluorescence than normal white blood cells. Other studies have related the increased HFLC values with the synthesis of antibodies. Therefore, we analyzed HFLC values in different classes of diseases that lead to a production of antibodies. Our results indicated that HFLC % is not a good parameter for the diagnosis of early sepsis.

Finally, we examined cell population data (CPD) to obtain information on the position, size, dispersion, and localization of the circulating neutrophils, lymphocytes, and monocytes. For the CPD study, we used control patients and patients diagnosed with sepsis. The results showed that different types of CPD indicated significant differences between the control group and the patients with sepsis. Within the CPD, the width of fluorescent neutrophils (Ne-WY) was the best parameter for diagnosing early sepsis, with a cut-off parameter of 623.50, a sensitivity of 92% and a specificity of 80%.





## **1.- HEMOGRAMA**

L'hemograma és una anàlisi quantitativa i qualitativa del recompte cel·lular sanguini en sang perifèrica. És una eina senzilla i útil que permet la detecció, avaluació i seguiment de moltes patologies. Les magnituds presentades en l'hemograma han anat augmentant a mesura que els avenços tecnològics milloren, donant informació útil per l'orientació diagnòstica del pacient.

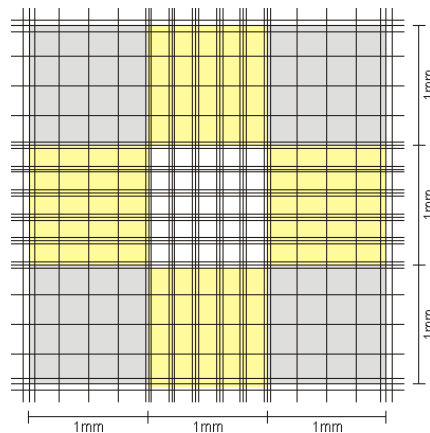
### **1.1 EVOLUCIÓ HEMOGRAMA**

Fins els anys 60 el recompte cel·lular sanguini es realitzava utilitzant pipetes i solucions de dilució i càmeres de recompte o hemocitòmetres. Es diluïa la sang en una solució adequada, que permetia identificar les cèl·lules que es volien comptar i la destrucció de la resta i posteriorment es dipositaven en les càmeres de recompte. El millor tub per fer el recompte cel·lular és el que utilitza anticoagulant com l'àcid etilendiaminotetracètic (EDTA).

Pel recompte d'eritròcits s'utilitzava com a solució diluïdora el líquid de Hayem (format per clorur de mercuri (0,25gr), clorur sòdic (0,50 gr) i sulfat sòdic (2,50gr) en aigua destil·lada (100 mL). Aquest líquid destrueix els leucòcits i manté intacte els eritròcits. En el cas dels leucòcits s'utilitzava el líquid de Türk format per àcid acètic al 2-3% i s'afegeix violeta de genciana. L'àcid acètic hipotònic s'utilitza per destruir els eritròcits i el violeta per ressaltar el leucòcits que es tenyeixen lleugerament. Per les plaquetes, el líquid de dilució utilitzat era l'oxalat amònic a l'1% que destrueixen els hematies i es pot fer el recompte de plaquetes sense interferències.

Les càmeres per comptar les cèl·lules sanguínies s'anomenen hemocitòmetres. El més utilitzat era la càmera de Neubauer (Figura 1) on la distància entre el cobreobjectes i la base de la quadrícula és de 0,1 mm. La quadrícula és un quadrat de 3mm de costat dividit en nou quadrats grans de 1 mm de costat, dividits a la seva vegada en 16 quadrats de 0,25 mm de

costat. El volum total de la càmera és de  $0,9 \text{ mm}^3$  i el volum de cadascun dels 9 quadrats d'1 mm de costat és de  $0,1 \text{ mm}^3$ .



**Figura 1. Càmera de Neubauer**

Arxiu sota llicència Creative Commons. Enllaç disponible a [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neubauer\\_improved\\_schema.gif](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neubauer_improved_schema.gif)

Es diposita una gota del líquid diluït per fer el recompte a la càmera i es deixa que s'ompli per capil·laritat. El recompte de les cèl·lules sanguínies es realitzava amb les fórmules següents:

- ERITRÒCITS. Es compten 5 grups de 16 quadrats petits de la càmera de Neubauer, que son les quatre cantonades i un dels centrals escollit de manera aleatòria:

$$\text{Àrea dels quadrats comptats} = 80 \times 0,0025 \text{ mm}^2 = 0,2 \text{ mm}^2$$

$$\text{Volum de la zona comptada} = 0,2 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,02 \text{ mm}^3$$

$$\text{Número eritròcits} = N \times 1/0,02 \times 200 \text{ (dilució)} = N \times 10.000 \text{ eritròcits} / \text{L}$$

- LEUCÒCITS. Es compten els leucòcits en quatre quadrats grans del reticle de la càmera de Neubauer.

$$\text{Àrea dels quadrats comptats} = 4 \times 1 \text{ mm}^2 = 4 \text{ mm}^2$$

$$\text{Volum de la zona comptada} = 4 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,4 \text{ mm}^3$$

$$\text{Número de leucòcits} = N \times 1/0,4 \times 20 \text{ (dilució)} = N \times 100 \text{ leucòcits} / \text{L}$$

- PLAQUETES. Es compten les plaquetes de 10 quadrats petits, 5 de cada costat de la càmera de Neubauer. Quan el límit de plaquetes sigui inferior a 100, es comptaran més quadrats fins a registrar com a mínim 100 plaquetes.

Àrea dels quadrats comptats=  $10 \times 0,0025 \text{ mm}^2 = 0,025 \text{ mm}^2$

Volum de la zona comptada=  $0,025 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,0025 \text{ mm}^3$

Número de plaquetes=  $N \times 1/0,0025 \times 100$  (dilució) =  $N \times 40.000$  plaquetes / l

Avui en dia s'utilitza pel recompte de líquids biològics però el seu ús pel recompte sanguini ha quedat en desús. (1)

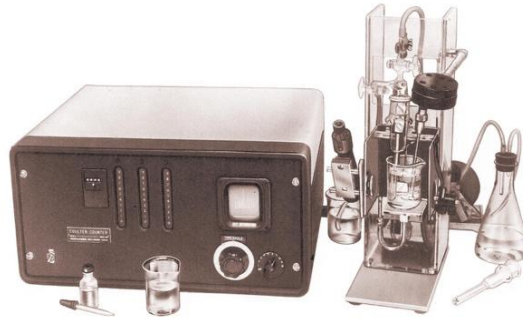
## 1.2. HEMOGRAMA ACTUAL

L'hemograma, conjunt de mesures realitzades en sang total anticoagulada, ens dona una informació àmplia de les tres sèries cel·lulars presents a la sang perifèrica: eritròcits, plaquetes i leucòcits. Dels eritròcits ens dona informació dels seu número absolut, el volum corpuscular mig, amplitud de distribució eritrocitària, la concentració hemoglobina, l'hematòcrit i la concentració hemoglobina corpuscular mitja. De les plaquetes ens dona informació de la quantitat de plaquetes i del seu volum mig. De la sèrie blanca, ens informa de la quantitat de leucòcits i del percentatge i nombre absolut de neutròfils, limfòcits, monòcits, eosinòfils i basòfils (1).

### Mètode d'impedància elèctrica

L'any 1947 l'investigador americà Wallace Coulter aplicà la corrent elèctrica en una suspensió cel·lular de sang a través d'un camp amb dos elèctrodes (Figura 2); les cèl·lules no són bones conductores de l'electricitat degut a la gran resistència de la seva membrana. Quan una cèl·lula suspesa en una dissolució electrolítica travessa una ranura de 50 a 100  $\mu\text{m}$  de diàmetre per la que passa una corrent d'intensitat es produeix un increment de la resistència elèctrica que genera un pols de voltatge i amplitud. La resistència elèctrica del líquid que passa a través de l'orifici es mesura amb dos elèctrodes situats als dos costats. Mentre només passi diluent la resistència és mínima però quan l'orifici sigui travessat per una cèl·lula sanguínia es produirà un augment de resistència i un canvi de potencial en els elèctrodes. L'augment de resistència elèctrica és proporcional al volum cel·lular. Els polsos de voltatge generats se separen per mides. D'aquesta manera és possible determinar les

distribucions de les diferents mides de les poblacions cel·lulars. Aquest és el mètode utilitzat avui en dia pel recompte cel·lular sanguini (1).



**Figura 2. Model A del comptador Coulter**

*Font Coulter Corporation sota llicència Creative Commons.*

### **Mètodes de dispersió de llum (mètode òptic)**

El pas d'una cèl·lula a través d'una petita àrea il·luminada produeix la dispersió de la llum. Aquest fenomen depèn de moltes característiques cel·lulars com la mida, la forma, la orientació i l'índex de refracció. Les cèl·lules sanguínies dispersen la llum a una regió angular estreta en direcció cap endavant. La quantitat de llum dispersada proporciona informació sobre el volum cel·lular (teoria òptica de Mie) (1). Un exemple n'és el recompte de reticulòcits.

### **Citometria de flux**

És una tècnica que s'utilitza per analitzar les propietats fisiològiques i químiques de les cèl·lules. Aquestes es fan passar alineades i una per una per un feix de llum que envia senyals als detectors. Bàsicament proporciona informació sobre la mida i estructura de les cèl·lules segons la dispersió de la llum. La mesura sobre la intensitat de la fluorescència emesa dona informació sobre la complexitat dels diferents tipus cel·lulars. La mesura d'aquests senyals proporciona dades que es representen amb histogrames i amb programes informàtics integrats generen informació molt precisa tant quantitativa com qualitativa dels elements cel·lulars (1).

## Concentració de l'hemoglobina

El mètode de referència de la Societat Internacional d'Hematologia és el de la cianmetahemoglobina. En aquest mètode, la sang es tracta amb una dissolució de ferrocianur potàssic i cianur sòdic la qual cosa provoca que l'hemoglobina es converteixi en cianmetahemoglobina. La intensitat de color produït és proporcional a la quantitat d'hemoglobina present. La lectura es realitza a 540 nm (1).

### 1.3 FORMACIÓ DELS ELEMENTS CEL·LULARS

Per una bona interpretació de l'hemograma cal en primer lloc conèixer el procés de síntesis de cadascuna de les tres sèries sanguínies. **L'hematopoesi** és el procés de generació, regulació, producció i manteniment de les diferents cèl·lules que circulen per la sang perifèrica i es desenvolupen a partir d'una sola cèl·lula mare progenitora en la medul·la òssia (Figura 3).

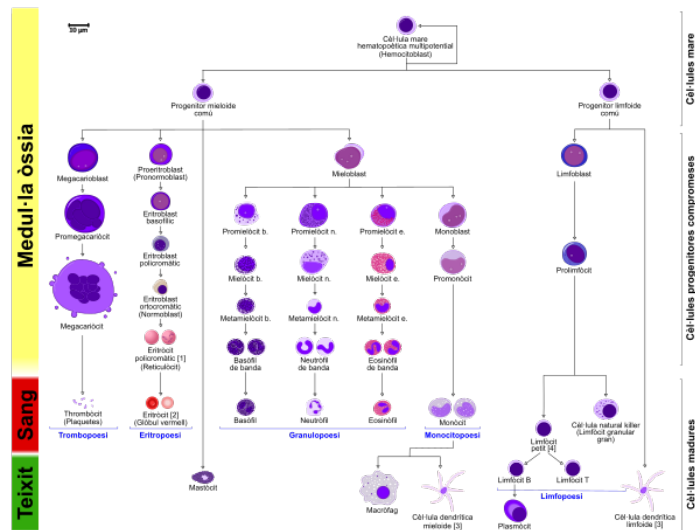
El funcionament normal de l'hematopoesi prové de la interacció entre mecanismes intracel·lulars i la influència del diversos factors que afecten a l'entorn cel·lular on es desenvolupen les cèl·lules hematopoètiques.

El sistema hematopoètic està format per diferents tipus cel·lulars organitzats jeràrquicament. Mentre el desenvolupament i maduració dels precursors té lloc en localitzacions anatòmiques concretes, els elements madurs i en menor mesura els immadurs circulen per la sang perifèrica i per tant es troben distribuïts per tots els òrgans i aparells. Per mantenir unes xifres normals d'aquests elements sanguínies cal un equilibri entre proliferació, diferenciació i apoptosi (mort cel·lular programada).

Totes les línies cel·lulars provenen d'una cèl·lula progenitora anomenada cèl·lula mare hematopoètica (*stem cell*). Aquesta és la que donarà lloc als precursors de les tres sèries hematopoètiques: eritrocitària, granulocítica i megacarcítica. Les cèl·lules mare



expressen de forma característica en la seva superfície l'antigen CD34 una sialmuocina que també expressa les cèl·lules endotelials (2,3).



**Figura 3. Diagrama de la Hematopoesi**

Sota llicència Creative Commons. Enllaç disponible a [https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Hematopoiesis\\_\(human\)\\_diagram\\_es.svg](https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Hematopoiesis_(human)_diagram_es.svg)

El manteniment de les xifres normals dels elements sanguinis requereix un balanç equilibrat entre la seva proliferació, diferenciació i destrucció (3). En l'adult la hematopoesi està regulada tan pel microambient medul·lar com per factors de creixement. El microambient medul·lar està constituït per un conjunt de substàncies químiques, hormonals i diversos tipus cel·lulars com ara fibroblasts, adipòcits, cèl·lules endotelials sinusoidals, osteoblasts, macròfags, mastòcits i cèl·lules dendrítiques. Els factors de creixement són indispensables en el procés de formació de cèl·lules sanguínies i poden actuar sobre la proliferació, maduració i funció de les mateixes. Exerceixen la seva acció a través de receptors de membrana de la cèl·lula diana específica. Fins ara s'han identificat més de 25 tipus de factors de creixement. S'ha comprovat que la majoria d'ells actuen de manera sinèrgica entre ells mateixos. Es poden classificar en tres tipus:

**Factors estimuladors de colònies:** Són citocines que indueixen la proliferació de determinats progenitors hematopoètics. L'eritropoetina, la trombopoetina o el factor granulocític-macròfag en són exemples.

**Factors potenciadors:** no tenen activitat estimuladora pròpia però augmenten considerablement l'acció dels factors estimuladors. Moltes d'elles son interleucines com ara la IL1, IL2 o IL6.

**Factors inhibidors:** Tenen una acció de control sobre la producció normal. Els interferons  $\alpha, \beta, \gamma$ , el factor de necrosi tumoral o el factor transformador de creixement en son alguns exemples (2).

## **2.- ANÀLISI DE LA SÈRIE VERMELLA**

### **2.1.- HEMOGLOBINA I ANÈMIA**

Dels paràmetres de la sèrie eritroide o vermella que inclou l'hemograma, l'hemoglobina és la determinació principal que orienta cap a diferents alteracions d'aquesta línia cel·lular. La mesura de l'hemoglobina s'ha de valorar tenint en compte els valors de referència de normalitat per la població que s'estudia. Una disminució de la concentració d'hemoglobina es coneix com anèmia (Organització Mundial de la Salut, 2016). Per contra, l'excés d'hemoglobina sol anar acompanyat d'un increment en la xifra d'eritròcits (poliglobúlia).

Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS) es considera anèmia quan la concentració de l'hemoglobina es troba per sota dels valors de referència segons edat i sexe (4). La classificació de les anèmies clàssicament respon a la diferència en la mida dels glòbuls vermells essent en microcítiques (mida més petita) , normocítiques (mida normal) i macrocítiques (mida més gran); també però es poden classificar segons la capacitat regenerativa de la medul·la òssia davant la disminució d'hemoglobina a la perifèria, essent regeneratives o perifèriques i aregeneratives o centrals.

Algunes anèmies poden ser hereditàries per defectes enzimàtics com ara el dèficit de glucosa-6-fosfat deshidrogenasa o per defectes de membrana com l'esferocitosi hereditària, si bé la causa més freqüent d'anèmia hereditària es l'alteració quantitativa o qualitativa de l'hemoglobina (hemoglobinopaties).

## 2.2 ESTRUCTURA DE L'HEMOGLOBINA

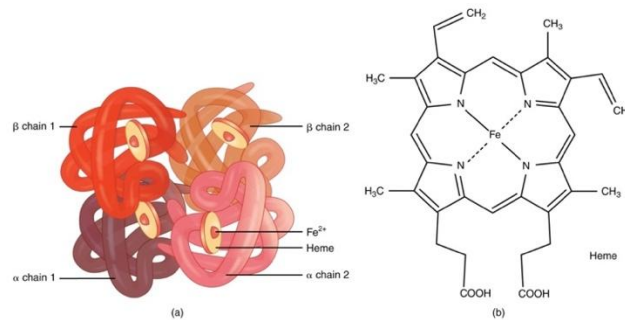
L'hemoglobina humana està formada per proteïnes tetramèriques de dos parells de cadenes de globines que formen una estructura estable a causa dels enllaços que es formen. Cada cadena conté un grup hemo que consisteix en un anell de protoporfirina IX i un àtom de  $\text{Fe}^{2+}$  que ocupa el centre de l'anell, el qual és capaç d'unir-se a l'oxigen. Un angle de  $15^\circ$  entre els dímers permet una oxigenació o desoxigenació gradual de la molècula d'hemoglobina (Hb), depenent de la tensió de l'oxigen en l'àrea que l'envolta. Cada fracció d'hemo pot unir una única molècula d'oxigen i per tant, cada molècula d'hemoglobina pot transportar fins a 4 molècules d'oxigen(5) (Figura 4).

Un adult normal presenta:

-HbA formada per dos cadenes alfa i dos cadenes beta ( $\alpha 2\beta 2$ ) i representa aproximadament el 97% de l'hemoglobina total.

-HbA<sub>2</sub> formada per dos cadenes alfa i dos cadenes delta ( $\alpha 2\delta 2$ ) i representa aproximadament el 2,5 % de l'hemoglobina total.

-HbF que consta de dos cadenes alfa i dos cadenes gamma ( $\alpha 2\gamma 2$ ) i es troba en quantitats molt petites en els adults (<1%)(6).



**Figura 4. Representació esquemàtica de l'hemoglobina**

Sota llicència Creative Commons. Enllaç disponible a [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1904\\_Hemoglobin.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1904_Hemoglobin.jpg)

## 2.3 HEMOGLOBINOPATIES: CONCEPTE I CLASSIFICACIÓ

Les hemoglobinopaties són les alteracions monogèniques més freqüents del món. Es produeixen per mutacions puntuals, delecions o insercions en els gens que codifiquen les cadenes de la globina i que poden causar una alteració qualitativa (hemoglobines estructurals) o una disminució o absència de l'expressió de les cadenes de la globina (talassèmies) (6).

Actualment, segons la web Database of Human Hemoglobins o HbVar (<http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>) hi ha més de 1800 mutacions descrites que produeixen alguna hemoglobinopatia, de les quals més de 1300 produeixen alguna hemoglobinopatia estructural i unes 500 relacionades amb talassèmies.

En general, son desordres autosòmics recessius i l'estat homocigot o doble heterocigot s'associa a una clínica d'una severitat molt heterogènia. Els estats heterocigots solen ser asimptomàtics però poden presentar algunes característiques hematològiques que poden ser útils pel seu diagnòstic.

La complexitat de les hemoglobinopaties prové dels nombrosos tipus de talassèmia i de la quantitat de genotips de les hemoglobines variants que poden interactuar entre elles quan s'hereten conjuntament, creant complexos fenotips hematològics que son difícils d'interpretar amb precisió i que requereixen una ampliació amb anàlisi del DNA per arribar al diagnòstic correcte. A la taula 1 podem observar els tipus hemoglobinopaties que es troben descrites actualment (7).

CLASSIFICACIÓ HEMOGLOBINOPATES	PRINCIPALS TIPUS HEMOGLOBINOPATIES
Talassèmies	$\alpha$ talassèmia $\beta$ talassèmia $\delta$ talassèmia $\beta\delta$ talassèmia $\epsilon \gamma \delta\beta$ talassèmia
Persistència hemoglobina fetal hereditària	Tipus pancel·lular Tipus heterocel·lular
Hemoglobines talassèmiques variants	$\alpha$ variants: Hemoglobina Constant Spring $\beta$ variants: Hemoglobina Lepore, Hemoglobina E.
Hemoglobines variants	Variants de la cadena $\alpha$ Variants de la cadena $\beta$ Variants de la cadena $\delta$ Variants de la cadena $\gamma$

**Taula 1.Principals tipus d'hemoglobinopaties. Font: pròpia**

### 2.3.1 TALASSÈMIES

Les talassèmies son desordres de l'hemoglobina en els quals hi ha una disminució o absència d'alguna de les cadenes de globina, donant lloc a una alteració en el rati entre les dos cadenes de l'hemoglobina. Es classifiquen en funció del gen o gens que estan afectats i si existeix una reducció o una absència de l'expressió genètica. Les talassèmies, de la mateixa manera que les hemoglobines variants presenten una distribució geogràfica característica lligada a factors ètnics i ambientals.

Cada població es caracteritza pel seu propi ventall de mutacions. Moltes d'aquestes mutacions han estat identificades per anàlisi molecular i la seva freqüència ha estat estudiada i publicada (6,7).

#### **$\alpha$ talassèmies**

Cada cromosoma 16 porta dos gens codificats per la globina  $\alpha$ . Així, individus amb  $\alpha$  talassèmia poden tenir diferents nivells de producció d'  $\alpha$  globina, des d'absència total de producció a gairebé nivells normals. S'han identificat més de 100 alteracions genètiques amb fenotips que van des de formes asimptomàtiques a letals. Tot i la complexitat, la severitat d'aquest trastorn està ben relacionat amb el nombre de cadenes no funcionals dels gens  $\alpha$  globina (8).

Quan un dels 4 gens de la cadena  $\alpha$  es troba mutat o deletat ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) s'anomena  $\alpha^+$  talassèmia. Les  $\alpha^+$  talassèmies són els trastorns hereditaris monogènics més freqüents al món. Normalment presenten una reducció o absència d'expressió en un dels dos gens  $\alpha$  ( $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ , HBA1 i HBA2 respectivament). Tot i que la causa més freqüent de les  $\alpha$  talassèmies són les delecions d'un dels dos gens de  $\alpha$  globina, també podem observar  $\alpha$  talassèmies causades per mutacions, petites delecions/ insercions d'alguns dels seus nucleòtids. Aquestes últimes són anomenades  $\alpha^0$  talassèmies no delecionals.

- $\alpha^+$ talassèmies delecionals S'han identificat 11 mutacions delecionals. Les més freqüents són les delecions  $\alpha^{3.7}$  i la  $\alpha^{4.2}$ . En els dos casos el resultat és una reducció del 50% de la síntesis de la cadena provinent de la delecio del gen  $\alpha 2$  de la globina. Es produeixen com a conseqüència d'un intercanvi genètic durant la meiosi, de manera que quan succeeix un cromosoma queda amb un sol gen  $\alpha$  mentre que l'altre queda en un triple gen  $\alpha$ .
- $\alpha^+$ talassèmies no- delecionals La majoria de les mutacions descrites es troben localitzades en el gen  $\alpha 2$  de la globina. Aquestes presenten una reducció de la globina més pronunciada que les produïdes per les delecions. En conseqüència les alteracions hematològiques són més marcades.  $\alpha^+$ talassèmia no-delecional més freqüent és la Constant Spring. Quan el defecte el trobem en dos gens  $\alpha$  es pot produir de dues maneres diferents. Per una banda, que els dos gens  $\alpha$  del mateix cromosoma siguin defectuosos ( $--/\alpha\alpha$ ). Aquesta condició es defineix com  $\alpha^0$  talassèmia i s'observa principalment en individus de sud-est asiàtic ( $--^{SEA}$ ), però també a l'àrea Mediterrània ( $--^{MEDI}$ ,  $--^{MEDI}$ ,  $-(\alpha)^{20.5}$ ). Per altra banda podem trobar que s'expressi només un gen  $\alpha$  de cada cromosoma ( $-\alpha/ -\alpha$ ), condició que es

coneix com a  $\alpha^+$  talassèmia en homozigosi. Les dues condicions son relativament benignes associades a una anèmia microcítica hipocròmica i sovint es poden confondre amb deficiència de ferro.

En el cas de 3 gens  $\alpha$  defectuosos ( $-\alpha/--$ ) ens trobarem amb una sola cadena  $\alpha$  i l'excés de cadenes  $\alpha$  forma homotetràmers ( $\alpha_4$ ). Aquesta fracció no funcional anomenada HbH es pot visualitzar com una Hb ràpida o pic en EC o HPLC, i com a inclusions eritrocitàries quan es tenyeix el frotis de sang perifèrica en blau brillant de cresil. HbH és el resultat de l'estat doble heterozigot resultant de  $\alpha^0$  talassèmia i  $\alpha^+$  talassèmia . La clínica varia d'asimptomàtic a anèmia severa requerint transfusions intermitents. Normalment, els fenotips més severos estan relacionats amb  $\alpha^+$ talassèmies no- delecionals. Quan cap dels gens  $\alpha$  son funcionals ( $--/--$ ) no es pot sintetitzar l'hemoglobina fetal i es formaran homotetràmers de  $\alpha_4$  anomenada hemoglobina de Bart. Aquesta hemoglobina no funcional presenta alta afinitat per l'oxigen i no l'allibera als teixits. Es produeix una fallida del cor al veure's incapaç d'aportar oxigen en els teixits . Com a conseqüència es produeix un edema (*hydrops foetalis*) que és incompatible amb la vida (6,9).

### $\beta$ -talassèmia

En les  $\beta$  talassèmies, l'expressió del gen  $\beta$  en un o els dos al·lells es troba absent, la qual cosa comporta a una deficiència en la síntesis de cadenes  $\beta$  . Depenent del tipus de mutació es pot classificar en talassèmia minor, intermèdia o major.

En la  $\beta$  talassèmia minor, un dels dos al·lells es troba mutat o eliminat donant lloc a una cadena  $\beta$  disminuïda ( $\beta^+$ )o absent ( $\beta^0$ ). Normalment els pacients presentaran una anèmia microcítica, hipocròmica.

La  $\beta$  talassèmia intermèdia (TI) ocorre quan l'expressió dels dos gens  $\beta$  es redueix, tot i que es continua fabricant suficient cadena  $\beta$  . A més, en aquells casos amb una talassèmia major els pacients poden millorar clínicament gràcies a un augment de l'hemoglobina F o a la coexistència d'una  $\beta$  talassèmia associada i donar lloc a una TI. Un altra situació que pot desencadenar una TI és l'associació d'una  $\beta$  minor amb triplicacions

o quadruplicacions dels gens de la cadena  $\beta$ . Els pacients afectats de TI presenten una simptomatologia variable, amb anèmia que no requereix transfusions regulars.

A la  $\beta$  talassèmia major, també anomenada anèmia de Cooley, no es produeix cadena  $\beta$  degut a les mutacions o defectes dels dos al·lels. L'hemoglobina Fetal va disminuint després del naixement i cap els 6 mesos de vida desenvolupen una anèmia severa. La majoria dels hematies son destruïts abans d'arribar a la circulació sanguínia degut al desequilibri entre les cadenes  $\alpha$  i  $\beta$ . Aquests pacients necessiten transfusions de manera regular per tal de compensar l'eritropoesi ineficaç que dona lloc a malformacions òssies i fractures dels ossos llargs i plans de la cara i el crani (característiques típiques dels pacients amb beta major) Degut també a l'eritropoesis ineficaç el fetge i la melsa es troben augmentats de mida. Si no es tracten aquests pacients presenten anèmia severa, debilitat i infeccions. Una de les complicacions de les transfusions és la sobrecàrrega fèrrica com a conseqüència de les transfusions repetides. Aquesta sobrecàrrega causa dany tissular i cel·lular afectant especialment al cor, fetge i glàndules endocrines (6,7).

### **$\delta$ -talassèmia**

El gen  $\delta$  es troba al cromosoma 11 entre els gens  $\beta$ - i  $\gamma$ . És un gen important per la formació de l'hemoglobina A2. És un gen molt similar al gen  $\beta$  però amb molta menys activitat promotora. Existeixen més de 30 mutacions diferents. Els defectes en el gen  $\delta$  no tenen significació clínica però poden comprometre el diagnòstic de la  $\beta$  talassèmia minor (6,7).

### **$\beta\delta$ -talassèmia**

La  $\beta\delta$ -talassèmia es pot classificar en  $(\beta\delta)^+$  i  $(\beta\delta)^0$  depenent de com afecti la mutació o el defecte en els gens  $\beta$  i  $\delta$ . La  $(\beta\delta)^+$  talassèmia inclou la Hb Lepore i trastorns més complexos com a resultat de la presència de dos mutacions diferents dins del mateix gen (Corfu, China  $\delta\beta$  talassèmia...). La  $(\beta\delta)^0$  talassèmia és deguda a grans delecions que inclouen el clúster del gen  $\epsilon\gamma\delta\beta$ , eliminant el gen  $\delta$ - i  $\beta$  i deixant un o els dos gens  $\gamma$  intactes(6,7).



### **Persistència d'hemoglobina fetal hereditària (HPFH)**

La persistència d'hemoglobina fetal hereditària (HPFH) és un grup de trastorns que es caracteritzen per nivells elevats d'hemoglobina F en adults, degut a una persistència de la síntesi de la cadena  $\gamma$ . No presenta clínica associada. Aquesta hemoglobinopatia pot ser causada per més de 25 mutacions diferents incloent-hi grans delecions o mutacions puntuals tant en el gen  $\gamma$  com en la zona promotora del gen  $\gamma$  (6,7).

#### **2.3.2. HEMOGLOBINES VARIANTS**

Són el resultat de mutacions genètiques que modifiquen la seqüència que afecta a la cadena de la globina, causant una substitució, addició o delecio d'un o més aminoàcids. Més infreqüentment pot ser el resultat d'un mal funcionament en l'encreuament entre dos gens durant la meiosi, creant una fusió de proteïnes entre les dues seqüències (Hb Lepore, Hb Kenya). La majoria són causades per mutacions puntuals que causen la substitució d'un o més d'un aminoàcid. La majoria són mutacions que afecten a la cadena  $\alpha$  o  $\beta$ . Una hemoglobina variant per una mutació a la cadena  $\alpha$  comporta hemoglobines variants A, A<sub>2</sub> i F. Una hemoglobina variant per una mutació a la cadena  $\beta$  comporta una hemoglobina variant A.

Les primeres hemoglobines variants descobertes es van categoritzar amb lletres de l'alfabet; a mesura que s'anaven descobrint d'altres variants es va acordar anomenar-les segons el lloc on varen ser descrites per primera vegada.

Actualment existeixen més de 1300 hemoglobines variants diagnosticades per la seqüència del seu ADN o de la proteïna; moltes d'elles però són silents. Presenten simptomatologia quan la mutació resulta amb canvis en la funció, solubilitat, estabilitat o reducció de la síntesi de l'hemoglobina. A la Taula 2 hi ha representades algunes de les propietats afectades d'aquestes hemoglobines. Les hemoglobines variants més freqüents al món són: HbS, HbC, HbE, HbD<sup>punjab</sup> i HbO<sup>arab</sup>.

Propietat	Exemple
Clínicament silent	Hb G-Philadelphia
Alteracions en el transport d'oxigen:	
Baixa afinitat per l'oxigen (possible anèmia lleu)	Hb Kansas
Alta afinitat per l'oxigen (policitemia familiar)	Hb Chesapeake
Anèmia hemolítica (inestable)	Hb Koln
Síntesis reduïda d'Hemoglobina (fenotip talassèmic)	HbE
Drepanòcits	HbS
Metahemoglobinèmia (cianosis familiar)	Hb M-Boston

**Taula 2. Propietats afectades per algunes de les hemoglobínopaties. Font: pròpia**

Tot i que totes elles son recessives, l'estat homozigot de HbS o la combinació de HbS/  $\beta$ , HbS/HbC, HbS/ HbE, HbS/ HbD<sup>punjab</sup> i HbS/HbO<sup>arab</sup>, donen lloc a la malaltia de les cèl·lules falciformes. De la mateixa manera, moltes hemoglobines estructurals que afecten a la cadena  $\beta$ , recessives i asimptomàtiques en estat heterozigot, poden provocar una talassèmia intermèdia o severa quan s'associa a  $\beta$  talassèmia. Degut a que la cadena  $\alpha$  presenta 4 gens, normalment una mutació en algun d'ells presentarà una clínica més lleu (7).

### Malaltia de les cèl·lules falciformes

És l'hemoglobínopatia més freqüent del món i la que presenta un impacte clínic més elevat. Presenta una alta incidència a l'Àfrica de manera que més del 45% de l'Àfrica tropical n'és portadora i fins el 10% de la població afro-americana. Quan es troba en el seu estat homozigot causa la mort de més del 15% dels nens africans menors de 5 anys.

Es produeix per la presència de l'HbS, resultat de la substitució de la base timina per adenina, provocant un canvi de l'aminoàcid àcid glutàmic per valina en la posició 6 del cromosoma 11 de la cadena  $\beta$  de la globina. Aquesta simple modificació és capaç d'induir una profunda alteració de la cadena de la globina, de manera que polimeritza a baixa tensió

d'oxigen, formant de manera irreversible estructures cilíndriques, rígides i insolubles que distorsionen completament l'estructura de l'eritròcit i que adopta la forma de falç (drepanòcit o sickle cell). Aquests hematies falciformes augmenten la viscositat sanguínia per disminució de la seva deformabilitat, i bloquegen la circulació capil·lar en diferents àrees de l'organisme produint microinfarts i acaben sent destruïts prematurament. L'hemòlisi que es produeix es de tipus mixt: extravascular per eliminació dels drepanòcits pel sistema mononuclear fagocític i intravascular per les alteracions de la membrana d'aquests drepanòcits.

Els símptomes varien depenent de si HbS es presenta en estat heterozigot o homozigot, així com per la presència de factors afavoridors (descens de la pressió d'oxigen, deshidratació, acidosis, infeccions) o de moduladors clínics com la interacció de l'HbS amb altres hemoglobinopaties (HbS, HbE, HbO,  $\beta$  talassèmia).

**L'estat heterozigot (HbAS) o tret drepanocític.** Es caracteritza per la pràctica absència de clínica. Només en aquells casos on les condicions externes siguin extremes de deshidratació o hipòxia.

**HbS homozigota (anèmia de les cèl·lules falciformes o drepanocitosis).** Es presenta amb una elevada heterogeneïtat. Es caracteritza per episodis aguts (crisis drepanocítiques) com a conseqüència de dos mecanismes: hemòlisis i crisis vaso-oclusives.

L'expressivitat clínica varia en funció de l'edat. Es produeix una anèmia crònica (que oscil·la entre 7-9 gr/dL) ben tolerada degut a la baixa afinitat de l'Hb S per l'oxigen, que provoca un retard en el creixement, destrucció progressiva d'ossos i articulacions per la hiperplàsia eritrocitària compensatòria, així com litiasis biliar. Donat que les crisis solen ser repetides, els òrgans van claudicant i provoquen insuficiència que afecta al pulmó, ronyó, fetge, i sistema nerviós central. Aquests pacients son més susceptibles a patir infeccions per bacteries encapsulades. Un altre aspecte clínic son les greus crisis de segrest degut a la retenció de grans quantitats de sang en un òrgan i que constitueix una urgència mèdica perquè pot donar lloc a un col·lapse circulatori i la mort en poc temps.

**Doble heterozigosi HbSC, HbSE, HbSD, HbSO<sup>arab</sup>, HbSD<sup>punjab</sup>, Hb S $\beta$ .** Malaltia de les cèl·lules falciformes. Son associacions de hemoglobinopaties on es produeix una doble heterozigosi. En tots els casos estan afectades les dues cadenes  $\beta$  i per tant no es produeix Hb A i presenten una clínica similar a una HbS homozigot però en diferent grau de severitat. Tant en el cas de HbS homozigosi com de doble heterozigosi, el resultat és una malaltia multiorgànica potencialment greu que es presenta en forma d'episodis aguts (6,7). A la Taula 3 es recullen les manifestacions clíniques més importants de la malaltia de les cèl·lules falciformes.

Manifestacions clíniques de la malaltia cèl·lules falciformes
Crisis vaso-oclusives
Anèmia crònica i severa, amb hemòlisis, segrest esplènica i litiasis biliar
Tromboembolisme
Síndrome toràcic agut
Isquèmia
Osteopènia, osteonecrosis
Úlceres a les cames.
Complicacions cardíques
Hipertensió pulmonar
Infeccions
Priapisme
Malaltia renal

**Taula 3. Manifestacions clíniques de la malaltia de les cèl·lules falciformes. Font pròpia**

### **Hemoglobinopatia C**

Es produeix per la substitució de l'aminoàcid glutàmic per lisina en la posició 6 del cromosoma 11 de la cadena  $\beta$  de la globina. És molt freqüent a l'Àfrica Occidental. Provoca un alteració en la càrrega superficial de l'hemoglobina, cristal·litzacions sobretot en casos d'hipòxia, tot i que no produeix les crisis vaso-oclusives de l'HbS. En l'estat heterozigot no s'acompanya de simptomatologia; a l'hemograma destaca certa tendència a la microcitosi, hiper Cromia sense anèmia. En el seu estat homozigot existeix un cert grau d'hemòlisis amb una anèmia moderada. En alguns casos pot presentar litiasis biliar, esplenomegàlia. En el frotis de sang perifèrica s'observen nombrosos dianòcits i cèl·lules de contorns irregulars per la típica cristal·lització de l'HbC (6).

### **Hemoglobinopatia D**

En estat heterozigot és asimptomàtica i només el seu estat homozigot presenta una discreta anèmia hemolítica i moderada esplenomegàlia. L'associació de HbS-D Punjab pot provocar una anèmia falciforme moderada.

### **Hemoglobina E**

En el seu estat heterozigot és asimptomàtica i pot cursar amb microcitosi, moderada poliglobúlia i presència d'abundants dianòcits circulants. En la seva forma homozigota cursa amb intensa macrocitosi, hipocromia i dianòcits i molt poca anèmia, per la qual cosa es confon amb una síndrome talassèmica. L'associació amb una  $\beta$  talassèmia provoca una talassèmia major (6).

## **2.4 - DISTRIBUCIÓ EPIDEMIOLÒGICA DE LES HEMOGLOBINOPATIES**

L'Organització Mundial de la Salut estima que almenys un 5,2% de la població es troba en risc de tenir descendència amb trastorns severos de l'hemoglobina; tanmateix conclou que al voltant del 7% de les dones embarassades són portadores d'una hemoglobina variant i que aproximadament 350.000 nounats presenten formes severes d'aquestes malalties cada any. Tot i que la freqüència més alta d'aquesta malaltia és a

l'Àfrica i altres regions tropicals, els moviments migratoris han estès aquests trastorns a països no endèmics (10).

Avui en dia, existeix una clara evidència de l'inusual alta freqüència de les hemoglobinopaties en comparació amb altres malalties monogèniques, així com la distribució irregular d'aquest trastorns entre els diferents països. Haldane (11) va ser el primer en observar que la distribució geogràfica de les hemoglobinopaties i la distribució de la malària se superposaven en gran part i va publicar la hipòtesis que els individus portadors HbAS o talassèmia havien de tenir una avantatge selectiva sobre els no portadors en termes de supervivència i reproducció en àrees on la malària era endèmica. Especialment la mutació produïda a la cadena beta que causa HbAS dona una protecció contra l'espècie més virulenta de la malària, el *Plasmodium falciparum* (11,12). Respecte als mecanismes de protecció, s'ha postulat que els hematies afectats per HbAS infectats pel paràsit presenten un canvi conformacional que provoca l'actuació de macròfags i cèl·lules T reduint la càrrega parasitària (10). També s'ha dit que aquests tipus de desordres els fan més resistents a les solucions hipotòniques i per tant també poden ser més resistents als esporozoïts de la malària (13).

Altres desordres eritrocitaris associats amb la resistència a la malària són els dèficit enzimàtics com el de la glucosa 6 fosfat deshidrogenasa i el dèficit de piruvat quinasa.

La malaltia de les cèl·lules falciformes és la hemoglobinopatia més freqüent en l'Àfrica sub-sahariana, Orient Mitjà, Índia i l'Àfrica ancestral. Les talassèmies i l'Hemoglobina E són les segones més freqüents i se situen sobretot a l'Àrea Mediterrània, Orient Mitjà, Àsia Central, Índia, sud de la Xina (beta talassèmies) i Orient mitjà, Índia, Sud Est Asiàtic i parts de la regió mediterrània ( $\alpha$  talassèmia i hemoglobina E). Altres hemoglobinopaties menys esteses són l'Hemoglobina C particularment important a l'Àfrica Occidental i l'hemoglobina D més freqüent al Sud Est Asiàtic, Orient mitjà i Índia.

Tot i que les hemoglobinopaties eren escasses als països del Nord i del Centre d'Europa, avui en dia són molt més comuns degut a la immigració des d'àrees endèmiques

i per la pràctica estesa en aquests països del casament consanguini que pot ser practicat per més del 25% de la població. Així doncs, les hemoglobinopaties representen un problema de salut pública on el diagnòstic d'individus portadors o afectats és essencial per poder prendre les accions apropiades per la prevenció i tractament de confort (14).

A Europa hi ha una gran variació respecte a la prevalença d'aquesta malaltia essent molt baixa entre els països Nòrdics, i més elevada en els mediterranis (11,14). A Espanya els estudis epidemiològics publicats han demostrat una distribució geogràfica irregular, amb la prevalença de talassèmies més baixa de tots els països de la conca Mediterrània. D'altra banda, la localització geogràfica i la procedència de diferents tipus de trastorns (anèmia falciforme en raça negra i beta talassèmia en caucàsics) està canviant com a conseqüència del moviment poblacional mundial. Ruano et Ravina (15) descriuen la situació en diferents àrees d'Espanya i destaquen la manca d'un registre d'hemoglobinopaties tant d'adults com de nens. És per aquesta raó que la detecció precoç d'hemoglobinopaties s'ha anat incorporant com a part dels programes del cribratge neonatal en alguns països on la incidència d'aquests trastorns comença a ser un problema de salut pública, com és el cas del Regne Unit o els Països Baixos (15–17).

Mañu et al varen publicar un estudi l'any 2009 on conclouen que Catalunya és la comunitat d'Espanya amb el nombre més elevat de casos de malaltia falciforme (18). La prevalença és molt més alta que a la Comunitat de Madrid on el cribratge en nounats per detectar HbS està implementat des de fa més de 10 anys (19). Un test pilot va ser iniciat a Catalunya l'any 2013 degut a la necessitat per part dels centres sanitaris assistencials de poder diagnosticar de manera precoç els casos d'anèmia drepanocítica. La prevalença d'aquest estudi va ser 1 cada 3909 nounats (0,026%). Aquesta prevalença situa la malaltia de les cèl·lules falciformes com la segona malaltia més prevalent de les actualment incloses al Programa de detecció precoç neonatal (20). A partir dels resultats obtinguts en aquest test pilot, des del gener de 2015, l'Agència de Salut Pública de Catalunya ha incorporat el Cribratge Neonatal de la malaltia de les cèl·lules falciformes de manera dirigida en el seu programa de detecció Precoç Neonatal (21).

Segons l'Institut Estadístic de Catalunya (IDESCAT) del 2004 al 2018, (Taula 4) la població immigrant de Girona era aproximadament del 19%, essent la regió amb l'índex de població no autòctona més alt de Catalunya (21).

	Població	Població estrangera	% sobre la població total
2018	761.947	144.720	18,99
2017	755.716	140.890	18,64
2016	753.576	141.902	18,83
2015	753.054	143.757	19,09
2014	756.156	150.309	19,88
2013	761.632	161.025	21,14
2012	761.627	163.068	21,41
2011	756.810	161.666	21,36
2010	753.046	162.247	21,55
2009	747.782	160.279	21,43
2008	731.864	149.236	20,39
2007	706.185	129.183	18,29
2006	687.331	116.284	16,92
2005	664.506	100.367	15,10
2004	636.198	79.133	12,44
2003	619.692	69.550	11,22
2002	598.112	53.668	8,97

**Taula 4. Evolució de la població total i estrangera a la província de Girona del 2002 al 2018. Font IDESCAT**



	Rest a de la UE	Resta d'Europa	Àfrica	Amèrica	Àsia	Oceania	No consta	Total
2017	2.989	1.087	2.176	4.411	718	55	3.464	14.900
2016	2.817	910	1.677	3.280	639	17	3.425	12.765
2015	2.704	1.026	1.232	2.274	482	17	3.429	11.164
2014	2.517	989	996	1.699	504	21	3.274	10.000
2013	2.068	826	1.160	1.375	426	21	2.913	8.789
2012	2.200	968	1.130	1.630	474	18	3.115	9.535
2011	2.608	1.106	1.854	2.349	917	9	3.749	12.592
2010	2.619	994	1.935	2.314	898	8	3.673	12.441
2009	2.778	1.026	2.851	2.605	1.282	6	2.994	13.542
2008	4.119	1.186	4.733	4.729	1.727	8	3.774	20.276
2007	6.865	1.478	5.885	6.907	1.629	17	2.431	25.212
2006	3.712	3.866	4.356	6.765	1.131	13	3.170	23.013
2005	3.145	3.392	4.468	4.760	1.231	5	2.113	19.114
2004	<b>2.682</b>	<b>3.216</b>	<b>4.063</b>	<b>4.683</b>	<b>818</b>	<b>5</b>	<b>2.209</b>	<b>17.676</b>

**Taula 5. Migracions externes per continent de procedència a l'àrea de Girona del 2004 al 2018. Font: IDESCAT**

Segons els estudis de Piel et al.(22), la immigració procedent de països amb una alta prevalença d'HbS contribueix a estendre la mutació a noves poblacions, provocant que els programes de cribatge siguin cada cop més necessaris. A la Taula 5 s'indica d'on provenen les migracions a la província de Girona segons l'IDESCAT. La gran majoria provenen d'Àfrica i d'Amèrica. La prevalença de portadors d'hemoglobines variants, especialment HbS és molt freqüent en certes zones del continent africà (23) i per tant, és necessari la seva detecció per evitar un increment de la malaltia drepanocítica.

## **2.5 LA IMPORTÀNCIA DEL CRIBATGE D'HEMOGLOBINOPATIES**

L'objectiu del cribatge d'hemoglobinopaties és identificar els seus portadors per poder assessorar a les parelles amb risc de tenir un nen afectat i donar informació sobre les opcions disponibles per evitar-ho. Les hemoglobinopaties son possiblement les úniques

malalties genètiques en el qual és possible detectar portadors utilitzant mètodes bioquímics i hematològics. L'anàlisi del DNA és utilitzat per la determinació de portadors en casos complexes o quan els resultats de les proves hematològiques/ bioquímiques no són clares, com la diferenciació d'una  $\beta^+$  talassèmia homozigosi d'un  $\beta^0$  talassèmia o la identificació definitiva d'una hemoglobina variant. Depenent del país, les parelles amb risc poden optar per una opció reproductiva evitant el naixement d'un nen afectat o preparar-los per la possibilitat de tenir descendència amb alguna hemoglobinopatia severa.

Els factors que cal tenir en compte al plantejar un programa de cribratge per detectar parelles d'alt risc són: coneixement de la freqüència i heterogeneïtat de les hemoglobinopaties en la població diana; coneixement de la freqüència de la malaltia en els països de la població immigrant; coneixement de les correlacions fenotípiques/genotípiques. S'han de tenir en compte els recursos disponibles (tècnics, infraestructura i financers) per escollir la metodologia per identificar els portadors. Factors socials, legals, culturals i religiosos. L'objectiu i el moment del programa de cribratge: nounats, adolescents, prematrimonial, pre-concepcional i estadis prenatals (7).

L'Organització Mundial de la Salut ha proposat i promogut aquests programes de cribratge des dels anys 70. En la resolució respecte les talassèmies i altres hemoglobinopaties l'any 2006 proposava: dissenyar, implementar i reforçar d'una manera efectiva, sistemàtica i apropiada un programa de prevenció i maneig de les talassèmies i altres hemoglobinopaties incloent vigilància i disseminació de la informació, consciència i proposar programes de cribratge en situacions específiques per tal de reduir la incidència, morbiditat i mortalitat associada a aquestes malalties.

La directriu de reduir la incidència i els nounats afectats és clara. Les raons del perquè aquesta posició ha estat adoptada és degut a la història natural d'aquestes malalties. Cal afegir els tractaments cars i exigents que només es troben a l'abast d'una petita part de la població del planeta. La decisió d'adoptar aquests programes de prevenció té la finalitat no només de reduir la despesa perquè és més cost-efectiu prevenir que curar sinó especialment en els drets del pacient que pateix aquesta malaltia.

A Xipre on la prevalença d'aquesta malaltia era 1:1000 per la beta talassèmia homozigota, sense programes com la limitació de nous naixements de persones afectades es va calcular que la prevalença podria arribar a 1:138 en cas que tots els pacients sobrevisquessin. Això comportaria un increment de les transfusions d'un 600% que hagués estat impossible de satisfer. Altres països amb un bon programa de prevenció son Itàlia i Grècia (7).

Hi ha 4 categories principals en els quals està indicat el cribratge, consell genètic i diagnòstic prenatal:

- 1,  $\beta$  talassèmies: Talassèmia major, talassèmia intermèdia (co-herència de 2mutacions  $\beta$  talassèmies incloent-hi  $\delta\beta$ -talassèmia/ Hb Lepore
- 2, Síndromes falciformes: anèmia falciforme deguda a la homozigosi HbSS, o les interaccions causades per HbS/C, HbS $\beta$ talassèmia, HbS/DPunjab, HbS/O-Arab, HbS/Lepore, HbS/HbE.
- 3, Síndromes HbE: HbE/  $\beta$ -talassèmia (co-herència de  $\beta^0$  i mutacions de talassèmies  $\beta^+$ severes amb HbE)
- 4,  $\alpha$  talassèmies. Hb Bart (*hydrops faetalis*)

## 2.6.- DIAGNÒSTIC DE LES HEMOGLOBINOPATIES

Les hemoglobinopaties (HBP) son uns trastorns genètics on els portadors poden ser identificats amb proves hematològiques o bioquímiques bàsiques. L'anàlisi de DNA cal que es reservi per casos complexes o quan el resultat d'hematologia o de bioquímica no esclareixi el resultat (24,25).

### 2.6.1 HEMOGRAMA

El primer pas en l'algoritme diagnòstic és determinar diversos paràmetres hematològics. Els paràmetres a avaluar son: hemoglobina (Hb) , hematies (RBC, *red blood cell*), volum corpuscular mig (VCM), hemoglobina corpuscular mitja (HCM) i amplitud de distribució eritrocitària (ADE). Les tres causes més comuns d'una anèmia microcítica son dèficit de ferro, anèmia de trastorns crònics i talassèmia. A més, la talassèmia pot causar microcitosi sense anèmia (25). L'hemograma ha de ser processat ràpidament un cop arribi

al laboratori. El tub per fer l'extracció cal que porti anticoagulant EDTA. Les mostres poden ser transportades i emmagatzemades a 4°C (24).

El punt de tall en els valors de l'hemograma per sospitar una hemoglobinopatia en adults son VCM per sota de 79fl, i HCM 27 pg. HCM és més fiable que VCM degut a que els eritròcits tendeixen a augmentar de dimensions al pas del temps. De totes maneres, cal que cada laboratori estableixi els seus punt de tall en funció de l'etnicitat i edat de la seva població (24,25).

Els portadors talassèmics sovint presenten anèmia microcítica, hipocròmica, i estudi del ferro normal. Degut a la similitud entre els portadors talassèmics i la deficiència de ferro, molts pacients talassèmics són tractats amb suplementes de ferro abans de realitzar estudis més extensos. Així doncs, nivells de ferritina i el número d'hematies són indicadors importants en el diagnòstic diferencial. En un pacient talassèmic, els nivells de ferritina solen ser normals o lleugerament elevats i el recompte d'hematies es troba normalment elevat en condicions d'àcid fòlic normal per compensar l'anèmia crònica. La morfologia eritrocitària sovint presenta dianòcits, puntejat basòfil i anisopoiquilocitosi (9).

Per contra, la compensació d'un increment de RBC pot ser menys evident en cas de poca ingesta d'àcid fòlic, una vitamina que és essencial per l'eritropoesi. En cas de dèficit, l'anèmia pot ser més acusada i la microcitosi menys evident i pot arribar inclús a desaparèixer (26).

Els hematies que presenten majoritàriament HbF són més grans que els hematies amb HbA. Per això, en els nounats, la microcitosi pot passar desapercibuda. En trets talassèmics associats a HbF elevada ( $\delta\beta$ - or  $\gamma\delta\beta$  talassèmia or HPFH), VCM pot quedar emmascarat (26).

L'ADE mesura el grau d'anisocitosi i permet discriminar entre talassèmia i deficiència de ferro. Cal tenir en compte que ADE es troba alterat en diverses patologies cardíaques i hepàtiques (26–28).

Els portadors de les hemoglobinopaties variants més importants (HbS, HbD, HbO<sup>arab</sup>) si no es troben associades a una  $\alpha$  talassèmia, presenten paràmetres eritrocitaris normals. Individus amb una hemoglobina Lepore, HbC i HbE sovint presenten VCM i HCM baixos. Les hemoglobines amb alta afinitat per l'oxigen (i algunes hemoglobines M) són ineficients per alliberar oxigen als teixits, es produeix un increment de l'eritropoesi provocant una policitèmia. Els leucòcits, el recompte plaquetari, la mida de la melsa, i l'oxigen arterial normalment són normals. Es presenten amb eritrocitosi, macrocitosi i hiper Cromia. A més, calen estudis per descartar hemoglobines inestables ja que algunes hemoglobines d'alta afinitat també són inestables (25).

### 2.6.2 ANÀLISI DE LES FRACCIONS D'HEMOGLOBINES

Segons les guies clíniques de la European Molecular Genetic Quality Network (EMQN) calen almenys dos tècniques de metodologia diferent per la identificació i el diagnòstic prenatal de les hemoglobinopaties. L'ús de la cromatografia líquida d'alta sensibilitat i electroforesis capil·lar maximitzen la detecció d'una hemoglobina variant i minimitzen l'avaluació de falsos artefactes (24).

Tots dos mètodes permeten detectar heterozigots, homozigots, heterozigots compostos de les hemoglobinopaties més freqüents amb elevada sensibilitat i especificitat.

#### **ELECTROFORESI**

És una tècnica que pot ser processada tant amb pH àcids com alcalins. En tots dos casos cal processar un control d'una barreja d'hemoglobines conegudes (HbA, HbF, HbS i HbC) en paral·lel amb les mostres per poder fer una comparació. Després de la separació electroforètica es fa una tinció dels gels. La interpretació es pot fer visual o per densitometria la qual donarà una quantificació precisa de la quantificació de les hemoglobines, tot i que no és molt precís per la mesura d'HbA<sub>2</sub> (7,29)

### **-Electroforesi Alcalina**

L'electroforesi alcalina es processa a un pH de 8,6-9,2 utilitzant gels agarosa o acetat de cel·lulosa. Al introduir un camp elèctric les hemoglobines se separen en funció de la seva càrrega. És un mètode excel·lent per a la separació de HbA, HbA<sub>2</sub>, HbF, HbS i HbC. També es pot detectar HbH. En canvi, algunes hemoglobines variants HbD, HbG, HbE i HbO co emigren al mateix lloc que Hb S i HbC, la qual cosa les fa indistingibles (7,29).

### **-Electroforesi Àcida**

L'electroforesi àcida es processa a un pH de 6,2 en citrat agar o gel d'agarosa. És molt útil per a la separació de les hemoglobines C i E. Les hemoglobines se separen segons la seva afinitat per l'agaropectina i per electroendosmosis. L'hemoglobina C és la que té l'afinitat més gran i migra més cap a l'ànode. Altres hemoglobines tenen menys interacció i migren més cap al càtode per electroendosmosis. Permet fer una bona separació d'algunes hemoglobines variants particularment les hemoglobines amb alta afinitat per l'oxigen que no es poden separar utilitzant l'electroforesi alcalina (7,29).

