

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE  
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE  
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

Cryslayne Clara Espínola Diniz

**A AUTOMAÇÃO NO HEMOGRAMA E SUA EVOLUÇÃO**

CUITÉ

2015

Cryslayne Clara Espínola Diniz

## **A AUTOMAÇÃO NO HEMOGRAMA E SUA EVOLUÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité, como requisito obrigatório para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Carlos Marcio Moura Ponce de Leon

CUITÉ

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE  
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

D585a      Diniz, Cryslyne Clara Espínola.

A automação no hemograma e sua evolução. /  
Cryslyne Clara Espínola Diniz. – Cuité: CES, 2015.

85 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro  
de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientador: Carlos Marcio Moura Ponce de Leon.

1. Hemograma. 2. Hemograma - automação. 3. Sysmex. I.  
Título.

CDU 616.15

Cryslayne Clara Espínola Diniz

## **A AUTOMAÇÃO NO HEMOGRAMA E SUA EVOLUÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité, como requisito obrigatório para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 24/02/2015

Banca Examinadora

---

Carlos Marcio Moura Ponce de Leon (Orientador) - UFCG

---

Wylly Araújo de Oliveira - UFCG

(2º MEMBRO)

---

Fillipe de Oliveira Pereira - UFCG

(3º MEMBRO)

Cuité

2015

*Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio, confiança, incentivo e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

Nesta etapa vitoriosa da minha vida, em que a emoção dos momentos saudosistas se confunde com a grandeza da missão cumprida, gostaria de agradecer as pessoas que sempre acreditaram no meu potencial e me fizeram acreditar que era possível. Agradeço primeiramente a Deus, meu eterno protetor, que me sustentou e cuidou até os últimos momentos desta jornada que será apenas o início de uma longa caminhada.

Aos meus pais, Krhstiane Espínola e Chirland Diniz, fonte inesgotável de amor e dedicação, que nunca mediram esforços na concretização dessa conquista, e também por acreditar que eu poderia chegar mais longe, apostando sempre na minha capacidade. Dedico a vocês, tudo o que há de melhor em mim, vocês são o meu maior orgulho!

Ao meu noivo, Pedro Filype, agradeço pelo companheirismo, pelo crescimento juntos, por sempre me incentivar e ser meu ombro amigo mesmo nas horas mais difíceis, dando-me força nas dificuldades e compartilhando comigo minhas alegrias. E demais familiares, agradeço por acreditar e confiar em mim.

Aos meus amigos e colegas de curso, Jéssika Ventura, Aninha, Karoll, Roselle e Natânia, agradeço pelas minhas melhores risadas e pelos lindos momentos vividos durante o curso que ficarão eternizados em minha memória.

Ao melhor orientador, Prof. Carlos Marcio Moura Ponce de Leon, que sempre esteve presente, agradeço pela sabedoria, pelos sábios conselhos, dedicação, paciência e acima de tudo por todos os ensinamentos antes e durante a elaboração do TCC. O senhor é o exemplo de um grande mestre ao qual me espelho para seguir na minha carreira profissional.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

*Charles Chaplin*

## RESUMO

O hemograma é utilizado para auxiliar o diagnóstico e a monitorização das diversas doenças e também avalia o aspecto quantitativo e qualitativo morfológico das células sanguíneas. Para a execução do hemograma existem diversos tipos de contadores automáticos que diferem entre si no sistema de contagem celular e na capacidade de avaliar os diferentes tipos de parâmetros hematológicos. Foi realizada uma revisão bibliográfica com o objetivo de verificar os impactos gerados pela automação na hematologia e também observar e comparar as similaridades e diferenças entre as metodologias empregadas nas máquinas. Os contadores analisados apresentaram como principais metodologias a impedância, citometria de fluxo e espectrofotometria para análise da morfologia celular. Como contadores de referência foram escolhidos cinco, Beckman Coulter, Sysmex (modelos XE 2100, XE 2110), Abbott (modelo Cell Dyn Sapphire), ABX (modelo Pentra DX 120) e Bayer (modelo Advia 120). Para estes foi feito um comparativo entre as suas metodologias e parâmetros avaliados correspondentes a três linhagens celulares eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A automação é essencial nos laboratórios de hematologia, os contadores automáticos estão cada vez mais evoluídos tecnologicamente, a automação permite a liberação de resultados mais precisos e exatos em um intervalo de tempo menor, trazendo confiança e credibilidade para o profissional que utiliza deste serviço.

Palavras-chave: Hemograma, automação no hemograma, parâmetros avaliados, Beckman Coulter, Sysmex, Abbott, ABX, Bayer.



## ABSTRACT

The hemogram is used to support the diagnosis and monitoring of various diseases and also evaluates the morphological quantitative and qualitative aspect of blood cells. For the hemogram implementation there are several types of automatic counters that differ in cell counting system and the ability to evaluate the different types of hematological parameters. A literature review in order to verify the impacts generated by automation in the hematology and also observe and compare the similarities and differences between the methodologies used in the machines was carried out. The analysis showed as major counter methodologies impedance spectroscopy and flow cytometry for analysis of cell morphology. As reference counters were chosen five, Beckman Coulter, Sysmex (XE 2100 models, XE 2110), Abbott (Cell Dyn Sapphire model), ABX (Pentra DX 120 model) and Bayer (Advia 120 model). For these was made a comparison between the methodologies and corresponding parameters evaluated three cell lines red blood cells, leukocytes and platelets. Automation is essential in hematology laboratories, are increasingly technologically advanced and allows the release of more precise and accurate results in a shorter time interval, bringing confidence and credibility to professionals who use this service.

Keywords: blood count, automation in blood count, evaluated parameters, Beckman Coulter, Sysmex, Abbott, ABX, Bayer.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Formação celular pelo sistema hematopoiético.....	22
Figura 2- Hemácia em forma de disco bicôncavo.....	23
Figura 3- Morfologia do eritrócito no microscópio óptico.....	23
Figura 4- Leucócitos células de defesa.....	30
Figura 5: Neutrófilo.....	31
Figura 6: Eosinófilo.....	32
Figura 7: Basófilo.....	32
Figura 8: Monócito.....	33
Figura 9: Linfócito.....	34
Figura 10: Análise das plaquetas por microscopia óptica.....	37
Figura 11- Figura: (A) Veias anticubitais utilizadas na coleta de sangue, (B) punção venosa utilizando a seringa e agulha, (C) punção venosa a vácuo.....	39
Figura 12: Câmara de Neubauer.....	40
Figura 13: Câmara de Neubauer com lamínula.....	40
Figura 14: quadrantes da Câmara de Neubauer.....	41
Figura 15: quadrados de contagem da Câmara de Neubauer.....	41
Figura 16: Esfregaço sanguíneo em lâmina.....	43
Figura 17: Procedimento de coloração para esfregaços sanguíneos.....	44
Figura 18: Contagem de leucócitos no esfregaço.....	50
Figura 19: Contador diferencial de leucócitos.....	50
Figura 20: Metodologia de impedância .....	53
Figura 21: Espectrofotometria.....	54
Figura 22: Citometria de fluxo.....	55
Figura 23: Citometria de fluxo com fluorescência.....	56

Figura 24: Sistema de foco hidrodinâmico Sysmex XE 2100.....	57
Figura 25: Histograma de reticulócitos.....	59
Figura 26: Histograma de linfócitos.....	60
Figura 27: Contagem de eritrócitos e plaquetas por angulação.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela I: Parâmetros e metodologias de eritrograma para hemoglobina, hematócrito e hemácia por diferentes equipamentos automatizados hematológicos.....	63
Tabela II: Parâmetros e metodologias de eritrograma para índices hematimétricos por diferentes equipamentos automatizados hematológicos.....	65
Tabela III: Parâmetros e metodologias de leucograma por diferentes equipamentos automatizados hematológicos.....	67
Tabela IV: Parâmetros e metodologias das plaquetas, volume plaquetário médio e amplitude de distribuição das plaquetas feita pelos equipamentos automatizados hematológicos.....	70

## LISTA DE ABREVIACÕES

AMEO: Associao da Medula sea

BFU E-Meg: Unidades formadoras de eritrócitos e megacariócitos

CGV: Contagem de Glóbulos Vermelhos

CH: conteúdo de hemoglobina

CHCM: Concentrao de hemoglobina corpuscular média

DeCS: Descritores em Ciências da Saúde

DC: Sistema corrente direta

DHSS (double hydrodynamic sequential system): Sistema Sequencial Hidrodinâmico Duplo