### **-Isoelectroenfocament**

Separa les hemoglobines en funció de les seves càrregues. El gel que normalment és d'agarosa conté amfòlits amb diferents punts isoelèctrics que creen un gradient de pH després que una corrent d'alt voltatge sigui aplicada. Les molècules carregades negativament migren a través del gradient de pH cap a l'ànode mentre que les positives migren cap al càtode fins que arriben a la zona amb un pH idèntic al seu punt isoelèctric. Aquesta tècnica permet separar de manera precisa HbC de l'hemoglobina O<sup>arab</sup>, i HbS de HbD i HbG (7,29).

### **-Electroforesi Capil·lar (EC)**

En l'electroforesi capil·lar, les substàncies són separades per flux electroosmòtic a través de capil·lars. L'electroforograma es divideix en 15 zones segons els temps d'elució. Les hemoglobines amb càrregues més positives com Hb A<sub>2</sub> migren a la zona 1 mentre que les hemoglobines carregades més negativament, com hemoglobina H migren a la zona 15. En

les mostres on no presenten Hb variants, l'EC proporciona una quantificació fiable de la quantificació de les HbA, HbA2 i HbF i la correlació amb HPLC és satisfactòria.

Generalment, les variants en EC mostren un patró similar que amb electroforesis alcalina. Al contrari que HPLC, l'hemoglobina E queda separada de l'HbA2. Això pot ser útil per diferenciar els casos homozigots, dels casos hemoglobina E/beta<sup>0</sup>. L'EC mostra hemoglobines delta variants que solen ser silents en HPLC i els seus percentatges (7,29).

## **CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ (HPLC, HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)**

En la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC), una fase mòbil líquida juntament amb la mostra, passa per una columna on hi ha un gradient positiu de força iònica. HPLC presenta l'avantatge sobre l'EC que en molts casos, proporciona fraccions d'hemoglobina més precisos. Aquest fet, és especialment important sobretot per la interpretació de l'HbA2 (7,29).

## **INTERPRETACIÓ DELS RESULTATS**

### **Quantificació i interpretació d'Hb A2**

Cada laboratori ha d'establir els seus marges de referència segons la població local i amb valors normals de la sèrie eritrocitària. Sempre cal interpretar el valor d'HbA2 juntament amb els valors de la sèrie vermella. Valors per sobre de 3,7% es consideren fortament suggestius de tret beta-talassèmic (24,29,30). Si no s'observa una HbA2 elevada, i l'hemoglobina corpuscular mitja (HCM) <25 pg, cal considerar l'anàlisi per una  $\alpha$ -0 talassèmia. Es recomana que valors d'HbA2 entre 3,4-3,7% siguin considerats dubtosos, donat que es troben en el límit del valor diagnòstic i repetir l'anàlisi amb nova mostra. A la Taula 6 s'observen possibles causes i interpretacions de l'hemoglobina A2 (25).

HbA2 (%)	INTERPRETACIÓ
>7	Cal excloure Hb variants. Mutació rara de $\beta$ talassèmia
3,8-7%	$\beta$ talassèmia minor Hemoglobina inestable
3,4-3,7%	Dèficit de ferro en pacient amb $\beta$ talassèmia minor Variant $\delta$ amb $\beta$ talassèmia minor (cal mesurar el total de l'HbA2) Interacció entre $\alpha$ i $\beta$ talassèmia Mutació rara de $\beta$ talassèmia Presència d'HbS Error analític com carryover
2-3,3%	Normal $\delta\beta$ talassèmia (si HbF elevada) $\alpha$ talassèmia $\alpha$ i $\beta$ talassèmia $\alpha$ o $\delta$ variant (cal mesurar la totalitat de HbA2)
<2%	$\delta\beta$ talassèmia (si HbF elevada) $\alpha$ talassèmia Malaltia HbH Dèficit de ferro $\delta$ talassèmia o Hb variant de la cadena $\delta$ (cal mesurar tota la HbA2)

**Taula 6. Causes d'increment i disminució de l'HbA2. Interpretació dels valors. Font pròpia**

### Quantificació i interpretació d'Hb F

Els nivells normals HbF han de ser menors a 1% després dels 2 anys d'edat. A la Taula 7 s'explica com cal interpretar un augment dels nivells HbF. En portadors amb HbA2  $\beta$  - talassèmia o portadors de HbS, els nivells Hb F es poden trobar discretament elevats o normals. Quan els nivells d'HbF són superiors a 7-8 % cal pensar en una co-herència d'altres alteracions del gen de la globina (ex. triplicació gen alfa amb beta talassèmia heterozigota) o haplotips específics del clúster del gen beta (variacions del promotor del gen  $\gamma$  com ara polimorfismes Xmn-I promotors del gen G  $\gamma$  o haplotips Arab-Indi o Senegal en portadors d' HbS).



Durant l'embaràs els nivells d'HbF han d'estar al voltant del 3%, fent que els valors entre 3-5% siguin de difícil interpretació. Valors superiors al 5% durant l'embaràs poden indicar la presència d'HPFH heterocel·lular i cal un seguiment 6 mesos després del part per mesurar els valors d'HbF.

HbF es pot trobar homogèniament distribuïda en els hematies o limitada a una subpoblació depenent de la causa. Si és degut a  $\beta$ - o  $\delta\beta$ -talassèmia, els hematies són en general més grans i la microcitosi pot quedar emmascarada. Si és limitat a una subpoblació els valors ADE poden ser més elevats (25).

HbF (%)	INTERPRETACIÓ
>95	Persistència hemoglobina fetal tipus Africà homozigot. Alguns nounats (prematurats).
>45%	$\beta$ talassèmia major Alguns casos de $\beta$ talassèmia intermèdia Nounats
15-45%	Alguns casos de $\beta$ talassèmia intermèdia Persistència hemoglobina fetal tipus Africà heterozigot (normalment HbF >20%)
5-20%	Presència d'algunes hemoglobines variants (ex. HbS) Alguns casos de $\beta$ talassèmia intermèdia Alguns tipus de persistència hemoglobina fetal. $\delta\beta$ talassèmia
1-5%	$\beta$ talassèmia minor Hemoglobines $\alpha$ variants Pacients amb alteracions hematològiques (anèmia aplàstica, síndromes mielodisplàsies, leucèmia mielomonocítica juvenil) Embaràs Persistència hemoglobina fetal no delecional heterozigota
0,2-1%	Resultats normals

**Taula 7. Causes d'increment i disminució d'Hb F i interpretació dels valors. Font pròpia**

## Quantificació i interpretació d'hemoglobines variants

Les alteracions estructurals de l'hemoglobina normalment són degudes a mutacions puntuals que afecten alguna o algunes bases que codifiquen els aminoàcids de les cadenes de globina. Moltes hemoglobines variants són hematològicament i clínicament silencioses degut a que la mutació no causa cap alteració a la funció, solubilitat i estabilitat de la molècula de l'hemoglobina. Existeixen algunes variants estructurals associades a fenotips clínics severes en les seves formes homocigotes i algunes en heterocigot. Moltes d'aquestes hemoglobines poden ser separades per HPLC o EC, però algunes són indetectables. Afortunadament, les variants més comuns que presenten significat clínic o genètic (ex. Hemoglobines S, C, D<sup>Punjab</sup>, E and O<sup>Arab</sup>) són detectables per les tècniques habituals on s'observarà la presència d'un pic anòmal en un temps de retenció diferent a les hemoglobines expressades normalment (30).

Existeixen tests funcionals per detectar algunes hemoglobines variants:

**Test de solubilitat per detectar HbS.** Com a resultat de la mutació de l'àcid glutàmic per una valina en la posició 6 de la cadena beta, HbS presenta una solubilitat molt pobre en condicions de poc oxigen i els glòbuls vermells polimeritzen, de tal manera que la forma dels hematies canvia i es torna rígida i en forma de falç (30).

**Test per detectar la formació de cossos de Heinz.** Pot ser útil per detectar hemoglobines inestables. Les mutacions que produeixen una substitució d'un aminoàcid a prop del grup hemo, o en els punts de contacte amb les cadenes de globina, poden afectar l'estabilitat de la proteïna i provocar la precipitació de les cadenes de globina. Aquests precipitats donen lloc als cossos de Heinz, i estan associats a anèmies hemolítiques sovint agreujades per drogues oxidants. La simptomatologia que presenten aquests tipus d'hemoglobinopaties sol ser molt heterogènia: des de silencioses a anèmies hemolítiques en estat heterocigot. L'Hb Köln és la variant més comú d'aquest grup. Normalment són indetectables amb les tecnologies bàsiques actuals i cal un diagnòstic molecular de confirmació (25,30).

**Test de corba de dissociació d'oxigen.** Poden indicar la presència d'una hemoglobina variant amb afinitat d'oxigen alterada. Hemoglobines amb alta afinitat d'oxigen normalment van associades a una eritrocitosis. Així es pot confondre amb una policitèmia vera i donar el tractament erroni. Per altra banda, hemoglobines amb baixa afinitat d'oxigen són molt poc freqüents (excepció HbS) i normalment van associades a anèmia i cianosis (25,30).

Quantificació i interpretació de les hemoglobines (Hb) quan variants de la cadena beta interactuen amb alfa talassèmia.

Els portadors de variants de la cadena beta (Hb S, Hb D-Punjab, Hb E i Hb C) el percentatge d'hemoglobina variant és directament depenent del número de cadenes alfa. En presència d'  $\alpha$  talassèmia, normalment s'observa una reducció  $< 35\%$  Hb variant tipus HbS, HbD-Punjab i HbC i  $< 25\%$  en casos d'HbE, tot i que els valors poden variar una mica en funció de la tècnica utilitzada pel seu diagnòstic. Cal però una confirmació per què també pot ser degut a la co-herència amb duplicacions del gen alfa (com per exemple, els reordenaments triple o quàdruple alfa). Cal tenir en compte que per algunes Hb variants estables de la cadena beta que presenten més càrrega negativa que HbA, com ara Hb J, la relació és a la inversa, a mesura que el nombre de cadenes alfa decreix, el percentatge de la variant augmenta en presència d'alfa talassèmia (25).

**Errorls comuns relacionats amb la separació i mesura de les fraccions d'hemoglobina.**

1- Valors alts en l' hemoglobina  $A_2$  (Hb $A_2$ ) poden ser trobats en altres condicions que no siguin beta talassèmia. Ex. Hipertiroïdisme, anèmia megaloblàstica, tractaments antiretrovirals (25,30).

2.- En un portador de beta talassèmia, els valors de l'Hb $A_2$  poden quedar emmascarats en presència de coexistir una Hb alfa o delta variant o degut a una alfa o delta talassèmia compromentent el diagnòstic (25,31,32).

3.- La mesura HbA<sub>2</sub> no té significat diagnòstic en presència d'HbA i de Hb variant tipus beta, ja que la presència d'aquestes dos Hb indica que els dos gens tipus beta es troben expressats (25).

4.- A causa del solapament de la fracció hemoglobinaS (HbS), alguns analitzadors sobreestimen el valor d'HbA<sub>2</sub>. Això pot donar lloc a malinterpretació dels resultats. Per altra banda, si el pacient presenta una Hb variant tipus beta i la HbA es troba reduïda o absent, l'estimació de HbA<sub>2</sub> pot ser útil, juntament amb HbF i CBC per discriminar entre Hb variant homozigota i la combinació entre variant i beta-talassèmia (hemozigosis). Cal tenir en compte, que HbA<sub>2</sub> pot estar sobre valorada davant la presència HbS i la microcitosi pot ser deguda a la coexistència d'una alfa talassèmia.

5.- HbS i  $\alpha$ -talassèmia són trets molt habituals en africans i asiàtics, així les combinacions són freqüents. En aquests casos, el nivell de HbS és més baix que en condicions HbS heterozigotes. Així una HbS per sota de 35–40% indica (-a/aa) talassèmia, una HbS entre 25–35% indica (-a/-a) o (-/aa), que és menys freqüent en aquestes poblacions. HbS < 25% pot indicar una associació amb malaltia HbH o un dèficit pronunciat de ferro. La combinació de HbH redueix de manera molt marcada el % de HbC o HbE.

6.- Interferència entre HbA<sub>1c</sub> i variants. Existeixen alguns estudis on descriuen hemoglobines variants que interfereixen amb l'hemoglobina HbA<sub>1c</sub> degut a que tenen el mateix temps de retenció. És el cas de l'hemoglobina HOPE, així com Hb Raleigh, Hb Sherwood Forrest, Hb South Florida and Hb Camperdown. En aquests pacients s'ha d'utilitzar un mètode alternatiu com a seguiment en cas de presentar diabetis associada. Cal ser conscients d'aquelles hemoglobines variants que afecten a HbA<sub>1c</sub> i proporcionar als clínics la informació adequada i les limitacions de les tècniques utilitzades (33).

### 2.6.3. MÈTODES PER L'ANÀLISI DE L'ADN

Per a la confirmació dels resultats obtinguts en l'anàlisi de les fraccions de les hemoglobines, així com el resultat de l'hemograma i els resultats bioquímics, cal un diagnòstic molecular. Existeixen diferents tècniques moleculars per obtenir un diagnòstic final (9).

La seqüenciació directa és considerada la tècnica de referència per detectar totes les mutacions, comuns, rares i no conegudes. No obstant, en moltes poblacions, el nombre de mutacions que causen talassèmia o hemoglobines variants és específic i està ben descrit. Per això en molts casos la utilització d'altres tècniques pot ser suficient per arribar al diagnòstic. En aquelles poblacions on convisquin diferents ètnies potser no es detectarien totes les mutacions i la seqüenciació directa hauria de ser el mètode escollit (34).

### **GAP PCR (GAP- POLIMERASA CHAIN REACTION)**

Aproximadament un 80% de totes les alfa-talassèmies son per causa d'una gran deleció en el gen de l'alfa globina on s'inclou un dels gens alfa (alfa+) o tots dos (alfa<sup>0</sup>). La tècnica de gap PCR s'utilitza per detectar les 7 delecions més freqüents ( $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $-\text{SEA}$ ,  $-\text{MED}$ ,  $\pm(\alpha)^{20.5}$ ,  $-\text{FIL}$  and  $-\text{THAI}$ ) (20). El principi de la gap PCR es basa en l'amplificació de l'ADN utilitzant 2 primers complementaris en la regió de l'ADN on hi ha la deleció. En cas de no haver-hi deleció com que la distància entre els dos primers és massa gran, no s'obtindrà cap producte. La banda només apareixerà si existeix una deleció. L'allargada del producte és indicatiu del tipus de deleció.

*Primers* formats per oligonucleòtids específics en tots dos costats de la deleció són utilitzats per amplificar l'àrea on hi ha hagut el trencament on s'evidencia la mida dels fragments específics delecionats. Per prevenir resultats falsos negatius, un primer addicional molt proper a un dels primers anteriorment mencionats (*breakpoints primers*) són utilitzats per fer de control normal del fragment. La tècnica de GAP PCR es processa amb la presència a cada run, de controls positius per cada una de les delecions, per poder identificar les bandes anormals separades en l'electroforesi amb gel d'agarosa.

Aquest mètode és relativament ràpid i fàcil de processar. Tot i que és un mètode útil per detectar la majoria de les  $\alpha$  talassèmies delecionals, algunes resten indetectables utilitzant aquest mètode (34).

## **SEQÜENCIACIÓ DIRECTA**

Aproximadament un 20% de les  $\alpha$  talassèmies i la majoria de les  $\beta$ - talassèmies estan causades per mutacions puntuals en un dels gens. Aquestes mutacions poden ser identificades a través de la seqüenciació directe de tot el gen de la globina incloent el promotor, tots els introns, eons i el lloc de poliadenació. Seqüenciar el gen complet és relativament fàcil quan ho comparem amb altres tipus de gens perquè el gen de la globina és relativament petit. Aquesta tècnica permet detectar qualsevol mutacions puntuals , petites delecions i insercions i és el mètode de referència pel diagnòstic de les mutacions del gen  $\alpha$  no deleccionals i per la  $\beta$ - talassèmia (9,34).

## **AMPLIFICACIÓ MULTIPLE DEPENDENT DE LA LLIGACIÓ DE SONDES (MLPA)**

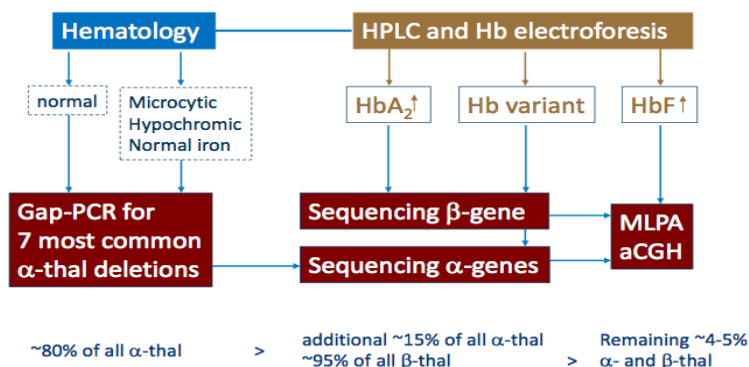
MLPA es basa en l'amplificació de seqüències específiques de l'ADN a través de múltiples sondes i un únic parell de cebadors. La tecnologia és molt similar a la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). MLPA permet detectar delecions o duplicacions del loci analitzat i representa una alternativa vàlida i complementaria al mètode GAP PCR. Existeixen kits comercials per clústers del gen de la globina tant per la cadena  $\alpha$  i  $\beta$ . Per dur a terme aquesta amplificació fem servir una sonda (probe) formada per dos encebadors o primers (oligonucleòtids) que s'uneixen a llocs específics (seqüències diana o targets) i adjacents de la mostra d'ADN analitzada. Aquests encebadors són específics pel caràcter que estem estudiant, i la hibridació només tindrà lloc en cas que en els nucleòtids que el codifiquen no hi hagi cap anomalia (34).

## **ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (aCGH)**

MLPA és una tècnica molt útil pel diagnòstic d'hemoglobinopaties un cop mutacions puntuals i delecions conegudes hagin estat excloses. No obstant, aquesta tècnica no permet conèixer el punt exacte de les delecions perquè la distància entre les sondes varia d'entre uns 100 parells de bases fins a més de 10kb. Tot i que no és essencial saber el punt exacte

de les delecions és interessant des d'un punt de vista científic per conèixer els mecanismes que donen lloc a aquestes delecions. A més, saber el punt exacte permet dissenyar gap-PCR específiques per aquestes mutacions (9).

La combinació de MLPA i aCGH son tècniques relativament fàcils i econòmiques que poden ser utilitzades en laboratori en poblacions amb una alta prevalença de delecions específiques (35). Seguint el diagrama de flux de la Figura 5, una possible estratègia pel diagnòstic de les hemoglobinopaties seria las següent: per a la detecció de les alfa talassèmies primer analitzar primer les 7 delecions més comuns a partir de GAP PCR. En cas de negatiu, caldria una seqüenciació directa del gen alfa i ocasionalment una anàlisi MLPA per detectar delecions més infreqüents d'aquest gen. Per detectar els portadors d'alguna alteració en el gen beta, la seqüenciació directe és la primera opció ja que més del 90% dels defectes d'aquesta cadena son causats per mutacions puntuals en el gen o a prop del gen, seguit d'una anàlisi MLPA per a les delecions menys comuns (34).



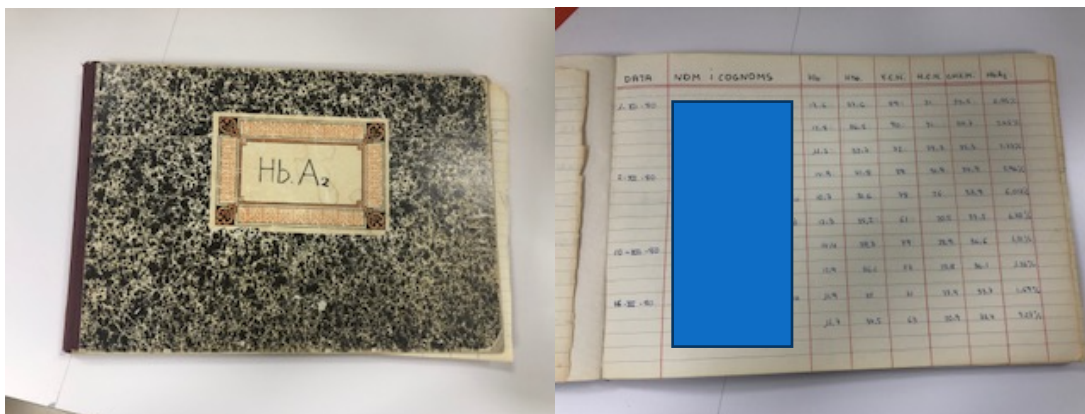
C.L.Harteveld, LUMC

**Figura 5. Diagrama de flux per la detecció de portadors d'hemoglobines.**

Foto cedida per K.Harteveld.

En el nostre laboratori, tenim constància del diagnòstic de les hemoglobinopaties des de l'any 1981. El procediment d'aquestes distava molt del que es realitza actualment. Es realitzava una electroforesis bàsica i es feia el registre en una llibreta on s'anotaven els valors dels paràmetres d'hemoglobina, hematòcrit, volum corpuscular mig, hemoglobina

corpuscular mitja, concentració hemoglobina corpuscular mitja i HbA<sub>2</sub>%. Hem pogut recuperar la primera llibreta on s'anotaven aquestes determinacions ( Figura 6).



**Figura 6.** Llibreta de l'any 1981 on s'anotaven els resultats de l'anàlisi de l'Hb A<sub>2</sub>.

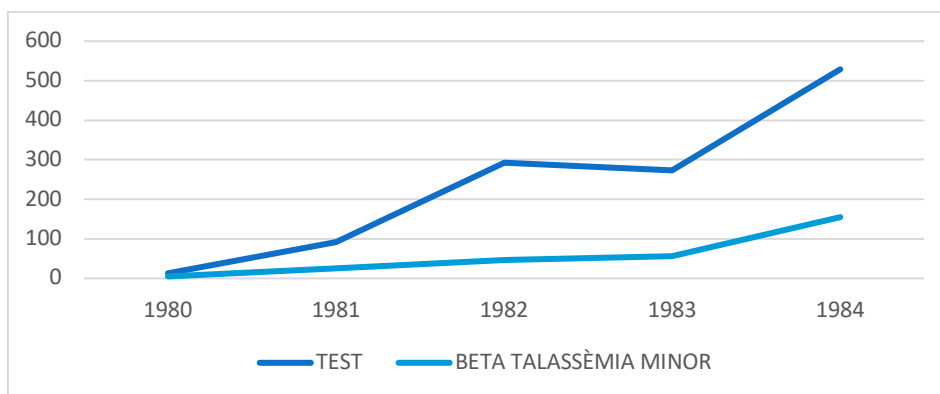
De l'any 1981 al 1984 es varen analitzar 1200 mostres amb el resultat de 287 beta talassèmies minor. A la Taula 8 i es mostren aquests resultats de manera més detallada

ANY	TEST	BETA TALASSÈMIA MINOR
1980	13	5
1981	92	25
1982	292	46
1983	274	56
1984	<b>529</b>	<b>155</b>

**Taula 8.** Resultats de l'anàlisi de beta talassèmia minor realitzades al nostre laboratori del 1981 al 1984.

A la Figura 7 podem observar l'increment de test diagnòstics a principis dels anys 80. Passant de 13 tests realitzats l'any 1981 als 529 tests l'any 1984.





**Figura 7. Resultats de les determinacions per anàlisi de beta talassèmia al nostre laboratori des de 1981 al 1984.**

## **2.7.- RET-HE: UN PARÀMETRE PER AVALUACIÓ DE LES ANÈMIES**

S’han proposat diversos algorismes basats en els diferents índexs eritrocitaris per poder diferenciar una beta-talassèmia d’un dèficit de ferro donat que presenten alteració dels mateixos paràmetres en l’hemograma. Pels d’altres tipus d’hemoglobinopaties no existeix cap magnitud de l’hemograma que ens doni una pista per sospitar aquest tipus de trastorn.

Ret-He és una magnitud que informa del contingut d’hemoglobina en els eritròcits. Actualment, es troba disponible en l’anàlitzador Sysmex® i en Advia® que rep el nom de contingut d’hemoglobina reticulocitària (CHr). Tots dos mètodes presenten resultats similars. Els resultats s’obtenen al mateix temps que s’obtenen els reticulòcits i de moment està considerat un paràmetre d’investigació (36).

En els analitzadors Advia®, l’hemoglobina reticulocitària és el producte de la mesura de la concentració de l’hemoglobina cel·lular i el volum cel·lular dels reticulòcits. Els analitzadors Sysmex® calculen l’equivalent de l’hemoglobina reticulocitària (Ret-HE) a partir de la gràfica de dispersió en funció de la mida cel·lular i del contingut d’ARN, obtingut pel canal de reticulòcits. El terme “equivalent” va ser proposat pel mateix fabricant ja que no és una mesura directa del contingut cel·lular d’hemoglobina (37).

És un paràmetre que s'ha proposat per diagnosticar i supervisar l'anèmia ferropènica ja que reflecteix la disponibilitat de ferro per la eritropoesis. Els hematies tenen una vida de 120 dies. Per tant, detectar les carències de ferro i canvis en el seu estat en el cas de l'eritropoesi únicament és possible en una fase relativament tardana utilitzant els paràmetres clàssics de l'hemograma com l'hemoglobina i el VCM/HCM o amb la mesura dels eritròcits hipocròmics (%Hypo-He).

Els reticulòcits són els precursors dels hematies madurs i són alliberats al torrent circulatori des de la medulla òssia i aproximadament maduren en el curs de dos dies. Per això la mesura dels reticulòcits és una mesura ràpida que dona informació sobre la biodisponibilitat actual de ferro. Un valor baix significa que existeix una carència de ferro o que no es troba disponible per l'eritropoesi. Es pot utilitzar juntament amb la ferritina, un valor de ferritina alt o normal i un valor del Ret-HE baix pot suggerir una carència de ferro funcional, mentre que els valors baixos de ferritina i del ret-he suggereixen un dèficit de ferro. L'interval de referència pel Ret-He és aproximadament de 28-35 pg; un valor per sota es considera un dèficit de ferro.

Actualment s'utilitza aquest paràmetre pel control del tractament amb eritropoetina (EPO) i/ o davant una teràpia amb ferro endovenós. Si el valor augmenta és indicatiu que la teràpia té un efecte positiu. La utilitat clínica, doncs està demostrada i actualment la determinació del Ret-He es recomana a les guies de nefrologia com l'European Best Practice Guidelines (EBPG) i la National Kidney Foundation Kidney Disease Outcome Quality Initiative (NKF KDOQI)(38,39).

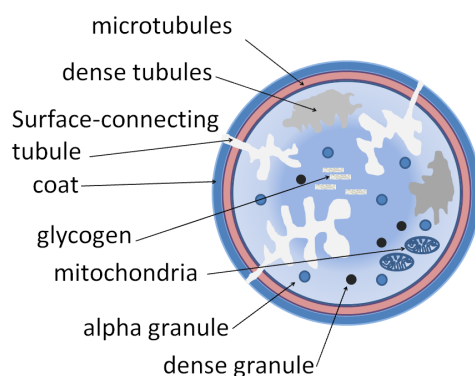
Diversos estudis han demostrat que el valor del Ret-He no queda afectat per interferències fisiològiques excepte en el cas de les talassèmies i macrocitosis/megaloblastosis. En aquests casos el Ret-He no es pot utilitzar com a marcador perquè quan el pacient presenta un d'aquests trastorns, els seus valors són sempre baixos (40). Així, estudis com el de Sudmann et al. varen aprofitar aquesta interferència per demostrar que el ret-He també es podia utilitzar pel cribratge de les talassèmies (36).

### 3.- ANÀLISI DE LA SÈRIE PLAQUETÀRIA: TROMBOPÈNIES

Les plaquetes estan constituïdes per fragments de citoplasma i no tenen nucli, per tant no tenen ADN genòmic, però contenen ARN (ARNm) derivat dels megacariòcits. Es troben envoltades per una coberta glucoproteica que és fonamental en els reaccions d'adhesió i agregació inicials en el procés de l'hemostàsia primària. A l'interior de les plaquetes es diferencien dos tipus de grànuls : densos i alfa. Els primers contenen calci, serotonina, ADP i ATP; en els segons hi trobem factor plaquetari 4,  $\beta$ -tromboglobulina, factor de creixement plaquetari, fibrinogen, fibronectina, factor de von Willebrand, altres factors de la coagulació i mucopolisacàrids.

Altres orgànuls citoplasmàtics contenen enzims hidrolítics (Lisosomes) i catalases (peroxisomes). El contingut dels grànuls s'allibera en el sistema canalicular obert (la invaginació de la membrana plasmàtica). El sistema reticular dens és probablement el lloc de síntesis de prostaglandines i tromboxà  $A_2$  (Figura 8 )(41,42).

Les plaquetes circulants tenen forma discoide, amb dimensions d'aproximadament 2.0–4.0 per 0.5  $\mu\text{m}$ , i un volum mitjà de 7–11 fl. La seva forma i mida petita permet que les plaquetes siguin enviades cap a la perifèria dels vasos sanguinis, col·locant-les en una posició òptima per la vigilància constant de la integritat vascular (43).



**Figura 8. Estructura de la plaqueta**

Sota llicència Creative Commons. Enllaç disponible a [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c5/Platelet\\_structure.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c5/Platelet_structure.png).

En condicions fisiològiques les xifres de plaquetes que circulen en sang perifèrica son entre  $150-450 \times 10^9 /L$ . De la quantitat total de plaquetes, el 70% es manté en la circulació mentre que el 30% restant roman de manera transitòria però constant a la melsa. Les plaquetes circulen per sang perifèrica durant una mitjana d'uns 10 dies. La melsa i el fetge s'encarreguen de retirar la majoria de les plaquetes després de la seva senescència, tot i que una petita fracció s'elimina constantment com a resultat de la seva participació en el manteniment de la integritat vascular.

En l'estat fisiològic normal, les plaquetes circulen sense adherir-se a l'endoteli vascular sa. Quan es presenta alguna alteració en la integritat de l'endoteli vascular o en la força de cisallament del flux sanguini, les plaquetes s'activen. Aquesta activació propicia un paper essencial en les respostes tan benignes com patològiques a lesions vasculars i formació de coàguls. El procés de transformació de plaquetes inactives en un tap plaquetari ben format es pot dividir en tres etapes que ocorren de manera continua:

- a.-Adhesió al subendoteli de la zona lesionada
- b.-Agregació de les plaquetes a nivell de les que s'han adherit a l'endoteli
- c.-Exposició al a seva superfície d'una capa fosfolipídica carregada negativament que servirà de suport per a la cascada de la coagulació i la formació de trombina (43).

Es defineix com trombopènia una xifra de plaquetes  $<150.000 \times 10^9/L$ . La presència d'una trombopènia pot associar-se a manifestacions hemorràgiques diverses com ara púrpura petequíal, equimosis... Les trombopènia es poden classificar en 2 tipus segons la seva etiologia: de causa central (defectes de producció) i de causa perifèrica (per destrucció i/o segrest)(44).

### **3.1.-TROMBOPÈNIES DE CAUSA CENTRAL**

La reducció del número de plaquetes pot ser degut a varies causes: a) disminució de la massa de megacariòcits degut a anomalies primàries de la cèl·lula mare hematopoètica, b) desplaçament de l'hematopoesi normal per infiltració medul·lar, c) fallida medul·lar que

afecta exclusivament als megacariòcit d) defecte en la producció de plaquetes malgrat el número de megacariòcits és normal (trombopoesis ineficaç). Aquí estarien incloses trombopènies associades a defectes nutricionals com l'anèmia megaloblàstica per dèficit de B12 o àcid fòlic, les síndromes mielodisplàstiques, agents químics (clortiazida, alcohol i estrògens ) o físics tòxics per a la megacariopoesi i infeccions víriques (virus del xarampió, citomegalovirus, mononucleosis infecciosa, dengue i hepatitis B) (2,44) .

### **3.2.-TROMBOPÈNIES DE CAUSA PERIFÈRICA.**

Es poden classificar en trombopènies immunes i no immunes .

#### **3.2.1TROMBOPÈNIES IMMUNES**

La unió d'anticossos a les plaquetes, ja siguin produïts de forma específica contra antígens plaquetaris (trombopènies immunes primàries) o en el context d'altres alteracions (trombopènies immunes secundàries) provoquen que siguin retirades de la circulació pel sistema monòcit-macròfag o destruïdes directament en el torrent sanguini per la fixació del complement. Les principals entitats que cursen amb trombopènia son:

- a) Púrpura trombopènica idiopàtica (PTI)** És una malaltia autoimmune caracteritzada per una trombopènia sense alteracions morfològiques de les plaquetes i unes xifres d'hemoglobina i recompte leucocitari normals. La dificultat en el diagnòstic és per falta de tècniques sensibles i específiques. La patogènia d'aquesta malaltia es produeix per un increment de la destrucció plaquetària per presència d'anticossos antiplaquetes i aquests també poden provocar un defecte en la producció de les plaquetes per la unió a megacariòcits. En funció del temps de duració, la PTI es classifica en aguda (inferior a 3 mesos) o crònica.

La PTI aguda se sol observar en nens entre 2-10 anys prèviament sans i després d'una infecció viral o vacunació. En un 70% dels casos es resol de manera espontània generalment en un període de temps que va de dos a vuit setmanes independentment de si reben tractament o no. Les formes asimptomàtiques o amb recomptes superiors a  $20 \times 10^9/l$  no requereixen tractament. En aquelles formes

simptomàtiques o amb recomptes plaquetaris inferiors a  $20 \times 10^9/l$  es tracten amb prednisona oral durant 21 dies. Entre un 5-20% dels nens amb una PTI tindran una malaltia crònica amb una durada superior a 6-12 mesos des del diagnòstic.

La PTI crònica sol tenir un començament insidiós i no se sol associar a un procés desencadenant identificable afectant a individus de totes les edats. S'observa més freqüentment en dones (2:1). Degut a que es van observant remissions espontànies i la potencial toxicitat terapèutica en els individus sense sagnats i amb xifres per sobre de  $30 \times 10^9/l$  cal fer vigilància sense tractament. Si aquest és necessari es comença amb corticoides. En cas de no resposta es pot plantejar com a teràpia de segona línia l'esplenectomia, la qual resulta eficaç en un 60% dels casos. Altres tractaments inclouen agents trombopoètics com el romiplostim o eltrombopag.

- b) **Trombopènies immunes secundàries;** poden aparèixer com a complicació d'una gran varietat de malalties sistèmiques sent habitualment indistingibles de la PTI crònica. Malalties autoimmunes com ara Lupus eritematós sistèmic (LES) presenten trombopènies associades. Fins al 40% dels malalts portadors d'infecció del VIH pot desenvolupar un quadre de trombopènia immune crònica. Altres malalties poden ser la malaltia de Graves, tiroïditis de Hashimoto, la miastènia gravis, malalties del teixit connectiu, malalties inflamatòries intestinals i la cirrosi biliar. Les trombopènies immunes també s'han associat a malalties limfoproliferatives com la leucèmia limfàtica crònica, i limfomes o altres infeccions víriques com ara el citomegalovirus, la mononucleosis infecciosa, l'hepatitis B, l'hepatitis C, la tuberculosi i la toxoplasmosi. El maneig de totes aquestes trombopènies sol ser similar al de la PTI primària.

c) **Trombopènies induïdes per fàrmacs.** Existeixen tres tipus de possibles mecanismes patogènics: immunocomplexes, mecanismes d'adsorció, mecanismes autoimmunes i mecanismes patogènics unificats. Existeixen una gran quantitat de fàrmacs que poden actuar com haptens i induir trombopènia. Pot ser de tipus agut o més insidiós i pot acompanyar-se de leucopènia (quinidina, cimetidina, penicil·lina) o d'anèmia hemolítica immune (paracetamol, penicil·lina). La clínica va

des de lleu púrpura a hemorràgia greu i desapareix després de 1 a 3 dies de la supressió del fàrmac. Destaquem la **trombopènia induïda per heparina**, un quadre greu que pot progressar fins a trombosis severa, amputació o mort. Afortunadament, aquesta complicació és cada cop menys freqüent amb l'ús d'heparina de baix pes molecular. Es tracta d'un quadre immune en el que els anticossos dirigits contra el complex heparina-factor 4 plaquetari causen l'activació plaquetària i endotelial. Per això, en tot pacient tractat amb heparina cal realitzar un hemograma als 5-10 dies post inici. En cas de presència d'aquest quadre cal retirar l'heparina immediatament. Altres fàrmacs provoquen trombopènia per altres mecanismes com d'origen central o dany plaquetari directe, tot i que el mecanisme immune és el més freqüent.

**d) Trombopènies al·loimmunes.** Les trombopènies al·loimmunes son el resultat de l'acció d'alloanticossos que reconeixen antígens específics sobre la membrana de les plaquetes donant lloc a dos entitats clíniques ben definides: trombopènia neonatal al·loimmune i púrpura post transfusional . La trombopènia neonatal al·loimmune és conseqüència de l'alloimmunització materna contra antígens plaquetaris del pare presents en el fetus. L'antigen més freqüent és PLA1, que es troba present en el 97% de la població. Generalment es presenta com una trombopènia greu aïllada en nounats que pot comportar clínica hemorràgica habitualment en forma de púrpura. La mortalitat global és del 13%. La púrpura postransfusional és una síndrome rara caracteritzada per trombopènia greu (destrucció de plaquetes pròpies i transfoses ) degut a la generació d'anticossos contra antígens específics plaquetaris (HPA) que sol aparèixer al cap de 5-12 dies post transfusió sanguínia. Es produeix degut al fenomen de pseudoespecificitat. També hi sol estar implicat l'antigen PLA1.

**e) Trombopènia cíclica perifèrica.** Es caracteritza per fluctuacions extremes dels valors plaquetaris sincrònicament amb la menstruació i amb manifestacions hemorràgiques en els períodes de trombopènies. Es tracta d'una destrucció

plaquetària immune perifèrica, cíclica, produïda per anticossos antiplaquetaris (2,44).

### 3.2.2. TROMBOPÈNIES NO IMMUNES.

#### **a) Microangiopàtiques.**

- La púrpura trombòtica trombocitopènica (PTT) i el síndrome hemolític urèmic (SHU) son dues malalties multisistèmiques que es caracteritzen per l'existència de trombopènia, anèmia hemolítica microangiopàtica, alteracions neurològiques, insuficiència renal i febre. Aquestes alteracions son secundàries a una oclusió difusa de la microvasculatura arteriolar causada per dany endotelial i un augment de l'agregació plaquetària produint una disfunció isquèmica dels òrgans. Clínicament la diferencia entre aquests dos síndromes és el major compromís neurològic en la PTT i en el predomini de la disfunció renal en el SHU. El dany endotelial sistèmic és un element comú tant en la PTT com SHU, que provoca l'alliberació de multímers de factor de von Willebrand (FvW) de mida inusualment gran. En pacients amb PTT es troben deficiències (adquirides o congènites) de l'enzim ADAMTS-13, la proteasa plasmàtica que degrada els multímers de FvW de gran mida. El SHU amb freqüència es produeix en el context d'infeccions bacteriana per *Escherichia coli*, *Shigella* o el pneumococ (2,44).

- La coagulació intravascular disseminada (CID) està ocasionada per una activació generalitzada del sistema hemostàtic cosa que provoca una massiva formació de fibrina en el sistema vascular amb un consum de factors de la coagulació i plaquetes i que pot donar com a resultat una microtrombosis i/o sagnats (coagulopatia de consum). La CID sol ser secundària a l'alliberació de material de tipus tromboplastínic en el torrent circulatori. La característica clínica més freqüent de la CID és el sagnat juntament amb les manifestacions clíniques secundàries a microtrombosis que poden ocasionar alteracions renals, pulmonars o cerebrals.

- Síndrome de HELLP. Durant l'embaràs és freqüent l'aparició de trombopènia. Està causada per l'hemodilució i l'augment de l'aclariment de les plaquetes per la circulació placentària. Pot afectar a un 6-7% de les embarassades i sol rebre el nom de trombopènia



gestacional. És un trastorn que no sol estar associat a risc de sagnat ni en la mare ni el nen. Per contra, les trombopènies associades a trastorns hipertensos de l'embaràs solen ser més greus i clínicament més rellevants com en els casos de preeclàmpsia, i sobretot d'eclàmpsia. Un subgrup d'aquestes pacients pot presentar el síndrome de HELLP (hemòlisis microangiopàtica, elevació enzims hepàtics i trombopènia), quadre greu amb mortalitat materna al voltant de 1-3 % dels casos.

**b) Altres causes adquirides.** Es poden produir trombopènies com a complicació d'infeccions bacterianes, virals, fongs o protozous. Així mateix les trombopènies poden estar ocasionades per segrest i per destrucció a la melsa (hiperesplenisme) o en els grans vasos (síndrome de Kasabach-Merrit o hemangioma cavernós). Aquesta destrucció augmentada es pot veure afavorida per anomalies anatòmiques en el torrent circulatori (cardiopaties, catèters, pròtesis o circulació extracorpòrea) (2,44).

**c) Trombopènies hereditàries.** La majoria de les trombopènies hereditàries com les macrotrombopènies constitucionals pures presenten recomptes de plaquetes entre 50-100 x 10<sup>9</sup>/l, solen ser asimptomàtiques o associar-se a sagnats mínims. Hi ha excepcions:

**Síndrome de Wiskott-Aldrich.** Malaltia que afecta habitualment a nens del gènere masculí caracteritzat per èczema, infeccions recurrents, deficiència immune per fallida en la maduració dels limfòcits i una reducció en la supervivència plaquetària.

**Trombopènia amb absència de radi.** És un trastorn amb presentació en els nounats que cursa amb trombopènia greu, reacció leucemoide i tendència a remissions espontànies. Existeix una disminució dels megacariòcits en la medul·la òssia, el radi es troba absent i les agregacions plaquetàries a epinefrina i col·lagen són deficientes.

**Síndrome de Chediak-Higashi.** S'associa a albinisme oculocutani, infeccions recurrents, grans inclusió granulars leucocitàries i defecte en l'emmagatzemament de grànuls densos plaquetaris. Les agregacions plaquetàries també solen ser defectuoses.

**Síndrome de Bernard-Soulier** Es tracta d'un trastorn autosòmic recessiu caracteritzat per trombopènia variable i plaquetes gegants disfuncionals. Es tracta d'una malaltia amb herència autosòmica recessiva deguda a un defecte del complex glucoproteic de la

membrana plasmàtica GPIb/IX/V, receptor que intervé en l'adhesió a l'endoteli a través de la seva unió al FvW (44).

**Macrotrombopènies genètiques.** S'observa la presència de plaquetes gegants amb una escassa afectació de la funció plaquetària i normalment associada a alteracions extrahematològiques.

**Macrotrombopènies associades a MYH9.** Es produeix per una incapacitat dels megacariòcits per estructurar correctament el seu citoesquelet i mantenir una producció eficaç de plaquetes. Normalment la xifra de plaquetes és superior a  $50 \times 10^9/L$ . El quadre més representatiu és l'anomalia de May-Hegglin que cursa amb inclusions en el citoplasma dels neutròfils similars als cossos de Döhle. La clínica hemorràgica sol ser variable dins d'una mateixa família.

**Macrotrombopènia familiar Mediterrània.** Es tracta d'una trombopènia hereditària generalment lleu, descrita a Itàlia i la península balcànica. Presenten plaquetes de mida més gran de lo normal i recompte disminuït. En alguns casos presenten una mutació en el gen del GPIb. La severitat de la diàtesis hemorràgica és variable i directament relacionada amb el número de plaquetes circulants i la seva funcionalitat (2).

**d) Pseudotrombopènia.** És un fenomen produït in vitro que produeix una aglutinació de plaquetes, produint un descens significatiu del recompte de plaquetes per part de l'analitzador. Va ser descrita per primera vegada l'any 1969 per Gowland. La causa més freqüent és la pseudotrombopènia produïda per l'anticoagulant EDTA. Aquesta aglutinació és causada per anticossos IgG que reconeixen antígens de les plaquetes modificats per EDTA. Altres anticoagulants com citrat, oxalat i heparina també s'han descrit casos similars. Aquest fenomen succeeix tant en pacients malalts com a la població sana amb una prevalença aproximada de 0,1-0,29%. N'ha relacionat amb ni alteracions en la morfologia ni amb la funció plaquetària (29,45,46). La pseudotrombocitopènia per EDTA també s'ha descrit en malalties com la mononucleosis infecciosa, cirrosi hepàtica, sèpsia, i diferents fàrmacs: àcid valproic, anticoagulants orals, antibiòtics com ceftriaxona o levofloxacino, olanzapina i abciximab (46).

Un altre fenomen de pseudotrombopènia relacionat amb EDTA és el satelitisme plaquetari o adhesió de les plaquetes a la superfície dels polimorfonuclears i ocasionalment també en monòcits o limfòcits, ja que pot ser la causa de recomptes automàtics falsament baixos (41,47). Davant d'una mostra amb un recompte de plaquetes baix cal confirmar al microscopi òptic que aquesta trombopènia sigui real. Cal fer un extensió de sang perifèrica tenyida amb May Grünwald-Giemsa (MGG) on s'observaran agregats plaquetaris. Quan s'analitza la mostra amb un altre anticoagulant se solen normalitzar els valors (41).

### 3.3.- DIAGNÒSTIC TROMBOPÈNIES

Cal interrogar i valorar al pacient fent un examen físic per detectar la presència d'epistaxis, gingivorràgies, menorràgies, petèquies, hematomes, femtes amb melena o hematoquèzia. Cal demanar si s'ha produït sagnat davant de traumes, extraccions dentals, cirurgies o parts. És necessari fer un recull sobre els antecedents familiars, antecedents previs de trombopènia o de sagnat, exposició a fàrmacs, vacunes, viatges recents (malària, rickettsiosis, dengue), transfusions recents, ingesta alcohol, tòxics, infeccions virals com VIH, hepatitis i altres.

**Hemograma.** És indispensable per avaluar la presència d'altres citopènies, el recompte diferencial per descartar la presència de cèl·lules patològiques i alteracions de la fórmula. Un examen acurat del frotis és fonamental, ens permetrà descartar una pseudotrombopènia i orientar el diagnòstic segons la presència de macro microplaquetes, fragmentació eritrocitària (esquistòcits), alteracions quantitatives i/o morfològiques d'altres cèl·lules sanguínies (Taula 9).

Cal valorar el volum plaquetari que es troba elevat en les trombopènies congènites i perifèriques, disminuït o de mida normal davant d'un dèficit de producció o segrest esplènic.

Prova	Utilitat
<b>Recompte sanguini</b>	Avaluar altres citopènies ( indispensable pel diagnòstic de PTI) Presència leucocitosi neutrofílica ( podria suggerir causa infecciosa) Limfocitosi ( virasi o síndrome limfoproliferatiu)
<b>Frotis de sang perifèrica</b>	Descartar pseudotrombopènia Morfologia plaquetària Macroplaquetes. Podria suggerir PTI ( quan hi ha una destrucció de plaquetes, coexisteixen plaquetes mida normal amb mida gran) Plaquetes gegants. Podrien suggerir trombopènies congènites. <i>Síndrome de la plaqueta gris.</i> Plaquetes de coloració grisosa amb disminució de grànuls alfa i tendència al sagnat. <i>Bernard Soulier.</i> Mutacions que afecten al gen GPIb- GPIX-V) <i>May-Hegglin</i> i altres síndromes associats a MYH9 ( amb inclusions citoplasmàtiques en els neutròfils) Plaquetes petites. <i>Wiscoth-Aldrcch</i> , plaquetopènia lligada al cromosoma X ( mutació del gen WAS) Morfologia eritrocitària Esquistòcits. Suggereixen microangiopatia (PTT,SHU, CID) Esferòcits. Síndrome de Evans Macrocitosi. Anèmia megaloblàstica, Síndrome mielodisplàstic Dacriòcits. Mielofibrosis Inclusions per paràsits. Malària Morfologia leucocitària Granulacions tòxiques, vacuoles citoplasmàtiques. Sèpsia Pseudopelguer, hipogranularitat. Síndrome mielodisplàstic Blasts. Leucèmia aguda Inclusions citoplasmàtiques. Trombopènies congènites Limfòcits anormals. Virasi o síndromes limfoproliferatius.

**Taula 9. Alteracions de l'hemograma i frotis de sang perifèrica. Font pròpia.**

**Estudi de la coagulació.** Es determinarà el temps de protrombina, el temps de cefalina i D-dímer quan hi hagi sospita de CID, i anticossos antifosfolipídics si hi ha sospita de síndrome antifosfolípid. Quan el recompte de plaquetes i l'examen en el frotis de sang perifèrica sigui normal cal estudiar que no hi hagi un dèficit qualitatiu de plaquetes . Normalment el sagnat cedeix als 3-8 minuts .

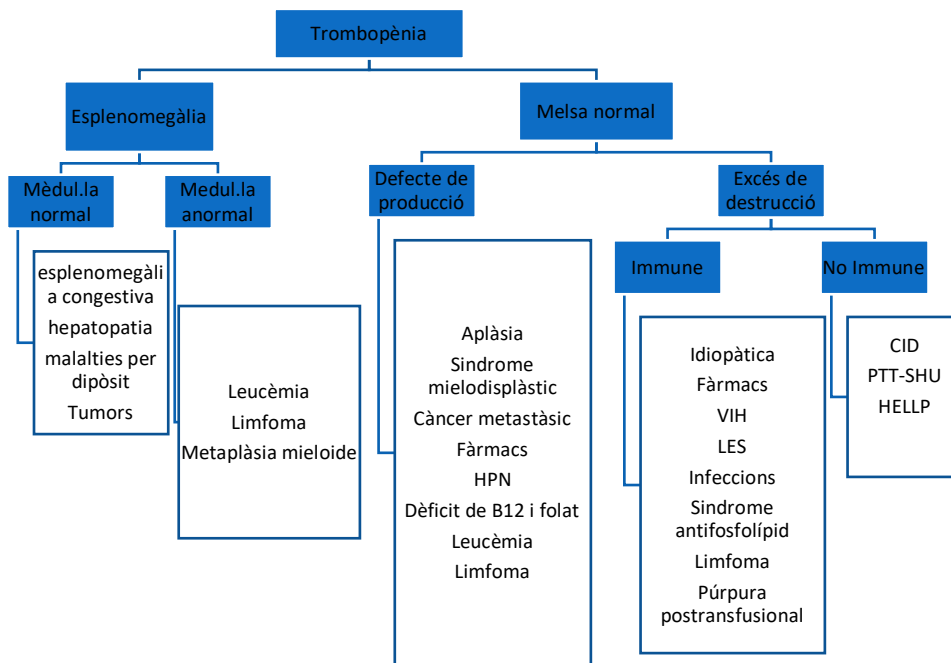
**Bioquímica sèrica.** Determinar la funció renal serà útil davant la sospita de la síndrome hemolítica-urèmica.

**Estudi immunològic.** Davant una trombopènia immune, cal sol·licitar els anticossos antinuclears, ja que de vegades la trombopènia és la primera manifestació d'un trastorn autoimmune (lupus eritematós sistèmic).

**Serologies.** Detecció serològica dels virus VIH, virus Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV) i hepatitis. Caldrà fer un frotis de sang perifèrica davant la sospita de malària .

**Proves d'imatge.** Cal realitzar una ecografia o una tomografia axial computeritzada (TAC) abdominal davant d'una hepatomegàlia o esplenomegàlia palpable o davant d'una limfadenopatia generalitzada.

**Aspirat/ Biòpsia de medul·la òssia.** Ens donarà el diagnòstic definitiu de l'origen de la trombopènia (central o perifèrica). Estarà indicada davant la sospita d'una causa central.



**Figura 9. Valoració clínica de la trombopènia un cop descartada la pseudotrombopènia. Font pròpia**

A la Figura 9 s'observa com enfocar la valoració de la trombopènia segons l'estat de la medul·la i els resultats de les proves de laboratori.

### 3.4 - FRACCIÓ DE PLAQUETES IMMADURES (IPF%)

Les trombopènies adquirides poden ser degudes a una disminució de la seva producció, augment de la destrucció (consum plaquetari), distribució aberrant per dilució, sagnat o esplenomegàlia. La valoració de l'activitat trombopoètica pot ser d'utilitat per la diferenciació entre elles. Malauradament, moltes vegades pel diagnòstic final calen fer proves invasives com un aspirat o una biòpsia medul·lar(48).

Inicialment es va observar que davant de la inducció d'hemorràgia aguda en gossos beagles, s'alliberaven plaquetes on es visualitzaven condensacions puntejades i grolleres que podien ser tenyides amb blau de metilè. Aquestes plaquetes contenien més proporció de RNA i es va suggerir que no fossin les anàlogues dels reticulòcits. Per això es varen anomenar “ plaquetes reticulades”. El nombre de plaquetes reticulades reflectia l'activitat de la trombopoesis, observant com s'incrementava la producció de plaquetes quan hi havia un augment d'aquestes. Així doncs, aquestes cèl·lules podien ser quantificades utilitzant un citòmetre de flux. No obstant, aquest mètode presentava moltes limitacions com ara el cost, la falta d'estandardització i el fet de ser una tècnica molt llarga (49,50). Diversos estudis com Aulet et al o Rinder et al (51,52) varen demostrar que davant un trombocitopènia, les plaquetes amb alt contingut amb RNA correlacionaven directament amb l'activitat megacariocítica. Pacients amb baixa activitat megacariocítica no presentaven augments de RNA en les seves plaquetes mentre que aquells amb alta activitat megacariocítica presentaven plaquetes amb més RNA. Aquest fet, oferia la possibilitat de discernir quan la trombopènia era degut a una baixa producció o a un increment de destrucció o pèrdua de plaquetes sense haver de procedir a una examen del moll de l'os (49).

Amb l'arribada dels nous analitzadors amb nous paràmetres d'investigació, es va pensar que l'IPF podien ser les plaquetes reticulades dels estudis abans mencionats. Estudis com Pons et al varen confirmar que existia una bona correlació entre les plaquetes reticulades i el marcador IPF. La fracció de plaquetes immadures és una magnitud obtinguda pel canal PLT-F de l'analitzador Sysmex® XN. Aquest canal consta d'un citòmetre de flux amb un làser semiconductor. Les plaquetes son marcades específicament. Al realitzar el

recompte, aquelles plaquetes que es localitzen en l'àrea d'alta intensitat de fluorescència son separats com a fracció de plaquetes immadures (IPF) (53,54).

Les IPF tenen un vida mitja curta (<24 hores). S'expressen amb percentatge respecte el total del recompte de plaquetes (%IPF)(55). Segons Sysmex® l'interval de referència es troba entre 1-5% del recompte total de plaquetes (56). Un augment en el número de plaquetes immadures pot suggerir una trombopoesis incrementada mentre que un nombre de plaquetes immadures baix pot suggerir una absència de producció de plaquetes i per tant que la causa de la plaquetopènia sigui d'origen central (48).

En els últims anys, hi ha hagut diversos estudis relacionats amb aquest marcador. Així, IPF és un bon predictor de la recuperació del moll de l'ós després de l'ús de quimioteràpia i transplantaments de progenitors eritropoètics. Els valors d'IPF normalment s'incrementen varis dies abans de que ho facin les plaquetes, i així permet evitar transfusions de plaquetes innecessàries (50).

També ha estat reportat com a marcador cardiovascular. Un increment de els fraccions de plaquetes immadures està associat a un pitjor pronòstic degut que les plaquetes immadures son metabòlicament i enzimàticament més actives que les madures, tenint més activitat protrombòtica (55).

Un altre ús de la fracció de plaquetes immadures que pot proporcionar informació sobre estats inflamatoris. En pacients amb sèpsia l'activitat del moll de l'os es pot veure incrementada tant amb la producció de plaquetes com de precursors mieloides. El mecanisme pot estar relacionat amb l'increment de la producció de citocines durant el procés inflamatori (57).