E: Eritrócito

EDTA: cido etilenodiamino tetra-acético

fL: Fentolitros

HB: Hemoglobina

HiCN: Cianometahemoglobina

HbS: Hemoglobina S

HT: Hematócrito

HM: Hemácia

G: Granulócitos

G6DP: Glucose-6-fosfato-desidrogenase

ISLH (International Society for Laboratory Hematology): Sociedade Internacional de Laboratório de Hematologia

LLA: Leucemia Linfóide Aguda

LLC: Leucemia Linfóide Crnica

LMA: Leucemia Mielóide Aguda

LMC: Leucemia Mielóide Crnica

M: Monócito

MAPSS: Multi Angle Polarized Scatter Separation.

MPV (Mean Platelet Volume) :Volume plaquetário médio

NADPH: fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NRBCs: células nucleadas de sangue vermelho

Ph: Philadelphia

PK: piruvato quinase

PLT: plaquetas

PDW (packed cell distribution width): amplitude de distribuição volumétrica das plaquetas

RFID (Radio Frequency Identification): Identificação por radiofrequência

RDW-CV (Red Cell Distribution Width): Amplitude de distribuição dos eritrócitos  
coeficiente de variação

SDS: dodecil sulfato de sódio

SLS: lauril sulfato de sódio

VCS: Volume, Condutividade, Scatter

VCM: Volume Corpuscular Médio

VPM: Volume Plaquetário Médio

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>19</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>20</b>
<b>4. HEMATOPOESE.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Células sanguíneas .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.1 Eritrócitos.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Alterações da morfologia eritrocitária.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2.1 Alterações no tamanho dos eritrócitos .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2.2 Alteração do conteúdo da hemoglobina .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2.3 Alterações na forma dos eritrócitos .....</b>	<b>25</b>
<b>4.3 Distúrbios eritrocitários .....</b>	<b>26</b>
<b>4.3.1 Anemias .....</b>	<b>26</b>
<b>4.3.2 Defeito de proteínas de membranas.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.3 Hemoglobinopatias .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3.4 Eritroenzimopatias: defeito metabólico.....</b>	<b>29</b>
<b>4.4 Leucócitos .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4.1 Neutrófilos.....</b>	<b>30</b>
<b>4.4.2 Eosinófilos .....</b>	<b>31</b>
<b>4.4.3 Basófilos.....</b>	<b>32</b>
<b>4.4.4 Monócitos .....</b>	<b>33</b>
<b>4.4.5 Linfócitos.....</b>	<b>33</b>
<b>4.5 Distúrbios Leucocitários.....</b>	<b>34</b>
<b>4.6 Plaquetas.....</b>	<b>36</b>
<b>4.6.1 Anormalidades morfológicas das plaquetas: .....</b>	<b>37</b>

<b>5</b>	<b>HEMOGRAMA.....</b>	<b>38</b>
5.1	Coleta de sangue.....	38
5.1.2	Hemólise .....	40
5.2	Hemocitômetro.....	40
5.3	Esfregaço sanguíneo em lâmina.....	42
5.3.1	Método da cunha .....	42
5.4	Coloração do Esfregaço.....	43
5.4.1	Método original de Romanowsky.....	43
<b>6</b>	<b>ERITROGRAMA: CONTAGEM DE ERITRÓCITOS .....</b>	<b>44</b>
6.1	Contagem manual em hemocitômetro .....	44
6.2	Contagem de eritrócitos automatizada .....	44
6.3	Hemoglobina.....	45
6.3.1	Dosagem de hemoglobina manual .....	45
6.4	Hematócrito .....	46
6.4.1	Microhematócrito .....	46
6.4.2	MACROHEMATÓCRITO (MÉTODO DE WINTROBE) .....	46
6.4.3	Hematócrito nos contadores automáticos.....	46
6.5	Índices hematimétricos.....	47
6.5.1	Volume Corpuscular Médio (VCM) .....	47
6.5.2	Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) .....	48
6.5.3	Concentração Média de Hemoglobina Corpuscular .....	48
6.5.4	RDW-CV .....	48
<b>7</b>	<b>LEUCOGRAMA .....</b>	<b>49</b>
7.1	Contagem total de leucócitos, técnica manual.....	49
7.1.1	Contagem diferencial de leucócitos, técnica manual.....	49
7.1.2	Contagem de leucócitos automatizada .....	50
<b>8</b>	<b>PLAQUETOGRAMA: CONTAGEM DAS PLAQUETAS .....</b>	<b>51</b>
8.1	Índices Plaquetários .....	51