Valors alts d'IPF també han estat relacionat amb les síndromes mielodisplàstiques. En aquest cas, l'IPF no indicaria regeneració medul·lar, ja que aquestes patologies tenen causa central, sinó que el valor estaria incrementat pel fet que en aquest tipus de patologies les plaquetes poden ser grans i presentar restes de material genètic quan son alliberades a

la sang perifèrica (58,59). Per últim, diversos estudis han analitzat el valor de l'IPF en macrotrombocitopènies familiars com per exemple la de May-Hegglin, relacionada amb el gen MYH9 presenten valors IPF anormalment alts, al voltant del 50% (60).

Una de les principals interferències d'aquest marcador es produeix en presència d'agregats plaquetaris. En aquestes circumstàncies, IPF presenta uns valors falsament elevats degut a que la presència de plaquetes aglutinades que originen un augment de fluorescència que no està relacionat amb la presència d'ARN en el seu interior (61). Per tant és important davant d'una trombopènia amb uns valors elevats IPF caldrà confirmar primerament que es tracta d'una trombopènia verdadera.

### **3.5.- ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT I SENSIBILITAT DE L'ALARMA D'AGREGATS PLAQUETARIS**

El recompte de plaquetes és essencial pel diagnòstic i maneig de les anormalitats relacionades amb el procés de l'hemostàsia. En casos de trombopènia, aquest recompte cal que sigui el més precís possible per poder prendre decisions clíniques adequades (53,62). Quan un pacient presenta recompte de plaquetes inferior a  $10 \times 10^9$  /L es recomana transfusió profilàctica mentre que quan el nombre de plaquetes és de  $20 \times 10^9$  /L només cal transfusió en casos de sagnat o febre. Aquestes diferències tan subtils requereixen d'un mètode precís per la determinació de les plaquetes (62).

El mètode proposat com a referència per International Society Laboratory Hematology (ISLH) pel recompte de plaquetes és la citometria de flux amb múltiples anticossos monoclonals específics de plaquetes (ex. CD41, CD 61) però a causa del seu cost elevat i procediments complicats, no és considerat mètode estàndard per a ús assistencial (53,62).

L'analitzador SYSMEX® XN presenta 3 canals per mesurar les plaquetes:



**-Canal PLT-I.** El mètode de corrent continua es basa en el principi que en un camp elèctric creat per dos elèctrodes de càrrega oposada poden ser utilitzats per determinar la mida de les cèl·lules. Aquest canal no permet diferenciar altres partícules que no siguin plaquetes ja que la metodologia que utilitza per mesurar-les és la mida d'aquestes (53). Així pot incloure en el recompte partícules provocant una sobreestimació en el nombre, o pot no tenir en compte plaquetes gegants donant lloc a una infraestimació del número de plaquetes.

**-Canal PLT-O.** El recompte de plaquetes pel canal òptic es mesura en el canal de reticulòcits. Un colorant de polimetil tenyeix RNA/DNA de les cèl·lules reticulades i els grànuls i membrana de les plaquetes. Aquesta tecnologia permet el recompte al mateix temps de reticulòcits, hematies i plaquetes. Dins la cèl·lula de flux, cada element travessa un feix de llum d'un làser semiconductor que permet la separació de plaquetes, hematies i reticulòcits. Aquesta tinció fluorescent no només permet l'exclusió de les partícules que no siguin plaquetes sinó que permet la inclusió de plaquetes grans o gegants. El canal òptic permet un recompte més precís en les mostres amb plaquetes inferiors a  $100 \cdot 10^9$  /L permeten decisions clíniques més acurades, especialment en els casos de transfusions plaquetàries. Cal tenir en compte, però, que els pacients sota tractament quimioteràpic la impedància és un sistema que proporciona un recompte més acurat probablement degut a la tinció errònia de fragments en apoptosi dels glòbuls blancs(53,63).

**-Canal PLT-F.** EL canal consta d'un citòmetre de flux amb un làser semiconductor. Les plaquetes son tenyides amb oxazina, colorant fluorescent que marca més específicament les plaquetes. Al realitzar el recompte, aquelles plaquetes que es localitzen en l'àrea d'alta intensitat de fluorescència són separats com a fracció de plaquetes immadures (IPF). Diversos estudis confirmen que aquest canal es relaciona amb mètode de referència per citometria de flux amb anticossos específics inclús per aquelles mostres on presenten un recompte baix (53,54,64).

El Sysmex® XN presenta una alarma per discernir agregats plaquetaris (*PLT clumps*) que prové dels càlculs comparatius de diferents mesures provinents de la mida de les plaquetes

(PDW, PL%, PU%, PMFV, PLT, PLCR, MPV, PU). A partir d'un valor determinat (>100), l'alarma d'agregats és reportada per l'instrument.

Degut als casos reportats d'interferències amb el paràmetre IPF quan hi ha agregats plaquetaris, i a que l'analitzador ens proporciona una alarma en cas de la presència d'aquests, volem estudiar la sensibilitat i especificitat d'aquesta alarma i determinar si és útil com a marcador de plaquetes agregades. Un objectiu més específic és estudiar aquesta alarma en pacients amb trombopènia que son els casos que requeriran una acció clínica.

## **4.- ESTUDI DE LA SÈRIE BLANCA: SÈPSIA**

### **4.1.- DEFINICIÓ DE SÈPSIA**

Segons l'últim consens internacional publicat el 2016 es defineix a la sèpsia com la disfunció orgànica potencialment mortal causada per una resposta desregulada de l'hoste davant una infecció (65). És una malaltia que afecta a 100-150 persones de cada 100.000 habitants/any, el que suposa a Espanya amb més de 50.000 pacients/ any dels quals poden morir més d'una tercera part (66).

Desencadenada per l'entrada de microorganismes o de les seves toxines al torrent circulatori, la sèpsia provoca una resposta inflamatòria per part de l'hoste amb pèrdua de l'autoregulació dels mecanismes de defensa i amb la tendència a la hiperproducció de substàncies proinflamatories o mediadors, activadors de la coagulació i fibrinòlisis que interrelacionen provocant el control de la infecció o la seva evolució a sèpsia greu o xoc sèptic (66,67). Avui en dia existeix suficient evidència científica per afirmar que la sèpsia requereix una identificació ràpida i un tractament immediat donat que un retard en el diagnòstic i tractament influeix negativament en l'evolució del procés. Es tracta d'una condició temps dependent on les primeres hores son de vital importància sobretot en les fases més precoces de la malaltia on el tractament és més eficaç (67).

Considerada una emergència mèdica la sèpsia pot progressar ràpidament a disfunció orgànica múltiple i mort malgrat les mesures terapèutiques immediates i agressives (68). Les societats científiques conscients d'aquesta situació varen proposar diversos documents de consens i campanyes centrades en el maneig de la sèpsia en els centres assistencials. La European Society of Intensive Care Medicine, el International Sepsis Forum y la Society of Critical Care Medicine varen iniciar l'any 2002 la campanya de "Surviving sepsis campaign" i la societat espanyola de Medicina d'urgències i emergències (SEMES) juntament amb la societat espanyola de medicina intensiva, crítica i unitats coronàries (SEMICYUC), l'any 2007 varen desenvolupar documents de consens com a guia d'actuació en els casos de sospita de sèpsia (67).

L'aplicació de les mesures recomanades per la Surviving Sepsis Campaign va aconseguir disminuir la mortalitat i morbiditat al voltant del 25% (66).

L'any 2012 a la declaració de Palma de Mallorca es va crear el codi sèpsia, que consisteix en la detecció precoç dels pacients amb sèpsia i l'aplicació immediata i estructurada d'un conjunt de mesures recomanades per diagnosticar, monitoritzar i tractar a aquests malalts i la definició d'uns indicadors assistencials que permetin avaluar el compliment de les recomanacions i els resultats de l'aplicació del codi a nivell local i nacional (<http://www.codi-gosepsis.com/es>) (66).

Davant la dificultat del diagnosticar correctament la sèpsia, hi ha hagut múltiples estudis per propiciar el diagnòstic precoç, un dels quals ha estat la cerca de biomarcadors sensibles i específics. Existeixen diversos estudis on es demostra que la meitat dels pacients que presenta símptomes i signes de sèpsia té un hemocultiu o altres proves microbiològiques positives. Els biomarcadors poden ajudar al diagnòstic i poden ser útils en el monitoratge i evolució del procés infecció. Actualment ja existeixen diversos marcadors de sèpsia però cap d'ells presenta la suficient especificitat i/o sensibilitat per ser utilitzat com a marcador diagnòstic (69).

#### **4.2. EVOLUCIÓ DE LA DEFINICIÓ DE SÈPSIA**

La paraula sèpsia deriva del grec antic [σῆψις] que significa descomposició de material orgànic animal o vegetal produït per bacteris. Hipòcrates [460-370 a.c] va utilitzar el mot "sepidon" per definir "distorsió, dissolució d'una estructura en xarxa". Aquesta definició no va patir cap canvi durant 2700 anys (70).

Tanmateix, davant la inexistència d'una definició o criteris diagnòstics uniformes, l'any 1992 es va publicar una nova definició de sèpsia per intentar uniformitzar els criteris diagnòstics. Criteris que varen provocar controvèrsia des del moment que varen ser presentats (71).

Els avenços en el coneixement de fisiopatologia ha demostrat que les infeccions provoquen una resposta complexa i variable de l'hoste amb mecanismes pro inflamatoris i

antiinflamatoris que poden contribuir d'una banda a l'eliminació de la infecció i recuperació dels teixits i per l'altra a l'afectació d'òrgans i infeccions secundàries; la resposta dependrà del patogen causal (càrrega i virulència) i de les característiques genètiques i malalties coexistents.

La resposta immunitària davant d'una sèpsia segueix un patró de reconeixement mediat per la desregulació del sistema immune seguit de la invasió patògena en la qual existeix un equilibri entre la resposta inflamatòria i antiinflamatòria. La magnitud d'aquesta depèn de múltiples factors com la del patogen causal (càrrega i virulència) i localització de la infecció i de les característiques genètiques i malalties coexistents (72).

**SÈPSIA 1** L'any 1992 es va publicar el primer consens de l'American College of Chest Physicians (ACCP) i per la Society of Critical Care Medicine (SCCM) que va establir el concepte de resposta inflamatòria sistèmica (Sistemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) definida pels criteris definits a la Taula 10 (73).

SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome)
Temperatura $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $<35\text{ }^{\circ}\text{C}$
Pulsacions cardíaques $>90/\text{min}$
Pulsacions respiratòries $>20\text{ min}$ o $\text{Pa CO}_2 < 32\text{ mm Hg}$
Leucòcits $> 12.000 / \text{mm}^3$ o $4.000 / \text{mm}^3$ o $> 10\%$ de bandes.

**Taula 10. Criteris de resposta inflamatòria sistèmica. Font pròpia.**

La sèpsia es defineix com una infecció juntament amb, com a mínim, 2 dels 4 criteris SIRS. En aquest mateix consens s'estableixen noves definicions com a resultat de la continuïtat de la sèpsia o la seva severitat clínica i fisiopatològica: sèpsia severa, xoc sèptic i síndrome de disfunció de múltiples òrgans. L'objectiu d'aquest consens era la de proporcionar una eina o criteris diagnòstics que permetessin fer un diagnòstic de la sèpsia de manera precoç i disminuir l'elevada mortalitat (71) Les deficiències d'aquella primera definició eren que els criteris de SIRS no eren útils pel diagnòstic de sèpsia; no indicaven

necessàriament una resposta desregulada amb risc de mort; i estava present en molt pacients no sèptics .

**SÈPSIA 2** A l'any 2001, la SCCM i the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), la ACCP i l' American Thoracic Society and Surgical Infection Society varen establir el segon consens per revisar la definició i criteris de sèpsia. En aquest consens es varen expandir els criteris de sèpsia i es va augmentar els paràmetres generals, hemodinàmics, paràmetres inflamatoris i de perfusió tissular però no varen haver-hi canvis en les definicions (71,74). La sèpsia es va definir com una síndrome clínica caracteritzada per la presència d'infecció i de resposta sistèmica inflamatòria. Malgrat l'augment dels paràmetres no va haver-hi una diferència entre el diagnòstic proposat per la definició de sèpsia-1 i sèpsia-2, i el diagnòstic entre sèpsia i sèpsia severa donava lloc a confusions. Així, va haver-hi un gran desacord entre els clínics i els investigadors (70).

**SÈPSIA 3** L'any 2016 el grup de Treball de les definicions de sèpsia (Sepsis Definition Task Force) publica el tercer consens Internacional per a la definició de Sèpsia i Xoc Sèptic. Es defineix sèpsia com una disfunció orgànica potencialment mortal causada per una resposta desregulada de l'hoste a la infecció (74).

Aquesta nova definició implica una resposta no homeostàtica de l'hoste a la infecció i inclou el concepte de disfunció orgànica, la qual cosa implica severitat i la necessitat d'un diagnòstic ràpid. Traumatismes, cremades, pancreatitis, dany en la perfusió isquèmica són causes de SIRS no infeccioses. Com que la inflamació a nivell molecular causada per una sèpsia és molt similar a la causada per altres malalties com les anteriors mencionades, de vegades és molt difícil fer un diagnòstic diferencial en els primers estadis de la malaltia. A més, molts pacients amb infecció també presentaven criteris de SIRS, moltes infeccions eren mal diagnosticades de sèpsia. Aquesta nova definició posa de manifest que els criteris SIRS utilitzats en les anteriors definicions depenen de molts de factors i que presenten tant una baixa sensibilitat com especificitat a l'hora de discriminar entre sèpsia i infecció no complicada (70,74). Per tant, en aquesta nova definició de sèpsia desapareixen els criteris SIRS pel diagnòstic de sèpsia i s'utilitzen un nou criteri de puntuació anomenat SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) on s'inclou una sèrie de criteris clínics i de laboratori.

Un score del SOFA és ZERO en aquells pacients sense disfunció orgànica pre existent. A la Taula 11 s'observen tots els criteris i la puntuació per obtenir SCORE del SOFA. Una puntuació SOFA  $\geq 2$  reflecteix una mortalitat aproximada d'un 10% davant una sospita d'infecció. Inclús pacients amb una lleugera disfunció orgànica poden empitjorar ràpidament, posant èmfasis en la severitat de la situació i la ràpida intervenció.

Puntuació SOFA	1	2	3	4
<b>Respiració</b> PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (mmHg)	<400	<300	<200 ---amb suport respiratori---	<100
<b>Coagulació</b> Plaquetes X10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	<150	<100	<50	<20
<b>Fetge</b> Bilirrubina ( mg/dL)	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12
<b>Cardiovascular</b> Hipotensió. Administració de medicaments vasoactius.	Tensió arterial mitja <70	Dopamina $\leq 5$ o cap	Dopamina >5 o norepinefrina $\leq 0,1$	Dopamina >15 o norepinefrina >0,1
<b>Sistema nerviós central</b> Puntuació Glasgow	13-14	10-12	6-9	<6
<b>Renal</b> Creatinina /mg/dL) o flux urinari	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9 o <500	>5.0 o <200

**Taula 11. Puntuació segons els criteris SOFA. Font pròpia**

Un dels problemes d'utilitzar aquest criteri és que pot alentir el diagnòstic degut a que son necessaris alguns paràmetres del laboratori. Per això, en aquest mateix consens es va proposar un sistema SOFA ràpid anomenat qSOFA (quick SOFA) per diagnosticar de manera ràpida la disfunció orgànica en el cas de sèpsia. No requereix de proves de laboratori i es pot utilitzar com a cribratge per pacients amb sospita de probable sèpsia. La Taula 12 resumeix els criteris pel q SOFA.

<b>Criteris Quick SOFA</b>
Freqüència respiratòria $\geq 22$ resp/min
Alteracions del nivell de la consciència
Pressió arterial sistòlica $\leq 100$ mmHg

**Taula 12. Criteris de q SOFA. Font: pròpia**

També queda definida la definició de “Xoc sèptic” com una subcategoria de la sèpsia on s’observen alteracions circulatòries i del metabolisme cel·lular clares com per augmentar considerablement la mortalitat. En canvi, en aquest nou consens desapareix la definició de sèpsia severa.

El grup de treball va reconèixer la necessitat de crear noves definicions sobre sèpsia en poblacions pediàtriques i d'utilitzar criteris clínic que tinguin en compte la variació depenent de l'edat en els respostes fisiològiques de l'edat impossibilitat d'aconseguir un consens total sobre tots els punts. Ni SOFA ni q SOFA son per si sols una definició de sèpsia i senyala que en determinats casos els criteris de SIRS poden ser encara útils per detectar infecció.

### **4.3 FISIPATOLOGIA DE LA SÈPSIA**

Una infecció provoca a l'hoste un seguit de reaccions , les quals desencadenen una resposta produïda per un rigorós equilibri entre resposta inflamatòria i antiinflamatòria al mateix temps. La magnitud de la resposta depèn de múltiples factors, entre els que s'inclouen virulència, lloc d'infecció, la genètica de l'hoste i comorbiditats associades (72). La majoria de les infeccions es controlen primer amb respostes innates i després amb l'actuació de respostes immunitàries. La seva resposta depèn de cada tipus de microorganisme.

Els éssers humans tenim 3 línies bàsiques de protecció contra la infecció.



1.- **Barreres naturals** com ara la pell, mucoses, epiteli ciliat, l'àcid gàstric i la bilis que restringeixen l'entrada a l'organisme.

2.- **Defenses immunitàries innates** que no son específiques contra l'antigen, com la febre, pèptids antimicrobians, interferó, complement, neutròfils, macròfags, cèl·lules dendrítiques i els limfòcits citolítics naturals (NK, natural killer). Proporcionen respostes locals ràpides que actuen en el lloc de la infecció i poden restringir el creixement i la propagació de l'organisme.

3.- **Respostes immunitàries adaptatives específiques contra l'antigen.** Són els anticossos i els limfòcits T, reforcen les proteccions innates, ataquen, i eliminen de manera específica als invasors que aconsegueixen travessar les dues primeres línies de defensa.

Els símptomes i la malaltia sorgeixen quan les funcions de la barrera i les respostes innates no son suficients per controlar les infeccions. Aquestes poden créixer, propagar-se, i causar malaltia durant el període necessari una resposta immunitària específica nova contra l'antigen. La memòria immunitària desencadenada per la infecció o la vacunació prèvies pot activar-se amb suficient rapidesa per controlar la majoria de les infeccions abans que es produeixin símptomes (75).

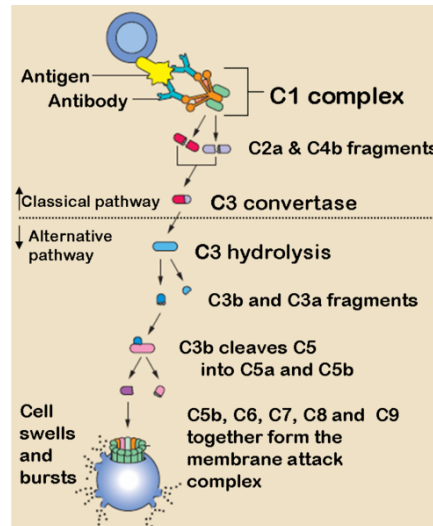
La protecció s'inicia amb l'activació local de les respostes innates i inflamatòries i progressa cap a les respostes de fase aguda i específica de l'antigen a escala sistèmica. Una nova resposta progressa de factors antibacterians solubles (pèptids i complements) a respostes cel·lulars i després a respostes solubles d'anticossos. Les respostes antibacterianes de l'hoste més importants son la destrucció fagocítica a través de neutròfils i macròfags i els anticossos contra les toxines. EL complement i l'anticòs faciliten que els fagòcits absorbeixen els microbis i les respostes dels limfòcits CD4 TH17 i TH1 augmenten i regulen la seva funció. La Taula 13 descriu un resum de les respostes antibacterianes (75).

Elements involucrats a la resposta immunitària contra els bacteris	Funció de la resposta immunitària enfront la infecció
<b>Proteïnes i pèptids antimicrobians</b>	Defensines i altres pèptids que fan malbé les membranes Transferrina, lactoferrina que segresten ferro i altres ions essencials
<b>Complement</b>	Producció de les proteïnes C3a i C5a, opsonització bacteriana C3b, Activació C3d per matar BGN
<b>Neutròfils</b>	Fagocitadors Destrucció bacteriana per mecanismes dependents i independents d'oxigen.
<b>Macròfags activats</b>	Funció fagocítica Destrucció bacteriana per mecanismes dependents i independents d'oxigen. Producció TNF- $\alpha$ , IL1, IL-6, IL-23, IL12 Activació fase aguda i de la resposta inflamatòria Presentació de l'antigen a CD4
<b>Cèl·lules dendrítiques</b>	Producció de citocines de fase aguda TNF- $\alpha$ , IL1, IL-6, IL-23, IL12; IFN- $\alpha$
<b>Cèl·lules T</b>	Activació de la resposta CD4 davant dels diferents estímuls microbians
<b>Anticòssos</b>	

**Taula 13. Resum de les respostes bacterianes. Font pròpia.**

Un cop passades les barreres, les superfícies de les cèl·lules bacterianes activen les vies alternatives o de la lectina del complement presents en el líquid intersticial i sèrum. El sistema del complement és una defensa antibacteriana precoç molt important. La via alternativa del complement (properdina) s'activa a través de l'escissió i unió del C3 a les superfícies bacterianes. La unió de la proteïna lligadora de manosa als polisacàrids activa la via de la lectina del complement. Quan ja hi hagin presents immunoglobulines tipus IgM o IgG s'activarà la via clàssica del complement. Les tres vies convergeixen en l'escissió del C3 en C3a, C3b i C3d i posteriorment en la generació del complex d'atac de la membrana

(MAC). Aquest pot destruir directament les bactèries gram negatives i no tant les gram positives degut principalment al peptidglicà de la bactèria gram positiva. La Figura 10 s'observa l'activació de la via del complement .



**Figura 10. Les vies clàssica i alternativa del complement.**

Sota llicència Creative Commons [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Complement\\_pathway.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Complement_pathway.png).

Les molècules de la paret cel·lular bacteriana (àcid teicoic, lipoteicoic, i fragments de peptidglicans de les bactèries gram positives i lípids A del lipopolisacàrid (LPS) de les bactèries gram negatives s'uneixen i activen als receptors per al patró molecular associat a microorganismes patògens (PAMP). Aquests components estimulen els receptors tipus toll (TLR) que són proteïnes que activen la resposta innata. Existeixen 11 tipus diferents de TLR. Així la unió de paret bacteriana o superantigen als receptors TLR i a receptors PAMP activen a les cèl·lules dendrítiques, macròfags, limfòcits B i altres cèl·lules (endotelials i epitelials), resultant en l'activació de l'inflamasoma i promou la producció de citocines (incloent la IL-6, i el factor de necrosi tumoral (TNF) alfa. Aquestes dues proteïnes augmenten la resposta inflamatòria estimulant canvis en els teixits locals, promovent la diapedesi dels neutròfils i macròfags cap a la zona i activant aquestes cèl·lules i respostes sistèmiques. Tant IL1 com TNF alfa són pirògens endògens que promouen la febre i la resposta de fase aguda. Aquesta resposta promou canvis que reforcen les defenses de l'hoste com la febre, anorèxia, somnolència, canvis metabòlics i la producció de proteïnes, com ara la proteïna C reactiva (PCR), components del complement, proteïnes de la

coagulació, proteïnes lligadores del LPS, proteïnes de transport, inhibidors de proteases i proteïnes d'adherència.

La PCR forma complexes amb els polisacàrids de nombroses bacteries i fongs i activa el complement, la qual cosa facilita l'eliminació d'aquests microorganismes a través d'una major fagocitosis. Les proteïnes de fase aguda reforcen les defenses innates davant d'una infecció. Aquesta inflamació aguda local desencadena una expansió dels capil·lars i l'increment del flux sanguini. Els leucòcits entraran amb més facilitat i proporcionaran accés al líquid i a les proteïnes del plasma. Les cinines i factors de la coagulació induïts pel dany tissular (per exemple el factor XII, bradixinina i fibrinopèptids) també participen en la inflamació. Aquests factors augmenten la permeabilitat vascular i són quimiotàctics pels leucòcits.

Productes del metabolisme de l'àcid araquidònic també influeixen sobre la inflamació. La ciclooxigenasa 2 (COX-2) i la 5-lipooxigenasa converteixen l'àcid araquidònic en prostaglandines i leucotriens. Tot i que els processos de la inflamació són beneficials per acabar amb l'organisme també provoquen dolor, eritema, calor, edema i promou el dany tissular. El dany inflamatori es deu sobretot als neutròfils (75).

## **RESPOSTA FAGOCÍTICA**

Els neutròfils són les primeres cèl·lules que arriben a la zona de la infecció. A continuació arriben els macròfags. El reclutament de caiats o bandes de neutròfils procedents de la medul·la òssia està indicat per una desviació a l'esquerra en el hemograma. Els macròfags i la resposta dels TH17 incorporen i activen als neutròfils.

La bacteries s'uneixen als neutròfils i el macròfags a través de receptors els glúcids bacterians (lectines, receptors per la fibronectina (*Staphylococcus aureus*) i receptors per les opsonines., incloent el complement (C3b), PCR, proteïna lligadora de manosa i la porció Fc de l'anticòs. Després de la unió una secció de la membrana plasmàtica envolta la partícula, la qual forma una vacuola fagocítica al voltant del microbi. Aquesta vacuola es fusiona amb els lisosomes primaris (macròfags) o grànuls (PMN) per permetre la inactivació

i la digestió del contingut de la vacuola. L'acció citolítica fagocítica pot dependre de l'oxigen o no.

El neutròfil mata als microbis fagocitats a través d'una citòlisis i de l'alliberació de grànuls que alliberen lisozima i lactoferrina. Aquestes proteïnes destrueixen les bactèries gram negatives destruint la seva integritat cel·lular. Per a les bactèries gram positives les destrueix per mecanismes depenent de l'oxigen. L'òxid nítric és produït pels macròfags activats i té activitat antimicrobiana. Els neutròfils contribueixen a la inflamació de diverses maneres: alliberant prostaglandines, leucotriens, augmentant la permeabilitat vascular, provocant edemes i estimulant els receptors del dolor. Durant la fagocitosis poden vessar el seu contingut i fer mal bé el teixit tissular. Els neutròfils tenen vides curtes i al morir alliberen una xarxa adherent d'ADN (trampa extracel·lular del neutròfil) i produeixen pus.

Els macròfags tenen vies més llargues i s'activen per IFN gamma per destruir els microbis fagocitats. El factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF), el TNF i la limfotoxina mantenen l'acció antimicrobiana. Els macròfags esplènics són importants per eliminar bactèries, especialment les encapsulades de la sang (*Neisseria meningitidis* i *Streptococcus pneumoniae*) (75).

## **RESPOSTA ESPECÍFICA CONTRA L'ANTIGEN A L'EXPOSICIÓ BACTERIANA**

A l'ingerir les bactèries i després que els components bacterians (PAMP) estimulin als TLR, les cèl·lules de Langerhans i les cèl·lules dendrítiques maduren, i deixen de fagocitar i es mouen cap als ganglis limfàtics per processar i alliberar els antígens interioritzats i presentar-los en els limfòcits T. Aquests pèptids antigènics es troben units al complex major d'histocompatibilitat tipus II (MCH II) i les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) les presenten als limfòcits T CD4, TH10 verges. Els limfòcits TH0 constitueixen el primer estadi. Els limfòcits T CD4 s'activen a través d'una combinació de:

-pèptid antigènic presentat per MCH II amb el receptor del limfòcit T per l'antigen (TCR) i amb el CD4.

-senyals co estimuladores proporcionades per un número suficient d'interaccions de les molècules B7 de les cèl·lules dendrítiques amb les molècules CD28 dels limfòcits T

- IL-6 i altres citocines produïdes per les cèl·lules dendrítiques. Els limfòcits TH0 produeixen IL-2 IFN gamma i IL4

De manera simultània, les molècules bacterianes amb estructures repetitives interaccionen amb els limfòcits B activant la producció de IgM. EL LPS i també el component C3d del complement activen als limfòcits B i promouen respostes específiques d'anticossos IgM.

La conversió dels limfòcits TH0 en limfòcits TH17 i TH1 inicia la resposta de l'hoste (resposta pro inflammatòria). Les citocines de fase aguda IL-1 i TNF alfa juntament amb el factor de creixement TGF beta promouen el desenvolupament dels limfòcits T CD4 TH17. Els limfòcits TH17 produeixen IL-17 i TNF alfa per activar les cèl·lules epitelials i els neutròfils a més la producció de pèptids antimicrobians. Les respostes TH17 son importants per al es respostes antibacterianes precoces.

Les cèl·lules dendrítiques produeixen IL12 promouen les respostes TH1. Els limfòcits T CD4 TH1

- Promouen i reforcen les respostes inflammatòries i el creixement de limfòcit T i B.
- Estimulen als limfòcits B per la producció d'anticossos i maduració cap a les cèl·lules plasmàtiques i de memòria.

Els limfòcits T CD8 faciliten l'eliminació d'infeccions intracel·lulars. La resposta inflammatòria causada per una infecció sol estar regulada per un mecanisme compensatori antiinflamatori. Les respostes dels limfòcits T CD4 TH2 (resposta antiinflamatòria) es poden activar als mateix temps que els limfòcits T CD4 TH1 i produeixen IL4, IL5, IL6 IL10 i IL13, la qual cosa augmenta la producció IgG. La resposta antiinflamatòria es produeix per l'alliberació de citocines antiinflamatòries com IL4 i IL 10 i antagonistes de receptors de citocines. Aquestes inhibeixen l'expressió de molècules d'adhesió, de factor tissular i els efectes vasculars mediat per òxid nítric, leucotriens i radicals lliures d'oxigen a més de modular la funció dels limfòcits T, macròfags i la síntesis d'immunoglobulines i citocines compensadores. Aquesta resposta vindrà produïda per la diferenciació que es produeixi dels limfòcits TH0 en TH1 (pro inflamatoris) o TH2 (antiinflamatoris)(75).

Els anticossos són la protecció principal contra les bacteries extracel·lulars i les toxines, promouen la seva eliminació i eviten les bacteries es propaguin a la sang (septicèmia). L'anticòs promou l'activació del complement, opsonitzen les bacteries per a la fagocitosis, bloqueja l'adhesió bacteriana i inactiva les exotoxines i les proteïnes citotòxiques produïdes per les bacteries.

Una resposta primària específica contra l'antigen en la infecció bacteriana triga de 5-7 dies. El moviment de les cèl·lules dendrítiques al gangli limfàtic pot trigar de 1 a 3 dies i després hi ha l'activació, expansió i maduració de la resposta.

En la reexposició les cèl·lules plasmàtiques de vida llarga poden produir anticossos. Els limfòcits T memòria poden respondre ràpidament a la presentació de l'antigen per les cèl·lules dendrítiques, els macròfags o els limfòcits B. Els limfòcits B memòria responen en 2-3 dies (75). Les citocines pro inflammatòries tenen diferents efectes en els òrgans que de no ser controlat pot acabar en la disfunció orgànica. L'activació de les respostes inflammatòries i de fase aguda poden provocar lesions tissulars i sistèmiques significatives.

L'activació dels macròfags i les cèl·lules dendrítiques en el fetge, la melsa i la sang a través de l'endotoxina port promou l'alliberació de citocines de fase aguda a la sang, la qual cosa provocarà molts dels símptomes de la septicèmia, entre ells el fracàs hemodinàmic, xoc i mort.

La funció de l'endoteli en la fisiopatologia de la sèpsia és de gran importància. La cèl·lula endotelial no només està implicada en l'activació de la resposta inflammatòria sinó que molts dels mediadors que es produeixen en aquesta resposta afecten la funció de l'endoteli. La cèl·lula endotelial té 4 funcions bàsiques:

- 1.- control de la coagulació mantenint un balanç entre la coagulació i la fibrinòlisis.
- 2.- regulació del to vascular.
- 3.- control de la permeabilitat vascular.
- 4.- regulació de l'adhesió i migració dels leucòcits i macròfag i de l'activitat inflammatòria.

Durant el procés sèptic aquestes funcions es veuen alterades i en conseqüència. Es produeix una activació de la coagulació i disminueix la fibrinòlisis afavorint la formació de microtrombosis. Indueix una vasodilatació sistèmica refractària i una vasoconstricció capil·lar excessiva disminuint així la perfusió tissular (hipoperfusió tissular). S'associa a una alteració de la permeabilitat vascular (vasodilatació) que resulta en una disminució del volum intravascular i per tant en més hipoperfusió tissular i amplifica el procés inflamatori que s'associa amb disfunció mitocondrial i mort cel·lular (76,77).

Tot i que la IL-1 IL6 i el TNF alfa estimulen les respostes protectores en una infecció local, aquestes mateixes respostes poden suposar una amenaça per a la vida quan s'activen per una infecció sistèmica. Els anticossos produïts per antígens bacterians que son similars a proteïnes humanes poden desencadenar accions autoimmunitàries. Els superantigens són molècules que s'uneixen a les cèl·lules presentadores d'antigen (CPA). Aquestes s'uneixen al complex major histocompatibilitat tipus II (MCH II) i també a les cadenes  $V\beta$  dels receptors de cèl·lules T, desencadenant la producció massiva de citocines pro inflamatòria (78). L'activació inespecífica dels limfòcits CD4 mitjançant superantigens promou la producció de grans quantitats de citocines i finalment la mort de grans quantitats de limfòcits T. L'alliberació sobtada i massiva de citocines pot produir un dany tissular greu.

Les turmentes de citocines es generen per una alliberació massiva de citocines en resposta a components de la paret cel·lular bacteriana (en especial LPS), toxines del xoc tòxic i certes infeccions víriques. La presència de microbis en sang desencadena fortes respostes innates. Durant la bacterièmia es produeixen grans quantitats de C5a i citocines i es distribueixen per tot el cos. El C5a i el TNF alfa promouen la fuga vascular, activació neutròfils i l'activació de la via de la coagulació. Les cèl·lules dendrítiques del sang produeixen grans quantitats de citocines inflamatòries i IL12 en resposta als PAMP bacterians. L'endotoxina és un activador especialment potent de les cèl·lules i inductor de la producció de citocines i septicèmia. El xoc sèptic és una conseqüència de la turmenta citocínica i pot atribuir-se a l'acció sistèmica de grans quantitats de TNF alfa.



El resultat final és la producció d'una quantitat de productes inflamatoris i no inflamatoris. Quan hi ha una desregulació es produeix una fallida orgànica múltiple que caracteritza la sèpsia. La resposta inflamatòria presenta dues fases: una precoç on intervenen els factors de necrosi tumoral (TNF), la IL6 i la IL1. El pic màxim d'aquests mediadors és d'hores. Després hi ha una fase tardana on la citocina fonamental s'anomena proteïna d'alta mobilitat (HMGB1). Amb relació a la resposta antiinflamatòria la producció de diverses citocines com la IL10 i el TGF beta. S'accepta que inicialment la resposta inflamatòria es caracteritza per l'activació del sistema immunitari però si la sèpsia persisteix lo que predomina és la resposta antiinflamatòria caracteritzada per la immunosupressió (75).

#### **4.4. BIOMARCADORS DE SÈPSIA**

Malgrat els avenços en les tècniques de diagnòstic molecular, l'hemocultiu continua sent la tècnica de referència per al diagnòstic de sèpsia. No obstant, el creixement de l'organisme pot trigar de 6h a 5 dies en ser detectable més el temps addicional que requereix per ser identificat (24h) i proporcionar l'antibiograma adequat (48h). A més l'hemocultiu presenta diverses dificultats. La primera, la quantitat de microorganismes presents en la circulació durant la infecció normalment és baixa oscil·lant entre 1 i  $1 \times 10^4$  CFU/ml. En nens petits l'extracció requereix entre 1 i 5 mL inoculats en un sol flascó aerobi mentre que en adults i en nens més grans el volum serà entre 10 i 20 mL repartits en dos flascons (aerobi i anaerobi). En línies generals es considera que l'índex de positivitat augmenta entre el 3-5 % per cada mil·lilitre addicional de sang cultivada (66,68). No existeix una recomanació universal sobre l'interval de temps entre cada extracció tot i que de manera general s'aconsella que estiguin separades entre 10 i 30 minuts. Així doncs, petits volums poden donar resultats falsos negatius. Una altra causa d'obtenir resultats negatius en l'hemocultiu és la iniciació de la teràpia antibiòtica abans de l'extracció dels hemocultius. Aquesta situació és important sobretot en noutats i en dones en treball de part. La demora en la identificació del patogen i l'antibiograma també pot desencadenar a una exposició perllongada d'antibiòtics d'ampli espectre donant lloc a resistències antibiòtiques. Un mal compliment en els procediments antisèptics durant la recollida de la mostra pot donar lloc a hemocultius falsos positius En un estudi de l'any 2005 el College of American

Pathologists varen reportar una mitjana de 2,89% d'hemocultius contaminats en 356 institucions (79). Més de la meitat dels pacients amb un hemocultiu falsament positiu son tractats amb antimicrobians. A més, entre 40-50% dels pacients adults amb bacterièmia (i 70% en fungèmia) reben un antibiòtic no correcte durant el tractament empíric abans de que els resultats dels hemocultius estiguin disponibles. Aquest ús incorrecte dels agents antimicrobians causa una exposició perllongada a antibiòtics d'ampli espectre i a més en un augment dels casos de *Clostridium difficile*, reaccions al·lèrgiques i toxicitat, resistència antibiòtica, i augment dels costos mèdics (68). Per tant, és essencial trobar nous mètodes per la detecció i identificació de microorganismes. En la última dècada han sorgit diverses innovacions tecnològiques en la detecció de patògens: des de biologia molecular, arrays, múltiple que escurcen el temps pel seu diagnòstic.

Durant els últimes dècades s'han estat utilitzant diversos biomarcadors pel diagnòstic diferencial de sèpsia . En el 2012, una revisió dels marcadors de sèpsia va trobar al voltant de 200 marcadors (80). Per definició un biomarcador de sèpsia hauria de reflectir els canvis bioquímics que son característics de la resposta de l'hoste a nivell cel·lular i subcel·lular. Els mediadors inflamatoris poden ser classificats en 7 grups segons les seves propietats bioquímiques: amines vasoactives, pèptids vasoactius, fragments dels components del complement, mediadors lipídics, citocines, quimiocines i enzims proteolítics (81). La cerca de biomarcadors se centra principalment a nivell de plasma (sistema del complement, sistema de la coagulació i sistema cal·licreïna-quinina) i els indicadors de l'activació o regulació dels elements cel·lulars (neutròfils, monòcits/macròfags i cèl·lules endotelials) que provoquen l'alliberació de mediadors i molècules (citocines, quimiocines i proteïnes de fase aguda) (81,82).

Es defineix com a biomarcador a aquella molècula mesurable en una mostra biològica de manera objectiva, sistemàtica i precisa. Cal que els seus nivells siguin indicadors d'un procés normal o patològic i serveixin per monitoritzar la resposta al tractament. Un biomarcador cal que sigui fàcil de mesurar, tècnicament no complex, de baix cost i que detecti la malaltia/ processos amb una alta sensibilitat i especificitat, permetent a més quantificar la severitat del procés en absència de signes clínics, el curs de la malaltia i la resposta a la teràpia (81).

Diversos marcadors de sèpsia estan disponibles actualment com la proteïna C reactiva (PCR) o la procalcitonina (PCT). No obstant la seva eficàcia és limitada alhora de discernir entre infecció o processos inflamatoris. En els últims anys hi ha hagut altres marcadors que han estat estudiats com la pro-ADM , IL-6,IL-8 o la pentraxin 3 (82).

#### 4.4.1. PROTEÏNA C REACTIVA (PCR)

La proteïna C Reactiva, és el marcador inflamatori més àmpliament usat degut a la seva disponibilitat als laboratoris d'urgències .És una proteïna plasmàtica de fase aguda e la família de les pentraxines. Se sintetitza en els hepatòcits i la seva concentració augmenta de manera significativa en els casos d'inflamació i/o infecció regulada per la citocina IL-6 (82,83). La seva funció és ajudar als macròfags a eliminar els microorganismes a través dels components la via del complement La PCR es comença a elevar a les 12 hores La PCR s'eleva durant els processos inflamatoris i infecciosos, especialment en pediàtrics i la PCR ultrasensible s'utilitza a biomarcador d'inflamació en aquells processos amb aterosclerosi i malalties cardiovasculars. Tot i la seva baixa especificitat, és un marcador que se sol utilitzar per cribrar la primera fase de la sèpsia. Donat al caràcter no específic de la resposta en fase aguda i l'augment de nivells, no es pot utilitzar de manera aïllada per diagnosticar la malaltia. També s'utilitza per monitoritzar pacients després de la cirurgia; els nivells acostumen a ser alts en comparació amb els nivells pre operatoris, però cauen en picat si en el post operatori no hi ha infecció. En cas de comorbiditats associades amb inflamació, la PCR pot estar augmentada; de totes maneres quan es detecta un increment dels valors de la PCR i altres indicadors com febre o leucocitosi es fortament suggestiu de sèpsia. Canvis en els valors de PCR son bons predictors de la resposta al tractament antimicrobià. La no reducció dels nivells de PCR poden indicar un fracàs terapèutic en l'antibiòtic escollit. Així doncs, és un bon paràmetre pel cribratge de sèpsia especialment en les fases inicials. El principal inconvenient és la seva baixa especificitat ja que augmenta per qualsevol tipus d'inflamació i que la seva concentració es manté elevada després que els estímuls sèptics hagin desaparegut (82).

#### 4.4.2. PROCALCITONINA (PCT)

La procalcitonina és possiblement el marcador de sèpsia bacteriana més específic i s'ha reportat una bona correlació entre la seva concentració i la severitat, morbiditat i mortalitat. Es una prohormona (precursor peptídic) de la calcitonina que se sintetitza primordialment a la glàndula tiroides i les cèl·lules neuroendocrines del pulmó (cèl·lules de Kultschitzky). En condicions normals tota la seva producció és processada i les persones sanes la seva concentració habitual és gairebé indetectable. Es considera normal concentracions  $<0,05\text{ng/ml}$ . Però en resposta a toxines bacteriològiques és alliberat per les cèl·lules parenquimals del fetge, ronyó, adipòcits i del múscul donant lloc a nivells serològics elevats en 2-4 hores; S'ha considerat que les citocines i endotoxines alliberades en els processos bacterians inhibeixen el pas final de PCT a calcitonina, la qual cosa provoca un augment d'aquesta(80). Per altra banda la procalcitonina no s'eleva en casos d'infeccions virals. Nivells alts de PCT s'han associat amb un increment de mortalitat que es correlaciona amb una severitat de les puntuacions (APACHE, SOFA, i SAPS) La utilitat clínica més important és definir el percentatge de variació entre 2 mesures de PCT que en pot indicar amb seguretat a la progressió de la resposta inflamatòria i infecció. L'aclariment de PCT (30-50% d'elevació o disminució) son molt significatius per la progressió o resolució de la sèpsia. Un dels usos més importants de la PCT és la determinació seriada del paràmetre per poder parar la teràpia antibiòtica. Aquesta capacitat diagnòstica i predictiva es manté en casos de malalts amb insuficiència renal, cirrosis, pacients oncohematològics, neutropènies, gent gran o amb malalties autoimmunes o reumatològiques (80).

Les limitacions de la PCT son que els paràmetres també augmenten en condicions no sèptiques inflamatòries sistèmiques (trauma, cirurgia, infart de miocardi) i poden haver-hi falsos positius a i que no es detecta en certs casos de sèpsia (falsos negatius) (83).

Diversos estudis assenyalen un major rendiment quan es combinen diversos marcadors. Green et al varen estudiar pacients adults amb processos infecciosos quan el lactat  $>4\text{ mmol/l}$  i la PCR  $>10\text{mg/dL}$  el risc de mort als 28 dies és molt alt (84).

La PCR té una cinètica mes lenta que la procalcitonina per la qual cosa la fa menys útil en el diagnòstic agut inicial. Mentre que la PCT es comença a elevar-se a les 2-3 hores

de l'agressió bacteriana, la PCR ho fa a les 12 hores, just quan la PCT adquireix el seu màxim nivell. El fetge continua sintetitzant PCR durant més dies inclús quan l'estímul inflamatori ha desaparegut, per la qual cosa pot continuar elevada quan la infecció està remitent. A més existeixen processos inflamatoris múltiples aguts i crònics que poden elevar els seus nivells disminuint la seva sensibilitat i especificitat respecte la PCT(80).

#### 4.4.3.-LACTAT

El lactat és el producte del metabolisme anaerobi en el que el piruvat provinent de la glucòlisis no ingressa al cicle de Krebs, sinó que passa a convertir-se a àcid làctic a través de l'enzim lactat deshidrogenasa, per estímul del factor induïble de la hipòxia tipus 1 (HIF-1) que a la vegada inhibeix l'enzim piruvat deshidrogenasa. La hiperlactèmia en un pacient crític no sempre serà resultat de hipòxia tissular. Woods i Cohen, varen classificar la hiperlactèmia en dos tipus A i B.

-La A és la que apareix típicament per la disminució de l'oxigenació o perfusió, quan l'aportació d'oxigen és insuficient per arribar a les demandes energètiques cel·lulars donant lloc a una ràpida acumulació de lactat.

-La B és deguda a causes diferents a la hipoperfusió. És deguda a diverses causes com ara l'alta taxa de glucòlisis en cèl·lules tumorals, per efecte de drogues o toxines o per errors innats del metabolisme (85).

Tradicionalment, l'acidosis làctica en sèpsia és atribuït a la glicòlisi anaeròbia degut a una disminució de l'aportació d'oxigen al teixit. No obstant, el mecanisme de hiperlactèmia en la sèpsia és multifactorial.

L'any 1970, Max H Weil va estudiar 142 pacients en xoc. Va demostrar que el lactat era el millor marcador per discriminar els supervivents dels no supervivents. Al monitoritzar els nivells de lactat les primeres 24 hores per valorar els canvis dinàmics de la seva concentració es pot predir el pronòstic dels pacients críticament malalts. Aquest estudi ha estat contrastat per molts estudis realitzats fins avui (85). És un marcador que ha estat inclòs en els criteris SOFA, als quals quan el nivell de lactat > 2 mmol/L i la pressió arterial mitja

cal ser elevada amb teràpies vasopressores > 65 mmHg es considera xoc sèptic (81). El lactat quan es tracta de sèpsia depèn de l'existència d'hipoperfusió i hipòxia, cosa que fa que quan els nivells es troben elevats ja ens mostra l'existència de disfunció orgànica i no ens serveix com a diagnòstic precoç (80) S'ha demostrat que en pacients sèptics amb hiperlactèmia després de 24 h de ressucitació tenen nivells similars de producció de lactat però menys aclariment làctic que aquells pacients sèptics sense hiperlactèmia. S'ha demostrat que en pacients sèptics que presenten un aclariment de lactat superior al 20% durant les 8 primeres hores de ressucitació, presenta un 22% de reducció de risc de mortalitat (86) A la Taula 14 es descriuen les capacitats diagnòstiques i pronòstiques dels marcadors mencionats amb els comentaris més rellevants de cadascun d'ells.

Biomarcador	Capacitat diagnòstica	Capacitat pronòstica	Comentaris
PCR	+++	++	Relacionada amb infecció bacteriana, sèpsia, gravetat, bacterièmia, mala evolució, mortalitat. Menys sensible i específica que la PCT
PCT	+++++	++++	Relacionada amb infecció bacteriana, sèpsia, gravetat, mortalitat, bacterièmia, mala evolució, guia de tractament antibiòtic, evolució segons aclariment percentual, sensibilitat i especificitat > 90%  Utilitat en neutropènics, pacients oncohematològics, reumatològics, amb insuficiència renal o hepàtica. Utilitat en la seriació i mesura de l'aclariment. És el biomarcador amb més poder diagnòstic
Lactat	-	+++++	Millor marcador d'hipoperfusió i hipòxia tissular. Predictor de mala evolució, gravetat i mortalitat. Utilitat en la seriació i mesura de l'aclariment. Resposta al tractament

**Taula 14. Classificació dels biomarcadors de sèpsia més importants. Font pròpia.**

#### 4.4.4. ALTERACIONS DE LA COAGULACIÓ

L'activació de la coagulació és degut a un augment de l'expressió del factor tissular en les cèl·lules endotelials i en els monòcits induïts pel factor de necrosis tumoral. Per tant, és l'activació de la via extrínseca la responsable de la formació de fibrina i el seu dipòsit a la microcirculació. Les manifestacions clínicament aparents de la coagulopatia associada a la sèpsia és l'hemorràgia. No obstant és la situació marcadament procoagulant i la formació massiva de fibrina que es diposita a la microcirculació, el canvi fisiopatològic que provoca la disfunció d'òrgans (87).

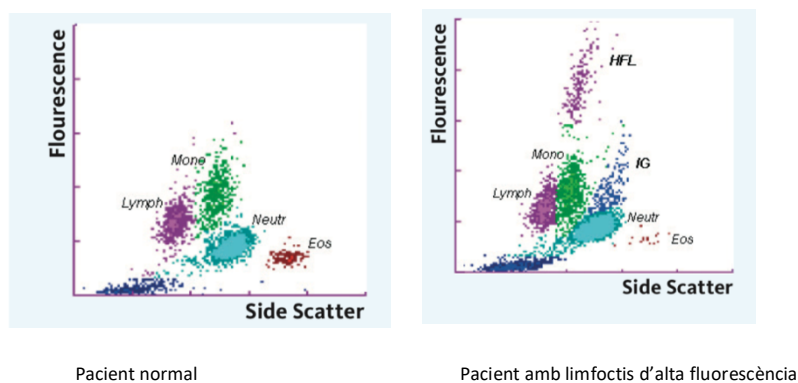
#### 4.4.5. ALTERACIONS DE L'HEMOGRAMA

Els leucòcits formen part del sistema immunitari per fer front a infeccions. Els neutròfils i monòcits intervenen bàsicament en la resposta immune innata mentre que els limfòcits actuen durant la resposta immune adaptativa. Per tant davant d'un procés infecciós és fàcilment observable l'alteració en aquests paràmetres. Normalment durant la infecció aguda s'observa un increment tant amb el nombre de leucòcits com en el nombre del neutròfils i les seves formes immadures. També es pot observar una leucopènia amb neutropènia per esgotament de la reserva medul·lar i destrucció perifèrica (67).

#### **4.5. PARÀMETRES DE SÈPSIA EN INVESTIGACIÓ. CELL POPULATION DATA (CPD) I LIMFÒCITS ALTAMENT FLUORESCENTS (HFLC)**

Els neutròfils s'activen per fagocitar els patògens i secretar diferents citocines. S'ha observat que els neutròfils activats canvien la seva morfologia (mida, forma i composició) de tal manera que es poden deformar, migrar per quimiotaxi. La granulació tòxica és un terme usat per descriure l'augment de densitat i el número de grànuls en aquests elements. La presència de vacuoles indica un increment de l'activitat fagocítica en resposta a una infecció bacteriana (88).

Els limfòcits són els responsables de la resposta adaptativa, en particular els limfòcits B i T. Els limfòcits T madurs s'activen quan reconeixen un antigen estrany per les cèl·lules presentadores d'antígens i es comencen a dividir per proporcionar limfòcits T memòria i limfòcits T CD4+. En la resposta humoral, les cèl·lules B són activades per segregar anticòsos. Tant en les infeccions víriques com bacterianes es poden observar limfòcits activats en una extensió de sang perifèrica. Presenten una mida més gran amb algun nuclèol, basofília citoplasmàtica. En la seva forma més madura els limfòcits B passen a cèl·lules plasmàtiques, altament basòfiles i es pot observar l'aroplasta al voltant del nucli. (88) Els limfòcits altament fluorescents (HFLC) reflecteixen aquells limfòcits amb un alt contingut d'ARN a l'interior de les seves cèl·lules. A la Figura 11 s'observa la posició d'aquestes cèl·lules en el diagrama de dispersió. Segons Sysmex® aquests tipus de limfòcits proporcionen informació sobre cèl·lules secretores d'anticòsos. Un HFLC alt és indicatiu d'una resposta immunològica enfront a una infecció. Existeix controvèrsia amb aquest tipus de marcador en estudi ja que hi ha treballs on es descriu que existeix una bona correlació entre HFLC i malalties infeccioses i HFLC i sèpsies en estats inicials (89,90) i altres on deixen clar que HFLC no és un bon marcador per detectar sèpsies en els moments inicials (91).



**Figura 11. Gràfiques de dispersió d'un pacient normal i d'un pacient amb limfòcits d'alta fluorescència (HFLC)**

Foto del manual de l'usuari Sysmex. [https://www.sysmex-europe.com/fileadmin/media/f100/Xtra/Xtra\\_article\\_Counting\\_of\\_HFLC.pdf](https://www.sysmex-europe.com/fileadmin/media/f100/Xtra/Xtra_article_Counting_of_HFLC.pdf)

Els monòcits i els macròfags són molt importants per la resposta immunitària innata. La seva funció és fagocitar els patògens a través de pseudòpodes. Són molt heterogenis en



mida i morfologia. S'han descrit 3 tipus de monòcits en funció dels antígens CD14 i CD16 presents a la superfície (88).

Avui en dia existeixen analitzadors en el mercat que permeten valorar totes aquestes alteracions dels neutròfils, limfòcits i monòcits provinents de l'activació davant un procés infecció. Són els Cell Population Data. Proporcionen dades numèriques sobre la mitjana i amplitud de distribució dels elements mesurats i donen informació sobre el volum, granulació i complexitat de cada cèl·lula.

L'analitzador Sysmex XN (Sysmex®, Kobe Japan) utilitza la impedància pels recomptes cel·lulars (eritròcits, plaquetes i leucòcits) i la citometria de flux per fer el diagnòstic diferencial dels leucòcits (neutròfils, limfòcits, monòcits, eosinòfils i basòfils). Pel recompte diferencial de leucòcits utilitza dos canals: el WDF i el WNR.

El canal WDF proporciona informació quantitativa i qualitativa dels diferents elements leucocitaris mesurats (tots excepte els basòfils que els proporciona a través del canal WNR). Aquest canal identifica l'element cel·lular segons la complexitat de la cèl·lula, (side scatter light), volum cel·lular i forma (forward light intensity) i el contingut àcid nucleic (intensitat de fluorescència) quan un feix de llum que travessa cada cèl·lula.

Els senyals òptics a través de l'eix de les X (side scatter) dona informació sobre la complexitat cel·lular interna, l'eix de les Y dona informació sobre la fluorescència dependent del contingut d'àcid nucleic, i l'eix de la Z és proporcional a la mida cel·lular.

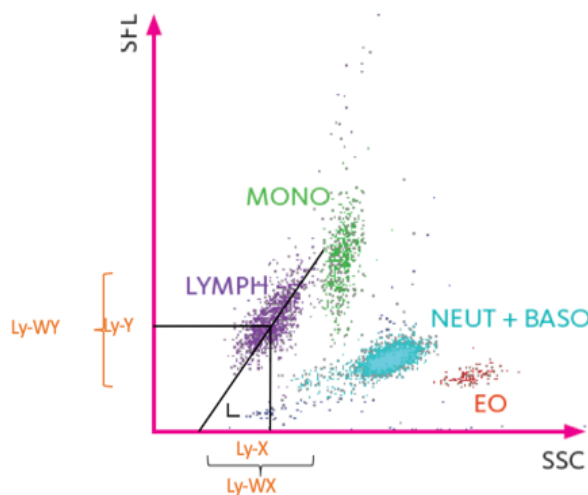
L'amplitud de dispersió dels valors estan calculats segons l'amplitud de dispersió un cop exclosos els "outliers" per sota del 20% del pic d'alçada màxima de la corba de distribució.

Els CPD relacionat amb l'eix de les X són : complexitat en els neutròfils (Ne-SSC), complexitat en els limfòcits (LI-X) i complexitat en els monòcits (MO-X), l'amplitud de dispersió de complexitat en els neutròfils (Ne-WX), amplitud de dispersió de complexitat dels limfòcits (LY-WX) i amplitud de dispersió de complexitat en els monòcits (MO-WX) (Figura 9).