<b>9 METODOLOGIAS NOS CONTADORES HEMATOLÓGICOS AUTOMATIZADOS</b>	
<b>52</b>	
<b>9.1 Impedância .....</b>	<b>52</b>
<b>9.2 Espectrofotometria .....</b>	<b>53</b>
<b>9.3 Citometria de Fluxo .....</b>	<b>54</b>
<b>9.4 Radiofrequência .....</b>	<b>55</b>
<b>10 MODELOS DE CONTADORES AUTOMATIZADOS.....</b>	<b>56</b>
<b>11 ALARMES SINALIZADOS PELOS CONTADORES AUTOMÁTICOS.....</b>	<b>62</b>
<b>12. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>12.1 Análise do eritrograma.....</b>	<b>63</b>
<b>12.2 Análise do leucograma.....</b>	<b>66</b>
<b>12.3 Análise do plaquetograma.....</b>	<b>70</b>
<b>13. CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>82</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O hemograma é o exame que avalia quantitativa e qualitativamente os elementos celulares do sangue. É o exame complementar mais requerido nas consultas, fazendo parte de todas as revisões de saúde e auxiliando os médicos no diagnóstico das doenças (FAILACE, et al.; 2009).

O hemograma é indicado para avaliação de anemias, reações infecciosas e inflamatórias, neoplasias malignas, acompanhamento de terapias medicamentosas e avaliação de distúrbios plaquetários. Fornecendo dados para classificação de anemias, de acordo com alterações na forma, tamanho, cor e estrutura das hemácias. Pois entende-se que um organismo com as contagens normais é capaz de produzir e destruir as células do sangue em perfeito equilíbrio, mantendo a quantidade e a qualidade das células em circulação. Entretanto, vários fatores podem interferir nesse equilíbrio, diminuindo a produção ou aumentando a destruição de eritrócitos, causando anemias (PEDROSA, 2013/2014).

Os dados fornecidos pelo hemograma são essenciais dentro da investigação das doenças hematológicas. Os contadores automatizados constantemente têm incorporado novas tecnologias que permitem uma análise mais detalhada das células (GROTTO, 2009).

No final dos anos 50 e início dos anos 60 surgiram no mercado os primeiros contadores de células semiautomáticos e a partir de então os avanços na engenharia eletrônica permitiram uma crescente automatização do processo (GROTTO, 2009). Observou-se uma grande evolução tecnológica na realização do hemograma, e as técnicas manuais têm sido substituídas por sistemas automatizados que apresentam maior precisão nos resultados e em um menor intervalo de tempo (GROTTO, 2009). Os métodos manuais, entretanto, despendem muito tempo e dependem da experiência do operador e seu uso é economicamente justificável para um pequeno número de amostras (SILVA et al., 2007).

Atualmente, há um aumento do uso de analisadores hematológicos automáticos introduzindo uma variedade de novas tecnologias com interesse em se reduzir o trabalho manual e aumentar a exatidão da contagem. Os contadores de células sanguíneas modernos apresentam alto nível de precisão, mas a variação entre os instrumentos deve ser considerada (LEWIS; ROWAN; KUBOTA, 1990).

Sem a habilidade e a velocidade dos modernos contadores automatizados em hematologia, os laboratórios clínicos seriam incapazes de analisar eficientemente o grande volume de amostras que receberiam diariamente. Os instrumentos automatizados oferecem alta sensibilidade e precisão na quantificação das células sanguíneas, bem como na contagem diferencial de leucócitos (FAILACE, 2004).

No entanto, algumas amostras sanguíneas analisadas pelos contadores automatizados, requerem a observação por meio de distensão sanguínea e microscopia, para permitir a análise visual de anormalidades morfológicas, dentre outras alterações (VELOSO et al., 2011). Apesar de a tecnologia eletrônica propiciar resultados confiáveis e análises de alta qualidade, tais aparelhos não são capazes de identificar algumas alterações hematológicas, que podem ser clinicamente significantes ou biologicamente relevantes (FAILACE, 2004).