Els CPD relacionats en l'eix de les Y són: intensitat de fluorescència dels neutròfils (Ne-SFL), intensitat de fluorescència dels limfòcits (LY-Y), intensitat de fluorescència dels monòcits (MO-Y), amplitud de dispersió dels neutròfils fluorescents (NE-WY), amplitud de dispersió dels limfòcits fluorescents (LY-WY) i amplitud dels monòcits fluorescents (MO-WY).

Finalment, les CPD relacionades amb l'eix de la Z. Mida dels neutròfils (NE-FSC), mida dels limfòcits (LY-Z) i mida dels monòcits ; l'amplitud de dispersió dels neutròfils (Ne-WZ), amplitud de dispersió dels limfòcits (LY-WZ) i amplitud de dispersió dels monòcits (MO-WZ) (92,93)

Les CPD s'expressen en unitats de dispersió de llum.



**Figura 12.** Gràfica on s'observa l'ample de distribució dels limfòcits.

*Foto del manual de l'usuari Sysmex.*

A més la composició de la membrana de les cèl·lules activades són diferents de les cèl·lules inactivades. Al estar activades, les membranes són més susceptibles a la perforació per reactius i així les tincions per fluorescència poden penetrar i tindre orgànuls del citoplasma i àcids nucleics (92).







## HIPÒTESI DE TREBALL.

La nostra hipòtesi de treball és que els nous paràmetres proporcionats pels autoanализadors poden ser utilitzats com a cribratge o bé com a algoritme diagnòstic per la detecció de diferents patologies.

En relació a la sèrie vermella, estàvem interessats en un paràmetre que ens pogués ajudar a fer el cribratge de les talassèmies, especialment en aquells casos on les alteracions de l'hemograma son més subtils, com és el cas de les alfa o les delta talassèmies. La nostra hipòtesi fou comprovar si el paràmetre Ret-He (hemoglobina en els reticulòcits) era útil en el cribratge de les hemoglobinopaties.

Respecte la sèrie plaquetària, volíem estudiar si hi havia algun paràmetre que facilités l'orientació diagnòstica de les plaquetopènies. Hi ha estudis que indiquen que l'IPF% podria discriminar entre plaquetopènia d'origen central (arregenerativa) o perifèrica (regenerativa). La nostra hipòtesi fou determinar si aquest paràmetre afegia valor diagnòstic específic a l'algoritme de les trombopènies i si podia evitar en algun cas la realització de proves invasives.

Pel que fa a la sèrie leucocitària, estudis recents indiquen que pot haver-hi paràmetres relacionats amb aquesta línia cel·lular que poden veure's alterats en els casos de sèpsia o infeccions sistèmiques, com ara les CPD (Cell Population Data) i HFLC%( cèl.lules limfòcits d'alta fluorescència). Son un grup de mesures morfomètriques de la població cel·lular leucocitària que sorgeixen del càlcul matemàtic que el programa informàtic incorporat a l'anализador realitza després de recollir la informació de les diferents subpoblacions leucocitàries. La nostra hipòtesi fou que donat que les cèl·lules intervenen en la resposta innata, els neutròfils i els monòcits, poden presentar alguna alteració morfològica mesurable en casos sèpsia i per tant poden ser útils en les fases precoces de la sèpsia.



## OBJECTIUS DE LA TESIS

- 1.-Realitzar una anàlisi poblacional de les hemoglobinopaties en la nostra població, on no ens consten estudis previs. Durant les últimes dècades s'ha produït un important flux migratori en el nostre territori i volem conèixer la distribució epidemiològica en la població de la nostra àrea geogràfica, per tal de relacionar el flux migratori de la població general dels darrers anys amb els possibles canvis en la distribució d'aquest grup de malalties.
- 2.- Analitzar el paràmetre Ret-He i determinar si pot ser útil pel cribratge de qualssevol tipus de talassèmia un cop descartat el dèficit de ferro.
- 3.-Estudiar el paràmetre de Fracció de plaquetes immadures (IPF%) i determinar la seva utilitat en el diagnòstic diferencial de les trombopènies d'origen immune.
- 4.- Analitzar la sensibilitat i especificitat de l'alarma d'agregats plaquetaris (alarma de clumps) en els casos que es presenta trombopènia per descartar o confirmar la presència d'aquests.
- 5.- Analitzar les Cell Population Data (CPD) dels neutròfils, limfòcits i monòcits i les cèl·lules limfoides d'alta fluorescència (HFLC%) per determinar si poden ser útils en el diagnòstic precoç de sèpsia.









# 1. MOSTRES I DADES

## 1.1 GRUPS D'ESTUDI PER OBJECTIUS

Per poder dur a terme els diferents objectius d'aquesta tesi, hem usat mostres biològiques corresponents a pacients de l'àrea geogràfica de Girona que s'analitzen de Laboratori Territorial de Girona ubicat al Parc Hospitalari Martí i Julià (Salt, Girona). Es poden diferenciar en dos grans grups: mostres de pacients hospitalitzats tant del centre hospitalari on es troba ubicat el laboratori com de l'Hospital Universitari Doctor Josep Trueta del què el laboratori n'és el referent; en aquest grup també s'hi afegeixen aquelles mostres de pacients que es troben de forma ambulatoria a l'Hospital de dia dels dos centres; i un segon grup de pacients ambulatoris no urgents provinents dels diferents centres de salut d'àmbit primari repartits per la província de Girona i dels que el Laboratori Territorial n'és referent. En tots els casos s'han usat les dades estrictament sol·licitades per requeriment assistencial, sense afegir proves ni perfils que no siguin els que el pacient ha consentit de forma expressa en el moment de l'extracció.

Per l'objectiu primer de la tesi, **impacte epidemiològic de les hemoglobinopaties en el nostre medi**, del gener del 2004 al desembre de 2018 hem estudiat 12.630 pacients en total dels dos grups citats en el paràgraf anterior. S'inclouen en aquest objectiu les determinacions segons el criteri clínic i del laboratori, seguint l'algoritme diagnòstic per aquest grup de malalties: edat, valors de l'hemograma i perfil fèrric del pacient.

L'estudi del paràmetre de l'hemograma **Ret-He** s'ha fet en dues fases: la primera fase amb 338 mostres de pacients processades al Laboratori Territorial de Girona durant un període de 5 mesos (Juliol-Setembre 2017) ; per la segona fase s'han emprat 494 mostres de pacients d'octubre a desembre del 2017.

Per l'objectiu segon de la tesi, **estudi del paràmetre IPF%** també s'ha fet en dues fases. Per la primera s'han processat 332 mostres en un període de 8 mesos (gener-agost 2019) de les quals 188 amb trombopènia (plaquetes  $< 100 \times 10^9/L$ ) i 144 controls. Per la segona

fase vàrem estudiar 329 mostres processades l'any 2019 on l'IPF presentava un valor superior a 13,6 %.

Per l'anàlisi de l'**alarma d'agregats plaquetaris**, s'han fet dos estudis. Primer hem analitzat 25.325 mostres corresponents al mes de gener 2017 on 151 mostres complien la condició de trombopènia (plaquetes < 100 x10<sup>9</sup>/L). S'han estudiat mostres amb aquesta condició de l'hemograma donada la repercussió sobre la clínica, evolució i opció terapèutica dels pacients afectes; xifres normals de plaquetes no son rellevants a l'hora d'avaluar aquesta alarma donat que en els algorismes de laboratori no es considera necessari ni útil la revisió de l'hemograma ni de la sang perifèrica en condicions quantitatives normals. En el segon estudi realitzat durant tot l'any 2019, s'han analitzat 197 mostres que presentaven agregats plaquetaris en el frotis de sang perifèrica, en els quals se'ls hi havia realitzat l'IPF.

Pel tercer objectiu de la tesi, per l'estudi de les **HFLC** (high fluorescence lymphocytes count) s'ha realitzat en dues fases. El primer estudi va consistir en analitzar el valor de HFLC en 277 pacients classificats en 5 grups segons el seu diagnòstic principal: 62 pacients amb mononucleosis infecciosa diagnosticada per PCR (reacció en cadena de la polimerasa) o per serologia; 50 pacients de sèpsia; 19 pacients amb desordres autoimmunes detectats per IFI (immunofluorescència indirecte) i manifestacions clíniques; 47 pacients amb síndromes limfoproliferatives (Immunofenotip compatible amb aquest tipus de desordre limfocitària) i 99 pacients sans en el grup control. La segona fase s'han emprat 42 mostres durant una setmana del mes de febrer.

Per l'estudi de les **Cell Population Data (CPD)** referent a les dades extretes per l'analitzador d'Hematimetria de les diferents poblacions leucocitàries analitzades, hem analitzat 361 mostres de pacients adults d'un període de 3 mesos (octubre-desembre 2018) dels quals 50 pacients tenien un diagnòstic de sèpsia. El diagnòstic va ser confirmat pels hemocultius positius i pels paràmetres clínics contemplats en el tercer consens internacional per les definicions per sèpsia i xoc sèptic (Sepsis 3); s'han inclòs 310 pacients en el grup control.

## 1.2 CONFIDENCIALITAT DE LES DADES

La recollida de dades ha seguit la “Ley Orgánica 15/1999 de 13 del desembre de 1999 de Protecció de Dades de Caràcter Personal” (LOPD) que en els seus articles 4, 8, 9, i 10 tracta de l’anonimat de dades, consentiment informat, ús de les dades sanitàries per part dels professionals de la salut , la seguretat i la confidencialitat de les mateixes.

L’article 4 en el seu punt 5 exposa que “Les dades de caràcter personal seran cancel·lades quan hagin deixat de ser necessaris o pertinents per a la finalitat per a la qual havien estat guardats o registrats *“No seran conservats de manera que permetin la identificació de l’interessat durant el període superior al necessari per a les finalitats per a les quals hagin estat guardats o registrats. Reglamentàriament, es determinarà el procediment pel qual, per excepció, atenent els valors històrics, estadístics o científics d’acord amb la legislació específica, es decideixi el manteniment íntegre de les dades esmentades.”* . En aquest treball, l’anonimat de les dades del pacient es fa assignant un número d’identificació a cada mostra sense considerar cap dada demogràfica o de l’historia clínica.

L’article 8 “Dades relatives a la salut” exposa que *“Sense perjudici del que es disposa en l’article 11 respecte a la cessió, les institucions i els centres sanitaris públics i privats i els professionals corresponents podran accedir al tractament de les dades de caràcter personal relatives a la salut de les persones que a ells acudeixin o hagin de ser tractades, segons la legislació estatal o autonòmica sobre la Sanitat”*.

L’article 9 “Seguretat de dades ” en els seus punts 1 i 2 exposen: *“El responsable del fitxer, i en el seu cas, l’encarregat del tractament hauran d’adoptar les mesures de caire tècnic i organitzatives necessàries que garanteixin la seguretat de les dades de caràcter personal i evitin la seva alteració, pèrdua, tractament i accés no autoritzat, segons l’estat de la tecnologia, la naturalesa de les dades emmagatzemades i els riscos ja exposats que provinguin de l’acció humana o del medi físic o natural “* .

L'article 10 "Deure de secret" exposa "El responsable del fitxer i aquells que intervinguin en qualsevol fase del tractament de dades de caràcter personal estan obligats al secret professional respecte els mateixos i al deure de guardar-lo, obligacions que subsistiran després i tot de finalitzar les seves relacions amb el titular del fitxer, o en el seu cas el responsable del mateix".

Com autora d'aquest projecte em comprometo a rebre i guardar tota la informació de manera confidencial, a utilitzar la informació recollida únicament pels propòsits i objectius delimitats en aquest projecte i a no utilitzar la informació facilitada o part d'ella en benefici propi o a tercers, tal i com estic obligada per pertànyer al servei de Laboratori Clínic en qualitat de Facultatiu Especialista.

L'autora de la tesi confirma que aquest treball compleix amb el codi ètic de les bones pràctiques dutes a terme en Laboratori Territorial ICS Girona i que garanteix que ha estat així durant tot l'estudi.

### **1.3. TUBS DE SANG I MEDIS DE CULTIU**

- Per la mesura de l'hemograma i paràmetres en estudi, les mostres han estat recollides en tubs de polietilè de 4 mil·lilitres (Beckton and Dickinson Vacutainer System) tractats amb anticoagulant EDTA (àcid etilendiamnotetracètic) tripotàssic. Totes les mostres han estat processades a l'analitzador d'Hematimetria en un temps màxim de 6 hores després de la flebotomia, a temperatura ambient. Per les determinacions de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC, High performance liquid chromatography) s'han usat el mateix tipus de tub però les mostres han estat conservades a 4°C fins a ser processades seguint el protocol específic de la tècnica.
- Per la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) i per l'immunofenotip de sang perifèrica les mostres han estat recollides en tubs de polietilè de 4 mil·lilitres (*Beckton and Dickinson Vacutainer System*) tractats amb anticoagulant EDTA (àcid etilendiamnotetracètic) tripotàssic.

- Pels paràmetres bioquímics, la detecció serològica i per immunofluorescència indirecte les mostres han estat col·lectades en un tub de 10 mil·lilitres de polietilè amb activador de la coagulació i amb gel separador (*Beckton and Dickinson Vacutainer System*).
- Per la detecció de la sèpsia hem utilitzat flascons d'hemocultius aerobi FA PLUS que conté sang suplementat amb perles polimèriques adsorbents i un flascó anaerobi de la casa FN plus que conté sang suplementat amb perles polimèriques adsorbents BACT/ALERT.

S'han inclòs aquelles mostres que en l'anàlisi pre-analítica reuneixen totes les condicions d'una extracció o col·lecció òptimes (mostra no coagulada en el cas dels tubs tractats amb EDTA, mostra suficient, bona identificació del pacient). S'han exclòs de l'estudi totes les mostres biològiques processades en medis diferents als descrit anteriorment i aquelles que presenten algun incompliment dels criteris d'acceptació pre-analítica (mostres coagulades, o insuficients).

## **2. EQUIPS I REACTIUS**

Tots els equips i reactius utilitzats han estat calibrats segons les especificacions tècniques de cada analitzador i abans de procedir a l'anàlisi de mostres s'han processat uns controls de la qualitat per verificar el bon funcionament de la tècnica. L'objectiu del calibratge és mantenir i verificar el bon funcionament dels equips, respondre als requisits establerts en les normes de qualitat i garantir la fiabilitat i la traçabilitat de les mesures. Els instruments de mesura requeriran ser calibrats amb més freqüència com més exactes siguin les seves mesures o bé més petites siguin les seves toleràncies d'error. Respecte els controls de la qualitat son mostres amb una concentració coneguda de la magnitud a analitzar que es processen abans de processar qualsevol mostra sanguínia. S'accepten aquells valors on el resultat sigui inferior a les 2 desviacions estàndards seguint la segona regla de Westgard (quan dos punts consecutius excedeixen el seu valor del mateix costat 2



desviacions estàndard, detectant un valor sistemàtic; resultat diana  $\pm 2SD$ ), tal i com marca la nostra política de qualitat (ISO 9001:2015).

## 2.1 HEMOGRAMA

Per les determinacions incloses en l'hemograma hem utilitzat el comptador automàtic i robotitzat de la casa comercial Sysmex® (Kobe, Japó) Sèrie XN. En el nostre laboratori es troba integrat en una cadena XN 9000 amb 5 analitzadors XN (2 XN 2000 i 3 XN 1000), i 1 extensor-tenyidor SP10.



**Figura 13.** Cadena Sysmex XN 9000 on es processen els hemogrames.

Foto extreta de <https://www.sysmex.com/la/ES/Products/Hematology/XNSeries/Pages/XN-9000-Hematology-Analyzer.aspx>.

Aquest equip requereix els següents reactius pel seu funcionament:

**-Cellpack DCL.** 20L. Composició: clorur sòdic 0,7%, tris buffer 0,2% EDTA-2K 0,02%. Diluent de sang total que s'utilitza per mesurar el número i mida dels eritròcits i plaquetes pel mètode de detecció del canal de flux de corrent continua. També és utilitzat per fer la mesura de l'hemoglobina juntament amb el reactiu específic per a la lisi de les hematies.

**-Cellpack DFL.** 1,5L. Composició: buffer tricine 0,17% Diluent de sang total que s'utilitza en combinació amb Fluorcell RET per l'anàlisi de reticulòcits o amb Fluorcell PLT per l'anàlisi de plaquetes per citometria de flux utilitzant un làser semiconductor.

-**Sulfolyser**. 1,5L Composició: lauril sulfat sòdic 1,8g/L. Reactiu utilitzat per la determinació de la concentració d'hemoglobina.

-**Lysercell WNR**. 4L. Composició: salts d'amoni quaternari orgànic 0,20% i surfactant no iònic 0,10% És un reactiu que lisa els hematies. S'utilitza combinat amb Fluorcell WNR. Primer es lisen els hematies amb Lysercell WNR i després utilitzant el Fluorcell WNR, l'analitzador és capaç de diferenciar els glòbuls blancs (excepte basòfils), basòfils, i eritroblasts.

-**Lysercell WDF**. 4L Composició: salts d'amoni quaternari orgànic 0,07% surfactant no iònic 0,17% És un reactiu que lisa els hematies. S'utilitza combinat amb Fluorcell WDF. Primer es lisen les hematies amb els Lysercell WNR i després es tenyeixen els diferents elements cel·lulars dels glòbuls blancs amb Fluorcell WDF (neutròfils, limfòcits, monòcits i eosinòfils).

-**Fluorcell WNR**. 82 mL. Composició: colorant polimetí 0,005% etilenglicol 99,9%. És un reactiu que tenyeix les cèl·lules nucleades un cop s'han lissat les hematies i s'utilitza per a la determinació del comptatge dels leucòcits, eritroblasts i basòfils.

-**Fluorcell WDF**. 42 mL Composició: colorant polimetí 0,002%, metanol 3%; etilenglicol 92%. És un reactiu que s'utilitza per tenyir els leucòcits un cop s'han lissat les hematies i s'utilitza per a la determinació dels diferents elements cel·lulars que formen part dels leucòcits excepte basòfils (neutròfils, limfòcits, monòcits i eosinòfils).

-**Fluorcell RET**. 12mL Composició: colorant polimetí 0,03% metanol 7,9%, etilenglicol 92%. És un reactiu que s'utilitza per tenyir els reticulòcits.

-**Fluorcell PLT**. 12 mL Composició: colorant oxazina 0,003%; etilenglicol 99,9%. És un reactiu que s'utilitza per tenyir les plaquetes.

-**Cellclean.** 50 mL. Composició: hipoclorit sòdic (concentració clorur disponible 5%). Detergent fortament alcalí utilitzat per eliminar el reactiu lisant, residus cel·lulars i proteïcs que resten en les càmeres de l'analitzador XN.

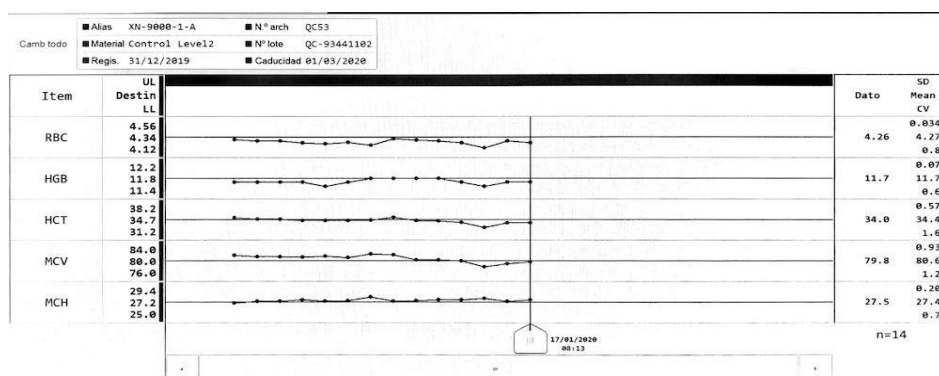
-**Control XN (CHECK/XN CHECK BF).** 3 mL.

-**Calibrador XN CAL.** 3 mL. S'utilitza per calibrar els leucòcits, eritròcits, hemoglobina, plaquetes i reticulòcits de l'instrument.

-**Calibrador XN CAL PF.** 3 mL. S'utilitza per calibrar el recompte de plaquetes en el canal de fluorescència).

L'equip Sysmex® XN es calibra de forma trimestral per part de tècnics de la casa comercial responsable o a sol·licitud del responsable quan es detecta alguna anomalia en el seu funcionament (94).

Es requereix una anàlisi diària de controls de qualitat interns per mesurar la mitjana, coeficients de variació (CV%) i desviacions estàndard (SD) seguint la segona regla de Westgard per cadascun dels paràmetres inclosos en l'hemograma i amb tres punts diferents de mesura (nivell alt, normal i baix) segons les recomanacions internacionals de l'*International Council Standardization Hematology (ICSH)*.



**Figura 14.** Representació dels controls de la qualitat del control normal de l'hemograma. Font: *Extracte dels controls de la qualitat del Sysmex XN*

*S'accepten aquells valors que estan dins dels marges de les dues desviacions estàndards.*

## 2.2. ANÀLISI MORFOLÒGICA DE SANG PERIFÈRICA

En els casos en què se sospita alguna alteració hematològica i/o altres malalties (sèpsia, infeccions sistèmiques, malalties autoimmunes...) es realitza una extensió o frotis de sang perifèrica per la seva observació al microscopi òptic. Per l'extensió del frotis de sang perifèrica hem utilitzat portaobjectes bisellats 76 x 26 mil·límetres, Sysmex®, Norderstedt, Alemanya) en l'extensor-tenyidor SP-10 (Sysmex®, Kobe, Japó). És un aparell que permet automatitzar les extensions i la tincions dels frotis de sang perifèrica.

La tinció es realitza amb els següents components conservats a temperatura ambient:

- Eosina-blau de metilè en solució May-Grünwald modificada (Merck, Darmstadt, Alemanya).
- Solució Giemsa (RAL Diagnostics, Martillac, França).
- Metanol PanReac AppliChem (ITW Reagents, Darmstadt, Alemanya).

El procediment per tenyir el frotis és el següent : 1 minut de prefixació amb metilè, 10 minuts de May-Grünwald modificada ,10 minuts de solució Giemsa .

La revisió del frotis de sang perifèrica y la classificació segons les seves característiques morfològiques s'ha realitzat a través del microscopi digital CellaVision DM96 i software Cellavision® versió 5.0.1. (Lund, Suècia) o un microscopi òptic Leica ICC50 W (Leica-Microsystems, Wetzlar, Alemanya).



**Figura 15. Microscopi digital Cella Vision DM 96.**

Foto extreta de <https://www.cellavision.com/en/>

## 2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ

Pel processament de la cromatografia líquida d'alta resolució s'han utilitzat els següents equips:

### 2.3.1 BIORAD D10 DUAL PROGRAM

Utilitzat per la detecció hemoglobinopaties del 2004 fins l'any 2016. Aquest equip requereix els següents reactius pel seu funcionament:

-**Elution buffer.** Composició: 1000 mL buffer Bi-Tri/fosfat , pH 6.0. Conté < 0,05% azida sòdica com a conservant.

-**Elution Buffer 2 1L.** Composició: 1000 mL de buffer bi-tri/fosfat, pH 6,7. Conté < 0,05% d'azida sòdica com a conservant.

-**Solució diluent .** Composició: 1600 mL d'aigua desionitzada amb < 0,05% d'azida sòdica com a conservant.

-**Calibrador / Kit diluent. HbA<sub>2</sub> /F/A<sub>1c</sub>.** Un kit consisteix en 3 vials de calibrador nivell 1, 3 vials de calibrador de nivell 2, i una ampolla de calibrador diluent. El vial de calibrador conté hematies humans liofilitzats amb gentamicina, tobramicina i EDTA com a conservant. El volum reconstituït ha de ser de 7 mL. El diluent del calibrador conté 100 mL d'aigua desionitzada amb < 0,05% azida sòdica com a conservant.

-**Columna analítica.** Columna intercanvi catiònic de 4,0 mm x 30 mm.

-**Primer de sang total** 4 vials d'hematies humans liofilitzats amb gentamicina, tobramicina i EDTA com a conservant. El volum reconstituït ha de ser 1,0 mL per vial.

-**Vials de mostra** 100 vials de polipropilè amb taps permeables, 1,5 mL.(95).

### 2.3.2 BIO RAD VARIANT II BETA THALASSÈMIA SHORT PROGRAM

Analitzador utilitzat a partir del 2016 per la detecció hemoglobinopaties pel mètode d'immunocromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Aquest equip requereix els següents reactius pel seu funcionament:

-**Elution Buffer 1.** Cada ampolla composició 1900 mL de buffer fosfat sòdic. Conté < 0.05 azida sòdica com a conservant.

-**Elution buffer 2.** Cada ampolla conté 1800 mL de buffer fosfat sòdic Conté < 0.05% azida sòdica com a conservant.

- **Calibrador / Kit diluent. HbA<sub>2</sub> /F/A<sub>1c</sub>.** Un kit consisteix en 6 vials de calibrador i 1 ampolla de calibrador diluent. El vial de calibrador conté hematies humans liofilitzats amb gentamicina, tobramicina i EDTA com a conservant. El volum reconstituït ha de ser de 10 mL. El diluent del calibrador conté 100 mL d'aigua desionitzada amb < 0,05% azida sòdica com a conservant.

-**Columna analítica.** Columna intercanvi iònic de 4.6 mm x 30mm.

-**Primer de sang total 10** vials d'hematies humans liofilitzats amb gentamicina, tobramicina i EDTA com a conservant. El volum reconstituït ha de ser 1,0 mL per vial.

-**Solució diluent .** Composició: 1800 mL d'aigua desionitzada amb < 0,05% d'azida sòdica com a conservant.

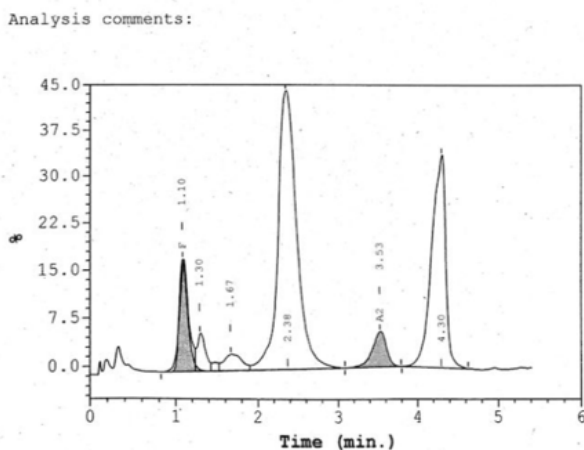


**Figura 16. Analitzador d'hemoglobines BIORAD VARIANT II.**

De <https://www.bio-rad.com/en-bh/product/variant-ii-instrumentation?ID=49373a90-6f08-4684-a7d8-8afd7e0564ef>

Les mostres per estudi d'hemoglobines es processen 1-2 cops/setmana depenent del volum de feina. Els dos analitzadors de BIORAD es calibren cada vegada que s'utilitza l'aparell i seguidament es passen els controls es controls de qualitat interns per quantificar l'hemoglobina A<sub>2</sub> i hemoglobina F , en dos tipus de controls (control per una mostra normal d'hemoglobines, control per una mostra patològica d'hemoglobines) seguint les recomanacions internacionals de *l'International Council Standardization Hematology* (ICSH). S'accepten com a vàlids aquells controls que detectin les hemoglobines prèviament

indicades i que la seva quantificació estigui dins dels marges establert pel fabricant. En cas de no complir-se, el control erroni presenta un asterisc i cal prendre les mesures necessàries (96).



**Figura 17. Control patològic on es pot apreciar els pics de l'hemoglobina F, hemoglobina A, hemoglobina A2 i hemoglobina S. Font: Extracte dels controls de la qualitat del BIORAD VARIANT II**

### 2.3.3. ADAMS™ A1C HA-8180 (MENARINI, FLORÈNCIA, ITÀLIA)

Aparell que s'utilitza per analitzar l'hemoglobina glicosilada HbA1c a través del mètode de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) Per fer-ho calen els següent reactius:

-**Eluant 60A HA 8180®** 1ml. Tampó d'elució. Elueix la fracció Hemoglobina amb càrrega menor que la fracció HbA<sub>0</sub>.

-**Eluant 60B HA 8180®**, 0,5 mL. Tampó d'elució. Elueix les fraccions HbS i HbC com a fracció única.

-**Eluant 60C HA 8180®**, 0,5 mL. Tampó d'elució. Elueix les fraccions Hb A0 i HbA2 com una fracció única.

-**Haemolisant 60H 8180®**, 1 mL. Solució utilitzada per hemolitzar la sang.

-**Columna HSII-V (Arkray)**. Una caixa amb 1 columna. Duració estimada de 4000 mostres

-**Controls Glyco Hb control Level 1 i Level 2**. Controls liofilitzats amb 65 mg cadascun que s'han de reconstituir amb 200 µL d'aigua destil·lada.

Les mostres per detectar l'hemoglobina glicosilada es processen cada dia. Es requereix una anàlisi diària de controls de qualitat interns en dos nivells de detecció: level 1(detecció de nivells baixos d'hemoglobina glicada) i level2(detecció de nivells alts d'hemoglobina glicada). Es calibra quan hi ha un canvi de columna o en el cas que es detecti anomalies en els resultats dels controls.

## 2.4 MAGNITUDS BIOQUÍMIQUES

Pel processament dels paràmetres bioquímics inclosos en la tesi s'han utilitzat els següents equips:

### 2.4.1 COBAS C 8000/ E602 (ROCHE, BASILEA, SUÏSSA)

Aquest equip requereix els següents reactius pel seu funcionament:

- **Ferritina.** Reactiu amb 200 determinacions. Llest pel seu ús. Aparell utilitzat per analitzar la ferritina mitjançant la tècnica d'electroquimioluminiscència (ECLIA).

Composició:

- **M.** Micropartícules recobertes d'estreptavidina. 0,72 mg/mL. Capacitat de fixació 470 ng de biotina/ mg de micropartícula + conservant. Tap transparent. 1 amp x 6,5 mL.
- **R1.** Anticossos anti-Ferritina-Biotina. Són anticossos monoclonals de rata— biotina 3 mg (L+ tampó fosfat 100 mmol/L pH 7,2 + conservant
- **R2.** Anticossos anti -ferritina- Ru (bpy)<sup>2+</sup><sub>3</sub>. Tap negre. 1 amp x 10 mL. Són anticossos monoclonals de rata-quelat de ruteni 6 mg/L + tampó fosfat 100 mmol/L pH 7,2 + conservant
- **Pro cell M.** 2x2 tampó del sistema
- **Clean Cell.** 2x2 solució de neteja per la cèl·lula de mesura.
- **Cal set. Calibrador** 3 mL
- **Precicontrol variant.** 4x5 mL





**Figura 18. Analitzador COBAS 8000**

[https://diagnostics.roche.com/us/en/products/systems/cobas\\_-8000-modular-analyzer-series.html](https://diagnostics.roche.com/us/en/products/systems/cobas_-8000-modular-analyzer-series.html)

La ferritina es calibra cada cop que s'instal·la un lot nou i setmanalment de manera rutinària. Diàriament es processen els controls interns de la qualitat per mesurar la mitjana, coeficients de variació (CV%) i desviacions estàndard (SD) seguint la segona regla de Westgard amb 2 punts diferents de mesura (nivell alt i baix (97).

#### 2.4.2 COBAS 502

- **Ferro.** Reactiu amb 200 determinacions. Llest pel seu ús. Tècnica fotomètrica

##### **Composició:**

- **R1** Àcid cítric: 200 mmol/L; tiourea: 115 mmol/L; detergent
- **R3** Ascorbat sòdic: 150 mmol/L; FerroZine: 6 mmol/L; conservant
- **Calibrador C.fas.** 12x 3 mL
- **Controls Precinorm U, Precipath U** (10x 3 mL)

- **Transferrina** Reactiu amb 100 determinacions. Llest pel seu ús Tècnica immunoturbidimetria.

##### **Composició:**

- **R1** Tampó fosfat: 55 mmol/L, pH 7.2; NaCl: 25 mmol/L; polietilenglicol: 5 %; conservant
- **R2** Anticossos de conill anti-transferrina humana: dependent del títol; NaCl: 100 mmol/L; conservant
- **Calibrador: Cfas protein** 5 x1mL

- **Controls: Precicontrol ClinChem** (El nivell normal precinorm, el nivell patològic precipath). Multi 1 i 2 (4x 5mL)

Per les magnituds bioquímiques esmentades es realitza un calibratge cada cop que es canvia el lot del reactiu i setmanalment de manera rutinària. Cada dia es processen els controls interns de la qualitat en dos nivells de diferents de mesura (nivell patològic (precipath) , nivell normal (precinorm)(98).

## 2.5 DETECCIÓ MICROBIOLÒGICA

### 2.5.1 HEMOCULTIU

Per realitzar cultius de sang perifèrica total (hemocultiu) s'ha fet servir l'analitzador BAC/ALERT (Biomerieux, Marcy-l'Etoile, França), sistema automatitzat de detecció microbiana. Aquest equip requereix els següents reactius pel seu funcionament:

- **Flascó BACT/ALERT.** Cada flascó conté 40 mL brou-soja caseïna i necessitem 10 mL de mostra de sang perquè hi hagi una dilució adequada de 1:4. Tots dos flascons utilitzen 0,035% d'anticoagulant SPS (polianetol sulfonat sòdic) El flascó aerobi presenta una atmosfera de CO<sub>2</sub>+aire i l'anaerobi una atmosfera de CO<sub>2</sub>+N<sub>2</sub> És un sistema de detecció microbiana que es basa utilitza un sensor colorimètric per detectar el canvi de color en el fons dels flascons produït per la presència de microorganismes (99).



**Figura 19. Flascons aerobi, anaerobi i pediàtric BACT/ALERT**

Sota llicència Creative Commons. Enllaç disponible

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bloodculturetubes.JPG>

#### 2.5.2 REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA

Per a la detecció de material genètic del virus Epstein-Barr i Citomegalovirus hem utilitzat la RT-PCR (*real time-polymerase chain reaction*), tècnica de biologia molecular que detecta la presència d'àcids nucleics pertanyents als virus a estudiar. Per fer-ho és necessari la utilització d'un extractor automàtic d'àcids nucleics i un detector de material genètic. En el nostre estudi hem utilitzat:

- **MAG CORE de RBC BIOSCIENCE** Extractor automàtic àcids nucleics. És un sistema de purificació àcid nucleic.
- **REAL CYCLER de CEPHEID** Real Cycler EBVCMVI és un kit de reactius per diagnòstic in vitro que permet la detecció de ADN del Virus Epstein-Barr (EBV), de Citomegalovirus (CMV) i d'Herpesvirus (VHH-6) en mostres clíniques. Consta de:
  - **AmpliMix EBCMVI** 24 vials de 18,67 mL.
  - **Control Positiu EBCMVI** que consisteix en una construcció artificial d'ADN de virus Epstein Barr, citomegalovirus i herpes virus 6.

Els equips Mag Core i Real Cycler es calibren per part del personal tècnic de la casa comercial en els revisions establides pel fabricant. En el cas del Real Cycler s'introdueix un

control a cada mostra que es processa de tal manera que si la mostra és positiva, s'amplificarà la mostra i el control en aquest cas pot donar positiu dèbil o negatiu, i en aquelles mostres negatives el control sempre ha de ser positiu (100).

## 2.6 SEROLOGIA I AUTOIMMUNITAT

Per a la detecció d'anticossos específics dels virus Epstein-Barr i Citomegalovirus hem utilitzat els següents analitzadors:

### 2.6.1 LIAISON, DIASORIN, SALUCCIA ITÀLIA.

Analitzador que utilitza la tecnologia de quimioluminiscència (CLIA. ChemiLuminescent Immuno Assay) per a la determinació quantitativa d'anticossos específics. Aquest equip requereix els següents reactius pel seu funcionament:

- **Liaison EBV IgM. Per 100 mostres**
  - **Partícules magnètiques** (2,3 mL). Cobertes amb antígens de la càpsida del virus d'Epstein Barr, albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, <0,1% azida sòdica.
  - **Calibrador 1** (0,55 mL). Sèrum/Plasma humà que conté nivells baixos d'IgM anti EBV, albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, 0,2% de ProClin 300 i un colorant groc inactiu. Les concentracions dels calibradors (u/mL)son calibrades amb una preparació interna d'anticossos.
  - **Calibrador 2** (0,55 mL) Sèrum/Plasma humà que conté nivells alts d'IgM anti EBV, albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, 0,2% de ProClin 300 i un colorant blau inactiu. Les concentracions dels calibradors (u/mL)son calibrades amb una preparació interna d'anticossos.
  - **Tampó A** (25 mL) IgG de cabra anti -IgG humana (reactiu d'absorció), sèrum de cabra, albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, 0,2% Pro Clin 300 i un colorant blau inactiu.

- **Conjugat** (23 mL) Anticossos monoclonals de ratolí anti IgM humana conjugats amb un derivat de l'isoluminol, IgG de ratolí policlonal no específic, albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, 0,2% Pro Clin 300, conservants.
  - **Control positiu** (2x 0.9 mL) Sèrum humà reactiu per EBV IgM estabilitzat amb tampó PBS, albúmina sèrica bovina, 0.2% ProClin 300 i un colorant inactiu groc.
  - **Control negatiu** (2x 0.9mL) Sèrum humà no reactiu per EBV IgM estabilitzat amb tampó PBS, albúmina sèrica bovina, 0.2% ProClin 300.
- **Liaison EBNA IgG. Per 100 mostres**
- **Partícules magnètiques** (2,3 mL). Recobertes amb pèptid sintètic EBNA-1, albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, <0,1% azida sòdica.
  - **Calibrador 1** (3,2 mL). Sèrum/Plasma humà que conté nivells baixos d'IgG anti-EBNA albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, 0,2% de ProClin 300 i un colorant groc inactiu. Les concentracions dels calibradors (U/mL)son calibrades amb una preparació interna d'anticossos.
  - **Calibrador 2** (3,2 mL) Sèrum/Plasma humà que conté nivells alts d'IgG anti-EBNA , albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, 0,2% de ProClin 300 i un colorant blau inactiu. Les concentracions dels calibradors (u/mL)son calibrades amb una preparació interna d'anticossos.
  - **Diluent de mostres (2x28 mL)** albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, 0,2% Pro Clin 300 i un colorant blau inactiu.
  - **Conjugat** (23 mL) Anticossos monoclonals de ratolí anti IgG humana conjugats amb un derivat de l'isoluminol, IgG de ratolí policlonal no específic, albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, 0,2% Pro Clin 300, conservants.
  - **Control positiu** (2x 0.9 mL). Sèrum humà reactiu per EBNA IgG estabilitzat amb tampó PBS, albúmina sèrica bovina, 0.2% ProClin 300 i un colorant inactiu groc.
  - **Control negatiu** (2x 0.9mL). Sèrum humà no reactiu per EBNA IgG estabilitzat amb tampó PBS, albúmina sèrica bovina, 0.2% ProClin 300.

- **Liaison VCA IgG. Per 100 mostres**

- **Partícules magnètiques** (2,3 mL). Recobertes amb antígens de la càpsida del virus Epstein-Barr, albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, <0,1% azida sòdica.
- **Calibrador 1** (3,2 mL). Sèrum/Plasma humà que conté nivells baixos d'IgG anti VCA, albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, 0,2% de ProClin 300 i un colorant groc inactiu. Les concentracions dels calibradors (U/mL)son calibrades amb una preparació interna d'anticossos.
- **Calibrador 2** (3,2 mL). Sèrum/Plasma humà que conté nivells alts d'IgG anti VCA, albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, 0,2% de ProClin 300 i un colorant blau inactiu. Les concentracions dels calibradors (u/mL)son calibrades amb una preparació interna d'anticossos.
- **Diluent de mostres (2x28 mL)** albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, 0,2% Pro Clin 300 i un colorant groc inactiu.
- **Conjugat** (23 mL) Anticossos monoclonals de ratolí anti IgG humana conjugats amb un derivat de l'isoluminol, IgG de ratolí policlonal no específic, albúmina sèrica bovina, tampó fosfat, 0,2% Pro Clin 300, conservants.
- **Control positiu** (2x 0.9 mL). Sèrum humà reactiu per VCA IgG estabilitzat amb tampó PBS, albúmina sèrica bovina, 0.2% ProClin 300 i un colorant inactiu groc.
- **Control negatiu** (2x 0.9mL) Sèrum humà no reactiu per VCA IgG estabilitzat amb tampó PBS, albúmina sèrica bovina, 0.2% ProClin 300.

L'equip Liaison es calibra cada 4 setmanes per cada tècnica o quan es detecta alguna anomalia en el seu funcionament. Es requereix una anàlisi diària de controls de qualitat interns amb dos punts diferents de mesura (control positiu, control negatiu (101)).

## 2.6.2 ARCHITECT, ABBOTT, CHICAGO, ILLINOIS, ESTATS UNITS

Analitzador que utilitza la tècnica d'immunoanàlisi quimioluminiscent de micropartícules per a la detecció d'anticossos. Aquest equip requereix els següents reactius pel seu funcionament:

- **Anticossos Ig G del Citomegalovirus (CMV IgG)**
  - **Micropartícules** (6,6 mL) recobertes d'un lisat del virus CMV (soca AD169) en solució salina amb el tampó TRIS. Concentració mínima 0,08% de partícules sòlides. Conservants ProClin 300 i agents antimicrobians.
  - **Conjugat** (5,9 mL) Anticossos de ratolí anti IgG humana marcats amb acridina en tampó MES. Concentració mínima 4 ng/mL. Conservants: azida sòdica i agents antimicrobians.
  - **Diluent d'assaig** que conté sèrum de vedella en tampó MES. Conservants ProClin 300 i Pro Clin 950.
  - **Pre-Trigger solution.** Solució preactivadora Architect que conté 1,32%(p/v) de peròxid d'hidrogen.
  - **Trigger solution.** Solució activadora ARCHITECT que conté hidròxid de sodi 0,35 N.
  - **Wash Buffer.** Tampó de rentat ARCHITECT que conté solució salina amb tampó fosfat. Conservants: agents antimicrobians.
  - **Control positiu** Sèrum humà reactiu per CMV IgG.
  - **Control Negatiu** Sèrum humà no reactiu per CMV IgG.
  
- **Anticossos Ig M del Citomegalovirus (CMV IgM)**
  - **Micropartícules** (6,6 mL) recobertes d'un lisat del virus CMV (soca AD169) en solució salina amb el tampó TRIS. Concentració mínima 0,08% de partícules sòlides. Conservants ProClin 300 i agents antimicrobians.

- **Conjugat** (5,9 mL) Anticossos de ratolí anti IgM humana marcats amb acridina en tampó MES. Concentració mínima 4 ng/mL. Conservants: azida sòdica i agents antimicrobians.
- **Diluent d'assaig** que conté sèrum de vedella en tampó MES. Conservants ProClin 300 i Pro Clin 950.
- **Pre-Trigger solution.** Solució preactivadora Architect que conté 1,32%(p/v) de peròxid d'hidrogen.
- **Trigger solution.** Solució activadora ARCHITECT que conté hidròxid de sodi 0,35 N.
- **Wash Buffer.** Tampó de rentat ARCHITECT que conté solució salina amb tampó fosfat. Conservants: agents antimicrobians.
- **Control positiu** Sèrum humà reactiu per CMV IgM.
- **Control Negatiu** Sèrum humà no reactiu per CMV Ig.

L'equip Architect es calibra cada 4 setmanes per cada tècnica o quan es detecta alguna anomalia en el seu funcionament. Es requereix una anàlisi diària de controls de qualitat interns amb dos punts diferents de mesura (control positiu, control negatiu (102).

### 2.6.3 QUANTALYSER 160 (INOVA DIAGNOSTICS, SANT DIEGO, ESTATS UNITS)

Analitzador que detecta anticossos antinuclears (ANA). Aquest equip requereix els següents reactius pel seu funcionament:

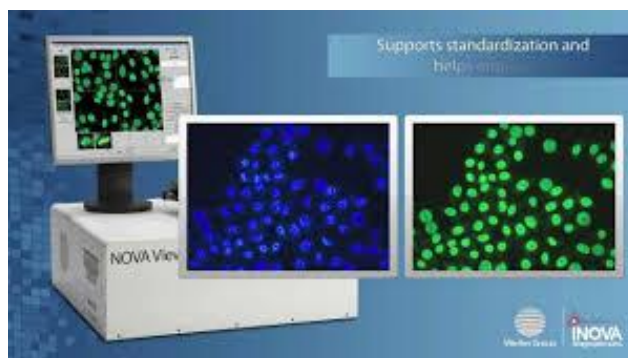
- **ANA Hep-2**, QR Slide 504310 que conté:
  - **Pous de reacció recoberts** amb cèl·lules Hep-2. 1 portaobjectes.
  - **Control negatiu IFA** 1 vial.
  - **Control positiu ANA** 1 vial.
  - **Concentrat de PBS** vial de 40 x 25 mL.
  - **FITC Ig G conjugat amb DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole, tinció fluorescent )



Es requereix una anàlisi diària de controls de qualitat interns amb dos punts diferents de mesura (control positiu, control negatiu) per cada kit de reacció(103).

#### 2.6.4 NOVA VIEW

Microscopi digital on es processa la lectura de plaques a través del sistema IFA (*immunofluorescence assay*) el qual a utilitza una llum LED amb excitació a dos longituds d'ones diferents per fer la lectura. La primera a 400 nm per identificar la posició dels nuclis mentre que la segona identifica la intensitat de la llum a 490 nm.(104).



**Figura 20.** Imatge de Nova view on s'observen dues imatges a diferents longituds d'ona.

Foto extreta de <https://www.inovadx.com/nova-viewr>

La primera en blau, l'excitació de la llum LED es processa a 400 nm per identificar les posicions dels nuclis i la segona identifica les diferents intensitats dels nuclis a 490 nm.  
<https://www.youtube.com/watch?v=RnfiYs73KSQ>.

## 2.7 IMMUNOFENOTIP

La citometria de flux és una metodologia que l'hem emprat en aquest treball de tesi de forma molt sensible i menys específica en l'analitzador Sysmex® XN pel diferencial leucocitari i pel diagnòstic de les malalties limfoproliferatives. Per aquest grup de patologies hem utilitzat l'analitzador FC500 (Beckman Coulter, Califòrnia, Estats Units). És un citòmetre de flux que permet l'anàlisi simultània multiparamètrica de les característiques físiques i químiques de les cèl·lules, fluint una a una, a través d'un aparell electrònic de detecció òptica(105).

Per fer-ho requereix els següents reactius:

- Coulter Clenz®
- Coulter® Cyto-Trol™ Control Cells kit
- Coulter® DNA-Prep Reagents kit
- Cyto-Comp™ Cell kit
- Flow-Check™ Fluorospheres
- Flow-Check™ & Flow-Set™ 675 Fluorospheres
- Flow-Check™ & Flow-Set™ 770 Fluorospheres
- Flow-Count™ Fluorospheres
- Flow-Set™ Fluorospheres
- Immuno-Brite™ Standards kit
- ImmunoPrep™ Reagent system
- Immuno-Trol™ Cell
- Immuno-Trol™ Low Cells
- IsoFlow™ Sheath Fluid
- QuickCOMP 4 kit.



**Figura 21. Citòmetre de flux FC500 de Beckmann-Coulter**

Foto extreta de <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=FC%20500%20Quick%20Reference%20>

### 3. PROCÉS ANALÍTIC DE LES MOSTRES

Expliquem breument el procés general de recepció i processament de les mostres en el nostre laboratori seguint els nostres protocols interns.



**RECEPCIÓ DE MOSTRES:** Les mostres arriben al laboratori a l'àrea de recepció en neveres mòbils i provinents dels diferents centres d'extracció de la província així com de l'Hospital Universitari Doctor Josep Trueta. Se separen en funció del tub col·lector i es distribueixen per les diferents àrees d'especialització del laboratori segons perfils analítics i metodologia emprada.

**COMPROVACIÓ DE LES MOSTRES:** Durant el procés pre-analític, cal realitzar una comprovació de les mostres, processant aquelles que compleixin els requisits necessaris. No es poden processar aquelles mostres aportades amb recipients inadequats, mostres insuficients ni mostres coagulades.

**PROCESSAR LES MOSTRES:** Cada mostra es processarà en l'analitzador adequat segons les proves a realitzar. Cal que tots els analitzadors estiguin en les condicions òptimes abans de començar a processar les mostres. Els analitzadors se sotmeten a manteniments diaris i/o setmanals segons les indicacions de la casa comercial. Un cop en condicions, es procedeix a la posada a punt del sistema respecte a calibratges i controls de la qualitat.

**VERIFICAR EL RESULTAT:** Quan l'analitzador emet un resultat, aquest és interpretat i verificat pel facultatiu especialista responsable de l'àrea que procedeix a l'emissió de l'informe final o a l'adició de proves complementàries per ajudar al diagnòstic .

### 3.1.PROCESSAMENT DE LES MOSTRES

Les **mostres amb anticoagulant EDTA** s'envien a l'àrea d'Hematologia on són processades primer per a la determinació de l'hemograma (abans de les 6 hores de la flebotomia); també es farà en aquesta mateixa àrea i amb la mateixa mostra l'estudi d'Hemoglobinopaties i/o Immunofenotip si s'escau. En cas que la determinació requerida no es fes el mateix dia, la mostra conserva a 4°C fins a ser processada per un màxim de 4 dies. S'han exclòs aquells pacients amb una edat inferior als 12 anys i aquells amb una sospita de transfusió els últims 3 mesos.

Les determinacions d'hemoglobines glicosilades també requereixen de tub amb anticoagulant EDTA i es processen a l'àrea de bioquímica el mateix dia. En cas de no poder processar, la mostra conserva a 4°C fins a ser processada per un màxim de 5 dies.

Respecte a la detecció de material genètic de virus d'Epstein-Barr, citomegalovirus i virus herpes 6, es poden processar amb un tub EDTA amb una demora màxima de 24 hores des de la flebotomia.

Les **mostres de sèrum** amb polietilè amb activador de la coagulació i amb gel separador s'envien a l'àrea de bioquímica on seran processades per fer les determinacions bioquímiques necessàries per la cadena de bioquímica COBAS 8000 / 502 i 602 i paral·lelament es faran alíquotes per altres àrees com serologia i autoimmunitat La demora màxima per fer les determinacions és de 3 dies per les proves de bioquímiques i 7 dies per les determinacions serològiques.

Les mostres que és necessari una anàlisi microbiològica com ara els **hemocultius** cal introduir-los a l'interior del BACTEC el més aviat possible de la seva arribada al laboratori.

#### 3.1.1. PROCESSAMENT DE LES MOSTRES A L'ÀREA D'HEMATOLOGIA

Com hem mencionat prèviament, es processa l'hemograma a la cadena XN 9000. L'analitzador està configurat amb unes regles i algorismes diagnòstics de manera que

aquelles mostres que presenten alguna anormalitat ja sigui quantitativa (alteració numèrica) com qualitativa (alarmes que l'analitzador presenta on s'observa alguna anormalitat a les cèl·lules ), es procedirà a una anàlisi més exhaustiu. Cal valorar l'hemograma en conjunt és a dir analitzant cadascuna de les sèries (hematies, plaquetes i leucòcits) i fer-ne una valoració conjunta. Per fer-ho més senzill presentem els protocols de cada sèrie per separat, focalitzant-nos en les patologies dels objectius d'aquesta tesi.

El protocol del laboratori en els casos d'alteracions de la sèrie eritroide és el següent:



Un cop s'ha processat l'hemograma, en aquells casos on s'observi alguna alteració en l'hemograma que no pugui ser justificada o que requereixi d'anàlisi més detallat, es procedirà a la realització del frotis de sang perifèrica. Depenent de l'alteració observada juntament amb la valoració de l'hemograma i l'estat clínic del pacient s'afegiran proves complementàries per ajudar al diagnòstic final de la malaltia.

Son consideracions patològiques derivades dels valors de l'hemograma i de la citologia en la sèrie eritroide les següents condicions:

- **Alteracions de la mida.** Anisocitosi que indica la desigualtat de mides entre els hematies; Poden ser microcítiques (diàmetre predominant de l'hematia menor a 6 micròmetres i un VCM inferior als 80 fl) o macrocítiques (diàmetre predominant d'hematies de diàmetre entre 8-11 micròmetres i VCM major a 100 fl).
- **Alteracions de la forma:** Poiquilocitosi és la desigualtat en la forma dels hematies. Com alteracions morfològiques podem trobar:

- **Esferòcits.** Són hematies esfèrics que han perdut la seva pal·lidesa central. Normalment es troben presents en casos anèmies hemolítiques congènites o adquirides (anèmia hemolítica autoimmune).
  - **El·liptòcits.** Son hematies allargats d'extrems pràcticament simètrics que freqüentment es troben en casos d'anèmia ferropènica.
  - **Dacriòcits.** Son hematies en forma de llàgrima presents en casos de mielofibrosis.
  - **Dianòcits.** Son hematies amb excés de superfície on es posa de manifest un contingut més gran d'hemoglobina en el centre, cosa que li dona un aspecte semblant a una diana.
  - **Esquistòcits** Són hematies fragmentats que poden presentar formes molt variades. Son freqüents en les anèmies hemolítiques microangiopàtiques
  - **Drepanòcits.** Són hematies en forma de semi lluna (allargats i estrets). Son característics de l'anèmia falciforme.
  - **Excentròcits.** Son hematies on l'hemoglobina es troba distribuïda de forma preferent en les extrems o pols de l'hematia. Poden indicar un dèficit de glucosa-6-fosfat deshidrogenasa .
- **Alteracions en la concentració de hemoglobina:** *Hipocromia*, hematies tenyits més dèbilment per el seu menor contingut d'hemoglobina; *Hipercromia*: que es tenyeixen més intensament per el seu major contingut en hemoglobina i *Policromasia* o presència d'hematies en color blau grisenc. Normalment correspon a reticulòcits. Són més grans que els hematies madurs i la seva presència diseritropoiesi o activitat medul·lar augmentada. La xifra normal de reticulòcits en sang perifèrica oscil·la entre el 0,5-2% del total de hematies.
  - **Eritròcits nucleats o Eritroblasts**, son precursors dels hematies madurs. En la sang perifèrica els veiem en nounats i en algunes malalties on hi hagi una alta demanda medul·lar (106).

En el cas concret de l'estudi de **distribució de les hemoglobines** i del **paràmetre Ret-He** hem seguit el següent procés:



Confirmat que les mostres presenten unes condicions pre-analítiques adequades (tub correcte, mostra identificada, volum suficient..), es processa l'hemograma per l'analitzador Sysmex<sup>®</sup>XN. En aquells casos on s'observa una alteració de l'hemoglobina i/o els diferents paràmetres eritrocitaris com ara el VCM (volum corpuscular mig) o l'HCM (hemoglobina corpuscular mitja), es realitza un frotis de sang perifèrica per veure si existeix alguna alteració qualitativa de les hematies. Paral·lelament, en aquells casos on s'observi un VCM o HCM baix s'analitza si el pacient té un dèficit de ferro i en el cas que no estigui estudiat, s'afegeix el perfil fèrric complet (ferro, ferritina, transferrina i índex de saturació de la transferrina) per fer-ne una valoració.

L'estudi d'hemoglobines es durà a terme segons criteri clínic, per criteri facultatiu de laboratori un cop descartada la ferropènia, i aquelles mostres derivades de l'estudi de l'hemoglobina glicada on s'observa un pic anormal en el cromatograma.

Respecte el paràmetre Ret-He, primerament s'ha fet un estudi retrospectiu d'aquells estudi hemoglobines prèviament realitzats. S'han classificat les mostres en funció de si presentaven algun tipus de talassèmia, hemoglobines estructurals o estudi normal i s'ha observat el valor del Ret-He.

Pel segon anàlisi, s'ha fet un recull de totes aquelles mostres que presentaven un Ret-He < 27,6 i s'ha analitzat quin tipus de desordre presentaven, si en presentaven alguna.