Desta forma, essas inovações mudaram a rotina dos laboratórios, tornando-os mais eficientes e ágeis, além de apresentarem uma melhor qualidade nos resultados (GROTTO, 2009). Além disso, a avaliação dos equipamentos hematológicos se torna importante porque estes são capazes de fazer uma análise total e diferencial das células sanguíneas (leucócitos) e também possuem a capacidade de contar um número maior de células quando comparado com as contagens manuais (GROTTO, 2009; VELOSO, 2011). Entretanto as técnicas de contagem de células ainda precisam ser organizadas, pois estudos mostram variabilidade entre um aparelho e outro no que diz respeito aos critérios de liberação automática dos hemogramas (FAILACE, R.; PRANKE, P., 2009).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Realizar uma revisão bibliográfica para verificar os impactos gerados pela automação na hematologia clínica.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Observar e comparar as similaridades e diferenças entre as metodologias empregadas nestas máquinas.

### **3. METODOLOGIA**

Foi realizada uma revisão de literatura nacional e internacional utilizando livros, periódicos e artigos científicos de bancos de dados como Scielo, PubMed e outras literaturas relacionadas. O critério de escolha dos artigos será baseado naqueles publicados nos últimos 10 anos, abrangendo de forma clara e objetiva a evolução e a automação dos exames hematológicos.

#### 4. HEMATOPOESE

A hematopoese é o processo da formação das células sanguíneas. O controle da proliferação, diferenciação e maturação destas células é feito através de uma interação molecular das células com o microambiente da medula óssea (SARCHS, 1995). Esta produção de células é realizada na medula óssea, a qual é composta por células tronco hematopoéticas, precursoras, células sanguíneas morfofuncionalmente maduras (NAKAGE; SANTANA, 2006).

A hematopoese é realizada na medula óssea de ossos chatos gerando eritrócitos e leucócitos. Apresentando uma produção celular em torno de  $10^{12}$  de células sanguíneas/dia/Kg, em adultos (BAIN, 2007).

As células que estão na corrente sanguínea têm como características principais a incapacidade de se dividir, as funções definidas e o tempo de vida média preestabelecido. Os eritrócitos (glóbulos vermelhos) permanecem na circulação por cerca de 110 a 120 dias; as plaquetas, por oito dias; os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) permanecem por 8 a 10 horas; os monócitos por cerca de 16 a 18 horas; e os linfócitos dependendo do tipo e da função, podem circular por dias meses ou anos (OLIVEIRA, 2007).

Após o nascimento, o tecido hematopoético é dividido em dois tipos: o linfático que é responsável pela produção dos linfócitos e o mielóide, onde se originam a série vermelha do sangue, ou seja as hemácias, a série branca que compreende os leucócitos, e por fim as plaquetas, que são fragmentos do megacariócito. Desta forma, as células tronco vão produzir células que vão começar a se diferenciar e seguir suas linhagens (CARVALHO, 1994).

As células tronco pluripotentes, além da capacidade para se diferenciar em qualquer linhagem, seja ela linfóide ou mielóide, fazem uma prévia auto-renovação (duplicação). As células progenitoras são aquelas que possuem capacidade de se proliferar (mitose) e já são diferenciadas em mielóide ou linfóide. De acordo com a figura 1, as células tronco mielóide possuem a capacidade de gerar, eritrócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos e monócitos. Enquanto que as células tronco linfóides possuem a capacidade de se diferenciar e dar origem aos linfócitos T, B ou NK (OLIVEIRA, 2007).