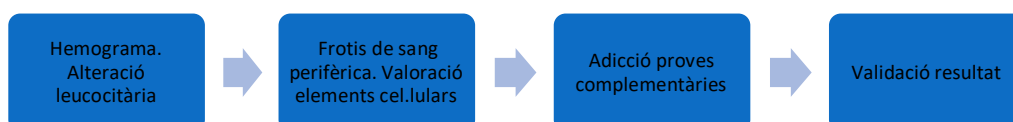
El protocol del laboratori en els casos de plaquetopènia és el següent:



Es processa l'hemograma seguint les condicions prèviament esmentades i en aquelles mostres que presenten plaquetes per sota de  $100 \times 10^9/L$ , es fa una anàlisi addicional on es determina el valor de l'IPF% (*Immature Platelet Fraction*) i es fa una segona quantificació de les plaquetes en el mateix analitzador XN però en un canal diferent. Un cop fet aquesta segona determinació es fa una valoració de les alarmes de l'hemograma juntament amb l'estat clínic del pacient. En aquells casos on aparegui una alarma d'agregats de plaquetes, es procedirà a la realització del frotis en sang perifèrica per confirmar la presència d'agregats. En cas d'observar la presència, es procedeix a l'eliminació del resultat produït per l'analitzador i s'escriu el comentari de plaquetes agregades. En cas de que aquest resultat es repeteixi en el temps amb diferents mostres es recomana fer la quantificació en un altre tipus de tub diferent a l'EDTA, en el nostre cas amb citrat. En aquells casos on no hi hagi la presència de d'agregats de plaquetes es valorarà el resultat segons la seva malaltia de base. En cas de dubte es procedeix a fer el frotis de sang perifèrica per fer una valoració quantitativa i qualitativa de les plaquetes.

En l'estudi de l'IPF% (*Immature Platelet Fraction*) es varen seleccionar plaquetopènies en diverses patologies i es va procedir a l'adició de la magnitud de l'IPF%. Totes les mostres varen ser analitzades per descartar la presència d'agregats plaquetaris. Respecte a l'anàlisi de d'agregats plaquetaris es va procedir a la realització de frotis de sang perifèrica per valorar la presència d'agregats de totes les mostres analitzades.

El protocol del laboratori en els casos d'alteració de la sèrie leucocitària (sola o acompanyada d'altres sèries) tant quantitativa com qualitativa és el següent:

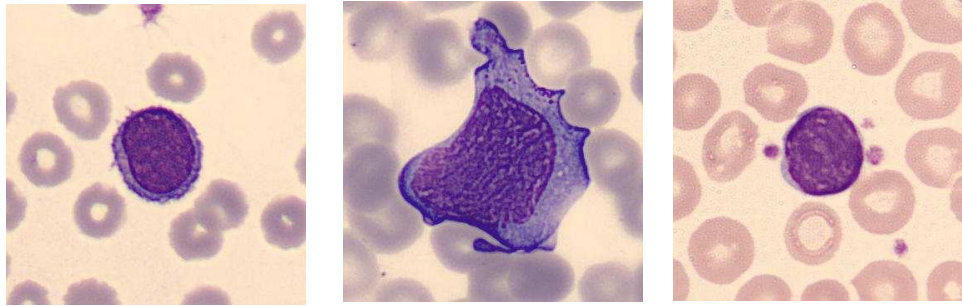




Es processa l'hemograma seguint el condicions prèviament mencionades. En cas d'alteracions qualitatives i/o quantitatives seguint les recomanacions de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) es procedeix a la realització del frotis de sang perifèrica. L'OMS recomana la realització i visualització del frotis de sang perifèrica en els casos següents:

- En el cas dels neutròfils, es recomana fer el frotis de sang perifèrica en aquells casos on s'observen neutropènia per sota  $< 1,5 \times 10^9/L$  i per sobre de  $15 \times 10^9/L$
- En el cas dels limfòcits, la recomanació és realitzar el frotis de sang perifèrica en aquelles analítiques on hi hagi un recompte  $> 5 \times 10^9/L$ , o s'observi una alteració en la gràfica de dispersió cel·lular.
- Respecte els monòcits i eosinòfils caldrà la visualització de la mostra en sang perifèrica en aquells casos on s'observin monòcits o eosinòfils  $> 1 \times 10^9/L$  o s'observi una alteració en la gràfica de dispersió cel·lular.
- En el cas dels basòfils cal una visualització en el frotis de sang perifèrica quan és  $> 0,20 \times 10^9/L$

Depenent de l'alteració cel·lular observada es procedeix a l'adició de proves addicionals. En el cas de l'observació de limfòcits d'aspecte reactiu característics de mononucleosi infecciosa, anomenats limfòcits de Downey (Figura 22) s'amplia estudi serològic i/o PCR (proteïna C reactiva) per la detecció de material genètic dels virus responsables d'aquest tipus d'alteració morfològica. En el cas de sospita de procés limfoproliferatiu degut a l'observació de cèl·lules limfocitàries d'aspecte anormal, es procedirà a l'anàlisi de les poblacions limfocitàries (107).



**Figura 22.** Imatge de limfòcits, Font pròpia (Cella vision®), d'esquerra a dreta limfòcit normal.

Per l'estudi de l'**HFLC** (high fluorescence lymphocytes count) s'han processat els hemogrames seguint les condicions prèviament esmentades. S'han seleccionat diverses patologies que per la seva alteració produïen un augment d'anticossos superior a la normalitat. En alguns casos, s'ha requerit de l'adició de proves complementàries per obtenir el diagnòstic final. En el cas de l'estudi de les **Cell Population Data (CPD)** s'han seleccionat aquells pacients amb sèpsia segons els criteris clínics contemplats en el tercer consens internacional de definicions de sèpsies i xoc sèptic (sepsis-3) i s'ha fet una anàlisi de les CPD de l'hemograma extret el mateix dia que l'hemocultiu.

## 4. MÈTODES ANALÍTICS

### 4.1 HEMOGRAMA

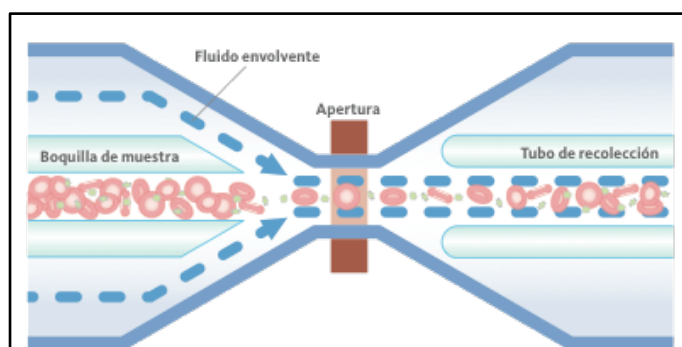
L'analitzador hematològic Sysmex® XN està disposat de tres metodologies diferents de mesura: impedància pel recompte de cèl·lules, citometria de flux per a la classificació dels diferents tipus de leucòcits i espectrofotometria de llum visible per mesurar la concentració d'hemoglobina. Per cada metodologia emprava diferents canals de mesura directament relacionats amb el paràmetre que quantifica. Disposa de tres canals de mesura directa per les tres poblacions de la sang perifèrica, eritròcits (*red blood cells* o RBC), leucòcits (*white blood cells* o WDF) i plaquetes (PLT). Disposa també d'un canal de mesura òptica dels reticulòcits (RET) i plaquetes (PLT-O). Addicionalment disposa de dos canals de mesura per fluorescència per la determinació de la fracció de plaquetes immadures (*immature platelet*

*fraction* o PLT-F) i per la detecció de precursors leucocitaris immadurs (*white precursor channel* o WPC) (94).

#### 4.1.1 CANAL RBC/PLT

El canal RBC/PLT fa el recompte total dels hematies i plaquetes mitjançant el mètode de detecció del canal de flux de corrent contínua.

El mètode de corrent contínua es basa en el principi que en un camp elèctric creat per dos elèctrodes de càrrega oposada poden ser utilitzats per determinar la mida de les cèl·lules. Els glòbuls vermells són conductors pobres de l'electricitat. El fluid (diluent) on queden suspesos quan passen per l'orifici és una solució isotònica que és un bon conductor de l'electricitat. Així quan les cèl·lules se suspenen en el diluent i passen per l'orifici entre els dos elèctrodes, cada cèl·lula incrementa momentàniament, la resistència (impedància) del corrent elèctric entre els dos elèctrodes. Cada cèl·lula genera un pols elèctric en proporció a la seva mida (94).



**Figura 23.** Esquema on es mostra l'anàlisi per impedància per fer el recompte cel·lular

*Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó.*

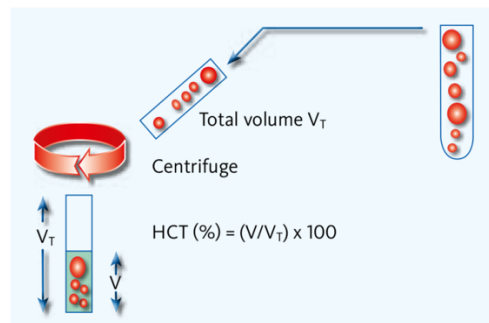
#### 4.1.2 MESURA DEL VOLUM CORUPUSCULAR MIG (VCM)

És el valor mig del volum dels hematies. Permet classificar les anèmies en microcítiques (volum baix), normocítiques (volum mig) i macrocítiques (volum alt). A l'apartat anterior hem descrit la mesura dels hematies a través de la mesura de polsos elèctrics. L'alçada del

pols és proporcional al volum de l'hematia. El volum corpuscular mig és la mitjana de tots els volums eritrocítics mesurats. Les unitats s'expressen en fentolitres (fl) (94).

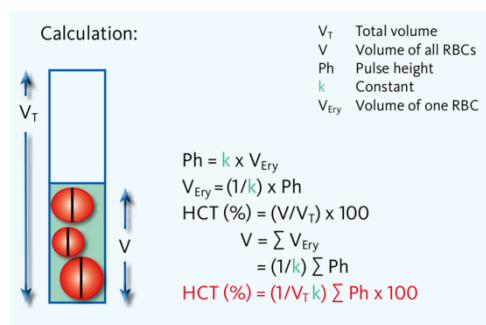
#### 4.1.3 MESURA DE L'HEMATÒCRIT

L'Hematòcrit s'obté de mesurar el volum acumulat total dels hematies en el volum de la sang total. En l'analitzador el valor de l'hematòcrit s'obté a partir de l'alçada acumulativa dels pols de cada eritròcit obtingut pel canal RBC mitjançant la tècnica anteriorment descrita de corrent continu. S'assumeix que l'alçada del pols és proporcional al volum de l'eritròcit. A través d'una fórmula matemàtica (Figura 25) es calcula l'hematòcrit (94).



**Figura 24.** Esquema on es presenta la fórmula de l'hematòcrit.

Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó).



**Figura 25.** Mètode utilitzat per l'analitzador per fer el càlcul de l'hematòcrit.

. Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó).

#### 4.1.4 MESURA DE L'HEMOGLOBINA

La concentració d'hemoglobina en sang és la magnitud que ens definirà l'**anèmia**. Segons l'OMS, es considera anèmia quan la xifra d'hemoglobina es troba per sota de les concentracions esperades segons edat sexe i localització geogràfica.

Per mesurar l'hemoglobina, l'analitzador Sysmex® XN utilitza el lauril sulfat sòdic (SLS). El mecanisme de reacció el podem resumir en els següents passos:

**1. Reacció hemolítica entre el SLS i la membrana de l'eritròcit.** SLS s'uneix per mitjà d'enllaços iònics i hidrofòbics a la membrana de l'hemàtia. Això permet que els fosfolípids de la membrana de l'hemàtia es facin solubles i es produeixi la sortida de l'hemoglobina des de l'interior de l'hemàtia mitjançant la modificació de l'estructura proteica de la membrana.

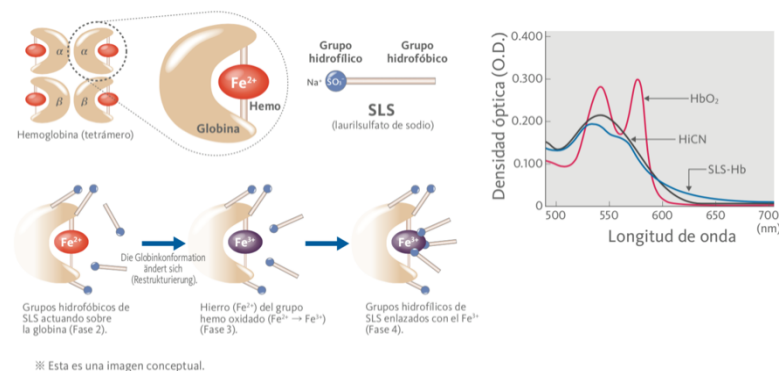
**2. Canvi en l'estructura tridimensional de la globina per SLS.** L'hemoglobina alliberada per l'hemòlisi realitza un canvi en la seva estructura tridimensional degut a la unió entre el grup hidrofòbic de SLS i la globina.

**3. Oxidació del ferro del grup hemo per l'oxigen.** Al mateix temps, amb el canvi de l'estructura tridimensional de l'hemoglobina, el ferro 2+ és fàcilment convertible en ferro 3+ per l'enllaç de l'oxigen amb el ferro del grup hemo o bé per l'oxigen dissolt.

**4. Enllaç del SLS.** Les poblacions hidrofòbiques de SLS s'enllacen amb el ferro del grup hemo per formar una unió estable hemoglobina-SLS. Aquesta reacció es realitza en segon quan s'utilitza el reactiu SULFOLYSER.

L'hemoglobina-SLS mostra una corba d'absorció amb un pic màxim de longitud d'onda de 560nm i un pic mínim de 535 nm. L'analitzador emet llum de 555 nm i mesura l'absorció. La metodologia aplicada en la mesura de l'hemoglobina és espectrofotometria d'absorció

seguint la llei de Lambert-Beer. Aquesta llei que permet de calcular la disminució de la intensitat d'un raig de llum, o d'una radiació electromagnètica semblant, després d'haver travessat una solució. La quantitat de llum absorbida és donada per l'expressió  $I=I_0 e^{-bcx}$  essent la intensitat del raig de llum incident, b el coeficient d'absorció per unitat de concentració de solut, que depèn de la longitud d'ona de llum emprada, c la concentració de la solució, i x el gruix travessat per la radiació. L'absorbància de les substàncies que satisfan la llei de Beer és proporcional a la concentració(94).



**Figura 26. Etapes per l'anàlisi de la mesura de l'hemoglobina**

Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó).

#### 4.1.5 PARÀMETRES CALCULATS ERITROCITÀRIS

- **Hemoglobina corpuscular mitja (HCM).** És un paràmetres que ens permet classificar les anèmies en hipocròmiques, normocromes i hiperocròmiques) És un càlcul que s'obté de dividir els hematies (RBC) i l'hemoglobina (Hb). Les unitats s'expressen en pg.

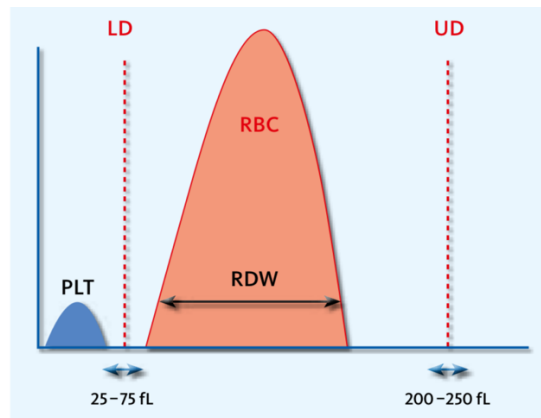
$$HCM = Hb / RBC$$

- **Concentració hemoglobina corpuscular mitja (CHCM)** És la concentració mitja de l'hemoglobina en un volum determinat d'hematies. Es calcula a partir del l'hematòcrit i l'hemoglobina. Les unitats s'expressen en g/dL.

$$CHCM = Hb/HTC$$

- **Amplitud de distribució eritrocitària (ADE).** És una mesura de la variabilitat de la mida dels hematies circulants. Ens dona informació sobre la homogeneïtat o heterogeneïtat de la mida dels hematies. Les unitats s'expressen en % (94).

$$ADE = (\text{desviació estàndard del VCM} / \text{mitja del VCM}) \times 100$$



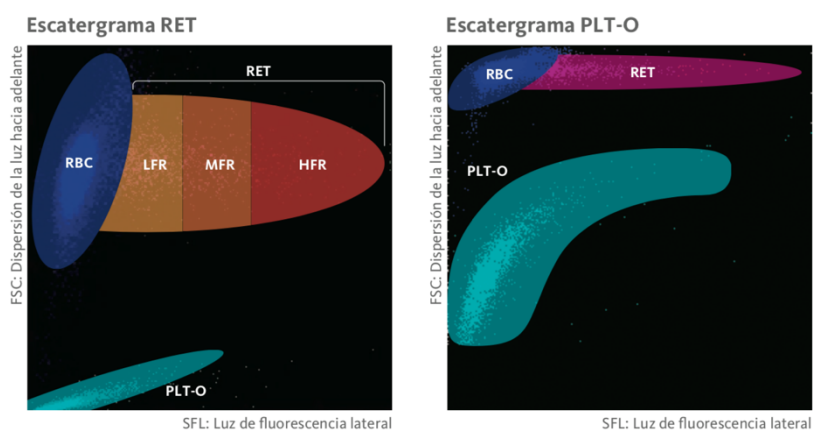
**Figura 27. Amplitud de distribució eritrocitària (ADE, RDW red cell Distribution width).**

*Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó.*

#### 4.1.6 CANAL DE MESURA ÒPTICA (RET) I PLT-O

El canal RET permet el recompte al mateix temps de reticulòcits, hematies i plaquetes. Els reticulòcits són eritròcits immadurs i la seva quantificació és una magnitud molt útil per saber si el tipus d'anèmia és regenerativa (causa perifèrica) o no regenerativa (causa central). Contenen en el seu interior àcid ribonucleic (ARN) ribosomal que serà el que el canal de mesura òptica detecta. Quan més ARN ribosomal presenta, més immadur és el reticulòcit i més fluorescència presenta. Aquests reticulòcits es poden observar al microscopi òptic utilitzant la tinció de blau de metilè.

En el canal RET, els àcids nucleics ADN/ARN són marcats amb el marcador Fluorecell RWT i després tractats amb el CELL PACK DFL. Aquestes cèl·lules es diferenciarien dels hematies madurs segons la diferent intensitat de fluorescència. La determinació obtinguda són els reticulòcits tant en quantitat relativa (%) com en nombre absolut.



**Figura 28. Distribució de les poblacions cel·lulars mesurades en funció de la seva mida i de la seva intensitat fluorescent**

Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó).

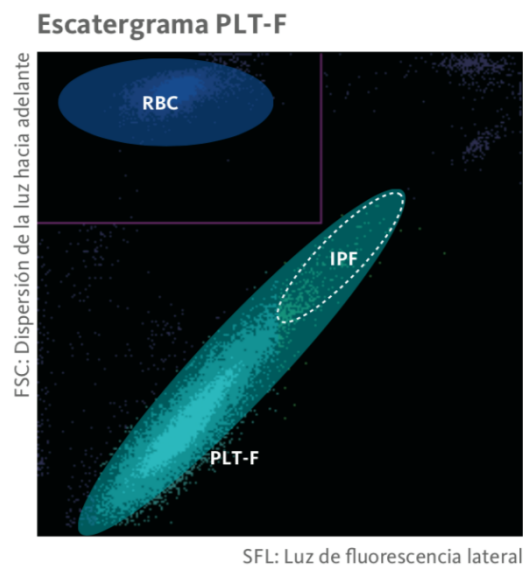
Aquest canal també permet realitzar el recompte de plaquetes per una metodologia diferent a la impedància. El recompte de plaquetes pel canal òptic es fa usant colorant de polimetil tenyeix RNA/DNA de les cèl·lules reticulades i els grànuls i membrana de les plaquetes. Dins la cèl·lula de flux, cada element travessa un feix de llum d'un làser semiconductor que permet la separació de plaquetes, hematies i reticulòcits. Aquesta tinció fluorescent no només permet l'exclusió de les partícules que no siguin plaquetes sinó que permet la inclusió de plaquetes grans o gegants. El canal òptic permet un comptatge més precís en les mostres amb plaquetes inferiors a  $100 \cdot 10^9 / L$  (94).

#### 4.1.7 CANAL PLT-F

El Sysmex®XN incorpora un citòmetre de flux amb un làser semiconductor. En el canal de fluorescència per la mesura de les plaquetes i la detecció de formes reticulades les plaquetes són marcades específicament amb el marcador fluorescent (Tinció d'Oxazina) Fluorcell PLT i després tractades amb el CELLPACK DFL. El canal fa un recompte de plaquetes



i els punts que es localitzen en l'àrea d'alta intensitat de fluorescència són separats com a fracció de plaquetes immadurs (immature platelet factor o IPF). Les plaquetes són clarament diferenciades de les altres cèl·lules sanguínies mitjançant la diferència en la dispersió cap endavant i la intensitat de fluorescència. A través d'un algoritme de càlcul matemàtic (SAFLAS Sysmex Adaptive Flagging Algorithm based on Shape-recognition) es mesura IPF com un percentatge de plaquetes reticulades del total del recompte de plaquetes. Els valors de IPF absoluts també estan disponibles a la pantalla d'investigació. (94).



**Figura 29.** Diagrama de dispersió de plaquetes en funció de la seva fluorescència i mida cel·lular

Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó).

#### 4.1.8 CANAL DE WNR (WHITE NUCLEATED CELLS)

El canal WNR realitza el recompte de leucòcits i estableix el recompte diferencial entre basòfils i eritroblasts. Els surfactants del Lysercell WNR produeixen l'hemòlisi dels hematies i plaquetes i penetra a la membrana cel·lular dels leucòcits. Aquest produeix canvis en la configuració externa i interna de la seva estructura, que son dependents de la seva estructura. Aquest canal ha estat capaç de diferenciar els basòfils d'altres leucòcits i fer el recompte degut a la intensitat de fluorescència que s'originen i als canvis en la dispersió de

la llum (FSC i SSC). EL reactiu Fluorcell WNR tenyeix de manera fluorescent els àcids nucleics i els orgànuls cel·lulars dels leucòcits i eritroblasts.

EL canal WNR utilitza les diferències en aquelles fluorescències per diferenciar els eritroblasts dels leucòcits i això permet separar el recompte per cadascun d'aquests tipus cel·lulars. A la Figura 31 observem la diferència entre la intensitat de fluorescència, que és forta en els basòfils i mitja a la resta dels leucòcits, motiu pel qual permet fer el recompte de basòfils en aquest canal i necessitar un altre canal per poder fer la diferenciació de la resta dels leucòcits (94).

	Hemólisis	Fluorescencia	Luz de fluorescencia lateral (SFL)	Dispersión de luz hacia adelante (FSC)
Basófilos			Fuerte	Fuerte
Linfocitos			Medio	Medio
Monocitos				
Granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, etc.)				
Eritroblastos			Débil	Medio
Hematies			Muy débil	Muy débil

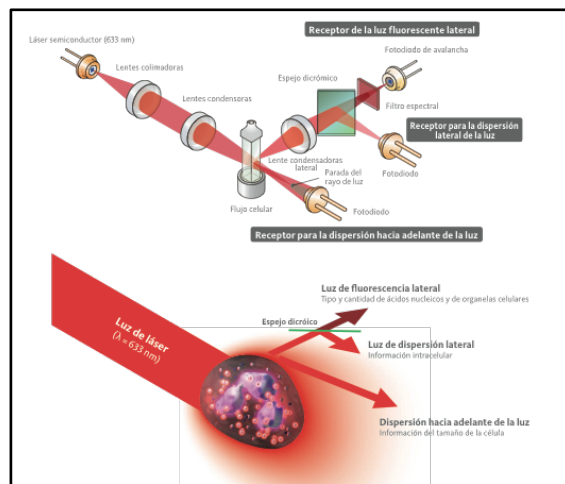
**Figura 30. Procés que presenten els diferents elements cel·lulars en el canal WNR.**

*Primer es produeix una hemòlisi per eliminar hematies i plaquetes i provoquen una modificació a la membrana dels leucòcits. Seguidament es tenyeixen amb un colorant fluorescent que separa els elements cel·lulars en funció de la intensitat de fluorescència i dispersió de llum. Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó.*

#### 4.1.9 DIFERENCIAL LEUCOCITARI: CANAL WDF (WHITE DIFFERENTIAL LEUKOCYTE)

L'analitzador Sysmex® XN utilitza la impedància pels recomptes cel·lulars (eritròcits, plaquetes i leucòcits) i la citometria de flux per fer el diferencial quantitatiu (absolut i relatiu) de les principals subpoblacions presents a la sang perifèrica dels leucòcits, ja que analitza els propietats fisiològiques i químiques de les cèl·lules. És una metodologia que proporciona informació sobre la mida, l'estructura cel·lular i l'interior de les cèl·lules.

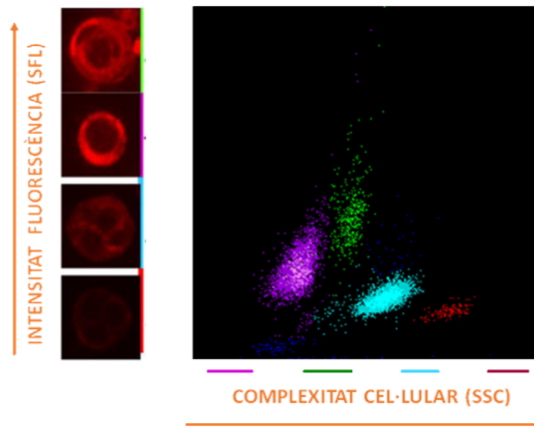
Aquest analitzador utilitza un làser semiconductor de 633nm que travessa cada element cel·lular alterant aquest el feix de llum. Aquesta alteració proporciona informació cel·lular en funció de la dispersió de la llum cap endavant (**forward side scatter** o FSC), la dispersió lateral de la llum (**side scatter** o SSC) i de la fluorescència lateral de la llum (**side fluorescence** o SFL).



**Figura 31.** Esquema de l'anàlisi per citometria de flux

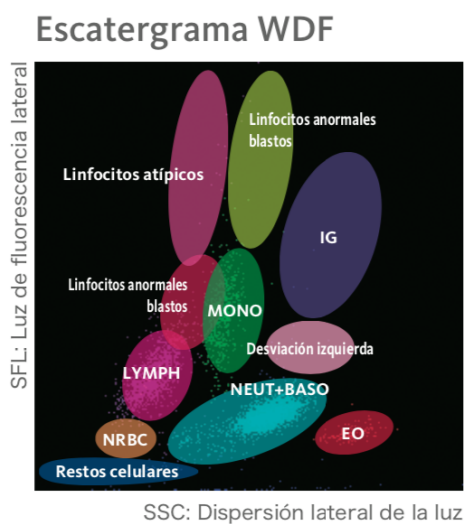
Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó).

El **forward scatter** (dispersió frontal) ens indica el volum cel·lular mentre que el **Side Scatter** (dispersió lateral) ens dona informació sobre la complexitat cel·lular com ara el nucli i els òrgans. La **fluorescència** ens indica la quantitat d'ADN o ARN present a la cèl·lula. Tota aquesta informació queda reflectida en el diagrama de dispersió.



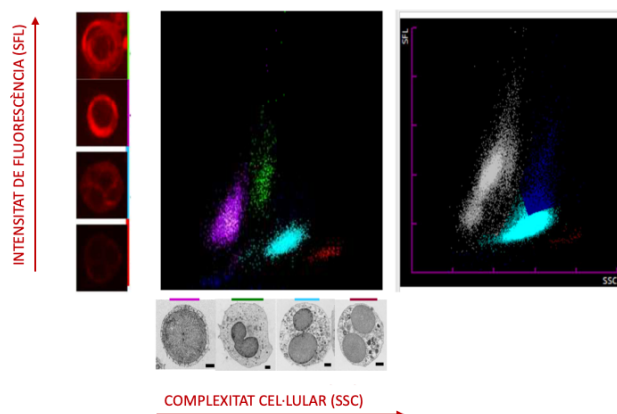
**Figura 32.** Imatge del diferencial leucocitari analitzat en un pacient normal

Per a la mesura del diferencial leucocitari es té en compte la intensitat de la llum emesa per la cèl·lula a l'eix Y (relació amb la mida) i la dispersió de la llum a l'eix X (complexitat citoplasmàtica). En rosa, limfòcits, verd els monòcits, blau clar els neutròfils i vermell els eosinòfils. Els basòfils en aquesta metodologia es veuen en un altre canal. Foto cedida per la Dra. M Serrano



**Figura 33.** Imatge del diagrama de dispersió dels diferents elements cel·lulars en funció de la seva localització i intensitat de fluorescència

Gràfica explicativa de la localització dels elements normals i de les alteracions o anomalies cel·lulars. Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó).



**Figura 34. Imatge del diferencial leucocitari analitzat en un pacient patològic.**

*Es pot observar que no s'aprecia una diferència entre els diferents grups leucocitàries presentant totes les cèl·lules aquest color gris .*

*Font: foto cedida per la Dra. Serrando*

L'anàlisi de diferencials consisteix en una reacció citoquímica de les cèl·lules amb un reactiu, seguida d'una anàlisi amb citometria de flux amb fluorescència. Al mateix temps, les membranes cel·lulars dels leucòcits es perforen deixant porus ultramicroscòpics a través dels quals passa un marcador fluorescent amb base de polimetina per unir-se als àcids nucleics.

Els surfactants del Lysercell WDF produeixen l'hemòlisi i la dissolució dels hematies i plaquetes Al mateix temps, les membranes cel·lulars dels leucòcits es perforen deixant porus ultramicroscòpics a través dels quals passa un marcador fluorescent amb base de polimetina per unir-se als àcids nucleics. El grau d'impacte i per tant el canvi de morfologia de la cèl·lula depèn de les característiques individuals de cada tipus de leucòcit. Aquestes diferències poden ser diferenciades utilitzant la llum de dispersió lateral. En un moment posterior, el marcador FLUORCELL WDF penetra dins les cèl·lules i marca els àcids nucleics i els orgànuls cel·lulars. La intensitat de fluorescència varia entre els diferents tipus de leucòcits segons el tipus i la quantitat d'àcids nucleics i orgànuls cel·lulars. Es possible diferenciar i fer el recompte de diversos tipus cel·lulars i la alarma de cèl·lules anormals apareix a partir de l'anàlisi de diferències entre les dispersions de llum i fluorescència amb el seu corresponent algoritme.

	Hemòlisis		Tinció		Luz de fluorescència lateral (SFL)	Dispersió lateral de la luz (SSC)
Linfocitos		→		→	Medio	Débil
Monocitos		→		→	Medio	Débil
Neutròfils		→		→	Débil	Medio
Eosinòfils		→		→	Débil	Fuerte
Linfocitos atípicos		→		→	Medio - Fuerte	Débil - Medio
Leucocitos inmaduros		→		→		

**Figura 35. Procés que presenten els diferents elements cel·lulars en el canal WDF**

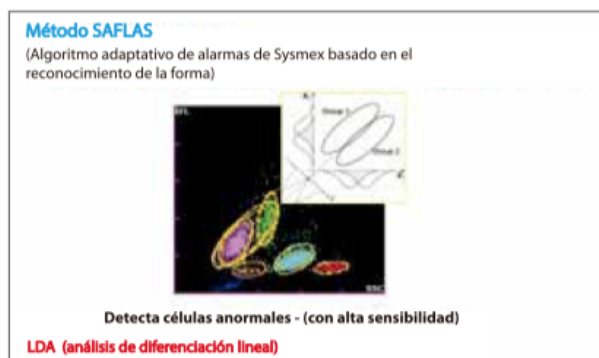
El primer pas és una hemòlisi per eliminar hematies i plaquetes i provoquen una modificació a la membrana dels leucòcits (exceptuant els basòfils). seguidament es tenyeixen amb un colorant fluorescent que separa els elements cel·lulars en funció de la intensitat de fluorescència i dispersió de llum. *Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó.*

A continuació s'analitza per citometria de flux amb fluorescència. Els senyals de mesura relatius a la dispersió lateral (SSC) i fluorescència lateral (SFL) s'analitzen i es representen en un diagrama de dispersió. Aquesta intensitat reflecteix l'estructura de la superfície cel·lular, la configuració de les partícules, la forma del nucli i l'índex de refracció i el de refractivitat de les cèl·lules. En general, el senyal FSC és més forta per a les cèl·lules més grans i el senyal SSC és més forta quan les estructures intracel·lulars són més complexes. La intensitat de fluorescència lateral de la llum reflecteix generalment el tipus i la quantitat d'àcid nucleics i orgànuls intracel·lulars.

El canal de diferenciació ens proporciona recomptes cel·lular de totes les subpoblacions de leucòcits normals, així com informació de senyals en cas d'anomalies. Per fer-ho utilitza la tecnologia SAFLAS (Sysmex Adaptive Flagging Algorithm based on Shape-recognition) on es fonamenta la diferenciació lineal d'agrupacions cel·lulars en el diagrama de dispersió WDF.

La metodologia SAFLAS reconeix no només la quantitat de cèl·lules sinó també diferents característiques cel·lulars. Cada grup cel·lular presenta unes determinades posicions, angles, mides, longitud que representen la normalitat en la representació del diagrama de dispersió i que són el patró referent. Quan hi ha una alteració d'alguna

d'aquestes característiques, apareix una alarma informant de que no es compleix la normalitat del patró de referència (94).



**Figura 36.** Gràfica on s'observa les diferents mesures en funció de la posició, angle, longitud.

*En el cas concret de la gràfica representa la dispersió dels limfòcits i monòcits. Font: manual de l'usuari Sysmex XN Series, Kobe, Japó).*

## 4.2 QUANTIFICACIÓ DE LES FRACCIONS DE L'HEMOGLOBINA

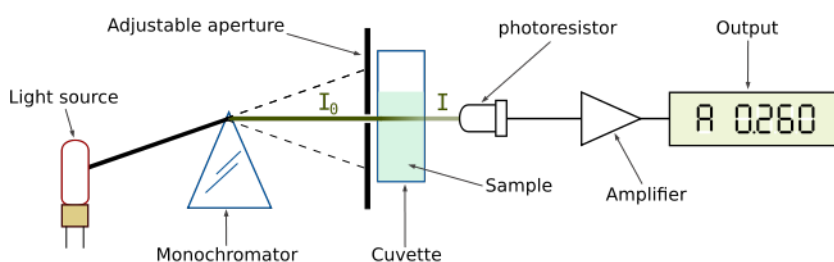
### **BIORAD D10 / VARIANT II DE BORAD**

L'analitzador D10 Dual Program obté les diferents fraccions de l'hemoglobina per immunocromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) a on la separació de les diferents hemoglobines segons les interaccions iòniques amb el material de la columna. Les mostres són diluïdes automàticament i injectades a la columna analítica on hi ha un gradient positiu de força iònica a mesura que s'avança. Les hemoglobines separades passen per un fotòmetre on es mesuren les diferències d'absorbància a 415 nm. Els resultats es presenten gràficament en un cromatograma. Un microprocessador transforma les àrees del cromatograma en la part proporcional de cada fracció d'hemoglobina en forma de percentatge.

Respecte a la interpretació dels resultats, es realitza tal i com s'ha explicat en l'apartat 3 de la de la introducció "diagnòstic de les hemoglobines", subapartat HPLC (95,96).

### 4.3 DETERMINACIÓ DE MAGNITUDS BIOQUÍMIQUES

L'**espectrofotometria** és una tècnica molt utilitzada per determinar magnituds bioquímiques que aprofita l'absorció de radiació electromagnètica en la zona ultraviolada i visible de l'espectre. La mostra absorbeix part de la radiació incident en aquest espectre i promou la transició de l'analit cap a un estat excitat, transmetent un feix de llum menor energia. En aquesta tècnica es mesura la quantitat de llum absorbida i depèn de l'estructura de les molècules ja que és característica de cada substància química. Aquesta llum és detectada per un fotomultiplicador, que és un detector que transforma la llum absorbida en corrent elèctric mesurable, de tal manera que permet saber la quantitat de llum que hi arriba.



**Figura 37.** Esquema de la tècnica d'espectrometria utilitzada per detectar els analits bioquímics

Foto extreta de <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spetrophotometer-en.svg>

**Les proves electroquimioluminiscència (ECLIA).** És una tècnica d'immunoassaig no competitiu on l'anticòs utilitzat recobreix unes micropartícules imantades i que després de la formació del complex antígen-anticòs, es fixen a un elèctrode per magnetisme. Aquest anticòs està conjugat amb un marcador (derivat del ruteni) capaç d'emetre fotons quan s'aplica una petita diferència de potencial sobre l'elèctrode. L'energia lumínica emesa es detecta en un fotomultiplicador.



**Les proves turbidimètriques** son tècniques basades en la propietat que posseeixen les partícules en solució o suspensió de dispersar la llum electromagnètica. És un fenomen que es produeix seguint la teoria de dispersió de la llum (Rayleigh) en la qual al incidir una radiació monocromàtica en una suspensió de partícules, aquesta al tenir un índex de refracció diferent és dispersada. La mesura turbidimetria mesura la llum no dispersada, mentre que la nefelomètrica mesura la llum dispersada (97,98).

### **COBAS 600 FERRITINA DE BIORAD**

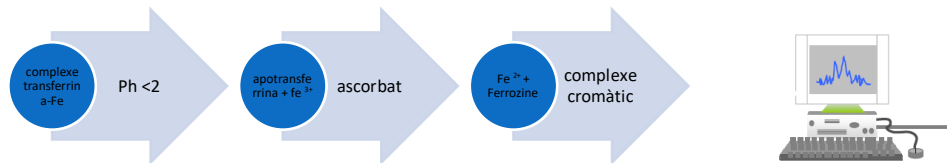
Per analitzar la ferritina s'utilitza el mètode d'electroquimioluminiscència (ECLIA). És una tècnica de sandwich amb una durada de 18 minuts.

1r- Incubació. S'incuba 15µL de mostra, amb un anticòs monoclonal biotilinat específic anti-ferritina i un anticòs monoclonal marcat amb quelat de ruteni específic contra la ferritina, de tal manera que es forma un complex tipus sandwich.

2n.- Incubació. Després d'incorporar micropartícules recobertes d'estreptavidina, el complex es fixa a la fase sòlida per la interacció entre biotina i estreptavidina. La barreja de reacció traslladada a la cèl·lula de lectura a on, per magnetisme, les micropartícules es fixen temporalment a la superfície de l'elèctrode. A continuació, s'eliminen els elements no fixats en el reactiu Pro Cell. Aplicant un determinat corrent elèctric té lloc una reacció quimioluminiscent, l'emissió de llum de la qual es mesura directament amb un fotomultiplicador. Els resultats s'obtenen a partir d'una corba de calibratge realitzada en el sistema per mitjà d'un calibratge a dos punts i una corba mestra inclosa en el codi de barres del reactiu (97).

### **COBAS 500 FERRO DE ROCHE**

Es tracta d'un test fotomètric on per a la determinació de ferro se segueixen els següents passos. L'alliberació dels ions  $Fe^{3+}$  del complex de transferrina mitjançant medis àcids o detergents. Reducció dels ions de  $Fe^{3+}$  a ions de  $Fe^{2+}$ , i reacció dels ions de  $Fe^{2+}$  per formar un complex cromàtic. El mètode utilitzat es basa en el mètode ferrozine sense desproteïnitació .



En un medi àcid, el ferro s'allibera de la transferrina. L'ascorbat redueix els ions de  $Fe^{3+}$  alliberats a ions de  $Fe^{2+}$  que reaccionen amb Ferrozine per formar un complex cromàtic. La intensitat cromàtica és directament proporcional a la concentració de ferro i es pot mesurar fotomètricament (98).

### **COBAS 500 TRANSFERRINA DE ROCHE**

La tècnica de la transferrina és una prova immunoturbidimètrica. És una prova de dispersió de la llum turbidimètrica on prèviament es produeix una reacció entre antigen (analit a mesurar ) i anticòs que s'aglutinen. Mostra i addició de R1 . Adició de R2 i inici de la reacció: Els anticossos anti-ferritina reaccionen amb l'antigen de la mostra formant un complex antigen-anticossos. L'aglutinació resultant es mesura per turbidimetria. L'adició de PEG permet arribar ràpidament al punt final i augmenta la sensibilitat de la prova (98).

## **4.4 DETECCIÓ DE MICROORGANISMES**

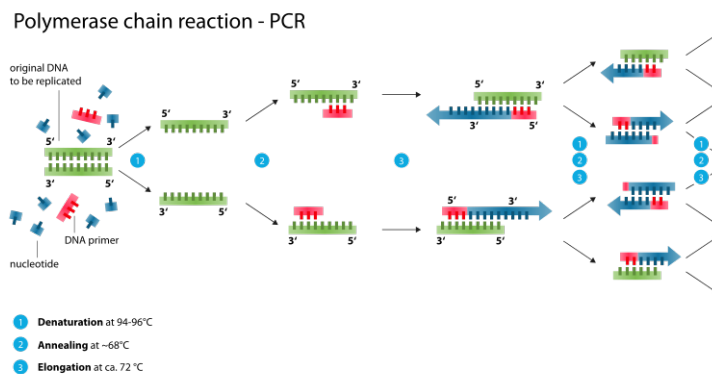
### **4.4.1. HEMOCULTIUS**

El BacT/Alert® (Organon Teknica) detecta l'augment i/o nivell total de  $CO_2$  produït pel creixement microbià utilitzant un sensor colorimètric intern enganxat en el fons dels flascons. A mesura que canvia el color del sensor, la quantitat de llum reflectida s'incrementa i és quantificada amb un augment del voltatge. Les senyals s'analitzen en un

ordinador a través d'un algoritme que utilitza tres criteris com a evidència de creixement. La lectura es realitza cada 10 minuts(99).

#### 4.4.2. BIOLOGIA MOLECULAR

Una de les tècniques més utilitzades per a la detecció de microorganismes en funció del material genètic trobat a la mostra és la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (polimerasa chain reaction, PCR). Està basada en l'amplificació d'una regió específica de l'ADN/ARN utilitzant oligonucleòtids complementaris a la seqüència diana. A la Figura 40 s'observa la base de la tècnica : primer es produeix una desnaturalització de l'ADN/ARN; seguidament s'hibrida amb sondes primers complementares en les dues direccions (5'→3' i 3'→5'). La tercera fase es produeix l'extensió de la cadena a l'unir-se les bases complementàries de la cadena desnaturalitzada (100).



**Figura 38.** Esquema gràfic de les etapes de la reacció en cadena de la polimerasa

Foto extreta de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase\\_chain\\_reaction.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction.svg)

En la PCR en temps real s'utilitzen sondes Taqman marcades amb fluorofòrns que emeten fluorescència en cas d'amplificació. El cicle de la PCR en la qual es detecta inicialment un augment significatiu del senyal de fluorescència és proporcional a la quantitat de material genètic present a la mostra. Aquest valor s'anomena Ct (Cycle Threshold). El sistema inclou un control intern CHIC (Competitive Heterologous Internal Control) per prevenir falsos negatius deguts a la inhibició de la reacció. L'amplificació del

virus Epstein Barr es detecta amb el fluoriform FAM, la de CHIC amb HEX, la del Citomegalovirus amb TxR i la de l'herpesvirus tipus 6 amb ATTO647N (100).

#### 4.4.3. SEROLOGIA

Una de les tècniques més aplicades en el camp de la serologia és la Quimioluminiscència. S'aplica la mostra sobre l'antigen (proteïna del microbi a determinar sobre el qual el cos humà genera anticossos). En el cas que la mostra presenti anticossos en contra d'aquest antigen, s'hi unirà. Seguidament s'afegeix un anticòs marcat normalment amb ester d'acridina. Cal un rentat per eliminar aquells anticossos marcats que no s'han unit i finalment s'afegeixen els reactius químics necessaris (com hidròxid sodi i peròxid àcid) perquè tingui lloc la reacció d'oxidació que produirà una reacció luminescent. En la quimioluminiscència, a diferència d'altres reaccions antigen-anticòs cal una reacció química enlloc de lumínica per generar una emissió de llum (101).

### **EPSTEIN-BARR**

#### **IgM EBV**

El mètode per a la determinació quantitativa d'IgM específica antiantígens **de la càpsida** del virus Epstein-Barr (VCA) és un assaig indirecte basat en el principi de quimioluminiscència (CLIA). El pèptid p18 és el component principal que s'utilitza per recobrir les partícules magnètiques (fase sòlida) i un anticòs monoclonal de ratolí es troba enllaçat a un derivat de l'isoluminol (conjugat anticòs-isoluminol). Durant la primera incubació, els anticossos anti VCA presents en els calibradors, en les mostres o en els controls enllacen la fase sòlida. Durant la segona incubació, l'anticòs conjugat reacciona amb la IgM anti-VCA ja enllaçada a la fase sòlida. Després de cada incubació, s'elimina el material no enllaçat mitjançant un cicle de rentat.

A continuació s'afegeixen els reactius estarter que indueixen una reacció de quimioluminiscència. La senyal lluminosa i per tant la quantitat de conjugat anticòs-

isoluminol es mesura amb un fotomultiplicador en unitats relatives de llum (URL) i indica la concentració IgM anti VCA present en els calibradors ,mostres o controls. El tampó A conté IgG de cabra anti IgG humana com a reactiu d'absorció per reduir les interferències deguts a l'IgG humana específica anti VCA o al factor reumatoide (101).

### **IgG VCA**

El mètode per a la determinació quantitativa d'IgG específica antiantígens **de la càpsida** del virus Epstein-Barr (VCA) és un assaig indirecte basat en el principi de quimioluminescència (CLIA). El pèptid p18 és el component principal que s'utilitza per recobrir les partícules magnètiques (fase sòlida) i un anticòs monoclonal de ratolí es troba enllaçat a un derivat de l'isoluminol (conjugat anticòs-isoluminol). Durant la primera incubació, els anticòs anti VCA presents en els calibradors, en les mostres o en els controls enllacen la fase sòlida. Durant la segona incubació , l'anticòs conjugat reacciona amb la IgG anti-VCA ja enllaçada a la fase sòlida. Després de cada incubació, s'elimina el material no enllaçat mitjançant un cicle de rentat.

A continuació s'afegeixen els reactius estèrils que indueixen una reacció de quimioluminescència. La senyal lluminosa i per tant la quantitat de conjugat anticòs-isoluminol es mesura amb un fotomultiplicador en unitats relatives de llum (URL) i indica la concentració IgG anti VCA present en els calibradors ,mostres o controls (101).

### **EBNA (Epstein-Barr Nuclear Antigen) IgG**

El mètode per a la determinació quantitativa d'IgG específica antiantígens **nuclear** del virus Epstein-Barr (VCA) és un assaig indirecte basat en el principi de quimioluminescència (CLIA). El pèptid EBNA-1 és el component principal que s'utilitza per recobrir les partícules magnètiques (fase sòlida) i un anticòs monoclonal de ratolí es troba enllaçat a un derivat de l'isoluminol (conjugat anticòs-isoluminol). Durant la primera incubació, els anticòs anti Ebna presents en els calibradors, en les mostres o en els controls enllacen la fase sòlida. Durant la segona incubació , l'anticòs conjugat reacciona amb la IgG anti-EBNA ja enllaçada

a la fase sòlida. Després de cada incubació, s'elimina el material no enllaçat mitjançant un cicle de rentat.

A continuació s'afegeixen els reactius estàter que indueixen una reacció de quimioluminescència. La senyal lluminosa i per tant la quantitat de conjugat anticòs-isoluminol es mesura amb un fotomultiplicador en unitats relatives de llum (URL) i indica la concentració IgG anti EBNA present en els calibradors, mostres o controls (101).

### **CITOMEGALOVIRUS**

Per a la detecció tant de IgG com IgM és un immunoanàlisi amb dos passos per a la detecció qualitativa i la de determinació semi-quantitativa dels anticossos contra el citomegalovirus en sèrum i plasma humans que utilitza la tecnologia de quimioluminescència de micropartícules.

Es combina la mostra, el diluent de l'assaig i les micropartícules paramagnètiques recobertes del lisat del virus CMV (soca AD169). Els anticossos IgG/IgM s'uneixen a les micropartícules. Un cop rentat s'afegeix el conjugat anti IgG/IgM marcat amb acridina per crea una mescla de reacció. Les solucions pre-activadora i activadora s'afegeixen a la mescla de reacció després d'un altre cicle de rentat. La reacció quimioluminiscent resultant es mesura en unitat relatives de llum (URL). Existeix una relació directament proporcional entre la quantitat d'anticossos presents a la mostra i les URL (101).

### **4.7 IMMUNOFLUORESCÈNCIA INDIRECTA**

És la tècnica més utilitzada per detectar la majoria d'autoanticossos. S'aplica la mostra sobre un tall de teixit o cultiu cel·lular, i els autoanticossos presents s'uneixen als seus antígens corresponents. Seguidament s'afegeix un anticòs marcat amb un compost fluorescent que s'unirà als autoanticossos presents a la mostra. Es procedeix a fer un rentat per eliminar aquells anticossos marcats que no s'han unit i finalment es produeix la lectura

de la fluorescència emesa. Els marcadors fluorescents més utilitzats són el FITC que s'excita a una longitud d'ona de 488 nm i emet a una longitud d'ona de 530 nm.

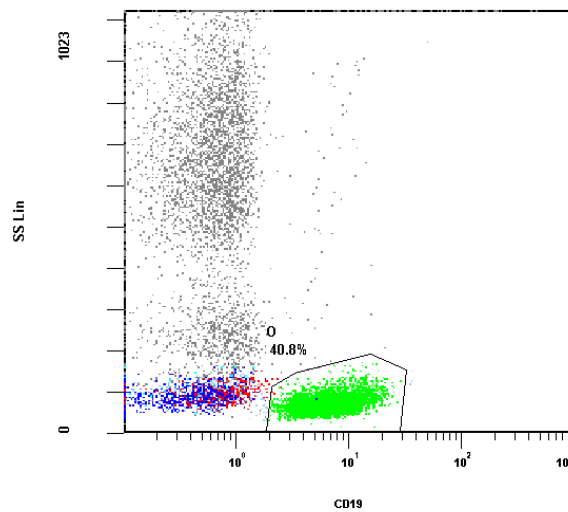
La utilització de cèl·lules Hep-2 d'origen humà són cèl·lules que reconeixen autoanticossos contra antígens en totes les fases de la mitosis.

S'afegeix la mostra problema a plaques de HEp-2 a diferents dilucions utilitzant el diluent PBS. Posteriorment s'afegeix el conjugat IgG que prové d'ovella, cabra o conill marcat amb el fluorescent FITC que detectarà els autoanticossos units a les cèl·lules Hep-2. La reacció d'immunofluorescència es llegeix a través de l'equip Nova View. Depenent dels patrons d'immunofluorescència i de la intensitat es procedirà a afegir les proves complementàries necessàries per arribar al diagnòstic final. Es considera una titulació de 1/160 a partir de la qual es procedeix a fer estudis d'especificitats (103,104).

#### **4.8 IMMUNOFENOTIP**

L'immunofenotip és la prova que estudia les proteïnes expressades per les cèl·lules. La citometria de flux és una tècnica per comptar, examinar i ordenar partícules microscòpiques sospeses en un fluid. Permet l'anàlisi simultània multiparamètrica, anàlisi de les característiques físiques i químiques de les cèl·lules fluint una a una, a través d'un aparell electrònic de detecció òptica.

Es mescla la mostra amb l'agent lisant per tal d'hemolitzar hematies. Seguidament hi afegirem els anticossos monoclonals que calguin per fer el marcatge cel·lular. Aquests anticossos monoclonals es troben marcats amb fluorescència. Posteriorment, Es procedeix a fer un rentat per eliminar aquells anticossos marcats que no s'han unit i finalment es produeix la lectura de la fluorescència emesa que serà detectat. Cada mostra es processa individualment i l'analitzador emet diferents gràfiques on es van combinant els diferents feixos de llum emesos amb els anticossos monoclonals marcats (105).



**Figura 39.**Exemple de resultat que emet el citòmetre de flux

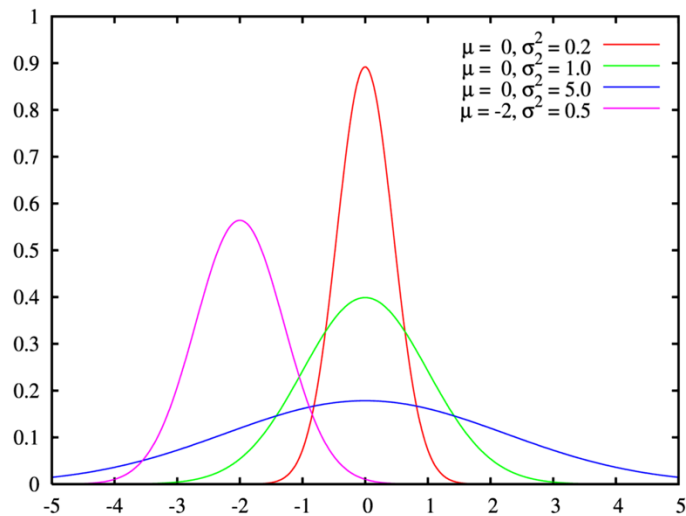
*S'observen en diferents colors cèl·lules marcades amb diferents anticossos monoclonals. L'exemple seleccionat de color verd representen cèl·lules CD19 positives. Font: foto pròpia*

## 5. TRACTAMENT DE LES DADES: ANÀLISI ESTADÍSTICA

Els resultats i l'extracció de les dades es va realitzar utilitzant el sistema informàtic del laboratori OMEGA 3000 de Roche (Basilea, Suïssa). Les dades clíniques i diagnòstiques dels pacient varen ser extretes del programa informàtic SAP (Systeme Anwendungen and Produkte, Alemanya). Per l'anàlisi estadística s'ha utilitzat el programa estadístic SPSS (Statistical Package Social Science ) versió 20.0 (per l'objectiu 2) i versió 23.0 (pels objectius 1 i 3) de Windows (SPSS,Armonk, NY,USA).

En els tres objectius ha estat necessari estudiar la normalitat de les poblacions que s'ha calculat a partir del test de **Kolmogorov-Smirnov** en aquells casos que el número de mostres fos superior a 50 i el test de **Shapiro-Wilk** en aquells casos on les mostres fossin inferiors a 50 determinacions.





**Figura 40. Exemples de diferents tipus de poblacions de distribució normal o Gaussiana.**

*El test de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk calculen si una recull de dades poblacionals presenten o no una distribució normal. Foto extreta de [https://es.wikipedia.org/wiki/Distribuci3n\\_normal](https://es.wikipedia.org/wiki/Distribuci3n_normal)*

En aquells estudis on la població ha seguit una distribució normal, s'ha procedit a la realització del **test d'ANOVA** per detectar si una determinada magnitud (estudi IPF del segon objectiu) presenta diferències significatives amb nivell de significació  $\alpha = 0,05$

En aquelles poblacions amb distribució no normal, s'ha procedit a la realització dels tests no paramètrics de **Mann-Whitney** en aquells casos en els quals tenim dos poblacions a estudiar (estudi del CPD del tercer objectiu), o el test de **Kruskall-Wallis** en aquells casos amb més de dos poblacions a estudiar. Estudi de Ret-He del 1r objectiu i HFLC% del 3r objectiu). Valors  $p < 0,05$  han estat considerats significatius en l'anàlisi.

En aquells casos on hi havia més de 2 poblacions a analitzar, es va procedir a realitzar la prova de POS-HOC utilitzant **el test de Tukey i Bonferroni** per establir quin o quins grups és el que presenta diferències estadísticament significatives.

L'anàlisi de la corba **ROC (Receiver Operating Characteristic)** ha estat utilitzada per trobar el millor punt de tall de les magnituds estudiades on s'ha confirmat que la magnitud presentava diferències significatives. S'ha utilitzat en l'objectiu 1 per detectar el millor punt

de tall del Ret-He, en l'objectiu 2 per detectar el millor punt de tall de l'IPF% i en l'objectiu 3 tant en l'objectiu HFCLC% per trobar el millor punt de tall en els casos on es detectava una mononucleosi infecciosa com en els CPD per detectar el millor punt de tall per detectar una sèpsia. Hem considerat acceptables aquells valors amb una sensibilitat i especificitat majors del 80%, tenint una ROC per sobre de 0,8. Valors  $p < 0,05$  son considerats significatius en tots els anàlisi.

La sensibilitat (S), especificitat (E), valor predictiu positiu (VPP) i valor predictiu negatiu (VPN) es varen calcular segons les fórmules següents:

	POSITIU REAL	NEGATIU REAL
PROVA POSITIVA	Vertader Positiu VP	Fals Positiu FP
PROVA NEGATIVA	Fals Negatiu FN	Vertader Negatiu VN

La sensibilitat és la capacitat del test per detectar els positius veritaders  $S = VP / (VP + FN)$ .

L'especificitat és la capacitat del test per detectar els veritaders negatius.  $E = VN / (VN + FP)$ .

El valor predictiu positiu descriu la probabilitat de que el resultat sigui correcte quan la prova diagnòstica és positiva.  $VPP = VP / (VP + FP)$ .

El valor predictiu negatiu descriu la probabilitat de que el resultat sigui correcte quan la prova diagnòstica és negativa.  $VPN = VN / (VN + FN)$ .







# **1.DISTRIBUCIÓ EPIDEMIO LòGICA HEMOGLOBINOPATIES A LA PROVINCIA DE GIRONA I ESTUDI DEL PARÀMETRE RET-HE E I DIAGNÒSTIC DE LES HEMOGLOBINOPATIES**

## **1.1 DISTRIBUCIÓ EPIDEMIO LòGICA HEMOGLOBINOPATIES A LA PROVINCIA DE GIRONA**

El primer objectiu és analitzar la distribució de les hemoglobinopaties a la nostra àrea geogràfica degut a que fins a la data, no consta cap registre sobre aquest tipus de trastorns. Clàssicament l'alteració de l'hemoglobina més prevalent a la zona Mediterrània son les talassèmies; tal i com hem explicat a la introducció la distribució de les alteracions qualitatives i quantitatives de l'hemoglobina varia molt en les diverses zones geogràfiques mundials fruit de la diferència en la procedència de la població resident i dels moviments migratoris entre diferents zones.

A la demarcació de Girona durant les últimes dècades hi ha hagut un increment de la migració poblacional des de diferents països d'arreu del món, tant dels provinents de la Unió Europea com d'altres continents especialment de l'Àfrica i d'Amèrica. Aquest fet ha proporcionat que al 2018 aproximadament un 20 % de la població de la província de Girona sigui de procedència estrangera. Per tant, no és agosarat pensar que amb aquest increment de població no autòctona hi podria haver un canvi tant en la distribució com en la prevalença del tipus d'hemoglobinopaties.

S'ha estudiat la distribució de les hemoglobinopaties detectades al nostre laboratori des del 2004 al 2018. Cal tenir en compte que al llarg d'aquests 15 anys hi ha hagut diversos factors que han propiciat que les condicions pel diagnòstic de les hemoglobinopaties difereixi al llarg d'aquest temps:

- a. Renovació i canvi de l'equipament de la cromatografia líquida d'alta resolució (High performance liquid chromatography, HPLC). He inclòs en aquest estudi epidemiològic els resultats obtinguts amb dos analitzadors usats en dos períodes de temps diferents:
  - Del 2004 al 2015, els resultats s'entregaven amb l'analitzador D10 (Bio-Rad), columna d'HPLC amb temps de retenció curt de fins a 4 minuts.

- Del 2016 en endavant, s'utilitza Variant II (Bio-Rad), columna d'HPLC amb temps de retenció llarg arribant als 6 minuts i augmentant la precisió de l'elució de les proteïnes analitzades i per tant increment de la seva detecció.

b. La gran majoria de determinacions i diagnòstics de les hemoglobinopaties estan fetes amb l'única tècnica de què hem disposat. Així ha estat pel diagnòstic de  $\beta$  talassèmia,  $\beta\delta$ talassèmia, HbS heterozigota, Hb SS, Hb C, Hb C homozigota. La resta d'hemoglobinopaties detectades s'han obtingut del nostre centre de referència, on es comproven els resultats amb dues tècniques diferents tal i com hem citat a la introducció.

c. En relació a l' $\alpha$  talassèmia, a partir del 2016 s'adquireix el coneixement per detectar-les i derivar-les al nostre centre de referència. Ens hem trobat amb casos que el pacient havia estat detectat d'una hemoglobina variant i més endavant li hem detectat una  $\alpha$  talassèmia associada. En aquests casos, s'ha comptat el pacient en la data on es detecta el diagnòstic final de les dues malalties associades.

d. Un cop definits els criteris pel diagnòstic de cada tipus d'hemoglobinopatia, ens hem trobat amb mostres que no complien cap dels criteris i recomanacions internacionals pel seu diagnòstic i per tant, no els hem pogut incloure en cap grup diagnòstic quedant reflectits a l'apartat d'estudis no conclouents.

e. En relació amb els pacients d'origen estranger, és possible que hi hagi hagut alguna duplictat degut a que el nostres sistemes informàtics accepten diferents números d'història clínica pel mateix pacient. Donat que la gran majoria de pacients estrangers presenten un sol cognom i n'hi ha de molt comuns ( ex. Balde, Diallo, Camara..), s'ha analitzat el pacient detalladament però davant del dubte , s'han comptat com a pacients diferents.

f. Des de l'any 2014, el personal responsable de l'àrea de bioquímica ens deriva totes aquelles mostres en les quals apareix un pic anòmal al ser processades per a la determinació de l'hemoglobina glicosilada en l'analitzador de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) ADAMS TM A1C HA-8180 (Menarini). És una determinació que s'utilitza per fer el

seguiment dels pacients diabètics. Aquest analitzador HPLC utilitza un temps de retenció més curt que l'utilitzat pel Variant II de Bio-Rad, i per tant permet detectar una hemoglobina anòmala sense poder-la identificar. Aquestes hemoglobines estructurals no solen presentar alteracions en l'hemograma i per tant és una troballa casual en pacients diabètics en seguiment. L'aparell no detecta talassèmies ja que no informa de l'hemoglobina A<sub>2</sub> ni del seu %. Aquests pacients s'estudien seguint els protocols estàndards hematològics per hemoglobinopaties.

g. El personal facultatiu responsable de l'àrea d'hematologia no ha estat estable i per tant la interpretació dels resultats podria haver estat diferent durant l'estudi donada la subjectivitat associada a aquests diagnòstics. Hi ha hagut varis factors que han modificat l'abordatge del diagnòstic de les hemoglobinopaties. Primerament, l'arribada de població amb una alta prevalença d'hemoglobines estructurals, quan a la nostra àrea les talassèmies eren les hemoglobinopaties més freqüents. La manca d'un algoritme diagnòstic intern de les hemoglobines amb els recursos materials i humans disponibles han dificultat l'estandardització de la interpretació dels resultats obtinguts. Així, de l'any 2004 fins l'any 2009, no es tenia en compte el resultat de l'estudi del metabolisme del ferro i es procedia a l'estudi hemoglobines independentment dels resultats de ferro, ferritina i índex de saturació del ferro. A partir del 2009, es processen les mostres pel diagnòstic d'hemoglobinopaties un cop obtinguts i interpretats els resultats de l'estudi de la ferropènia, excloent els pacients amb malalties per carència marcats per la possible interferència amb els resultats (la manca de ferro pot derivar en una infraexpressió de la fracció A<sub>2</sub> de l'hemoglobina amb la conseqüent mala identificació del pacient).

h. Formació per part del personal qualificat a cursos especialitzats i estades formatives a centres on el diagnòstic d'hemoglobinopaties son referents (any 2016 i 2017).

i. A partir del 2017, es forma una unitat d'Eritropatologia formada per pediatres, hematòlegs i analistes i clínics. Els pacients els quals se'ls ha detectat una hemoglobinopatia son derivats a aquesta consulta per estudi familiar i consell genètic. A més també es duu a terme estudis als familiars degut a que son malalties genètiques. Això ha fet incrementar de forma significativa la quantitat de pacients estudiats i el grau de complexitat de les



proves addicionals associades a aquests estudis, sovint amb diagnòstics de biologia molecular.

L'estudi s'ha dut a terme en dues fases bastant diferenciades. La primera va ser l'anàlisi del 2005-2015. El 2015 iniciava la tesi i vàrem pensar que fer un estudi retrospectiu de 10 anys a partir d'aquell moment ens podia donar una visió bastant acurada del tipus d'hemoglobinopaties trobades a la nostre regió i la seva freqüència. Aquest estudi va ser publicat a l' *International Journal of Laboratory Hematology* (108).

A la Taula 15 es mostren els resultats publicats. En aquesta publicació vàrem observar que la beta talassèmia era l'hemoglobinopatia més freqüent detectada en el nostre territori en 1324 pacients representant el 46% del total de pacients amb alguna hemoglobinopatia. La seva detecció es manté estable durant els 10 anys d'estudi. L'hemoglobina S heterozigota representa el 34,5% del total de pacients amb alguna hemoglobinopatia (997 de 2.884). En aquest cas s'observa un increment molt marcat en la seva detecció a partir del 2010. A la taula podem observar com del 2005 al 2009 es detecten aproximadament unes 50 Hemoglobina S heterozigotes per any i a partir del 2010 al voltant de 120 deteccions. Aquest resultat probablement és degut a l'increment de migrants durant aquests anys a la província de Girona, tal i com s'ha mencionat prèviament.

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	TOTAL
Normal Hemoglobin Study	444	470	361	528	575	440	440	315	306	376	322	4577
Beta- thalassaemia minor	157	142	121	149	127	127	85	98	63	110	145	1324
Hemoglobin S heterozygote	57	58	52	63	44	127	148	111	106	122	109	997
Iron deficiency anemia	48	99	93	198	130	133	153	147	93	191	275	1560
Hereditary Persistence Fetal Hemoglobin	16	10	6	8	5	11	8	21	2	3	3	93
Hemoglobin C heterozygote	8	12	13	13	18	27	51	21	17	28	48	256
Hemoglobin S homozygote	8	8	3	5	10	6	9	7	6	7	4	73
Other	8	9	5	8	22	7	6	5	14	25	29	138
Hemoglobin C homozygote	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3
	746	809	654	972	931	878	900	725	608	863	935	9021

**Taula 15. Resultats publicats a l' *International journal of laboratory hematology* 39.4 (2017): e98-e101. amb el títol "Epidemiological distribution of hemoglobinopathies in the area of Girona over 10 years."**

Gràcies a aquests resultats es va canviar l'arbre de decisió diagnòstica en funció dels paràmetres de l'hemograma i de la disponibilitat de personal i de tècniques. Això va comportar un canvi en la quantitat i qualitat de la detecció d'aquest grup de malalties en la població a la que el laboratori dona servei. L'increment més marcat observat és el referent a les  $\alpha$  talassèmies. Vàrem creure doncs convenient ampliar l'estudi i afegir les dades del 2004 (primer any de què disposem del registre de les dades d'aquest perfil patològic) i els estudis dels anys 2016, 2017 i 2018.

Es varen processar 12.630 pacients en total en el període comprés entre el 2004 i el 2018. De tots els estudis d'hemoglobines analitzats en aquests 15 anys, el 37,8 % (4.784 pacients) varen mostrar resultats compatibles amb algun tipus d'hemoglobinopatia, tal i com mostra la Taula 16.

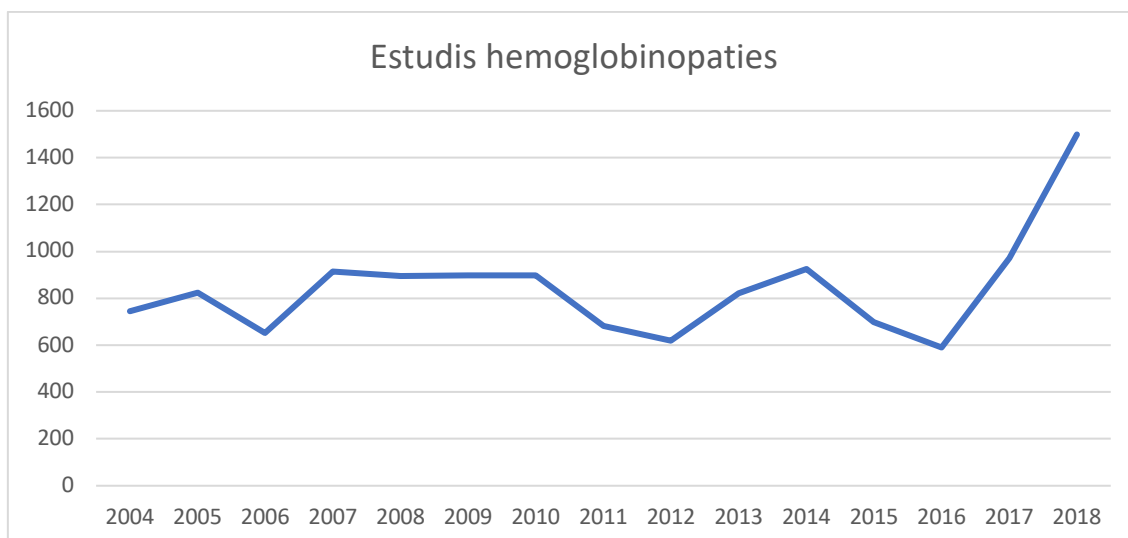
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
<b>Estudis patològics</b>	267	268	224	270	234	316	326	255	244	321	359	336	302	451	611
<b>Estudis normals</b>	467	554	424	629	651	581	571	417	372	496	557	361	283	512	882
<b>No conclouents</b>	10	3	4	15	10	1	1	9	4	4	9	1	5	8	6
<b>TOTAL</b>	<b>744</b>	<b>825</b>	<b>652</b>	<b>914</b>	<b>895</b>	<b>898</b>	<b>898</b>	<b>681</b>	<b>620</b>	<b>821</b>	<b>925</b>	<b>698</b>	<b>590</b>	<b>971</b>	<b>1499</b>

**Taula 16. Número de pacients analitzats per estudi d'hemoglobines.**

D'aquest estudi epidemiològic i de distribució d'hemoglobinopaties a la nostra zona geogràfica se'n pot concloure que les sol·licituds d'aquest tipus d'estudi al laboratori s'han incrementat de forma molt marcada i progressiva durant els darrers 15 anys. A la Figura 39 es pot observar aquest increment observat en especial durant el període que inclou els anys 2016-2018.

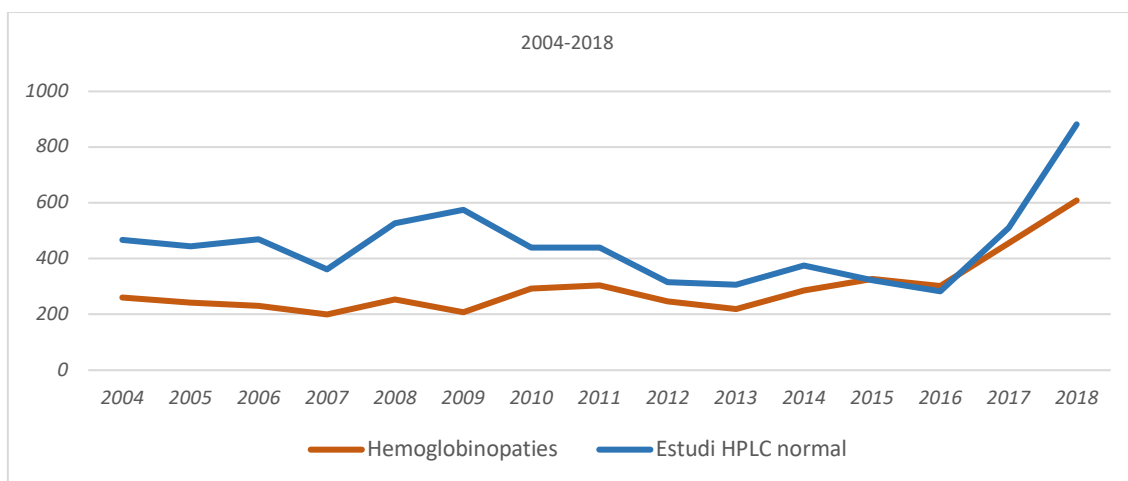
A la gràfica 41 podem observar que malgrat haver augmentat la població migrant, especialment des del 2007, (veure Taula 4 de la introducció) els estudis d'hemoglobines es mantenen més o menys constant al llarg del temps. A partir de l'any 2016 sí que s'observa un augment de les determinacions degut al canvi d'estratègia diagnòstica adaptada a les recomanacions internacionals i considerants la multietnicitat de la població com una variable comuna a tots els territoris de l'hemisferi nord. A més, destacar l'elevat grau de coneixement dels facultatius actualment en la detecció d'hemoglobinopaties i la creació de la consulta d'Eritropatologia, on a més de fer un estudi exhaustiu al pacient s'amplia l'estudi als membres familiars.

Es pot observar una lleugera disminució de determinacions els anys 2010-2012 com a conseqüència de la introducció de l'estudi metabòlic del ferro i la recomanació de cursar l'estudi d'hemoglobines una vegada corregida la ferropènia si convenia. Això va fer que molts dels estudis que en aquell moment acomplien els requisits de sol·licitud no es duguessin a terme.



**Figura 41.** Evolució dels estudis d'hemoglobines sol·licitats

A la Figura 42 es pot observar que la detecció d'hemoglobines patològiques es manté d'una manera més o menys estable fins l'any 2016, a partir del qual, s'observa un increment en valors absoluts passant del número d'hemoglobinopaties detectades de 302 al 2016 (51% del total d'estudis realitzats) a 611 al 2018 representant el 40,76% del total d'estudis realitzats.



**Figura 42.** Comparativa de la detecció d'hemoglobinopaties versus estudis normals entre l'any 2004 al 2018

Aquest resultat és fruit de varis factors entre els quals destaquen la formació del personal facultatiu i investigador de l'àrea d'Hematologia del laboratori a centres de referència d'hemoglobines com ara el Leiden University Medical Center (LUMC, Països Baixos) i l'estada formativa amb la Dra Barbara Bain (UK), hematòloga i professora de la Facultat de Medicina de l'Imperial College de Londres i consultora de l'Hospital St. Mary's. Com he esmentat, durant el mes de juny del 2017 s'obre la consulta d'Eritropatologia per donar cobertura a les necessitats del grup de pacients afectats per aquest tipus de malaltia i dels seus familiars. Amb aquesta consulta s'han detectat pacients familiars portadors heterozigots de diferents hemoglobines variants estructurals. També s'han completat els estudis amb detecció per biologia molecular de les mutacions més freqüentment associades.

Fent una anàlisi més exhaustiu d'aquestes hemoglobinopaties, s'han separat els pacients en 3 grups:

GRUP 1: S'ha analitzat el grup de talassèmies ( on s'inclou: alfa talassèmia, hemoglobina H, la beta talassèmia minor i beta talassèmia major, delta talassèmia, beta delta talassèmia, hemoglobina F persistent hereditària, i hemoglobina Lepore) diagnosticades durant aquests anys (2004-2018); GRUP 2, hemoglobines variants estructurals i GRUP 3 compost d'algun tipus de combinacions entre talassèmies i alguna hemoglobina estructural.

Respecte GRUP 1, a la Taula 17 observem els diferents tipus de talassèmies detectades al llarg d'aquests 15 anys. Totes les talassèmies permeten ser detectades per HPLC excepte l' $\alpha$  talassèmia que cal una anàlisi molecular per a la seva detecció ja que al estar afectada la cadena alfa de la globina, aquesta afecta per igual a totes les hemoglobines (hemoglobina A ( $\alpha_2\beta_2$ ), hemoglobina A2 ( $\alpha_2\delta_2$ ) i hemoglobina F ( $\alpha_2\gamma_2$ )).

L'alteració quantitativa més observada ha estat la  $\beta$  talassèmia minor que representa el 82,8% de totes les talassèmies diagnosticades i el 45,17 % de tots els estudis patològics, sent l'hemoglobinopatia més freqüent detectada a la nostra àrea en 2.161 pacients.

L'  $\alpha$  talassèmia representa el 10% de totes les talassèmies detectades i el 5,28% del total d'hemoglobinopaties detectades i la  $\beta\delta$  talassèmia el 3,22% de les talassèmies i 1,69 % del total d'hemoglobinopaties.

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
<b><math>\beta</math> talassèmia minor</b>	161	145	132	164	129	131	94	104	70	126	162	172	157	192	222
<b><math>\beta</math> major</b>	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<b><math>\alpha</math> talassèmia</b>	0	0	0	1	2	0	0	4	3	2	3	2	9	74	158
<b>hemoglobina H</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<b><math>\beta\delta</math> talassèmia</b>	9	3	6	3	13	1	2	2	0	7	4	4	2	10	15
<b>HPFH</b>	6	16	10	6	8	5	11	8	21	2	3	3	1	0	0
<b><math>\delta</math> talassèmia</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>hemoglobina lepore</b>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	4	1	0	0	1	0
<b>TOTAL</b>	<b>176</b>	<b>165</b>	<b>148</b>	<b>175</b>	<b>154</b>	<b>138</b>	<b>108</b>	<b>118</b>	<b>94</b>	<b>141</b>	<b>173</b>	<b>182</b>	<b>169</b>	<b>268</b>	<b>395</b>

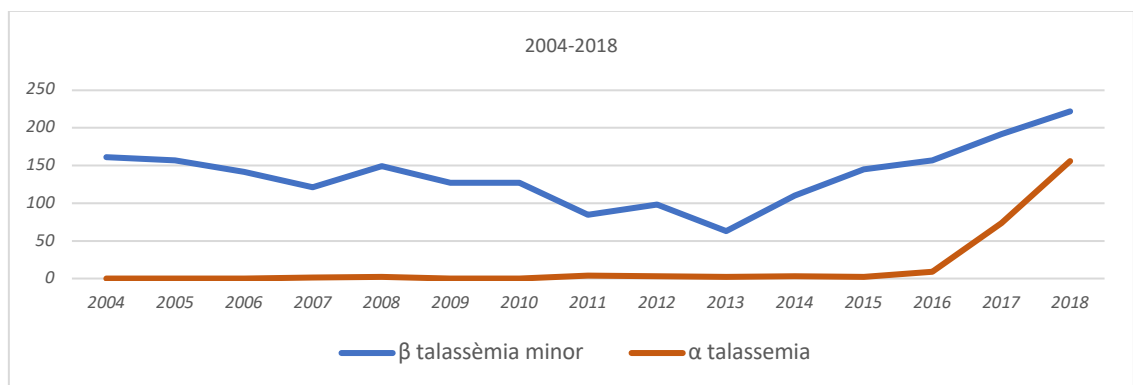
**Taula 17..Distribució de les talassèmies detectades del 2004 al 2018**

També destaca el gran increment en les sol·licituds i deteccions d'  $\alpha$  talassèmies en els últims 2 anys, passant de pràcticament 0 deteccions durant els primers 13 anys a 158 deteccions l'any 2018.

L' $\alpha$ -talassèmia és l'hemoglobinopatia més freqüent del món. Es troba especialment distribuïda en els països Mediterranis, Sud-Est asiàtic i el sud de la Índia (109). Crida l'atenció doncs, que en 14 anys la prevalença a la nostra àrea de l' $\alpha$  talassèmia fos pràcticament nul·la, fet que ens va fer sospitar que havia estat infradiagnosticada durant aquell període de temps. Un dels principals motius creiem que és que aquesta hemoglobinopatia no es detecta per cromatografia líquida d'alta resolució sinó que el seu diagnòstic és molecular. L'alt cost econòmic d'aquesta determinació juntament amb el fet que l'hemograma pugui presentar-se sense alteracions, poden haver contribuït al seu infradiagnòstic. El fet

d'adaptar l'algoritme diagnòstic a les recomanacions internacionals basades en la recerca dels darrers anys en aquest tema ha fet que aquest tipus d'alteració genètica es detecti de forma molt més efectiva al nostre laboratori. Ara, ampliem estudi molecular per  $\alpha$  talassèmia a aquelles mostres que presenten una microcitosi permanent en el temps sense alteracions en les diferents fraccions d'hemoglobines per HPLC; o aquelles mostres que presenten resultats en HPLC de la fracció hemoglobina A<sub>2</sub> per sota del rang de referència.

Es varen analitzar les dades de la  $\beta$  talassèmia minor i  $\alpha$  talassèmia durant el període de temps estudiat per veure'n la freqüència d'aparició i la tendència. A la Figura 43 hem seleccionat la  $\beta$  talassèmia minor en blau i  $\alpha$  talassèmia en vermell; podem observar que inicialment l' $\alpha$  talassèmia era pràcticament residual amb <5 deteccions anuals mentre que la  $\beta$  talassèmia tenia al voltant de 150 pacients detectats en un any. Actualment la tendència és a igualar-se, és a dir, que els dos tipus de talassèmies son igualment detectades a la nostra àrea geogràfica.



**Figura 43. Evolució en la detecció de l'alfa talassèmia i de la beta talassèmia**

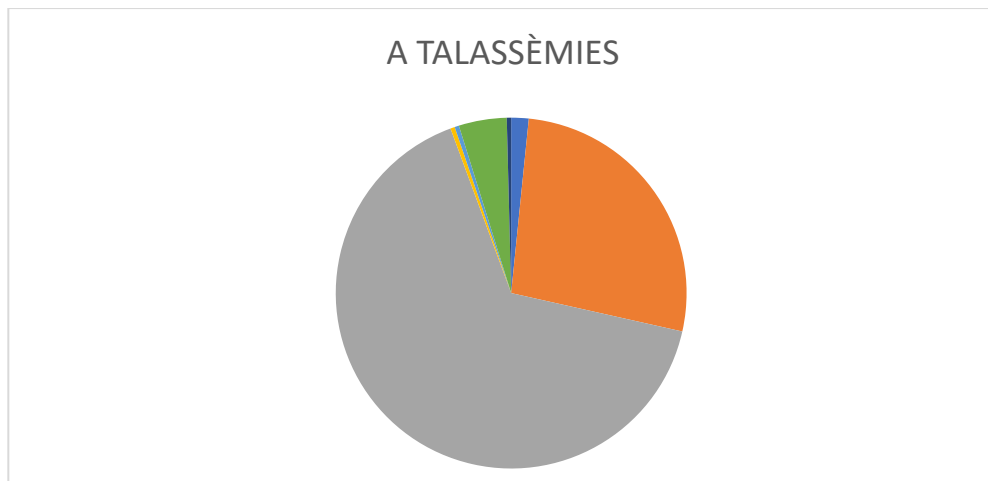
Analitzant amb més detall els tipus d' $\alpha$  talassèmia diagnosticades per biologia molecular, s'han demanat un total de 501 estudis moleculars d' $\alpha$ -talassèmies, majoritàriament els últims dos anys. D'aquests la meitat 50,5% ha resultat ser positiu per alguna mutació. La Taula 18 descriu totes les mutacions trobades al llarg d'aquests 15 anys.

La mutació delecional en heterozigosi de 3,7 kb és la més freqüent, seguida de la mutació delecional en homozigosi de 3,7 kb, i la mutació puntual  $\alpha 2$  IVS-5nt en heterozigosi que s'ha trobat en 10 ocasions.

	2007	2008	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
<i>SEA en heterozigosi</i>			2	1						1
<i>3,7 homozigosi</i>			2	2		2	1	2	28	30
<i>3,7 heterozigosi</i>	1	2			1		1	1	45	116
<i>FIL heterozigosi</i>						1				
<i>mutació delecional de 3.7 Kb en heterozigosi i la mutació puntual <math>\alpha 2</math> IVS-5nt en heterozigosi;</i>								1		
<i>mutació puntual <math>\alpha 2</math> IVS 1-5nt en heterozigosi;</i>									1	11

**Taula 18.** Tipus d' $\alpha$  talassèmies diagnosticades al llarg de 15 anys

A la Figura 44 s'observa un gràfic de distribució dels resultats obtinguts amb les  $\alpha$  talassèmies on es confirma que la mutació més detectada és la delecional en heterozigosi de 3,7 kb amb un 66% de les talassèmies detectades, seguida de la mutació delecional en homozigosi de 3,7 kb amb un 27%.



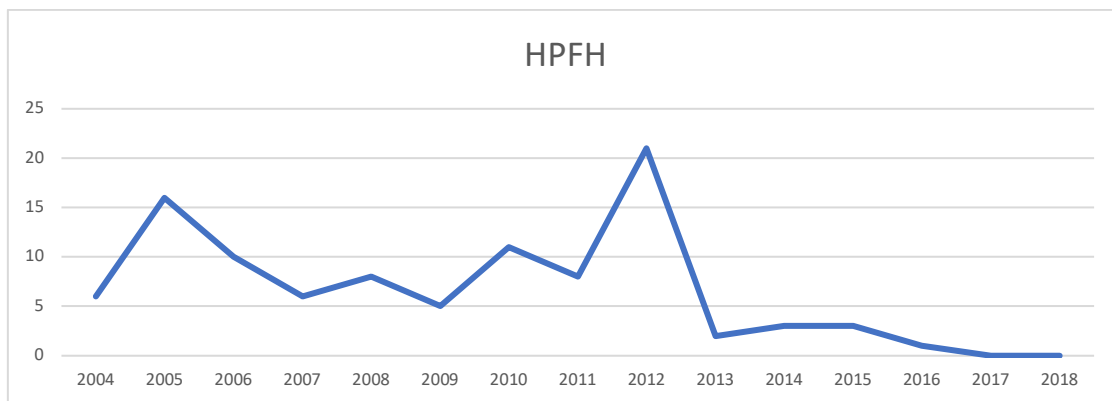
**Figura 44.** Distribució de les  $\alpha$  talassèmies segons la mutació detectada

En color gris tenim les mutacions en 3,7 en heterozigosi, en taronja 3,7 en homozigosi, en verd les mutacions  $\alpha 2$  IVS <sup>1(-5 nt)</sup>. La resta de colors indiquen aquelles mutacions trobades puntualment.



Segons Hartevelde and Higgs (109) els tipus d' $\alpha$ -talassèmia més freqüents a l'àrea Mediterrània són l' $\alpha^{3,7}$ ,  $\alpha$  IVS<sup>1(-5 nt)</sup>, que coincideix amb les  $\alpha$  talassèmies més freqüents detectades.

Analitzant amb més detall la Taula 17, podem observar la disminució en el diagnòstic de la persistència hereditària de l'hemoglobina fetal (Hereditary Persistence Fetal Hemoglobin, HPFH). A la Figura 45 ens mostra la seva distribució on es pot apreciar que els primers 10 anys es diagnosticaven entre 5-10 per any aproximadament i els últims anys la tendència és pràcticament indetectable. Bàsicament el diagnòstic d'aquesta malaltia fins l'any 2016 es confirmava per la presència d'aquest tipus d'hemoglobina per HPLC juntament amb l'absència d'un altre pic que indiqués una hemoglobina variant. La presència d'hemoglobina F és un tipus d'hemoglobina que no comporta alteracions clíniques i permet una milloria en les manifestacions clíniques en casos on altres hemoglobines anòmales es troben presents, com és el cas d'algunes talassèmies i la drepanocitosi (110). També es produeix un augment de l'hemoglobina F en dones embarassades (fins a un màxim de 5%), la leucèmia mielo-monocítica juvenil o davant la ingesta de medicaments com ara la hidroxiurea, on precisament s'utilitza aquest efecte per millorar la simptomatologia de la drepanocitosi. Avui en dia, es coneix que poden haver-hi altres patologies en les quals es pot presenciar un augment d'hemoglobina F. És el cas de persones amb diabetis mellitus, tirotoxicosis o fàrmacs com el valproat sòdic (6). Creiem que el coneixement més ampli dels diferents motius pels quals es pot incrementar aquesta hemoglobina, juntament amb la millor detecció d'altres hemoglobinopaties com la betadelta-talassèmia ha contribuït a la disminució de la detecció de l'hemoglobina F persistent hereditària.



**Figura 45.. Evolució en la detecció HPFH (Persistència hereditària de la hemoglobina fetal, Hereditary Persistency Fetal Hemoglobin)**

El GRUP 2 analitzat fa referència a la detecció de les hemoglobines estructurals. Tal i com observem a la Taula 19, l'hemoglobina estructural més detectada és la hemoglobina S heterozigota en un 69,6% de les hemoglobines estructurals i 30,4 % del total d'hemoglobinopaties detectades. La segona en freqüència és la hemoglobina C heterozigot amb 17% de les hemoglobines estructurals detectades i 7,48 % del total d'hemoglobinopaties detectades.

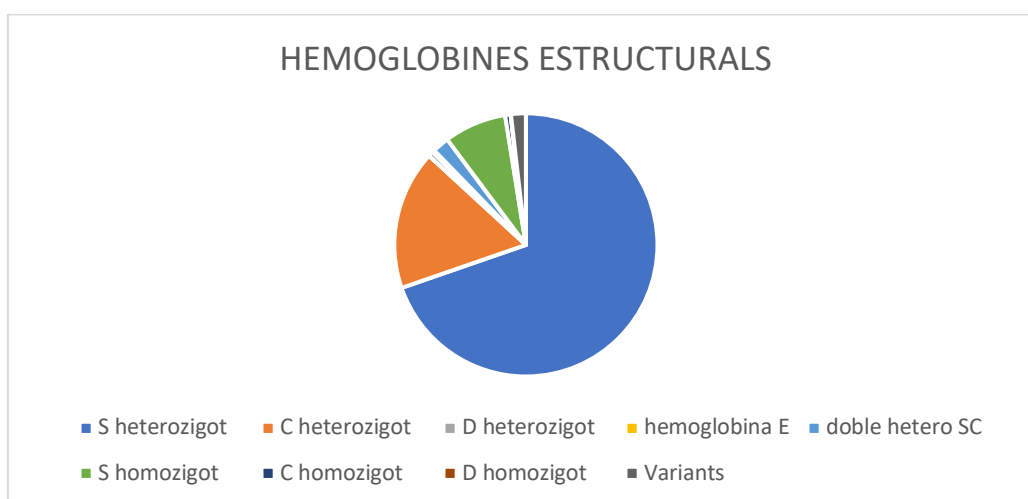
Respecte el diagnòstic de la malaltia de les cèl·lules falciformes ha estat diagnosticada en 160 pacients representant el 7% dels casos de les hemoglobines estructurals i 3,34% del total d'hemoglobinopaties diagnosticades. L'hemoglobinopatia doble heterozigot SC ha estat diagnosticada en 43 ocasions, representant el 2% de les hemoglobines estructurals detectades i el 0.89% del total d'hemoglobines detectades.

Altres hemoglobines estructurals detectades han estat l'hemoglobina D heterozigota diagnosticada en 13 pacients, hemoglobina E heterozigota detectada en 6 pacients.

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
<b>S heterozigot</b>	65	63	54	65	43	133	153	109	111	127	120	99	95	93	126
<b>C heterozigot</b>	4	13	11	13	9	29	51	19	20	30	48	27	18	30	36
<b>D heterozigot</b>	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	4	1	1	4	0
<b>hemoglobina E</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	2	0
<b>doble hetero SC</b>	6	4	2	2	5	2	0	1	3	5	2	4	3	4	0
<b>S homozigot</b>	14	15	7	11	21	10	10	4	9	8	7	11	10	11	12
<b>C homozigot</b>	0	3	0	0	0	0	1	1	2	2	0	3	1	1	0
<b>D homozigot</b>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Altres Variants</b>	1	3	2	3	1	4	2	0	2	5	2	6	2	3	2
<b>TOTAL</b>	<b>91</b>	<b>102</b>	<b>76</b>	<b>95</b>	<b>80</b>	<b>178</b>	<b>217</b>	<b>134</b>	<b>147</b>	<b>178</b>	<b>184</b>	<b>153</b>	<b>130</b>	<b>148</b>	<b>176</b>

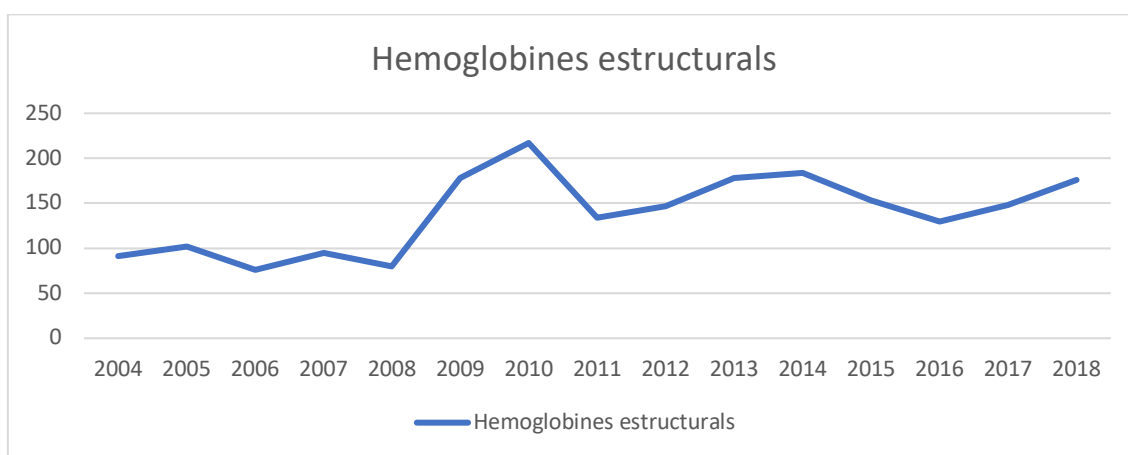
**Taula 19..Distribució de les hemoglobines estructurals detectades al llarg de 15 anys**

A la gràfica 46, es pot observar com l'hemoglobina S heterozigota és la més prevalent de les hemoglobines estructurals en un 69% dels casos, seguida de l'hemoglobina C heterozigota en un 17,11% doble heterozigosi SC, S homozigota en un 7,6%, doble heterozigosi SC en un 2,05 i altres variants en 1,95%.



**Figura 46..Distribució de les hemoglobines estructurals detectades a Girona entre 2004-2018.**

Respecte aquest grup d'hemoglobinopaties, observem que la seva detecció presenta un salt quantitatiu elevat a partir del 2009 i les deteccions es mantenen estables a partir d'aquell any. A Figura 47 observem aquesta tendència. Creiem que aquest salt pot ser degut a l'increment de la població migrant que es produeix a la província de Girona, tal i com mostra la Taula 4 prèviament mencionada. A més, les hemoglobines estructurals, a diferència de l' $\alpha$  talassèmia, es detecten bé per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC), ja que apareix un pic anòmal en el cromatograma, i per això la seva detecció s'ha mantingut estable.



**Figura 47. Detecció d'hemoglobines estructurals a Girona entre 2004-2018.**

De les hemoglobines estructurals detectades, 1,81% pertanyen al grup d'altres hemoglobines variants atípiques. A la Taula 20, es fa una anàlisi de cadascuna d'aquestes variants. Observem una gran variació de tipus d'hemoglobines variants minoritàries on destaca l'hemoglobina HOPE heterozigota diagnosticada en 19 pacients i hemoglobina HOPE+S diagnosticada en 4 pacients l' hemoglobina O -Arab heterozigota és detectada en 3 pacients.

<b>Any</b>	<b>Hemoglobines variants</b>
2004	1 Hope
2005	2 Hope, 1 Philadelphia
2006	1 Hope, 1 Hofu J paris
2007	3 Hope,
2008	1 doble heterozigot Hope+S
2009	4 Hope
2010	1 HOPE , 1 Hb J
2011	-
2012	1 Hope ,1 Etobikoke,
2013	3hope, 1 camden, hemoglobina J
2014	2 Hope
2015	3 S+HOPE, 1 HOPE HETEROZIGOT,1 OARAB, HBH, HB J
2016	2 O arab, 1 Ihartoum hetero
2017	1hemoglobines G, doble heterozigot CD, 1 Korle-bu
2018	1 Pyro, 1 D homozigota

**Taula 20.Descripció de les hemoglobines variants més minoritàries detectades en la nostra àrea geogràfica entre 2004-2018.**

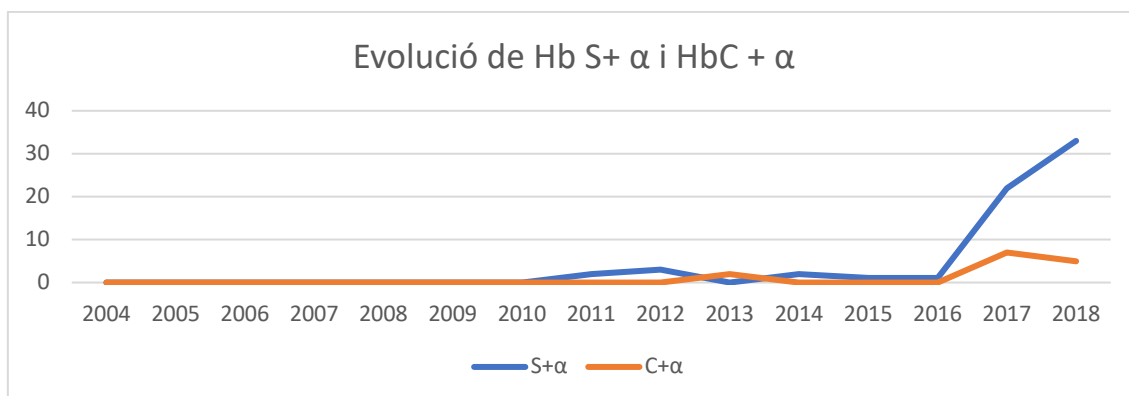
Analitzant el grup d'hemoglobines variants més minoritàries destaca la quantitat d'hemoglobines HOPE detectades. Creiem que aquest augment pot ser degut als estudis d'hemoglobines realitzats als familiars dels casos diagnosticats. Un d'aquests casos familiars detectats va ser publicat en forma de pòster a l'International Society for Laboratory Hematology amb el títol " Variant Haemoglobinopathy detection based on increasingly unexpected haemoglobin A1c results" l'any 2016. Aquesta hemoglobina variant elueix al mateix temps que l'hemoglobina A<sub>1c</sub> donant uns valors anormalment alts d'hemoglobina glicada, al voltant del 45 % si el pacient és heterozigot. L'afectat va ser diagnosticat d'una hemoglobina doble heterozigota (Hb HOPE + Hb S). En aquella ocasió es va poder fer l'estudi familiar complet resultant el pare portador de HbS i Hb HOPE (doble heterozigot) ,mare heterozigota HbAS; filla de 9 anys amb Hb HOPE heterozigota, filla de 5 anys homozigota HbSS i filla de 3 anys HbS i Hb HOPE (doble heterozigota).

El GRUP 3 analitzat pertany al grup que inclou talassèmies i hemoglobines estructurals. S'han detectat 87 hemoglobinopaties compostes (talassèmies+estructurals) en 15 anys, que representa el 1,70 % de totes les hemoglobines detectades.

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
$\alpha+\beta$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1
S+ $\beta$	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
S+ $\alpha$	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	2	1	1	22	33
C+ $\alpha$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	7	5
Variants + talassèmies	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
TOTAL	0	1	0	0	0	0	1	3	3	2	2	1	3	30	41

**Taula 21. Incidència dels diferents tipus d'hemoglobines estructurals+ talassèmies detectades per any.**

Si ho analitzem detalladament, veiem un increment molt important de les hemoglobines S+ $\alpha$  els últims dos anys i en menys proporció hemoglobina C+ $\alpha$  tot i que també en destaca l'augment (Taula 21). Coincideix en tots dos casos amb els anys que més  $\alpha$  talassèmia s'han detectat. Respecte a les variants més minoritàries hem detectat: el 2011 una hemoglobina D+ $\beta$ , i el 2018 una hemoglobina D+ $\alpha$ , i una HbSC+ mutació delecional en heterozigosi de 3,7 kb. A la Figura 48 es pot observar l'evolució en les deteccions de l'HbS + $\alpha$  i HbC+ $\alpha$  al llarg d'aquests 15 anys.



**Figura 48. Evolució del diagnòstic de l'hemoglobina S+alfa i hemoglobina C+alfa**

L'associació d'una alfa talassèmia amb una hemoglobina estructural on s'afecta la cadena beta de la globina com ara l'hemoglobina S o l'hemoglobina C sovint va associada a la infraexpressió de la forma heterozigota en uns nivells d'hemoglobina variant per sota del 35%. Aquestes associacions poden ser asimptomàtiques o es pot observar una discreta microcitosi en l'hemograma (111).

Respecte el tipus d' $\alpha$ -talassèmies detectades, la mutació més freqüent és la mutació delecional en heterozigosi de 3,7 kb, seguida de la mutació delecional de 3,7 kb en homozigosi. Un dels motius pels quals hi ha hagut aquest increment de detecció dels compostos l'hemoglobina S+ $\alpha$  i hemoglobina C+ $\alpha$  és degut al increment en la detecció de les alfes.

Tal i com hem mencionat prèviament, en aquells casos on el pacient havia estat diagnosticat per una hemoglobina variant en els anys previs i l'any 2017-2018 se li detecta una  $\alpha$  talassèmia associada, es compta una única vegada en la data on es detecta el diagnòstic final de les dues malalties associades.

En resum podem dir que davant la manca d'un registre oficial d'hemoglobines anòmales detectades a l'àrea de Girona, creiem que aquest estudi és el més ampli que s'ha fet, i que ens pot donar una aproximació sobre la seva de la distribució, i així conèixer les hemoglobines clínicament més rellevants de la nostra població. L'hemoglobinopatia més freqüent és la  $\beta$  talassèmia minor, fet que coincideix amb altres estudis poblacionals en

àrees pròximes a la nostra, com ara la població mediterrània i estudis fets en altres regions espanyoles. (14,15) Respecte l' $\alpha$ -talassèmia, al tenir una hemograma que pot passar desapercebuda, a més de no ser detectada per HPLC sinó que pel seu diagnòstic son necessàries tècniques de biologia molecular, creiem que ha estat infradiagnosticada. La formació especialitzada en centres de referència, i el coneixement més ampli de les noves tècniques moleculars, han contribuït a l'augment de detecció d'aquesta hemoglobinopatia.

La mutació  $\alpha$  talassèmia més freqüentment obtinguda en els nostres estudis, ha estat la deleció  $-\alpha 3.7$ . Aquesta mutació és la més habitual en la conca Mediterrània, segons altres estudis com el de Piel et Weatherall (112).

En relació a les hemoglobines estructurals, l'hemoglobinopatia estructural més detectada va ser l'hemoglobina S heterozigota i les seves formes compostes. Considerem molt important tenir diagnosticats aquests pacients que són asimptomàtics per poder realitzar un bon consell genètic i familiar per poder detectar els casos de malaltia falciforme . El nostre resultat coincideix amb el reportat amb altres estudis com Dulín o Mañu on també recalquen la importància d'un diagnòstic precoç de la malaltia (17,18).

Degut a un major coneixement en el camp de les hemoglobinopaties, també hem pogut observar com en els últims dos anys, s'han detectat hemoglobines més complexes i més difícils de detectar en l'HPLC, per això creiem que és essencial una bona formació en aquest camp, degut a la gran complexitat que presenta fer un bon diagnòstic d'aquestes malalties.

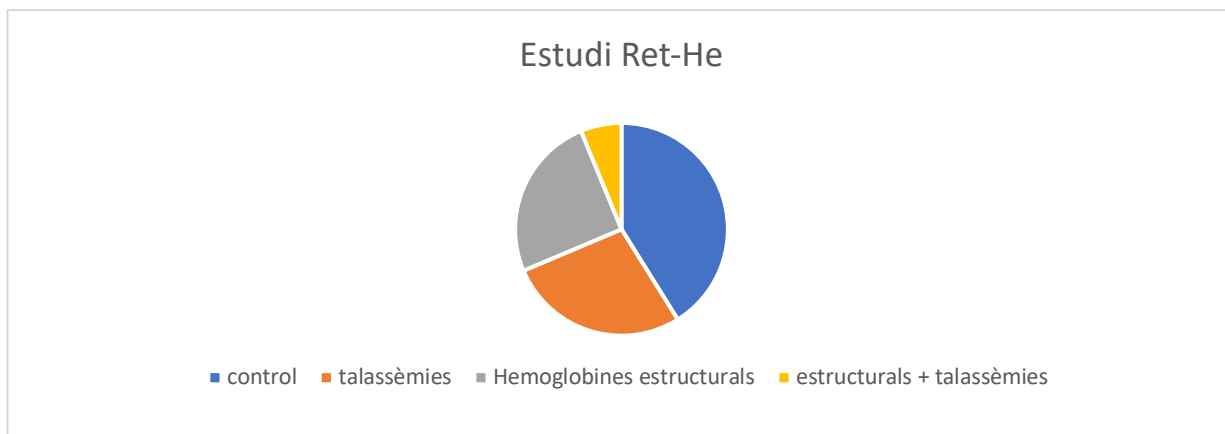
L'anàlisi de la distribució de les hemoglobinopaties a l'àrea de Girona on el percentatge de gent que prové d'altres països aproximadament del 20% de la població i coneixedors de la gran prevalença de HbS heterozigots i  $\beta$  talassèmia minor juntament amb l'augment de detecció de l' $\alpha$  talassèmia, creiem imprescindible un bon consell genètic i estudi familiar per evitar i/o minimitzar les conseqüències d'adquirir les hemoglobinopaties més greus com HbSS, compostos heterozigots HbS amb altres hemoglobines,  $\beta$  talassèmia majors i compostos heterozigots  $\beta$  amb altres hemoglobinopaties i HbH o la fatal hemoglobina de Barts. Recentment s'ha obert la consulta d'eritropatologia on un equip



multidisciplinar d'hematòlegs i especialistes del laboratori treballem conjuntament per diagnosticar i fer un seguiment d'aquests pacients.

## 1.2 ANÀLISI DEL PARÀMETRE RET-HE COM A CRIBATGE PER DETECTAR LES TALASSÈMIES

El nostre objectiu és determinar si el Ret-He és una bona magnitud per ser utilitzada com a cribratge en l'hemograma per detectar les talassèmies, un cop confirmat que el pacient no presenta una anèmia ferropènica. Es va determinar el Ret-He en els 139 pacients control, 93 pacients amb talassèmia (63  $\beta$ -talassèmies, 26  $\alpha$ -talassèmies, 4  $\beta\delta$ ), 85 pacients amb hemoglobines estructurals i 21 pacients compostos talassèmies + hemoglobines estructurals (12 HbS+  $\alpha$ , 9 HbC+ $\alpha$ ), distribució que podem apreciar a la Figura 49.



**Figura 49.** Grups de pacients escollits per analitzar la magnitud de Ret-He

Tal i com mostra la Taula 22, la mitja  $\pm$  desviació estàndard del Ret-He pel grup control va ser de  $30,91 \pm 2,19$  pg, en talassèmies  $22,13 \pm 3,5$  pg, en les hemoglobines estructurals  $30,97 \pm 2,72$  pg i en el grup de talassèmies + estructurals  $27,7 \pm 4,40$  pg.

	Grup control	Talassèmies	Hemoglobines estructurals	Talassèmies+ hemoglobines estructurals
Ret-He (pg)	$30,91 \pm 2,19$	$22,13 \pm 3,5$	$30,97 \pm 2,72$	$27,7 \pm 4,40$

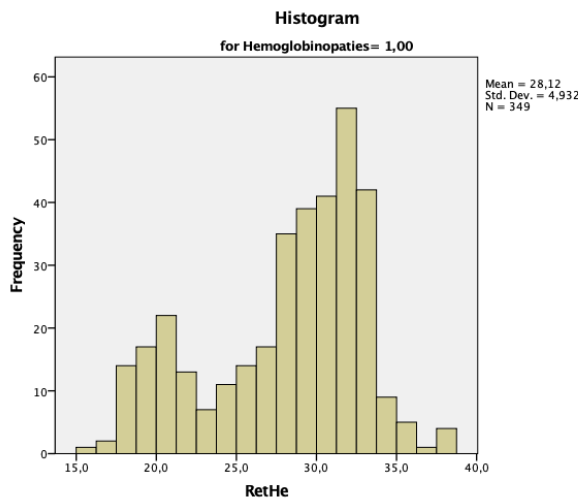
**Taula 22.** Valors de la mitjana i desviació estàndard dels resultats del Ret-He en els grups analitzats.

Es va calcular si les poblacions presentaven una distribució normal ja que les fórmules a aplicar varien en funció de la normalitat. El resultat de la Taula 23 i l'histograma

a la Figura 50 ens mostra que el Ret-He de la població estudiada presenta una distribució no normal.

Paràmetre	Kolmogorov-Smirnov
Ret-He	<0,001

**Taula 23. Test de Normalitat del paràmetre Ret-He analitzat per la població estudiada**



**Figura 50. Histograma de distribució del paràmetre Ret-He en la població estudiada**

Per fer l'anàlisi estadística utilitzem el test de Kruskal-Wallis, ja que és el test no paramètric més adient quan es presenten més de dos poblacions a estudiar. Els càlculs estan fets pel programa SPSS. Presentem dos hipòtesis:

-La hipòtesis nul·la. Les poblacions no presenten valors del Ret-He diferents que siguin estadísticament significatius. Això succeirà si el test de Kruskal-Wallis dona un resultat  $> 0,05$  de nivell de significació.

- La hipòtesis alternativa. Les poblacions presenten valors de Ret-He diferents i aquests són estadísticament significatius. El resultat hauria de donar un nivell de significació  $< 0,05$ .

La Taula 24 mostra el resultat del programa estadística SPSS pel test de Kruskal-Wallis on es confirma la hipòtesis alternativa, és a dir que el Ret-He presenta diferències significatives entre les diferents poblacions estudiades.

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of RetHe is the same across categories of Hemoglobinopatia.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

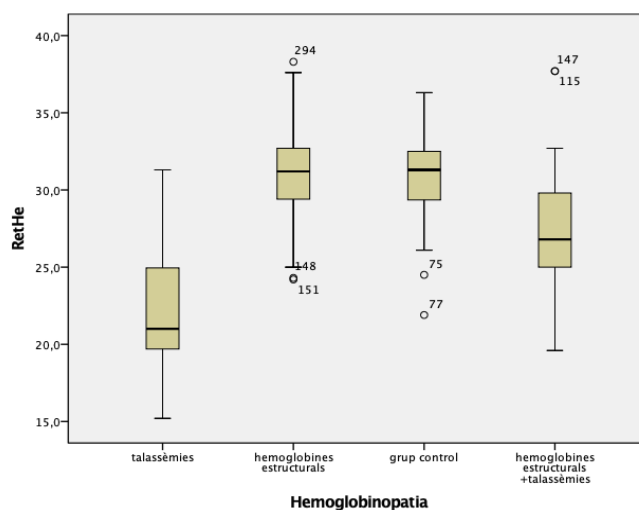
**Taula 24. Resultat del test de Kruskal-Wallis per analitzar si Ret-He presenta diferències significatives entre els grups estudiats. El resultat amb SPSS sí que presenta diferències significatives ( $p < 0.05$ )**

Posteriorment es fa una anàlisi pos hoc aplicant el mètode Tukey. Anteriorment, ja hem demostrat que el Ret-He presenta diferències significatives entre les diferents poblacions però no sabem entre quines es presenten aquestes diferències. L'anàlisi de Tukey ens indica entre quins grups dels estudiats (control, talassèmies, hemoglobines estructurals i talassèmies + estructurals) el Ret-He presenta diferències significatives (Taula 25). Els resultats ens indiquen que el Ret-He en el grup de les talassèmies i el Ret-He del grup de talassèmies + estructurals presenta diferències significatives respecte el grup control. En canvi el Ret-He en el grup de les hemoglobines estructurals no presenta diferències significatives respecte el grup control. El nivell de significació també és de 0,05.

<i>Hemoglobinopatia a estudiar</i>	<i>Comparació amb els altres grups.</i>	<i>Sig.</i>
<i>talassèmies</i>	<i>hemoglobines estructurals</i>	<i>&lt;0,001</i>
	<i>grup control</i>	<i>&lt;0,001</i>
	<i>hemoglobines estructurals +talassèmies</i>	<i>&lt;0,001</i>
<i>hemoglobines estructurals</i>	<i>talassèmies</i>	<i>&lt;0,001</i>
	<i>grup control</i>	<i>,998</i>
	<i>hemoglobines estructurals +talassèmies</i>	<i>&lt;0,001</i>
<i>grup control</i>	<i>talassèmies</i>	<i>&lt;0,001</i>
	<i>hemoglobines estructurals</i>	<i>,998</i>
	<i>hemoglobines estructurals +talassèmies</i>	<i>&lt;0,001</i>
<i>hemoglobines estructurals +talassèmies</i>	<i>talassèmies</i>	<i>&lt;0,001</i>
	<i>hemoglobines estructurals</i>	<i>&lt;0,001</i>
	<i>grup control</i>	<i>&lt;0,001</i>

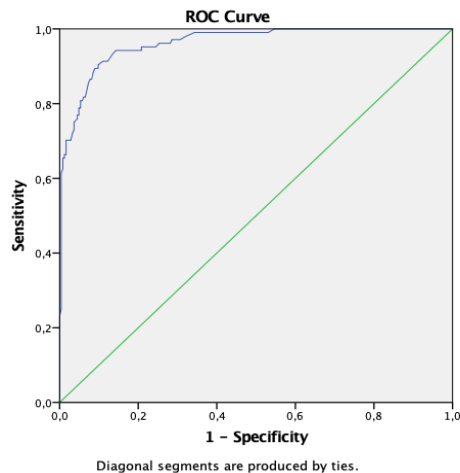
**Taula 25.** Anàlisi pos-hoc on s'observa les diferències significatives entre els tres grups estudiats pel mètode de Tukey.

A la Figura 51 veiem de manera gràfica els resultats obtinguts pel mètode Tukey. La gràfica mostra que els valors del Ret-He en les talassèmies presenta valors molt més baixos respecte els valors del Ret-He del grup control. Per contra, els valors de Ret-He de les hemoglobines estructurals presenta uns valors molt similars als del grup control de manera que no presenten diferències significatives. En relació al grup de talassèmies +hemoglobines estructurals també presenta diferències significatives respecte el grup control.



**Figura 51.** Diagrama de caixes on s'observa que tant el grup de les talassèmies presenten diferències significatives respecte el grup control i el grup que presenta hemoglobines estructurals

Una vegada confirmat que el Ret-He de les mostres amb alguna talassèmia presenta diferències significatives respecte el grup control vàrem procedir a buscar quin seria el punt de tall més adient per fer el cribratge. Per fer-ho, vàrem juntar els dos grups que presenten alguna talassèmia i els vàrem tractar com a un sol grup. El motiu és que el valor del Ret-He el podem obtenir al mateix temps que l'hemograma i l'objectiu de la tesi és buscar una magnitud que ens sigui útil per qualsevol tipus de talassèmia. El punt de tall l'obtenim utilitzant l'àrea sota la corba ROC (Receiver Operating Characteristic). En aquest estudi, el millor punt de tall del Ret-He per ser utilitzat com a cribratge per les talassèmies i hemoglobinopaties compostes amb alguna talassèmia és de 27,6 pg. amb una sensibilitat del 90,4% i una especificitat del 90,2% (Figura 52).



**Figura 52..Corbes ROC del Ret-He amb pacients amb algun tipus de talassèmia**

Actualment no existeix cap magnitud de l'hemograma que sigui característica d'hemoglobinopaties. En el cas de les talassèmies, es pot observar una disminució del VCM i HCM i en alguns casos eritrocitosi. Aquestes condicions es donen especialment en els casos de  $\beta$  talassèmia, tot i que també els podem observar en les ferropènies . En d' altres talassèmies, o en el cas d'hemoglobines estructurals, aquests trets son molt més lleus i sovint passen inadvertits.

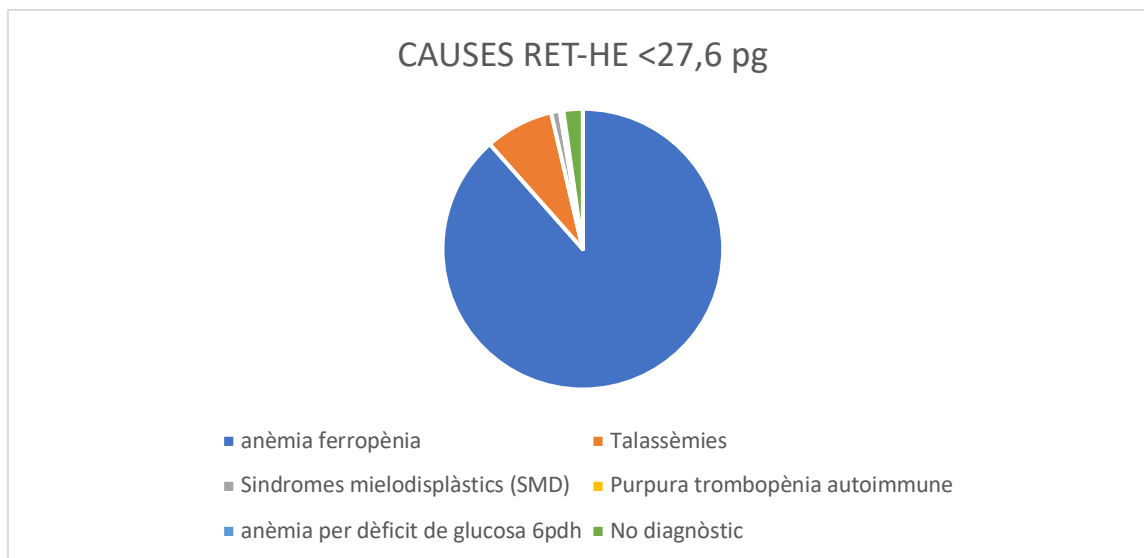
Ret-He dona informació de l'hemoglobina que es troba en els reticulòcits. És una magnitud que ha estat àmpliament estudiada pel diagnòstic i seguiment dels estats ferropènics. En tots ells, s'ha demostrat les talassèmies com a interferència. En el cas de que el pacient tingui una talassèmia associada, el ret-He no es pot utilitzar per fer el seguiment de la seva ferropènia (40).

Segons els nostres resultats, un Ret-He < 27,6 pg podria ser d'utilitat en el cribratge de casos de talassèmia, un cop descartades les ferropènies amb una sensibilitat del 90,4% i especificitat del 90,2%. En el nostre estudi, el ret-He no és útil pel cribratge de les hemoglobines estructurals. Una explicació d' aquests resultats podria ser, que en el cas de les talassèmies, la mutació provoca una síntesis d'hemoglobina defectuosa i per tant presenta menys concentració d'aquesta en els reticulòcits, mentre que les hemoglobines estructurals, la mutació provoca una alteració de l'hemoglobina però no un dèficit en la seva concentració. A la literatura, trobem moltes referències que tracten el Ret-He com a paràmetre de diagnòstic i seguiment de les ferropènies en diferents tipus de malalties com

poden ser les oncològiques o en pacients sotmesos a hemodiàlisi crònica i que solen presentar anèmia (113,114). No obstant, molt pocs estudis estan centrats en l'estudi d'aquest paràmetre en relació amb el diagnòstic de les talassèmies. El grup de Suddmann et al (36) van estudiar el paràmetre Ret-He en diferents tipus d'hemoglobinopaties (talassèmies i estructurals) amb o sense ferropènia associada. Les talassèmies estudiades varen ser  $\beta^+$  i  $\beta^0$  talassèmies i les alfa talassèmies varen ser :  $\alpha^{3,7}$ ,  $\alpha^{4,2}$ , --SEA. . El valor del Ret-He era anotat en tots els casos, independentment de si el pacient presentava ferropènia associada o no. És per això que el Ret-He en el seu estudi presenta valors més baixos que el nostre punt de tall de 27,6 pg. En el seu cas, el Ret-He el varen incloure en els seus algoritmes diagnòstics per a la detecció de talassèmies juntament amb altres paràmetres com VCM i HCM.

Aprofundint una mica més en l'estudi del Ret-He, durant 3 mesos, vàrem realitzar una anàlisi prospectiva d'aquells pacients amb valors de Ret-He < 27,6 pg. Per fer-ho es varen seleccionar totes aquelles analítiques amb un valor de ret-He < 27,6 pg i es va estudiar la malaltia que presentava el pacient. A la Figura 53 presentem els resultats. Durant els 3 mesos estudiats, 494 pacients presentaven un valor de ret-He <27,6 pg. D'aquestes, 437 varen resultar ferropèniques, 39 presentava alguna talassèmia, 5 presentaven algun tipus de síndrome mielodisplàstica (SMD), 1 púrpura trombopènica idiopàtica (PTI), 1 anèmia hemolítica per dèficit de glucosa 6 fosfat deshidrogenasa i en 11 casos no es va poder arribar al diagnòstic final. A la Figura 9 s'observa com la causa més freqüent de Ret-He <27,6 pg és l'anèmia ferropènica (88% dels casos), seguida de les hemoglobinopaties talassèmiques (9% dels casos) i 1% degut a uns Síndromes mielodisplàstics (SMD).





**Figura 53.** Resultat de l'anàlisi prospectiu d'aquells valors de Ret-He < 27,6 pg.

Segons els nostres estudis, un valor de Ret-He <27,6 pg detectat en un hemograma ens orientarà principalment cap a una ferropènia en la gran majoria dels casos (88%), degut principalment a que és l'anèmia més freqüent en la nostra població. Descartada la ferropènia, amb un valor de Ret-He <27,6 pg cal sospitar d'una hemoglobinopatia tipus talassèmic. Les hemoglobines estructurals, les quals no solen presentar alteracions en l'hemograma, no es poden detectar mitjançant un paràmetre de cribatge de l'hemograma i el Ret-He tampoc no és útil per cribar aquestes patologies.

Cal tenir en compte que un petit percentatge, un 1,4% de les mostres que presentaven un Ret-He <27,6 pg eren degudes a d'altres patologies com els síndromes mielodislàstics (SMD). Caldrien més estudis per poder estudiar si existeix alguna relació entre determinades síndromes mielodislàstics i el Ret-He.

Així segons els nostres estudis, quan un pacient presenta un Ret-He <27,6 pg, podem sospitar, primer que el pacient presenta una ferropènia i en cas que l'estudi del metabolisme del ferro sigui normal, seria adequat realitzar un estudi d'hemoglobines. Ens vàrem plantejar si existia un punt de tall estadísticament significatiu entre els pacients que presentaven ferropènia i els que presentaven una talassèmia associada. És a dir que una de les dues malalties tingués un punt de tall estadísticament inferior a l'altre. Per fer-ho, vàrem

utilitzar les dades prèviament descrites de 437 pacients amb dèficit de ferro i 39 pacients amb algun tipus de talassèmia i varem aplicar el test no paramètric de Mann Whitney en el que es plantejaven les següents hipòtesis.

-La hipòtesis nul·la. Els valors del Ret-He en els grups estudiats no presenten valors que siguin estadísticament significatius (no existeixen diferències entre grups per aquest paràmetre) . Això succeirà si el test de Mann Whitney dona un resultat  $> 0,05$  de nivell de significació estadística.

- La hipòtesis alternativa Els valors de Ret-He en els grups estudiats presenten valors que siguin estadísticament significatius (existeixen diferències entre grups per aquest paràmetre). Això succeirà si el test de Mann Whitney dona un resultat  $< 0,05$  de nivell de significació estadística.

El resultat de l'anàlisi del test de Mann-Whitney U utilitzant el programa SPSS va ser l'observat a la Figura 54, on es conclou que no existeixen diferències en els valors del Ret-he en els grups estudiats, així doncs, quan el valor de Ret-He és  $< 27,6$  pg no podem distingir entre una ferropènia o una talassèmia. Haurem de procedir a estudi complert dels paràmetres de la ferropènia per orientar el diagnòstic. Aquests resultats son similars a altres estudis recents com el de Praguaywan et al (115).

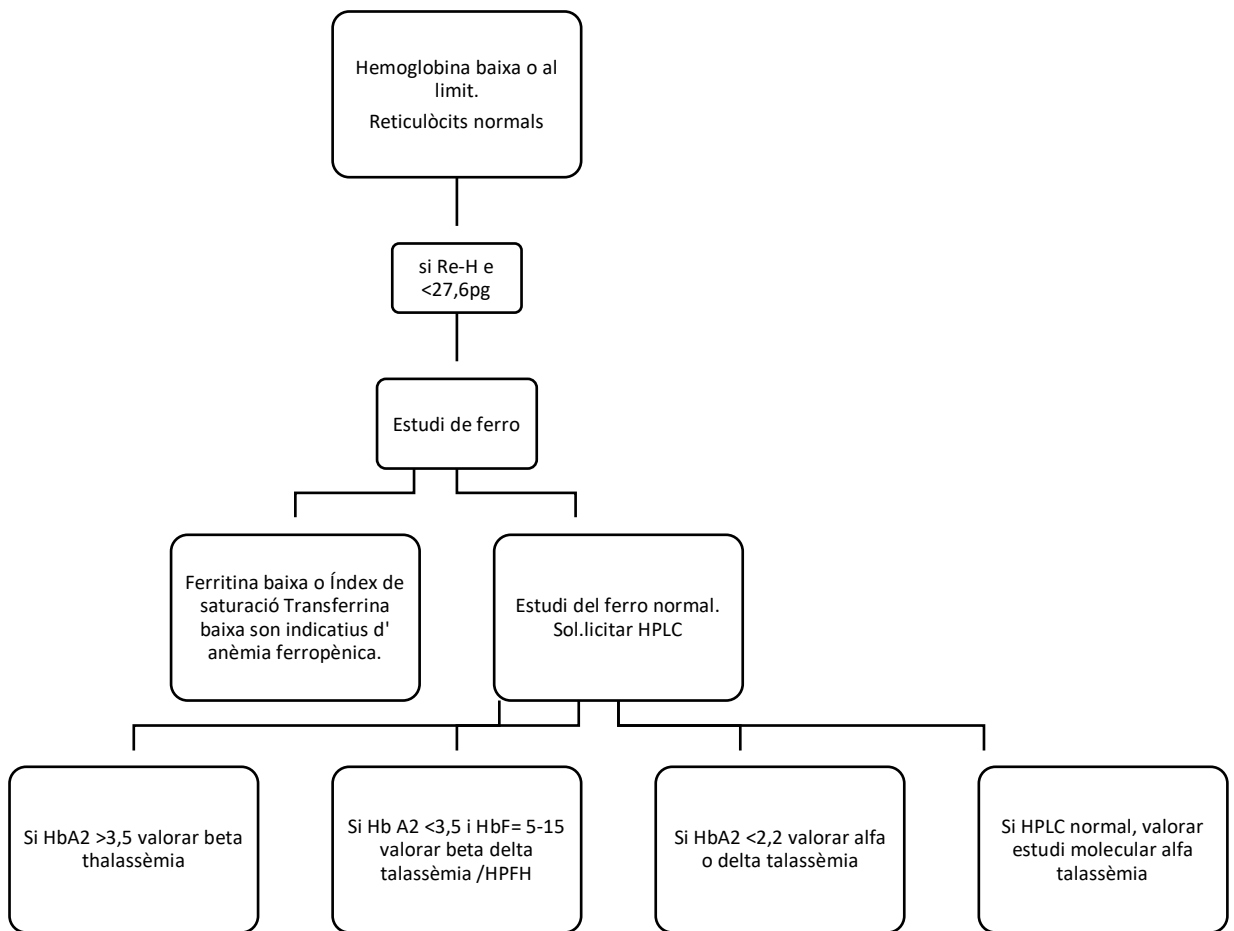
**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
→ 1	The distribution of RETHE is the same across categories of MALALTIA.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,072	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

**Figura 54. Resultat del test de Mann Whitney U en la distribució del valor del Ret-He pels dos grups de malalties ( ferropènia, talassèmia)**

Segons els resultats esmentats, el Ret-He pot ser un paràmetre d'utilitat en el cribratge de tot tipus de talassèmies i que es podria incloure en els algoritmes diagnòstics juntament amb els clàssics volum corpuscular mig (VCM), hemoglobina corpuscular mitja (HCM) i amplitud de distribució eritrocitària (ADE). És un paràmetre fàcil de mesurar, ràpid i barat que pot donar informació rellevant per ajudar al diagnòstic de les anèmies. Una proposta d'algoritme diagnòstic podria ser la descrita a la Figura 53. Un dels inconvenients que presenta aquest algoritme és la demora en el cribratge, ja que necessitem l'estudi del metabolisme del ferro per completar l'algoritme. De totes maneres, creiem que davant la manca de marcadors pel cribratge de les talassèmies especialment en aquelles que no són  $\beta$  talassèmies, el ret-He podria ser una bona eina per detectar aquest tipus de desordres. En un hemograma on es detecti una hemoglobina baixa es podria crear la regla experta afegint els reticulòcits per veure el tipus d'anèmia. Aquelles anèmies amb valors baixos de reticulòcits normalment indiquen una anèmia ferropènica o algun tipus de talassèmia. L'analitzador processa al mateix temps el reticulòcits i el paràmetre Ret-He, de tal manera que sense cap tipus de cost extra podem disposar d'aquest valor que ens pot orientar en el diagnòstic. Si el Ret-he dona un valor  $<27,6$  pg, caldria afegir els paràmetres relacionats amb el metabolisme del ferro i si aquests donessin normals, caldria sospitar d'una hemoglobinopatia. En el cas de que els resultats de l'estudi del ferro indiqués una anèmia ferropènica, caldria primer tractar la ferropènia i fer un nou control passat el temps reglamentari. És convenient no fer l'anàlisi de l'HPLC immediatament ja que està descrit que el valor de l'hemoglobinaA<sub>2</sub> pot estar disminuït en casos de ferropènia i per tant la beta talassèmia podria quedar emmascarada(25).



**Figura 55. Proposta d'algorithm pel cribratge de talassèmies**



## **2.- ANÀLISI DE LA FRACCIÓ DE LES PLAQUETES IMMADURES (IPF%) I ESTUDI DE SENSIBILITAT I ESPECIFICITAT DE L'ALARMA D'AGREGATS PLAQUETARIS**

### **2.1 ANÀLISI DE LA FRACCIÓ DE PLAQUETES IMMADURES (IPF%) EN EL DIAGNÒSTIC DE LES TROMBOPENIES**

La trombopènia és un trastorn de la sèrie plaquetària freqüent en el que és molt important, trobar l'etiologia per fer un bon diagnòstic, especialment en aquells casos greus amb clínica associada (recompte de plaquetes  $< 20 \times 10^9 /L.$ ).

La fracció de plaquetes immadures (IPF%) és la fracció de plaquetes reticulades presents a la sang perifèrica i amb presència de reticle endoplasmàtic en el seu citoplasma que es relacionen de forma directa amb l'activitat trombopoètica de la medul·la òssia de tal manera que un augment en la seva producció pot indicar regeneració medul·lar de plaquetes (49).

L'objectiu d'aquest treball de tesi és analitzar si aquest marcador es troba elevat en els pacients amb trombopènia primària immune i si el valor d'IPF% és estadísticament significatiu quan es compara amb altres patologies no regeneratives com ara en casos de malaltia crònica hepàtica o els pacients que es troben amb tractament quimioteràpic.

La trombopènia primària immune és una malaltia de tipus regeneratiu, on es produeix una destrucció de plaquetes a nivell perifèric. L'IPF% en aquest tipus de malaltia hauria d'estar elevat mentre que en els altres tipus de malaltia (malaltia hepàtica i tractament amb quimioteràpia) solen ser de tipus no regeneratiu i per tant IPF% no hauria de presentar valors elevats (116).

L'analitzador del Sysmex® XN disposa de 3 canals de mesura de plaquetes: impedància, mètode òptic (canal de mesura dels reticulòcits Ret-He) i canal de fluorescència PLT-F. El canal d'impedància presenta un bon recompte de plaquetes per sobre de  $20 \times 10^9/L.$  Per

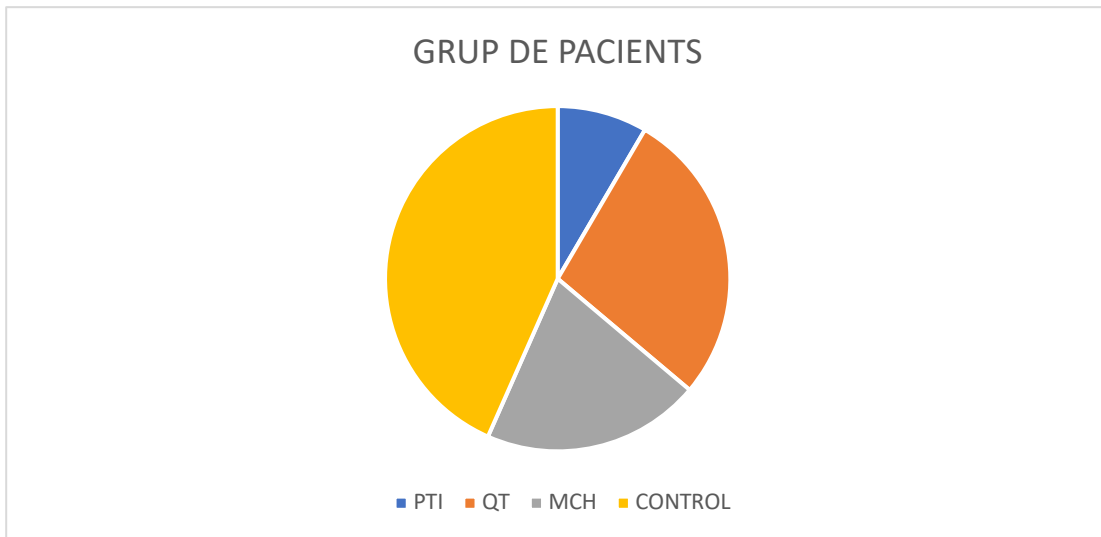
sota d'aquestes xifres va perdent especificitat i linealitat i augmenten les interferències per altres partícules que es confonen amb plaquetes (fragments d'hematies, hematies petits, cèl·lules trencades...). Un recompte inferior al real es pot donar per la presència de plaquetes grans o agregats plaquetaris. Amb l'aparició dels nous canals PLT-O, i sobretot PLT-F aquestes interferències han anat disminuint principalment degut a que el recompte es realitza per fluorescència i no per impedància. El canal PLT F no només permet diferenciar de manera més acurada les plaquetes d'altres partícules , sinó que també és capaç d'identificar plaquetes grans o gegants (117).

Durant 3 mesos (Octubre-Desembre 2014) es van analitzar un total de 100 mostres. 75 pacients amb trombopènia (plaquetes  $< 100 \times 10^9/L$ ) i 25 persones com a grup control. Dels 75 pacients, 17 estaven diagnosticats per trombopènia primària immune ( PTI), 34 rebien quimioteràpia (QT) i 24 eren pacients amb malaltia crònica hepàtica (MCH). En l'estudi vàrem concloure que els valors de l'IPF en els casos amb PTI eren estadísticament superiors respecte el valor de l'IPF en la resta de malalties estudiades. El punt de tall per diferenciar una PTI de la resta de malalties va ser d'un IPF 11,7% amb una sensibilitat de 88,2% i una especificitat de 91,5%. L' estudi va ser publicat a la revista internacional del Laboratori d'Hematologia (ISLH) i va rebre el premi al Trainee Travel Award del XVIII International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology de l'any 2015 (118).

L'any 2019, es va decidir ampliar l'estudi amb 332 pacients per poder aportar resultats més robusts a l'estudi prèviament mencionat. Dels 332 pacients, 28 varen ser diagnosticats de trombopènia primària immune (PTI), 92 pacients sota tractament amb quimioteràpia

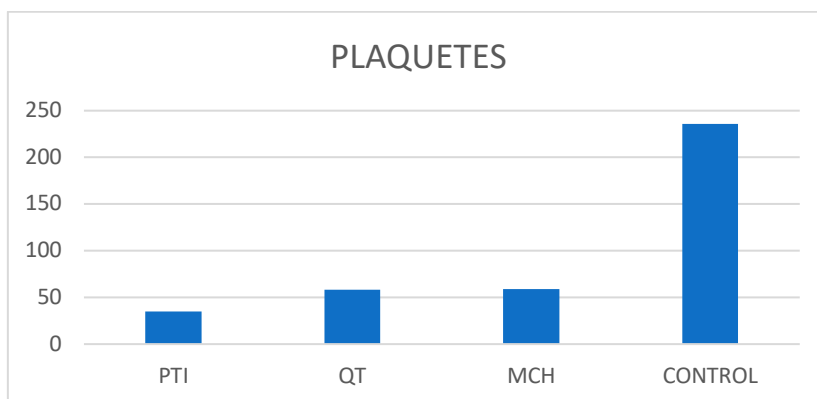
(QT), 68 pacients diagnosticats amb una malaltia crònica hepàtica (MCH) i 144 pacients control.

*PTI (trombopènia primària immune), QT (tractament amb quimioteràpia), MCH (malaltia crònica hepàtica)*



**Figura 56..Grups de pacients seleccionats amb plaquetopènia per analitzar el marcador IPF.**

La mitja del recompte de plaquetes pel grup control fou de  $246 \pm 68,9 \times 10^9/L$ ; pacients amb QT fou de  $51,6 \pm 23,9 \times 10^9/L$ ; pacients amb MCH la mitja fou de  $57,5 \pm 16,06 \times 10^9/L$  i pacients amb PTI fou de  $35,11 \pm 26,5 \times 10^9/L$ .



**Taula 26.Mitja del recompte de plaquetes entre els diferents grups estudiats**

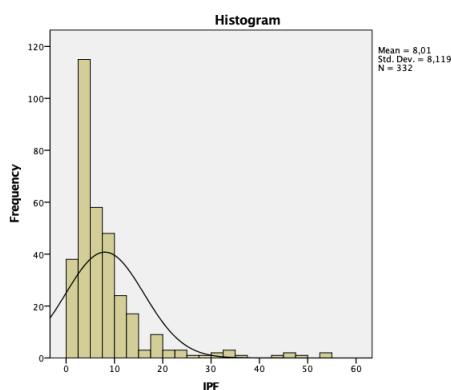


Per veure si el valor d'IPF% presenta diferències estadísticament significatives respecte els altres grups, primer es processa el test de Kolmogorov-Smirnov per saber si la població estudiada presenta una distribució normal respecte l'IPF. Es considera una distribució normal quan el valor de les significàncies  $> 0,05$ .

Paràmetre	Kolmogorov-Smirnov
IPF	$<0,001$

**Taula 27. Test de Normalitat del paràmetre IPF**

L'histograma confirma que la població no segueix una distribució normal



**Figura 57. Histograma de distribució del paràmetre IPF en la població estudiada**

Per a la comparació dels 4 grups i per poder determinar si hi ha diferències significatives entre ells, utilitzem el mètode de Kruskal-Wallis, que és el que s'utilitza en casos de distribució no normal. Les dos hipòtesis plantejades són:

-La hipòtesis nul·la. Els valors d'IPF % en els grups estudiats no presenten valors que siguin estadísticament significatius (no existeixen diferències entre grups per aquest paràmetre). Això succeirà si el test de Kruskal-Wallis dona un resultat  $> 0,05$  de nivell de significació estadística.

- La hipòtesis alternativa. Els valors d'IPF% en els grups estudiats presenten valors que siguin estadísticament significatius (existeixen diferències entre grups per aquest paràmetre). Això succeirà si el test de Kruskal-Wallis dona un resultat  $< 0,05$  de nivell de significació estadística.

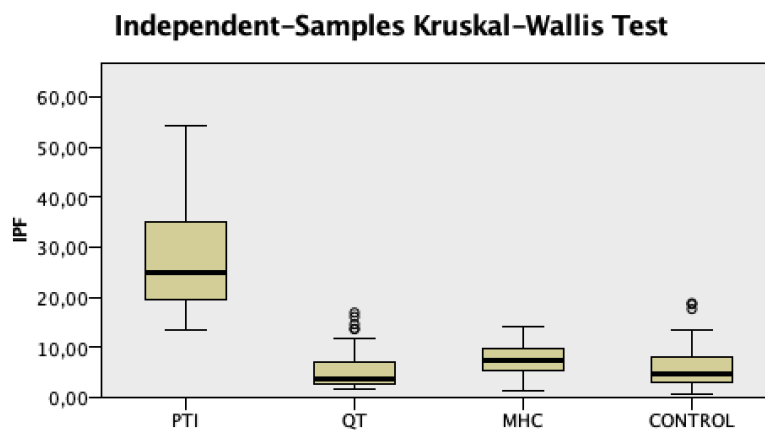
## Nonparametric Tests

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of IPF is the same across categories of CAUSA.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

**Figura 58.** Resultat del test de Kruskal-Wallis

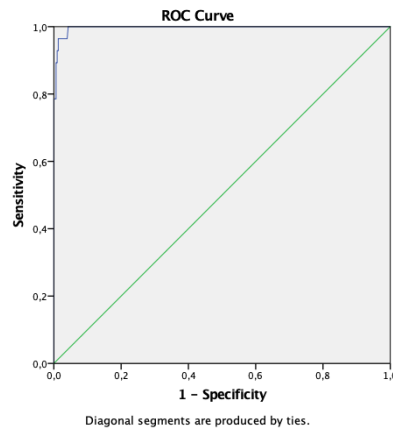
Els valors IPF obtinguts varen presentar diferències significatives en el grup de PTI respecte els altres grups amb trombopènia. En pacients amb PTI el resultat IPF és significativament superior quan el comparem amb la resta de grups estudiats ( PTI:  $29 \pm 12,2$  ; grup control:  $5,77 \pm 3,68$ ; QT:  $6,47 \pm 4,1$ ; i MHC :  $7,73 \pm 3,1$ ; ( Figura 59).



**Figura 59.** Distribució IPF% en tots els grups estudiats

Una vegada confirmat que el valor de l'IPF en els pacients amb púrpura trombopènica idiopàtica presenta diferències significatives respecte el grup control i les altres patologies estudiades, vàrem calcular el millor punt de tall per l'IPF pel diagnòstic de

les PTI que va resultar ser de 13,55 % amb una sensibilitat de 96,2% i una especificitat de 96,1%. A la Figura 60, s'observa l'anàlisi de la corba ROC pels valors de IPF%.



**Figura 60.** Corba ROC on s'observa la sensibilitat i especificitat IPF% dels pacients amb PTI

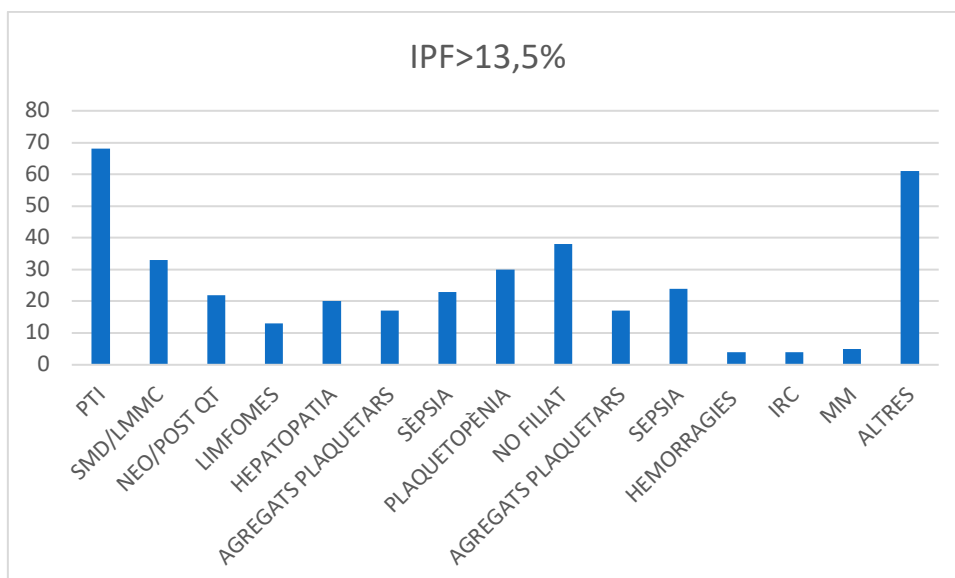
En el nostre estudi, suggerim que la fracció de plaquetes immadures (IPF) es un marcador robust pel diagnòstic diferencial de les trombopènies i un bon marcador de la recuperació de plaquetes. Tal i com indiquen els resultats, el valor de %IPF va ser estadísticament superior en la trombopènia immune primària (PTI) respecte les altres situacions clíniques estudiades. No hi van haver diferències estadístiques entre els grups amb tractament quimioteràpic (QT) ni en pacients amb malaltia crònica hepàtica (MCH). Aquests resultats reafirmen els resultats obtinguts en l'estudi de 2014 i concorden amb altres estudis realitzats més recentment (119,120,121).

En el nostre estudi, el millor punt de tall per distingir adequadament entre els pacients PTI i els de QT i MCH va ser IPF de 13,55% amb una sensibilitat de 96% i una especificitat de 96,5%. Els valors difereixen una mica respecte el nostre estudi fet l'any 2014, (IPF% de 11,5%) probablement a causa de l'increment en el número de mostres estudiades. L'estudi d'Adly, en pacients pediàtrics amb PTI el millor valor de IPF% és 9.4 amb una sensibilitat 88% i especificitat de 85,7% (122). Aquestes diferències entre els valors poden ser degudes tant per les diferències en edat dels diferents grups utilitzats, com pels diferents analitzadors utilitzats.

Els nostres resultats proven que la magnitud IPF en Sysmex®XN pot ser considerada com un bon marcador pel diagnòstic diferencial en els trastorns trombopèncs, especialment en aquells casos amb un resultat baix de plaquetes en sang perifèrica. IPF a més, és un bon predictor de la recuperació plaquetària (62,120).

A partir d'aquest estudi, el nostre grup de treball va estudiar el valor de la fracció de plaquetes immadures (IPF%) de l'hemograma com a predictor del risc de sagnat durant l'embaràs a les gestants amb trombocitopènia. Es varen estudiar 31 gestants amb trombopènia. De totes elles es va analitzar l'IPF i es va observar quines embarassades sagnaven més en el moment del part. Els resultats varen ser que les gestant amb trombopènia i IPF<10% tenen major risc de sagnat amb comparació amb les de trombopènia i IPF>10% (123).

Durant l'any 2019, vàrem aprofundir més en l'estudi de l'IPF i vàrem realitzar un estudi prospectiu estudiant tots aquells pacients que presentaven en el hemograma una trombopènia < 100 x10<sup>9</sup> /L. un valor IPF >13,5% . L'objectiu era determinar quines eren les causes més freqüents d'aquests valors elevats, i si es podia concloure que una troballa d'un IPF elevat juntament amb una trombopènia es pot atribuir a una PTI. Vàrem estudiar 329 pacients amb un IPF>13,6%. En 38 casos no es va poder arribar a un diagnòstic, i per tant no consten en aquest estudi. En 68 casos el pacients presentaven una PTI, en 33 casos presentaven un SMD amb els valors més alts en aquells pacients amb LMMC (amb un IPF de 60%), 30 amb plaquetopènies no estudiades de tipus crònic (algunes filiades com hereditàries, plaquetopènia amb plaquetes grans, altres de llarga evolució..), 17 casos d'agregats plaquetaris, 25 casos de sèpsia o infecció greu (4 pneumònies), 22 casos oncològics un cop passat tractament QT, 13 casos de limfomes, 18 casos hepatopatia de diverses causes ( autoimmune, alcohòlica, cirrosis en 4 casos). Els 65 casos restants el diagnòstic és variat com IRC, PTT, diabetis mellitus, amiloïdosis i hemorràgies.



**Figura 61. Resultat de l'anàlisi de pacients amb IPF >13,5%**

Analitzant els casos amb IPF >13,6% podem observar que no en tots els casos el pacient presenta una malaltia de tipus regeneratiu. És el cas de les síndromes mielodisplàstiques. Aquest tipus de malaltia provoca alteracions en les cèl·lules productores de sang. Una de les explicacions respecte a la troballa de valors alts d'IPF en situacions on no es presenta regeneració medul·lar pot ser degut a que en patologies com SMD solen tenir plaquetes grans i presenten displàsia (58,59).

Vàrem voler analitzar si existia un punt de tall de l'IPF diferent per afinar més el diagnòstic entre els SMD i PTI. Per això vàrem plantejar la següent hipòtesi:

-La hipòtesis nul·la. Els valors de l'IPF en els grups estudiats no presenten valors que siguin estadísticament significatius (no existeixen diferències entre grups per aquest paràmetre) . Això succeirà si el test de Mann Whitney dona un resultat  $> 0,05$  de nivell de significació estadística.

- La hipòtesis alternativa. Els valors de l'IPF en els grups estudiats presenten valors que siguin estadísticament significatius ( existeixen diferències entre grups per aquest paràmetre). Això succeirà si el test de Mann Whitney dona un resultat  $< 0,05$  de nivell de significació estadística.

El resultat va concloure que el valor de l'IPF no és estadísticament significatiu per diferenciar entre els casos de PTI i SMD tal i com mostra la Taula 62 obtinguda del programa estadístic SPSS on el test de Mann-Whitney presenta una  $p > 0,05$ .

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of IPF is the same across categories of TIPUS_MALALTIA.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,215	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

**Figura 62. Resultat del test de Mann Whitney**

La fracció immadura de plaquetes és el resultat de la mida de les plaquetes i del contingut d'ARN en el seu interior (62). Davant d'un pacient amb trombopènia, l'IPF ens pot proporcionar informació que ens pot ajudar en el seu diagnòstic. És molt important realitzar el frotis de sang perifèrica per visualitzar la morfologia de les plaquetes i poder arribar a un bon diagnòstic. Com hem vist a la introducció i com veurem més endavant en el punt 2.2 de resultats, els agregats plaquetars (pseudotrombopènia) presenten un IPF alt i el recompte de plaquetes en aquell pacient és baix. Aquests valors d'IPF són deguts a que les plaquetes agregades simulen una mida més gran i presenten més fluorescència (60).

Els pacients amb SMD també poden presentar trombopènia i valors d'IPF elevats; en aquest cas l'IPF es troba elevat a causa del contingut de restes d'ARN en les plaquetes que es troben en sang perifèrica; a més moltes vegades aquests pacients presenten anisotrombia i es poden veure plaquetes de mida més gran (58). Un estudi interessant seria determinar si hi ha diferències significatives entre el valor de l'IPF i els diferents SMD.

Segons diversos estudis, pacients amb trombopènia hereditària com la mutació del gen MYH9 presenten un IPF elevat. Hi ha alguns estudis on s'observen valors de l'IPF són superiors al 40% (60). En el nostre estudi no presentem cap pacient diagnosticat per cap trombopènia hereditària tot i que en 30 casos, la història clínica recull que el pacient presenta trombopènia hereditària, ja que altres familiars també s'ha identificat aquesta

trobada. En aquest cas el motiu pel qual l'IPF presenta valors elevats seria pel fet que les plaquetes són molt grans i amb restes de material genètic. (60) Seria molt interessant ampliar l'estudi IPF en aquest grup de pacients.

Per últim, els casos de trombopènia immune primària, els pacients presenten trombopènia amb IPF elevats degut a la regeneració de plaquetes. En el nostre estudi el punt de tall adequat per diferenciar-les d'altres patologies no regeneratives seria de 13,5%

Com a conclusió, la fracció immadura de plaquetes (IPF) pot ajudar al diagnòstic diferencial en casos de trombopènia, juntament amb la clínica del pacient i la realització del frotis de sang perifèrica per observar la morfologia de les plaquetes.

## 2.2. ESTUDI DE L'ESPECIFICITAT I SENSIBILITAT DE L'ALARMA D'AGREGATS PLAQUETARIS AMB PACIENTS AMB TROMBOPÈNIA

La pseudotrombopènia és un fenomen produït in vitro que produeix una aglutinació de plaquetes, produint un descens significatiu del recompte de plaquetes per part de l'analitzador. Com s'ha comentat prèviament a la introducció el valor de l'IPF% pot resultar falsament elevat en casos d'agregats plaquetari (61). Això fa indispensable realitzar el frotis de sang perifèrica per valorar la presència d'aquests. I per tant, davant d'un resultat elevat en el valor de l'IPF% és molt important descartar la presència d'agregats. Cal tenir en compte que, en els casos amb presència d'agregats, l'analitzador molt probablement emetrà un resultat amb trombopènia.

Primer de tot es va fer un estudi retrospectiu de l'any 2019 amb aquelles mostres que havien presentat agregats a l'observació del microscopi òptic. Es va analitzar l'IPF de les mostres amb el resultats presentats a la Taula 28. La mitjana del IPF en les mostres amb presència d'agregats és de  $IPF=15,64 \pm 6,248 \%$ , amb un interval de confiança del 95% de [14,76- 16,52] on es confirma que aquelles mostres amb presència d'agregats presenten un IPF elevat.

	<i>N</i>	<i>IPF%</i>	<i>RANG</i>	<i>DS</i>
	<i>mostres</i>			
<i>IPF%</i>	197	15,64	14,76- 16,52	6,248

**Taula 28. Valors IPF% en mostres amb presència d'agregats plaquetaris**

L'analitzador Sysmex® XN disposa d'una alarma que marca aquelles mostres suggestives de tenir pseudotrombopenia per la presència d'agregats plaquetaris anomenada "PLT Clumps". L'objectiu és analitzar la sensibilitat i especificitat d'aquesta alarma per valorar si la seva presència és a causa de l'agregació de plaquetes.



Al gener de 2017 es varen analitzar 25.325 mostres. D'aquestes 151 presentaven trombopènia (plaquetes < 100 x10<sup>9</sup>/L).

Es va fer una anàlisi del frotis de sang perifèrica de totes elles per verificar en quins casos es detectava presència d'agregats i en quins no n'hi havia. Es varen obtenir els següents resultats: en 64 casos no hi havien agregats i en cap d'ells es presentava l'alarma d'agregats; en 77 casos es va observar al microscopi òptic la presència microagregats, és a dir, presència de petits grups de plaquetes sense arribar a ser morfològicament agregats. D'aquests, 71 casos no presentaven l'alarma de clumps, i en 6 si que presentava l'alarma; finalment vàrem observar 10 casos d'agregats plaquetaris al microscopi òptic dels quals 6 no presentaven l'alarma d'agregats plaquetaris i 4 casos si que la hi tenien present. La Taula 29 mostra els resultats esmentats.

	AGREGATS	NO AGREGATS	TOTAL
ALARMA CLUMPS	6+4=10	0	10
NO ALARMA	71+6=77	64	141
TOTAL	87	64	151

**Taula 29. Resultats de les 151 mostres analitzades amb trombopènia segons si presenten alarma de clumps i si s'observen agregats plaquetaris.**

Calculem la sensibilitat (S), especificitat (E), valor predictiu positiu (VPP) i valor predictiu negatiu (VPN) de l'alarma d'agregats plaquetaris segons les fórmules següents:

$$S = VP / (VP + FN) = 10 / 87 * 100 = 11,45 \% \text{ IC (95\%) [4,22-18,77]}$$

$$E = VN / (VN + FP) = 64 / 64 * 100 = 100\% \text{ IC (95\%) [99,22-100]}$$

$$VPP = VP / (VP + FP) = 10 / 10 = 100\% \text{ IC (95\%) [95-100]}$$

$$VPN = VN / (VN + FN) = 64 / 141 = 45,4 \% \text{ IC (95\%) [49,4-65,83]}$$

Els resultats mostren que l'alarma és molt poc sensible, és a dir, existeixen casos en els quals la mostra presenta agregats plaquetaris i l'analitzador no els detecta, especialment en aquells casos on hi ha microagregats. Per tant és una alarma que no permet estalviar-se

l'observació de plaquetes al microscopi òptic quan aquestes presenten un valor baix. En canvi, és una alarma molt específica, la qual cosa significa, que quan hi ha presència d'alarma, la mostra presenta agregats.

Els valors de sensibilitat i especificitat són propietats intrínseques a la prova diagnòstica independentment dels valors de la prevalença del fenomen a estudiar (en el nostre cas, pseudotrombopènies). En canvi, el concepte de valors predictius depenen en gran mesura de la freqüència d'aquest fenomen. Quan la prevalença és baixa, un resultat negatiu permetrà descartar la malaltia amb més seguretat. Un resultat positiu no permetrà confirmar el diagnòstic.

En el nostre cas, degut a que la pseudotrombopènia presenta una prevalença baixa, 0,1-0,29%, convé que el valor predictiu negatiu de l'alarma d'agregats plaquetaris presenti valors elevats (124). A més, hagués estat molt convenient que presentés un VPN alt, és a dir, que l'absència d'alarma descartés la presència d'agregats. Succeeix just el contrari, la presència d'alarma permet confirmar la presència d' agregats però la seva absència no ho permet descartar. Per tant considerem, que malgrat l'alarma presenti una excel·lent especificitat, no permet estalviar l'observació d'agregats plaquetaris en aquells casos on es presenti trombopènia i no hi hagi alarma.

Com a conclusió, l'elaboració de regles expertes és imprescindible en els laboratoris d'hematimetria per poder fer un cribratge d'aquelles mostres que per criteris quantitius o qualitius requereix l'observació del frotis de sang perifèrica, com és el cas de la trombopènia. L'IPF% és un bon marcador per discernir la causa i origen de la trombopènia(51,56,125). Si la trombopènia és d'origen central els valors IPF% seran baixos (fins a un 5%) mentre que si la trombopènia és d'origen perifèric o regeneratiu, els valors del IPF% seran alts. (48)En el cas de la trombopènia immune primària establím el punt de tall de l' IPF en 11.8% segons els nostres resultats. Una de les interferències més importants i més limitants descrites sobre l'IPF%, son els valors falsament elevats davant la presència d'agregats plaquetaris (60). En aquestes situacions, l'hemograma presentarà una trombopènia i el valor de l'IPF% serà alt, cosa que ens farà sospitar de manera errònia sobre una trombopènia d'origen regeneratiu. Això és degut a que els agregats plaquetaris es

col·loquen a la mateixa zona que les plaquetes immadures (per mida i emissió de fluorescència)(61). L'analitzador Sysmex® XN presenta una alarma d'agregats plaquetaris quan detecta la presència d'aquests grups de plaquetes que dispersen la llum del làser amb mida excessivament elevada.

Es va realitzar un estudi de sensibilitat i especificitat d'aquesta alarma per poder establir un bon algoritme diagnòstic en els casos de trombopènia i mirar d'agilitzar-ne el procés evitant anàlisi de frotis de sang perifèrica innecessaris.

El resultat del nostre treball demostra que l'alarma d'agregats plaquetaris presenta una sensibilitat de 11,45% que és molt baixa. Aquest resultat probablement és degut a que la presència de microagregats no és detectada per l'analitzador com a possible interferència, la qual cosa obliga a l'observació del frotis en sang perifèrica en tots els casos. D'altra banda, l'especificitat és del 100%. No hem trobat cap cas que es presentés l'alarma i no observar agregats. Respecte, els valor predictiu negatiu ens ha donat un resultat del 45%. Degut a que aquest paràmetre depèn de la prevalença i en el cas de la pseudotrombopènia és molt baixa, l'ídoni hagués estat que el valor del VPN fos el més alt possible, que indicaria que l'absència d'alarma descarta la presència d'agregats. En el nostre cas aquest valor és molt baix i això ens obliga a la visualització de frotis de sang perifèrica per a l'observació d'agregats plaquetaris cada cop que hi hagi trombopènia i no aparegui l'alarma.

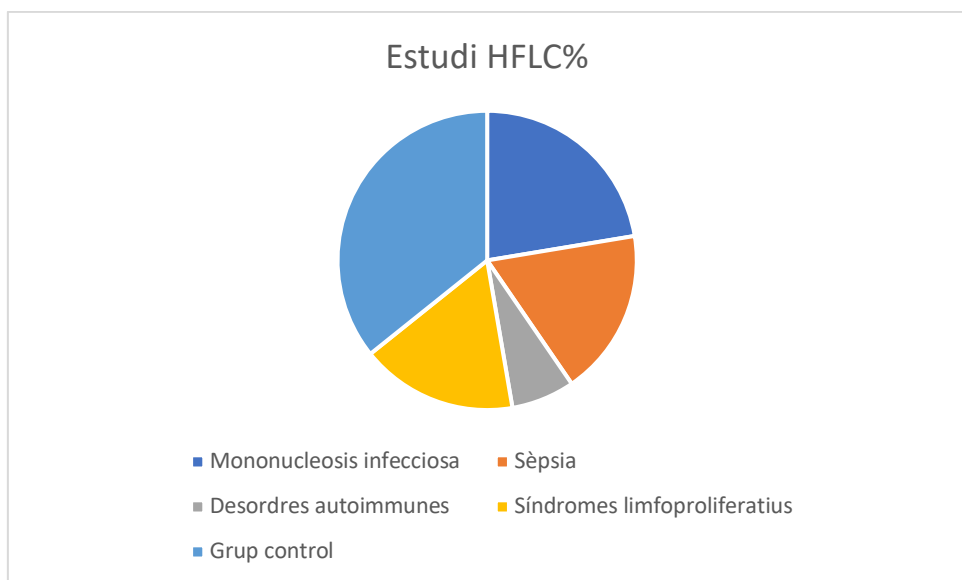
### **3.- ESTUDI MARCADORS LEUCOCITARIS PEL DIAGNÒSTIC DE SÈPSIA**

#### **3. 1 AVALUACIÓ DEL MARCADOR HFLC% (HIGH FLUORESCENCE LYMPHOCITES COUNT) EN CASOS DE SÈPSIA**

Els limfòcits altament fluorescents (HFLC) reflecteixen aquells limfòcits amb una alt contingut d'ARN a l'interior de les seves cèl·lules. Un valor d' HFLC alt és indicatiu d'una resposta immunològica. S'ha relacionat aquest paràmetre amb la fabricació d'anticossos, i per tant podria ser un paràmetre útil en el diagnòstic de sèpsia (89,90).

El nostre propòsit és determinar si l'HFLC% és un bon marcador per detectar sèpsies, degut a que és una de les patologies on s'activa la síntesis d'anticossos per combatre les infeccions. Per fer-ho analitzem diferents grups de pacients que per la seva condició clínica mostren un augment en la síntesis d'anticossos.

Analitzem el valor de HFLC% en 277 pacients classificats en 5 grups segons el seu diagnòstic principal: 62 pacients amb mononucleosis infecciosa on en el frotis de sang perifèrica presentaven limfòcits activats de Downey. El diagnòstic es feia per PCR (reacció en cadena de la polimerasa) o per serologia. 50 pacients amb sèpsia segons el tercer consens Internacional per a la definició de Sèpsia i Xoc Sèptic (sepsis-3); el valor de l'HFLC en aquests pacients és el de l'anàlítica extreta al mateix temps que els hemocultius, que normalment és la primera analítica a l'arribada a urgències; 19 pacients amb malalties autoimmunes diagnosticades per IFI (immunofluorescència indirecte) i manifestacions clíniques; 47 pacients amb síndromes limfoproliferatives (mieloma múltiple, malaltia de Waldestrom i leucèmia limfàtica crònica) amb Immunofenotip compatible amb aquest tipus de desordre limfocitària i 99 pacients sans en el grup control.



**Figura 63. Grups de pacients inclosos per l'estudi de l'HFLC%**

A la Taula 30 observem la mitja de cada grup amb l'interval de confiança del 95% i la seva desviació Standard. Així pels desordres autoimmunes HFLC presenta una mitjana de 0,058% (IC 95% 0,0018-0,0098), pels desordres limfoproliferatius HFLC es de 0,27 % (IC 95% de 0,489-0,72), pels pacients amb sèpsia HFLC és de 0,11 % (IC95% 0,066-0,163) ,pels pacients amb mononucleosi infecciosa la mitja es de 2,25% (IC95% 1,677-2,858) i pel grup control és de 0,08% amb un IC95% (0,055-0,101).

	Sèpsia	Desordres autoimmunes	Síndromes limfoproliferatius	Mononucleosi infecciosa	Grup control
<b>HFLC %</b>	<b>0 (0.1-0.20)</b>	<b>0 (0-0.01)</b>	<b>0 (0-0.20)</b>	<b>1.90 ( 0.7-3.10)</b>	<b>0(0-0.10)</b>

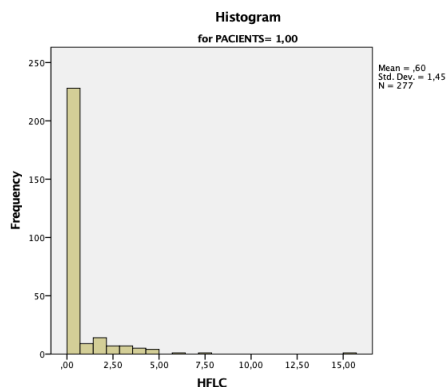
**Taula 30. Anàlisi descriptiu del valor de la mitja dels diferents grups estudiats**

Dels 277 pacients classificats en 5 grups, primer analitzem si la població presenta una distribució normal a través del mètode Kolmogorov-Smirnov .A la Taula 31 s'exposen els resultats on s'observa que l'estudi HFLC% presenta una distribució no normal.

Paràmetre	Kolmogorov-Smirnov
HFLC%	<0,001

**Taula 31.** Anàlisi de la normalitat de la població pel paràmetre HFLC%

L'histograma confirma que la població estudiada no segueix una distribució normal



**Figura 64.** Histograma de distribució del paràmetre HFLC% en la població estudiada

Per a la comparació dels 5 grups i per poder determinar si hi ha diferències significatives entre ells , utilitzem el mètode de Kruskal-Wallis. En aquest punt de l'estudi ens plantejarem dos hipòtesis:

-La hipòtesis nul·la. Els valors d'HFLC% en els grups estudiats no presenten valors que siguin estadísticament significatius (no existeixen diferències entre grups per aquest paràmetre) . Això succeirà si el test de Kruskal-Wallis dona un resultat  $> 0,05$  de nivell de significació estadística.

- La hipòtesis alternativa. Els valors d'HFLC% en els grups estudiats presenten valors que siguin estadísticament significatius (existeixen diferències entre grups per aquest paràmetre). Això succeirà si el test de Kruskal-Wallis dona un resultat  $< 0,05$  de nivell de significació estadística.

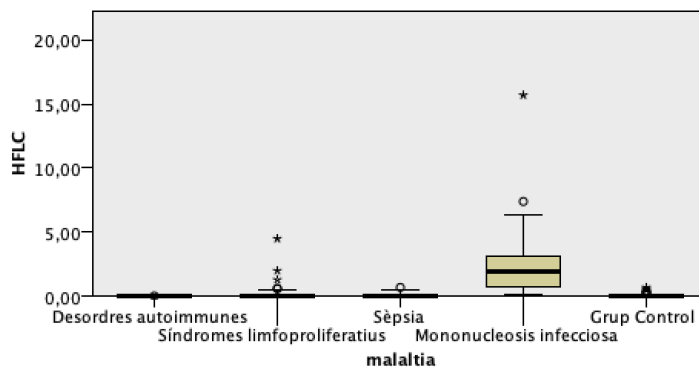
La Taula 32 mostra el resultat del test de Kruskal-Wallis obtingut pel paquet estadístic SPSS on es confirma la hipòtesis alternativa, és a dir, els valors d'HFLC% en els grups estudiats presenten valors que son estadísticament significatius i per tant existeixen diferències que fan que aquest paràmetre sigui clau en el diagnòstic diferencial del grup de malalties estudiat.

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of HFLC is the same across categories of malaltia.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

**Taula 32. Resultat del test de Kruskal-Wallis per analitzar si HFLC% presenta diferències significatives entre els diferents grups estudiats.**

La Figura 65 mostra el diagrama de caixes i bigotis dels 5 grups estudiats. Podem observar dos tendències clarament diferents. Per una banda els pacients amb desordres autoimmunes, síndromes limfoproliferatius, pacient amb sèpsia i el grup control, els valors de HFLC% tenen un valor pràcticament de 0, mentre que el grup de mononucleosis infecciosa el seu valor és més alt amb un valor mig de HFLC de 1,90% .



**Figura 65. Valors de HFLC% en les diferents poblacions estudiades**

Per confirmar la nostra sospita que els valors de l'HFLC% son estadísticament significatius en els casos de mononucleosis infecciosa i no ho son en els casos de sèpsia, fem ús de l'anàlisi pos hoc de Tukey. També es plantegen 2 hipòtesis.

-La hipòtesis nul·la. Els valors d'HFLC% entres els dos grups estudiats no presenten valors que siguin estadísticament significatius (no existeixen diferències entre grups per aquest paràmetre) . Això succeirà si el test de Tukey dona un resultat  $> 0,05$  de nivell de significació. estadística (  $p > 0,05$ ).

- La hipòtesis alternativa. Els valors d'HFLC% entre els dos grups estudiats presenten valors que siguin estadísticament significatius ( existeixen diferències entre grups per aquest paràmetre). Això succeirà si el test de Tukey dona un resultat  $< 0,05$  de nivell de significació estadística ( $p < 0,05$ ).

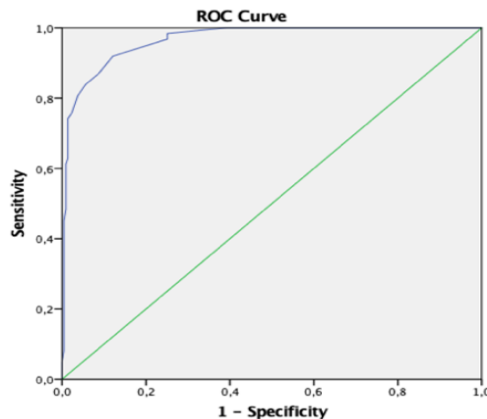
A la Taula 33 observem la comparació de cada grup amb tots els grups restants. Els pacients amb mononucleosis infecciosa son els únics que presenten diferències significatives quan es comparen amb la resta de grups ( $p < 0,05$ ). En cap altra cas, succeeix que els valors HFLC% siguin estadísticament significatius.



<b>Test de Tukey</b>		
<b>Malaltia a estudiar</b>	<b>Comparació amb els altres grups</b>	<b>Sig.</b>
<b>Desordres autoimmunes</b>	<b>Síndromes limfoproliferatius</b>	,912
	<b>Sèpsia</b>	,997
	<b>Mononucleosi infecciosa</b>	<0,001
	<b>Grup Control</b>	,999
<b>Síndromes limfoproliferatius</b>	<b>Desordres autoimmunes</b>	,912
	<b>Sèpsia</b>	,960
	<b>Mononucleosi infecciosa</b>	<0,001
	<b>Grup Control</b>	,879
<b>Sèpsia</b>	<b>Desordres autoimmunes</b>	,997
	<b>Síndromes limfoproliferatius</b>	,960
	<b>Mononucleosi infecciosa</b>	<0,001
	<b>Grup Control</b>	1,000
<b>Mononucleosi infecciosa</b>	<b>Desordres autoimmunes</b>	<0,001
	<b>Síndromes limfoproliferatius</b>	<0,001
	<b>Sèpsia</b>	<0,001
	<b>Grup Control</b>	<0,001
<b>Grup Control</b>	<b>Desordres autoimmunes</b>	,999
	<b>Síndromes limfoproliferatius</b>	,879
	<b>Sèpsia</b>	1,000
	<b>Mononucleosi infecciosa</b>	<0,001

**Taula 33.. El test de Tukey ens informa que els pacients amb Epstein-Barr presenten uns valors d' HFLC% estadísticament significatius respecte la resta de grups estudiats.**

Dels grups estudiats, l'únic grup que presenta diferències estadísticament significatives és el grup de la mononucleosi infecciosa. Per saber si existeix un punt de tall a partir del qual s'obtingui un valor discriminatori per la seva detecció, realitzem una corba ROC. A la Figura 66 es mostra un valor de HFLC de 0,25% amb una sensibilitat i especificitat de 92% i 88% respectivament per diferenciar la mononucleosi infecciosa de la resta de grups.



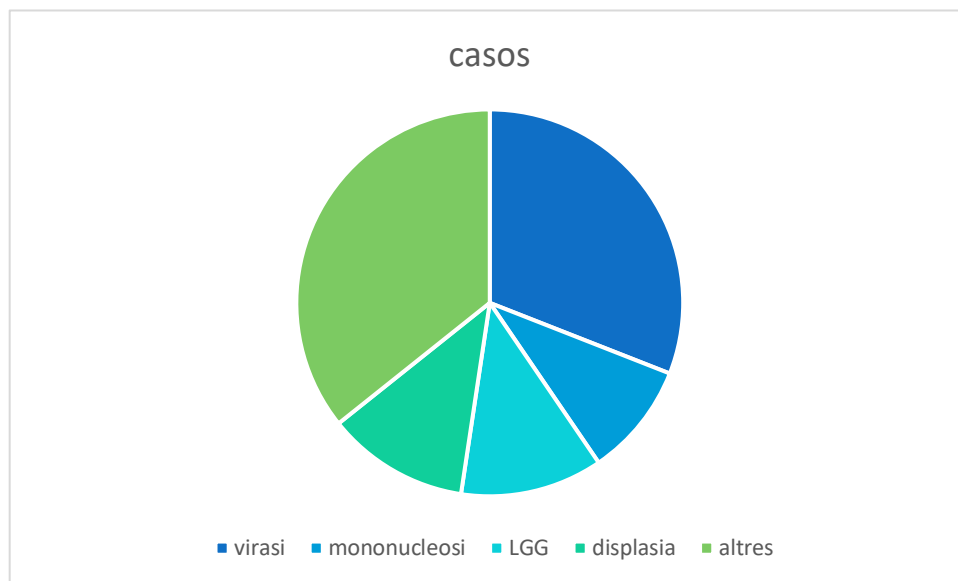
**Figura 66..Corba ROC on s'observa que un cut-off de 0,25 % amb un 92% sensibilitat i 88% d'especificitat per detectar una mononucleosi infecciosa.**

Segons els nostres resultats, l'HFLC% no és un bon marcador per la detecció precoç de la sèpsia. No hem trobat que existeixin diferències estadísticament significatives quan el comparem amb el grup control o amb qualsevol dels altres grups estudiats. Coincidim doncs, amb l'estudi de Fang et al. 2014 on el seu estudi en cap cas els pacients que presentaven sèpsia en el moment de l'estudi coincidia amb un HFLC% alt (91). En aquest estudi indiquen que aquest marcador podria ser útil en el seguiment donat que l'estudi el valor de l'HFLC pot augmentar en altres estadis de la malaltia. En el nostre estudi no hem realitzat un seguiment dels pacients diagnosticats amb sèpsia per poder orientar si aquest valor pot ajudar en altres estadis de la sèpsia, ja sigui en el seguiment o pronòstic. Seria doncs interessant, ampliar l'estudi per poder confirmar els resultats de l'estudi i poder-los aplicar en el nostre laboratori.

On sí que observem que existeixen diferències significatives és en el grup de pacients amb mononucleosi infecciosa, on els valors presentats per HFLC% son superiors a la resta de grups estudiats, amb un cut-off de 0,25% (92% sensibilitat i 88% especificitat). Creiem

que el valor de l'HFLC està relacionat amb l'activació dels limfòcits, degut a que els pacients amb mononucleosis infecciosa presentaven els limfòcits activats característics d'aquesta malaltia (limfòcits de Downey). Caldria ampliar l'estudi i realitzar un frotis de sang perifèrica a cadascun dels grups per poder confirmar aquesta hipòtesis. No hem trobat molta literatura al respecte, i creiem que podria ser molt interessant per establir una connexió entre els limfòcits activats i HFLC. Sysmex assenyala que HFLC mostra els limfòcits amb alta fluorescència perquè tenen un alt contingut en RNA. Els seus estudis mostren una bona correlació entre HFLC i els limfòcits B activats (126). Altres estudis mostren resultats molt prometedors en la detecció de dengue i alts valors HFLC% (90). Per altra banda, cal buscar altres tipus de marcadors diferents a l'HFLC per poder predir la sèpsia en els seus estats inicials. Un d'aquests marcadors son els cell population data (CPD) que seran explicats més endavant en el punt 3.2.

Vàrem estudiar aquells pacients amb una HFLC > 0,3% durant una setmana del febrer del 2019. Van haver-hi 42 casos amb un HFLC>0,3% dels quals, en 13 casos es varen observar limfòcits reactius (11 no filiada, 1 varicel·la, i 1 cas de dengue), en 5 casos s'observaven limfòcits grans granulars, 4 casos varen ser diagnosticats de mononucleosi infecciosa, 5 casos on s'observava algun tipus de displàsia i en 15 casos el diagnòstic era variat com observació de microagregats, alguna drepanocitosi, i fàrmacs.



**Figura 67. Resultat de l'anàlisi prospectiu per mostres amb HFLC > 0,3%**

Per tant, la conclusió és que l'HFLC malgrat es troba elevat en els casos de mononucleosi, no es pot diagnosticar un pacient de mononucleosi només amb el valor de l'HFLC, ja que com s'ha vist és molt poc específic, ja que valors elevats els trobem amb virasis, o quan s'observen limfòcits reactius o grans granulars. Caldrien més estudis per poder orientar al clínic a un diagnòstic més específic quan s'observin limfòcits d'alta fluorescència.



### 3.2. ANÀLISI DE LES CELL POPULATION DATA EN EL DIAGNÒSTIC DE SÈPSIA

Actualment no existeix cap marcador patognomònic de sèpsia. L'hemocultiu és el principal mètode diagnòstic per detectar el microorganisme responsable de la sèpsia i realitzar posteriorment l'antibiograma. És una prova lenta i no del tot sensible ni específica (66). Per intentar agilitzar el diagnòstic s'han estudiat molt marcadors bioquímics derivats de les reaccions de l'organisme per fer front a aquestes infeccions. Alguns d'ells com la proteïna C reactiva i la procalcitonina s'utilitzen actualment per intentar establir un diagnòstic precoç de la malaltia (80).

Els leucòcits son elements cel·lulars que intervenen tant en la resposta innata com adaptativa. Quan es presenta una infecció a l'organisme, aquests provoquen uns canvis morfològics als diferents elements cel·lulars que avui en dia els analitzadors son capaços de detectar. De tots els resultats numèrics que s'obtenen de l'anàlisi cel·lular per citometria de flux a l'analitzador Sysmex® XN, ens fixarem en aquest punt de l'estudi en aquells que fan referència als càlculs de posició, forma, dispersió i ubicació de les diferents poblacions cel·lulars detectades, coneguts com CPD (cell population data). Son dades de cadascun dels elements mesurats amb les variacions dels grups cel·lulars respecte els eixos de projecció (X,Y i Z) . La complexitat cel·lular (side scatter light, SCL), volum cel·lular i forma (forward light intensity, FSC) i el contingut àcid nucleic (intensitat de fluorescència, FSL) (92).

Tal i com hem explicat a la introducció els CPD relacionat amb l'eix de les X són : complexitat en els neutròfils (Ne-SSC), complexitat en els limfòcits (LI-X) i complexitat en els monòcits (MO-X), l'amplitud de dispersió de complexitat en els neutròfils (Ne-WX), amplitud de dispersió de complexitat dels limfòcits (LY-WX) i amplitud de dispersió de complexitat en els monòcits (MO-WX).

Els CPD relacionats en l'eix de les Y són: intensitat de fluorescència dels neutròfils (Ne-SFL), intensitat de fluorescència dels limfòcits (LY-Y), intensitat de fluorescència dels monòcits (MO-Y), amplitud de dispersió dels neutròfils fluorescents (NE-WY), amplitud de

dispersió dels limfòcits fluorescents (LY-WY) i amplitud dels monòcits fluorescents (MO-WY).

Finalment, les CPD relacionades amb l'eix de la Z. Mida dels neutròfils (NE-FSC), mida dels limfòcits (LY-Z) i mida dels monòcits ; l'amplitud de dispersió dels neutròfils (Ne-WZ), amplitud de dispersió dels limfòcits (LY-WZ) i amplitud de dispersió dels monòcits (MO-WZ).

El nostre objectiu és analitzar si aquests CPD son paràmetres útils per observar diferències que siguin estadísticament significatives respecte un grup de pacients control i que ens puguin orientar cap a un diagnòstic de sèpsia. Per fer-ho, s'han seleccionat 50 pacients amb diagnòstic de sèpsia segons el tercer consens Internacional per a la definició de Sèpsia i Xoc Sèptic (sepsis-3) i els hem comparat amb 310 casos de pacients sans com a grup control.

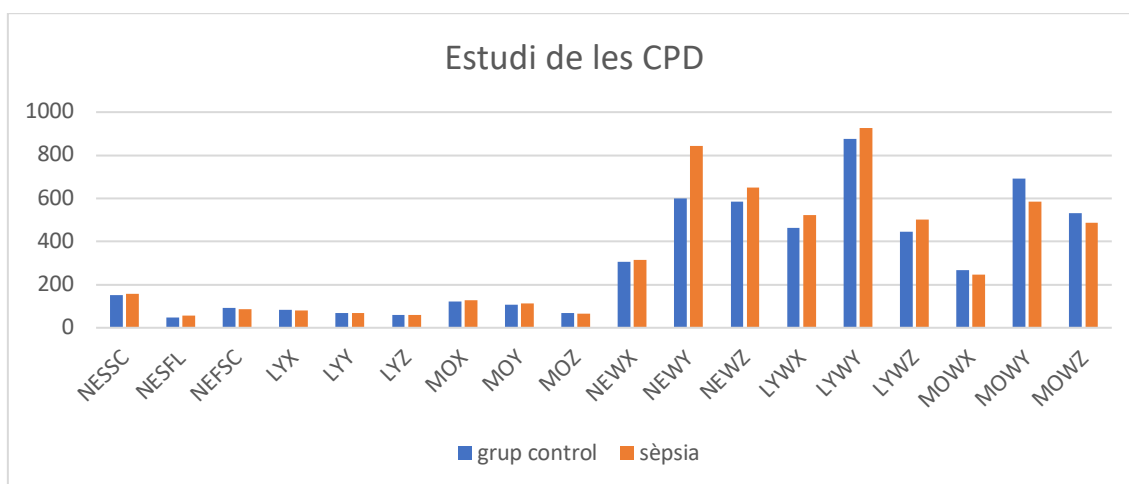
S'ha determinat la mitjana i la seva desviació estàndard entre els dos grups per cadascun dels CPD dels neutròfils (NE-SSC, NE-SFL, NE-FSC, NEWX, NEWY, NEWZ) limfòcits (LYX, LYY, LYZ, LYWX, LYWY, LYWZ) i monòcits (MOX, MOY, MOZ, MOWX, MOWY, MOWZ). La Taula 34 mostra el resultat d'aquestes determinacions.

CPD	grup control		sèpsia	
	Mitjana	Desviació Standard	Mitjana	Desviació Standard
NESSC	152,51	4,266	156,78	4,94
NESFL	46,65	2,455	57,54	16,003
NEFSC	91,24	3,436	86,6	5,573
LYX	82,28	1,633	80,52	3,812
LYY	68,48	3,136	67,91	7,298
LYZ	60,26	0,859	58,32	3,152
MOX	121,37	1,843	126,64	5,54
MOY	107,68	4,963	113,26	12,468
MOZ	67,76	1,912	66,33	6,595
NEWX	305,28	15,501	315,22	29,343
NEWY	599,57	28,163	844,34	183,017
NEWZ	586,37	35,769	648,78	81,497
LYWX	461,76	42,355	522,48	147,854
LYWY	876,67	67,152	927,2	307,041
LYWZ	446,17	33,442	500,76	118,392
MOWX	266,67	27,168	245,58	63,672

<b>MOWY</b>	691,64	83,785	583,44	313,526
<b>MOWZ</b>	531,37	54,622	487,5	126,962

**Taula 34. Valors de les mitjanes de les Cell Population Data i la seva desviació estàndard**

A la Figura 68, expressem els mateixos resultats de les mitjanes de cadascun dels CPD descrits a la Taula 34 en una gràfica de barres. Podem observar que la gran majoria presenten unes mitjanes similars entre els dos grups estudiats (control i sèpsia) però s'aprecien algunes diferències i voldríem determinar si aquestes diferències entre mitjanes dels dos grups presenten diferències estadísticament significatives que puguin ajudar al diagnòstic precoç de sèpsia.



**Figura 68..Gràfica de barres de les mitjanes de les cell population data (CPD) respecte els dos grups estudiats.**

Per fer l'anàlisi estadística primer cal esbrinar si els valors de les CPD segueixen una distribució normal. Per fer-ho utilitzem el mètode de Kolmogorov-Smirnov pel grup control i Shapiro-Wilk pel grup de sèpsia. A la Taula 35 s'exposen els resultats on s'observa que entre els diferents paràmetres CPD pels dos grups bàsicament és un comportament no normal i per tant farem el tractament de les dades seguint els mètodes no paramètrics.



Paràmetre	Kolmogorov-Smirnov
<i>NESSC</i>	0,200
<i>NESFL</i>	<0,001
<i>NEFSC</i>	<0,001
<i>LYX</i>	<0,001
<i>LYY</i>	<0,001
<i>LYZ</i>	<0,001
<i>MOX</i>	<0,001
<i>MOY</i>	<0,001
<i>MOZ</i>	<0,001
<i>NEWX</i>	<0,001
<i>NEWY</i>	<0,001
<i>NEWZ</i>	<0,001
<i>LYWX</i>	<0,001
<i>LYWX</i>	<0,001
<i>LYWY</i>	<0,001
<i>LYWZ</i>	<0,001
<i>MOWX</i>	<0,001
<i>MOWY</i>	<0,001
<i>MOWZ</i>	<0,001

**Taula 35.** Anàlisi de la normalitat de la població per les diferents CPD

A la Figura 69 es troben representats els histogrames les distribucions per cadascun dels cell population data (CPD) per les poblacions estudiades. Es pot observar que en tots els casos menys en el cas de NeSSC no se segueix una distribució normal. En el cas de Ne

SSC la seva distribució sí que és gaussiana. Com que només és un paràmetre el que difereix de distribució respecte la resta, farem l'anàlisi assumint que les poblacions no segueixen una distribució normal.

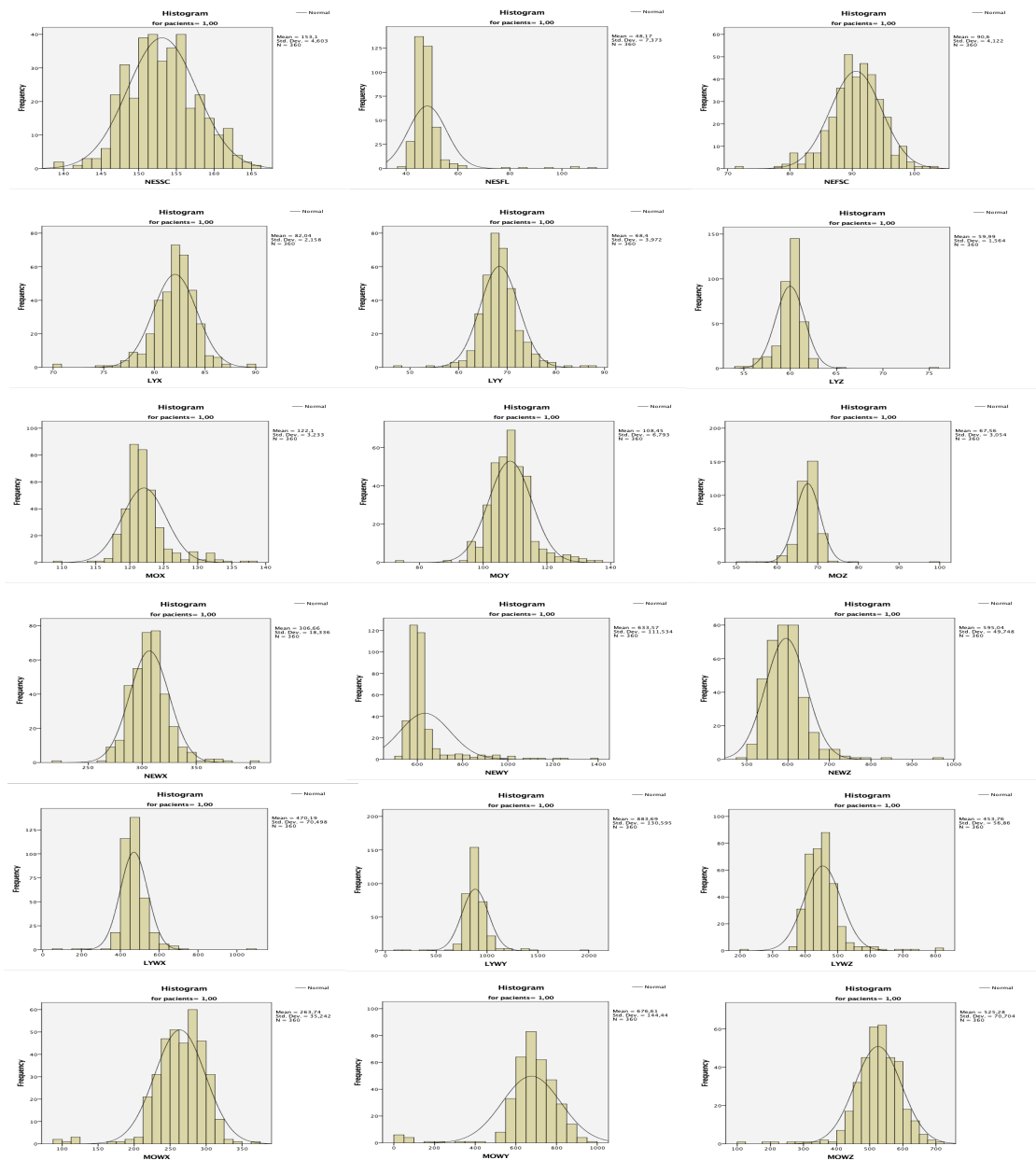


Figura 69. Histograma de distribució dels paràmetres CPD en les poblacions estudiades

Per fer l'anàlisi estadística utilitzem el test de U-Mann Whitney, utilitzat per l'anàlisi de distribució no paramètrica. Presentem dos hipòtesis:

-La hipòtesis nul·la. Els valors de les CPD en els grups estudiats no presenten valors que siguin estadísticament significatius (no existeixen diferències entre grups per aquest paràmetre) . Això succeirà si el test de U-Mann Whitney dona un resultat  $> 0,05$  de nivell de significació estadística.

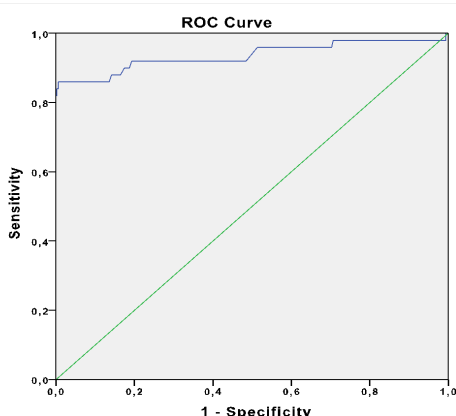
- La hipòtesis alternativa. Els valors de les CPD en els grups estudiats no presenten valors que siguin estadísticament significatius (no existeixen diferències entre grups per aquest paràmetre) . Això succeirà si el test de U-Mann Whitney dona un resultat  $<0,05$  de nivell de significació estadística.

<i>CPD</i>	<i>Sig test de U- Mann-Whitney</i>	<i>Decisió hipòtesis</i>
<b>NESSC</b>	0<0,001	<i>Refusem Hipòtesis nul·la</i>
<b>NESFL</b>	0<0,001	<i>Refusem Hipòtesis nul·la</i>
<b>NEFSC</b>	0<0,001	<i>Refusem Hipòtesis nul·la</i>
<b>LYX</b>	0<0,001	<i>Refusem Hipòtesis nul·la</i>
<b>LYY</b>	0,357	<i>Acceptem la hipòtesis nul·la</i>
<b>LYZ</b>	0<0,001	<i>Refusem Hipòtesis nul·la</i>
<b>MOX</b>	0<0,001	<i>Refusem Hipòtesis nul·la</i>
<b>MOY</b>	0<0,001	<i>Refusem Hipòtesis nul·la</i>
<b>MOZ</b>	0,001	<i>Refusem Hipòtesis nul·la</i>
<b>NEWX</b>	0,11	<i>Acceptem la hipòtesis nul·la</i>
<b>NEWY</b>	0<0,001	<i>Refusem Hipòtesis nul·la</i>
<b>NEWZ</b>	0<0,001	<i>Refusem Hipòtesis nul·la</i>
<b>LYWX</b>	0<0,001	<i>Refusem Hipòtesis nul·la</i>
<b>LYWY</b>	0,075	<i>Acceptem la hipòtesis nul·la</i>
<b>LYWZ</b>	0,003	<i>Refusem Hipòtesis nul·la</i>
<b>MOWX</b>	0,113	<i>Acceptem la hipòtesis nul·la</i>
<b>MOWY</b>	0,824	<i>Acceptem la hipòtesis nul·la</i>
<b>MOWZ</b>	0,92	<i>Acceptem la hipòtesis nul·la</i>

**Taula 36.Resultats del test de U Mann-Whitney pels CPD**

A la Taula 36 observem que les CPD que sí que presenten diferències significatives entre les dues poblacions a estudiar son: Ne-SSC, Ne-SFL, Ne-SFC, LY-X,LY-Z, MO-X,MO-Y,MO-Z,Ne-WY,Ne-WZ,LY-WX, LY -WZ.

De totes elles, realitzem una corba ROC i observem que el millor resultat per diferenciar els dos grups es la magnitud NE-WY amb un cut-off de 623,50 amb una sensibilitat del 92% i una especificitat del 80% (Figura 70).



**Figura 70. Corba ROC realitzada a la magnitud NE-WY amb un cut-off de 623,5 ( sensibilitat 92%, especificitat 80%)**

Després d'analitzar totes les CPD en pacients que eren diagnosticats de sèpsia seguint els criteris internacionals, observem que els millors paràmetres indicatius de sèpsia son el NE-WX, MO-X i NE-SFL. NE-WX mesura l'amplitud de dispersió de la complexitat dels neutròfils i MO-X mesura la complexitat dels monòcits, tots dos paràmetres relacionats amb la granulació i NE-SFL mesura la intensitat de la fluorescència, relacionat amb el contingut d'àcid nucleic i per tant amb un increment d'activitat. Segons els nostres estudis, el que proporciona el millor resultat és el NE-WX.

Creiem que l'anàlisi de l'hemograma a la porta d'entrada a urgències podria donar informació addicional important per a la valoració de la sèpsia. Davant d'una infecció bacteriana es posaran en marxa una sèrie de mecanismes (resposta innata i adaptativa) que comporten un canvi en la morfologia d'aquestes cèl·lules. Els neutròfils i monòcits es caracteritzen per tenir deformabilitat, mobilitat i habilitat per poder-se adherir, fagocitar i alliberar citocines per eliminar els microorganismes. Aquests canvis en la morfologia dels leucòcits son els que reflecteixen les CPD. Un dels principals avantatges és que són uns

paràmetres que es mesuren al mateix temps que es processa l'hemograma i per tant d'una manera ràpida i sense un cost extra es pot fer una valoració d'aquests resultats (127). Estudis previs han proposat l'ús dels CPD com a marcador suggestiu pel diagnòstic precoç de sèpsia (127,128,131). Els resultats han estat similars als nostres, on els marcadors NE-SFL i MO-X son els que han donat els millors resultats (127). L'estudi de Park et al, ha obtingut NE-SFL i NE-WY com a millors resultats (128). En el cas d'altres analitzadors com el de Beckman Coulter, on també s'han estudiat els CPD, el millor marcador pel diagnòstic precoç de sèpsia és el d'amplitud de distribució dels monòcits(129). Crida l'atenció que els estudis realitzats amb l'analitzador Sysmex®, els paràmetres més importants siguin CPD relacionats amb els neutròfils (NE-SFL, NE-WY) i els estudis que utilitzen l'analitzador de Beckman Coulter assenyalin l'amplitud de distribució de monòcit com a millor marcador pel diagnòstic de sèpsia. La diferència, segurament és deguda a la metodologia utilitzada per calcular cada element cel·lular. Sysmex utilitza el sistema de citometria de flux, mentre que Beckmann utilitza la metodologia VCS (volume, conductivity, scattergrama).

L'any 2016, va sortir un estudi on es proporcionaven valors de referència per les CPD segons edat i sexe. L'estudi es va fer amb un Sysmex® XN 2000 i la població era asiàtica. Caldrien doncs, més estudis referits a la població caucàsica per establir uns bons valors de referència i poder afinar més en el diagnòstic (130).

Creiem que també seria necessari una ampliació de l'estudi analitzant les CPD en els casos on hi hagi inflamacions sense sèpsia i monitoritzar les infeccions ja que ens proporcionarien una informació més precisa en el diagnòstic i pronòstic de la sèpsia.

CONCLUSIONS

---



## CONCLUSIONS

1. S'observa un increment en el nombre d'estudis hemoglobines al llarg dels anys estudiats (2004-2018) amb un augment molt pronunciat a partir del 2016.
2. La beta talassèmia és l'hemoglobinopatia més freqüent detectada en el nostre territori representant el 45,17% del total de pacients estudiats amb alguna hemoglobinopatia i el 82,8 % de totes les talassèmies diagnosticades.
3. S'observa un increment en les sol·licituds i confirmacions diagnòstiques d'α talassèmies en els últims 2 anys. Fins l'any 2016, la detecció de l'alfa talassèmia era pràcticament nul·la malgrat formar part d'un territori on l'alfa talassèmia es troba reportada en tota la Mediterrània. La mutació delecional en heterozigosi de 3,7 kb és la més freqüent.
4. L'hemoglobina estructural més detectada és la hemoglobina S heterozigota en un 69,6% de les hemoglobines estructurals i 30,4 % del total d'hemoglobinopaties detectades. Observem que la seva detecció presenta un salt quantitatiu elevat a partir del 2009 i les deteccions es mantenen estables a partir d'aquell any. Creiem que aquest salt pot ser degut a l'increment de la població migrant que es produeix a la província de Girona.
5. La magnitud Ret-He podria ser d'utilitat en el cribratge de casos de talassèmia, un cop descartades les ferropènies, considerant un punt de tall de Ret-He <27,6 pg amb una sensibilitat del 90,4% i especificitat del 90,2%. No és útil pel cribratge de les hemoglobines estructurals.
6. La fracció de plaquetes immadures (IPF, immature platelet factor) es un marcador fiable pel diagnòstic diferencial de les trombopènies i un bon marcador de la recuperació de plaquetes. El millor punt de tall per distingir adequadament els pacients amb púrpura immune trombopènica es 13,55% amb una sensibilitat de 96,2% i una especificitat de 96,1%. Malgrat la seva utilitat com a marcador de regeneració plaquetar, existeixen patologies on s'observen valors alts de l'IPF que no



indica regeneració sinó plaquetes grans amb cert grau de material genètic en el seu interior. És el cas de les síndromes mielodisplàstiques i les macrotrombopènies familiars.

7. L'alarma d'agregats plaquetaris presenta una sensibilitat d' 11,45% i un Valor Predictiu Negatiu del 45,4%, la qual cosa ens obliga a la visualització de frotis de sang perifèrica per a l'observació d'agregats plaquetaris davant una d'una trombopènia independentment de la presència de l'alarma.
8. Els limfòcits d'alta fluorescència (HFLC%) han estat proposats com a marcador de sèpsia. Segons els nostres resultats, l'HFLC% no és un bon marcador de sèpia precoç. En canvi, s'observen diferències significatives en el grup de pacients amb mononucleosi infecciosa, on els valors presentats per HFLC% son superiors a la resta de grups estudiats, amb un cut-off de 0,35% (87% sensibilitat i 84,8% especificitat) Creiem que el valor de l'HFLC està relacionat amb l'activació dels limfòcits. No obstant, l'estudi prospectiu realitzat a partir del nostre cut-off es conclou que és un paràmetre molt poc específic per les infeccions víriques en general.
9. De les Cell Population Data (CPD) estudiades, l'amplitud de dispersió dels neutròfils fluorescents (NE-WY ) és un bon marcador pel diagnòstic precoç de sèpsia amb un punt de tall de 623,50 amb una sensibilitat del 92% i una especificitat del 80%.





## BIBLIOGRAFIA

1. González de Buitrago JM. Técnicas y métodos de laboratorio clínico. Elsevier Masson; 2010.
2. Cobo Martínez F. Hematología : del laboratorio a la práctica clínica. Formación Alcalá; 2010. 21 p.
3. Merino A. Manual de citología de sangre periférica. 1.<sup>a</sup> ed. grupo acción médica; 2005.
4. Capellini MD, Motta I. Anemia in clinical practice. Definition and classification: does hemoglobin change with aging? 2015; 52(4):261-269
5. Steinberg MH. Disorders of hemoglobin : genetics, pathophysiology, and clinical management. Cambridge University Press; 2001. 1268 p.
6. Bain BJ. Haemoglobinopathy Diagnosis: Second Edition. Haemoglobinopathy Diagnosis: Second Edition. Blackwell Publishing Ltd; 2007. 1-314 p.
7. Old J. Prevention and Diagnosis of Haemoglobinopathies: A Short Guide for Health Professionals and Laboratory Scientists 2016. Thalassemia International Federation p.21
8. Piel FB, Weatherall DJ. The  $\alpha$ -Thalassemias. Longo DL, editor. N Engl J Med. 2014;371(20):1908-16.
9. M Phylipsen. Development of new technological applications for post- and prenatal diagnosis of the hemoglobinopathies. 2015.Leiden.
10. SM H. Toward prevention of hemoglobinopathies in Oman. 2015. Leiden
11. Dronamraju KR. Recollections of J.B.S. Haldane, with special reference to Human Genetics in India. Vol. 18, Indian Journal of Human Genetics. 2012. p. 3-8.
12. Duraisingh MT, Lodish HF. Sickle cell MicroRNAs inhibit the malaria parasite. Cell Host and Microbe. Cell Press; 2012.Vol 12 p. 127-8.
13. Akide-Ndunge OB, Ayi K, Arese P. The Haldane malaria hypothesis: Facts, artifacts, and a prophecy.2003 Vol. 8, Redox Report. p. 311-6.
14. Cataldo F. Immigration and changes in the epidemiology of hemoglobin disorders in Italy: An emerging public health burden. Italian Journal of Pediatrics. 2012. (38)1-5.
15. Ruano-Ravina A, Jato-Díaz M, Cerdá-Mota T. [Newborn screening of

- hemoglobinopathies: considerations on its application in Spain]. *Med Clin (Barc)*.2006;126(9):337-40.
16. Haemoglobinopathies on the Move: Is Europe ready? *Health and Migration Policy Perspectives* (2013) | 3 Piel FB et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates.
  17. Dulín Iñiguez E, Cantalejo Lopez M<sup>a</sup> A, Cela de Julián M<sup>a</sup>E . Detección precoz neonatal de anemia falciforme y otras hemoglobinopatías en la comunidad autónoma de Madrid. Estudio piloto. *An Pediatr*. 2003;58(2):146-55.
  18. Mañú Pereira M, Corrons J-LV. Neonatal haemoglobinopathy screening in Spain. *J Clin Pathol*. 2009;62(1):22-5.
  19. Cela de Julián E, Dulín Iñiguez E, Guerrero Soler M, Arranz Leirado M, Galarón García P, Beléndez Bieler C, et al. [Evaluation of systematic neonatal screening for sickle cell diseases in Madrid three years after its introduction]. *An Pediatr (Barc)*. 2007;66(4):382-6.
  20. Luis Marín Secció J, José Vidal M, Gascón P, Botet F, Maria Pérez J, Badell I, et al. Coordinació Redactors Membres de la Xarxa Catalana de Diagnòstic i Seguiment d'Hemoglobinopaties i Talassèmies 2014. (Catglobin).
  21. [www.idescat.cat](http://www.idescat.cat). 2019
  22. Piel FB, Tatem AJ, Huang Z, Gupta S, Williams TN, Weatherall DJ. Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: a quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. *Lancet Glob Heal*. 2014;2(2):e80-9.
  23. Thachil J, Owusu-Ofori S, Bates I. Haematological Diseases in the Tropics. *Manson's Trop Infect Dis*. 2014;894-932.e7.
  24. Traeger-Synodinos J, Harteveld CL, Old JM, Petrou M, Galanello R, Giordano P, et al. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(4):426-37.
  25. Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis: algorithms, lessons and pitfalls. *Blood Rev*. 2011;25(5):205-13.
  26. Giordano PC. Strategies for basic laboratory diagnostics of the hemoglobinopathies

- in multi-ethnic societies: interpretation of results and pitfalls. *Int J Lab Hematol*. 2013;35(5):465-79.
27. Felker GM, Allen LA, Pocock SJ, Shaw LK, McMurray JJ V, Pfeffer MA, et al. Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure: data from the CHARM Program and the Duke Databank. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(1):40-7.
  28. Maruyama S, Hirayama C, Yamamoto S, Koda M, Udagawa A, Kadowaki Y, et al. Red blood cell status in alcoholic and non-alcoholic liver disease. *J Lab Clin Med*. 2001;138(5):332-7.
  29. Kottke-Marchant K, Davis BH, International Society for Laboratory Hematology. *Laboratory hematology practice*. chap 44 56. Wiley-Blackwell/International Society for Laboratory Hematology; 2012. 748 p.
  30. Barbara j. Bain, Imelda Bates, Michael A. Laffan SML. *DACIE AND LEWIS Practical Hematology*. Eleventh. Churchill Livingstone; 2012. 11-22 p.
  31. Mantikou E, Arkesteijn SG, Beckhoven van JM, Kerkhoffs JL, Hartevelde CL, Giordano PC. A brief review on newborn screening methods for hemoglobinopathies and preliminary results selecting beta thalassemia carriers at birth by quantitative estimation of the HbA fraction. Vol. 42, *Clinical Biochemistry*. 2009. p. 1780-5.
  32. Phylipsen M, Hartevelde CL, de Metz M, Gallivan MVE, Arkesteijn SGJ, Luo H-Y, et al. New and known  $\beta$ -thalassemia determinants masked by known and new  $\delta$  gene defects [Hb A(2)-Ramallah or  $\delta 6(A3)Glu \rightarrow Gln$ , GAG>CAG]. *Hemoglobin*. 2010;34(5):445-50.
  33. Lorenzo-Medina M, De-La-Iglesia S, Ropero P, Nogueira-Salgueiro P, Santana-Benitez J. Effects of hemoglobin variants on hemoglobin a1c values measured using a high-performance liquid chromatography method. *J Diabetes Sci Technol*. 2014;8(6):1168-76.
  34. Hartevelde CL. State of the art and new developments in molecular diagnostics for hemoglobinopathies in multiethnic societies. *Int J Lab Hematol*. 2014;36(1):1-12.
  35. Phylipsen M, Chaibunruang A, Vogelaar IP, Balak JRA, Schaap RAC, Ariyurek Y, et al. Fine-tiling array CGH to improve diagnostics for  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia rearrangements. *Hum Mutat*. 2012;33(1):272-80.
  36. Sudmann ÅA, Piehler A, Urdal P. Reticulocyte hemoglobin equivalent to detect

- thalassemia and thalassemic hemoglobin variants. *Int J Lab Hematol*. 2012;34(6):605-13.
37. Brugnara C, Laufer MR, Friedman AJ, Bridges K, Platt O. Reticulocyte hemoglobin content (CHr):early indicator of iron deficiency and response to therapy. *Blood* 1994; 83:3100-3101.
  38. [www.sysmex-europe.com](http://www.sysmex-europe.com). 2019
  39. Garzia M, Di Mario A, Ferraro E, Tazza L, Rossi E, Luciani G, et al. Reticulocyte hemoglobin equivalent: an indicator of reduced iron availability in chronic kidney diseases during erythropoietin therapy. *Lab Hematol*. 2007;13(1):6-11.
  40. Brugnara C, Schiller B, Moran J. Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret He) and assessment of iron-deficient states. *Clin Lab Haematol*. 2006;28(5):303-8.
  41. Merino A. Diagnóstico diferencial de la trombocitopenias. *Educación Continuada Laboratorio Clínico*; 17: 48-61. SEQC 2013-2014
  42. Flores MG. Diagnóstico de citopenias. Algoritmo de estudio. Volumen 21-Extraordinario XXIII Congreso Argentino. Sociedad Argentina de Hematología, 2017 p 250
  43. Sharathkumar, A. A., & Shapiro, A. D. Trastornos de la función plaquetaria. *Tratamiento de la Hemofilia*, 2008; 19, 1-22.
  44. Lozano ML, Navarro-Núñez L, Martínez C, Rivera J. Platelet alterations. Etiopathogenesis, classification, clinical manifestation, diagnostic and therapeutic approach. *Medicine (Baltimore)*. 2008;10(22):1465-74.
  45. Gowland E, Kay HE, Spillman JC, Williamson JR. Agglutination of platelets by a serum factor in the presence of EDTA. *J Clin Pathol*. 1969;22(4):460-4.
  46. Sarasa C, Arruga C DS. Aprendiendo de los errores: fenómeno EDTA. *Semergen*. 2009;35(2):105-7.
  47. Quirós Quirós W. Hallazgo de satelitismo plaquetario alrededor de linfocitos en una neoplasia de células B. *Rev del Lab Clínico*. 2013;6(1):41-4.
  48. van der Linden N, Klinkenberg LJJ, Meex SJR, Beckers EAM, de Wit NCJ, Prinzen L. Immature platelet fraction measured on the Sysmex XN hemocytometer predicts thrombopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. 2014;93(2):150-6.

49. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol.* julio de 2004;126(1):93-9.
50. Yamaoka G, Kubota Y, Nomura T, Inage T, Arai T, Kitanaka A, et al. The immature platelet fraction is a useful marker for predicting the timing of platelet recovery in patients with cancer after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Lab Hematol.* 2010;32(6 Pt 1):e208-16.
51. Ault KA, Rinder HM, Mitchell J, Carmody MB, Vary CPH, Hillman RS. The Significance of Platelets with Increased RNA Content (Reticulated Platelets) *A Measure of the Rate of Thrombopoiesis.* *Am J Clin Pathol.* 1992;98(6):637-46.
52. Rinder HM, Munz UJ, Ault KA, Bonan JL, Smith BR. Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. *Arch Pathol Lab Med.* 1993;117(6):606-10.
53. Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count. Vol. 29, *International Journal of Laboratory Hematology.* 2007. p. 77-91.
54. International Council for Standardization in Haematology Expert Panel on Cytometry, International Society of Laboratory Hematology Task Force on Platelet Counting. Platelet counting by the RBC/platelet ratio method. A reference method. *Am J Clin Pathol.* 2001;115(3):460-4.
55. Imperiali CE, Arbiol-Roca A, Sanchez-Navarro L, Dastis-Arias M, Lopez-Delgado JC, Cortes-Bosch A, et al. Reference interval for immature platelet fraction on sysmex xn haematology analyser in adult population. *Biochem Medica.* 2018;28(1).
56. Fracción de plaquetas inmaduras - Sysmex España. Disponible en: <https://www.sysmex.es/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/immature-platelet-fraction-ipf.html>
57. Enz Hubert RM, Rodrigues MV, Andreguetto BD, Santos TM, de Fátima Pereira Gilberti M, de Castro V, et al. Association of the immature platelet fraction with sepsis diagnosis and severity. *Sci Rep.* 2015;5:8019.
58. Larruzea Ibarra A, Muñoz Marín L, Perea Durán G, Torra Puig M. Evaluation of immature platelet fraction in patients with myelodysplastic syndromes. Association with poor prognosis factors. *Clin Chem Lab Med.* 2019;57(6):e128-30.



59. Saigo K, Takenokuchi M, Imai J, Numata K, Isono S, Zenibayashi M, et al. Usefulness of Immature Platelet Fraction for the Clinical Evaluation of Myelodysplastic Syndromes. *Lab Hematol*. 2009;15(2):13-6.
60. Miyazaki K, Koike Y, Kunishima S, Ishii R, Danbara M, Horie R, et al. Immature platelet fraction measurement is influenced by platelet size and is a useful parameter for discrimination of macrothrombocytopenia. *Hematology*. 2015;20(10):587-92.
61. Miyazaki K, Koike Y, Kunishima S, Ishii R, Danbara M, Horie R, et al. Immature platelet fraction measurement is influenced by platelet size and is a useful parameter for discrimination of macrothrombocytopenia. *Hematology*. 2015;20(10):587-92.
62. Schoorl M, Schoorl M, Oomes J, Van Pelt J. New fluorescent method (PLT-F) on sysmex XN2000 hematology analyzer achieved higher accuracy in low platelet counting. *Am J Clin Pathol*. 2013;140(4):495-9.
63. Dai Q, Zhang G, Lai C, Du Z, Chen L, Chen Q, et al. Two cases of false platelet clumps flagged by the automated hematology analyzer Sysmex XE-2100. *Clin Chim Acta*. 2014;429(20):152-6.
64. Seo JY, Lee ST, Kim SH. Performance evaluation of the new hematology analyzer Sysmex XN-series. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(2):155-64.
65. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801.
66. Serrano MRG, Escartin NL, Arriaza MM and Diax JC. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 2019, 37 (5), 335-340
67. León Gil C, García-Castrillo Riesgo L, Moya Mir M, Artigas Raventós A, Borges Sa M, Candel González FJ, et al. Documento de Consenso (SEMES-SEMICYUC). Recomendaciones del manejo diagnóstico-terapéutico inicial y multidisciplinario de la sepsis grave en los Servicios de Urgencias hospitalarios. *Med Intensiva*. 2007;31(7):375-87.
68. Sinha M, Jupe J, Mack H, Coleman TP, Lawrence SM, Fraley SI. Emerging Technologies for Molecular Diagnosis of Sepsis. *Clinical Microbiology reviews*, 2018; 31(2).
69. Henriquez-Camacho C, Losa J. Biomarkers for sepsis. *Biomed Res Int*.

- 2014;2014:547818.
70. Gül F, Arslantaş MK, Cinel İ, Kumar A. Changing Definitions of Sepsis. *Turkish J Anaesthesiol Reanim.* 2017;45(3):129-38.
  71. Colegio Médico del Perú. ER, Málaga G. *Acta médica peruana.* Vol. 33, *Acta Médica Peruana.* Colegio Médico del Perú; 2016. 217-222 p.
  72. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence.* 2014;5(1):36-44.
  73. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992;20(6):864-74.
  74. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801-10.
  75. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología Médica.* StudentConsult en Español . StudentConsult. 8th ed. Elsevier; 2017. 973 p.
  76. Aduen J. Sepsis . *Fisiopatología ya avances en l tratamiento.* *Acta Méd. Colomb* 2004; p156-163.
  77. Salomão R, Ferreira BL, Salomão MC, Santos SS, Azevedo LCP, Brunialti MKC. Sepsis: evolving concepts and challenges. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol.* 2019;52(4):e8595.
  78. Ortiz Leyba C, Garnacho Montero J. *Conocimientos Actuales En La Fisiopatología De La Sepsis.* *Med Intensiva.* 2005;29(3):135-41.
  79. Bekeris LG, Tworek JA, Walsh MK, Valenstein PN. Trends in blood culture contamination: a College of American Pathologists Q-Tracks study of 356 institutions. *Arch Pathol Lab Med.* 2005;129(10):1222-5.
  80. Julián-Jiménez A, Candel-González FJ, González del Castillo J. Utilidad de los biomarcadores de inflamación e infección en los servicios de urgencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(3):177-90.
  81. León C, Loza A. Biomarcadores en la sepsis. ¿Simplificando lo complejo? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(3):137-9.
  82. Riedel S, Carroll KC. Laboratory Detection of Sepsis. *Clin Lab Med.* 2013;33(3):413-37.

83. Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2013;50(1):23-36.
84. Green JP, Berger T, Garg N, Shapiro NI. Serum Lactate Is a Better Predictor of Short-Term Mortality When Stratified by C-reactive Protein in Adult Emergency Department Patients Hospitalized for a Suspected Infection. *YMEM.* 2010;57:291-5.
85. Dueñas C, Ortíz G, Mendoza R, Montes L. El papel del lactato en cuidado intensivo. *Revista chilena de medicina intensiva*,2016; 31(1), 13-22
86. Chertoff J, Chisum M, Garcia B, Lascano J. Lactate kinetics in sepsis and septic shock: a review of the literature and rationale for further research. 2015; 3(1),39.
87. López Rodríguez A. Alteraciones de la coagulación en la sepsis. *Med Intensiva.*2005;29(3):166-77.
88. Europe GmbH S. SEED Haematology Looking deeper into inflammatory conditions from a laboratory and clinical perspective. 2018. System Educational Enhancement and Development.
89. Arneith BM, Ragaller M, Hommel K, Tiebel O, Menschikowski M, Siegert G. Novel Parameters of Extended Complete Blood Cell Count under Fluorescence Flow Cytometry in Patients with Sepsis. *J Clin Lab Anal.* 2014;28(2):130-5.
90. Tantanate C, Klinbua C. Performance Evaluation of High Fluorescence Lymphocyte Count: Comparability to Atypical Lymphocyte Count and Clinical Significance. *Lab Med.* 2018;49(4):362-8.
91. Fang Y, Himchak E, Richards E, Rand J. Hematopathology 085 Id: 30SA High Fluorescence Lymphocyte Cell Counts are NOT an Early Marker For Sepsis . *Am J Clin Pathol.* 2014; 142(1): A085-A085
92. Urrechaga E, Bóveda O, Aguirre U. Role of leucocytes cell population data in the early detection of sepsis. *J Clin Pathol.* 2018;71(3):259-66.
93. Urrechaga E, Bóveda O, Aguirre U, Garcia, S and Pulido E Neutrophil Cell Population Data biomarkers for Acute Bacterial Infection. *Journal of Pahtology and Infectious Diseases.* 2018; 1(1);1-7.
94. Manual del usuario de XN series. Sysmex . 2010. Kobe. Japan
95. Manual del usuario BIORAD D10. 2005. Unites States, Bio-Rad Laboratories.
96. Manual del usuario BIORAD variant II. 2007. United States.Bio-Rad Laboratories.
97. Manual del usuario COBAS 8000 ( cobas e- 602).2013. Roche diagnòstics.

98. Manual del usuario cobas 502. 2013 Roche diagnòstics.
99. Manual del usuario hemocultivos BACTEC. 2013. Beckton and Dickinson Company
100. Manual del usuario Real Cycler. Cepheid.2018. Maurens-Scopont. France
101. Manual del usuario Liaison. Diasorin . 2006.Deutchland.
102. Manual del usuario Architect. Abott. 2013. Chicago, Illinois, United States.
103. Manual del ususario Quantalyser 160. 2012. Inova Diagnostics. Werfen.
104. Manual del usuario Nova View. 2012. Inova Diagnostics. Werfen
105. Manual del usuari FC500. Beckman Coulter. 2016. United States
106. Merino A. Manual de Citologia de sangre perifèrica y líquidos biológicos. 2019. Editorial Panamericana; Madrid , Spain
107. Swerdlow Sh, Campo E, Harris NL et al . WHO cloassification of Tumors of Hematopoietic and lymphoid Tissues 2017. 4ªEd. France IARC Press,
108. Marull A, Ramirez JM, Bustins A, Morales-Indiano C, Tejerina P, Montesinos M, et al. Epidemiological distribution of hemoglobinopathies in the area of Girona over 10 years. *Int J Lab Hematol.* 2017;39(4):e98-101.
109. Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:13.
110. Thein SL, Menzel S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. *Br J Haematol.* 2009;145(4):455-67.
111. Barbara B. Hemoglobinopathy diagnosis. 2nd ed. Blackwell Publishing Ltd; 2006. 139-189 p.
112. Piel FB, Weatherall DJ. The  $\alpha$ -thalassemias. *N Engl J Med.* 2014;371(20):1908-16.
113. Buttarello M, Pajola R, Novello E, Mezzapelle G, Plebani M. Evaluation of the hypochromic erythrocyte and reticulocyte hemoglobin content provided by the Sysmex XE-5000 analyzer in diagnosis of iron deficiency erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(12):1939-45.
114. Urrechaga E, Boveda O, Aguayo FJ, de la Hera P, Muñoz RI, Gallardo I, et al. Percentage of hypochromic erythrocytes and reticulocyte hemoglobin equivalent predictors of response to intravenous iron in hemodialysis patients. *Int J Lab Hematol.* 2016;38(4):360-5.
115. Kadegasem, P., Songdej, D., Lertthammakiat, S., Chuansumrit, A., Paisooksantivatana, K., Mahaklan, L., and Sirachainan, N. (2019). Reticulocyte

- hemoglobin equivalent in a thalassemia-prevalent area. *Pediatrics International*, 61(3), 240-245.
116. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2004;126(1):93-9.
  117. Dai Q, Zhang G, Lai C, Du Z, Chen L, Chen Q, et al. Two cases of false platelet clumps flagged by the automated hematology analyzer Sysmex XE-2100. *Clin Chim Acta*. 2014;429:152-6.
  118. Serrando M, Marull A, Ruiz M, Perez del Campo D, Puig-Pey I, Muñoz JM, et al. Clinical significance of IPF% measurement in diagnosing thrombocytopenic disorders: distinguishing primary immune thrombocytopenia from other disorders. *Int J Lab Hematol*. 2016;38(3):e65-8.
  119. Kuter DJ. The physiology of platelet production. *Stem Cells*. 1996;14 Suppl 1:88-101.
  120. Pons I, Monteagudo M, Lucchetti G, Muñoz L, Perea G, Colomina I, et al. Correlation between Immature Platelet Fraction and Reticulated Platelets. Usefulness in the aetiology diagnosis of thrombocytopenia. *Eur J Haematol*. 2010;85(2)
  121. Ali, I., Graham, C., & Dempsey-Hibbert, N. C. . Immature platelet fraction as a useful marker in the etiological determination of thrombocytopenia. *Experimental Hematology* 2019, 78, 56-61
  122. Adly AAM, Ragab IA, Ismail EAR, Farahat MM. Evaluation of the immature platelet fraction in the diagnosis and prognosis of childhood immune thrombocytopenia. *Platelets*. 2015;26(7):645-50.
  123. Coll R, Marull A, Sagüés M, Jimenez O, Ramirez M, Serrando M.S .Valor de la fracció de plaquetes immadures (ipf) de l'hemograma com a predictor del risc de sag-nat durant l'embaràs a les gestants amb trombocitopènia". *Agrupació de Ciències Mediques i de la Salut de Girona. XXXIII Jornada de Cloenda* 2016.
  124. Garcia Raja A. Herramientas utiles para decidir sobre las pruebas diagnósticas. *Educ Contin en el Lab*. 2007;10:22-33.
  125. Ko YJ, Hur M, Kim H, Choi SG, Moon HW, Yun YM. Reference interval for immature platelet fraction on Sysmex XN hematology analyzer: A comparison study with Sysmex XE-2100. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53(7).
  126. Sysmex. Counting of highly fluorescent lymphocytes (HFLC) as antibody-producing

plasma cells on XE-5000 Normal Patient Patient with IG Patient with IG and HFL Side Scatter Flourescence Flourescence Flourescence Side Scatter Side Scatter.

127. Urrechaga E, Bóveda O, Aguirre U. Role of leucocytes cell population data in the early detection of sepsis. *J Clin Pathol.* marzo de 2018;71(3):259-66.
128. Park SH, Park C-J, Lee B-R, Nam K-S, Kim M-J, Han M-Y, et al. Sepsis affects most routine and cell population data (CPD) obtained using the Sysmex XN-2000 blood cell analyzer: neutrophil-related CPD NE-SFL and NE-WY provide useful information for detecting sepsis. *Int J Lab Hematol.* 2015;37(2):190-8.
129. Crouser ED, Parrillo JE, Seymour CW, Angus DC, Bicking K, Esguerra VG, et al. Monocyte Distribution Width. *Crit Care Med.* 2019;47(8):1018-25.
130. Park SH, Park C-J, Lee B-R, Kim M-J, Han M-Y, Cho Y-U, et al. Establishment of Age- and Gender-Specific Reference Ranges for 36 Routine and 57 Cell Population Data Items in a New Automated Blood Cell Analyzer, Sysmex XN-2000. *Ann Lab Med.* 2016;36(3):244.
131. Urrechaga, E., Bóveda, O., & Aguirre, U. (2019). Improvement in detecting sepsis using leukocyte cell population data (CPD). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 57(6), 918-926.