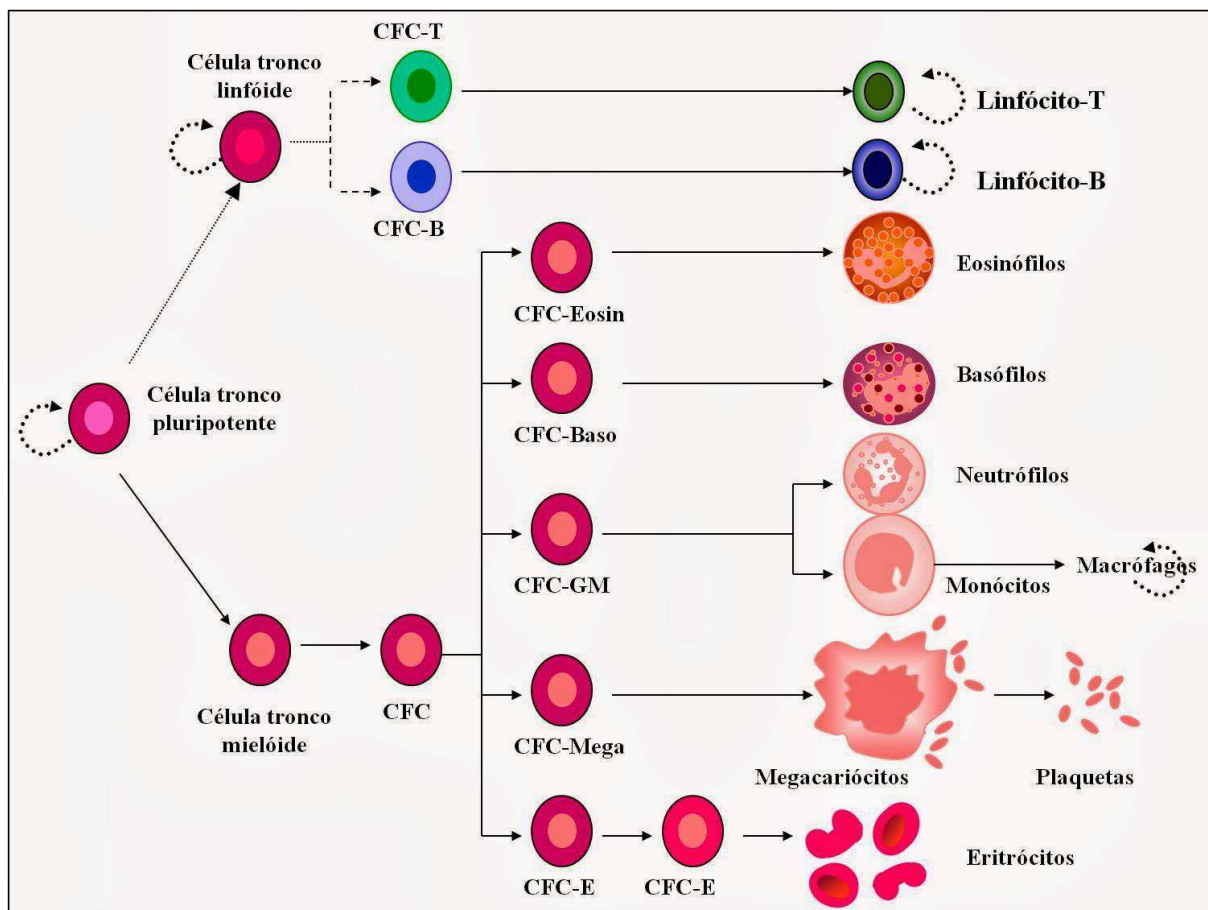


Figura 1: Formação celular pelo sistema hematopoiético.

Fonte: <[http://biologiaaocotidiano.blogspot.com.br/2013\\_10\\_01\\_archive.html](http://biologiaaocotidiano.blogspot.com.br/2013_10_01_archive.html)> Acesso em 19/11/14.

#### 4.1 Células sanguíneas

##### 4.1.1 Eritrócitos

As células sanguíneas vermelhas são as mais abundantes no corpo. As hemácias são células bastante complexas, apesar de serem células anucleadas, constituídas por uma membrana plasmática e citoplasma, desempenham funções vitais no organismo. Originam-se pela medula óssea, sendo formadas a partir das células tronco pluripotentes que por meio da diferenciação e maturação celular dos eritroblastos, originam os eritrócitos (ZAGO, 2001).

Os eritrócitos são unidades morfológicas da série vermelha do sangue, também designados hemácias. A grande maioria dos eritrócitos ou hemácias, quando não agrupados, tem a forma de disco bicôncavo como pode ser observado na figura 2, variando de 6 a 8 µm em diâmetro. Apresentando um contorno circular e possui pequenas variações quanto a forma e tamanho (figura 3) (BAIN, 2006).



Figura 2: Hemácia em forma de disco bicôncavo

Fonte: BAIN, B.J., 2006

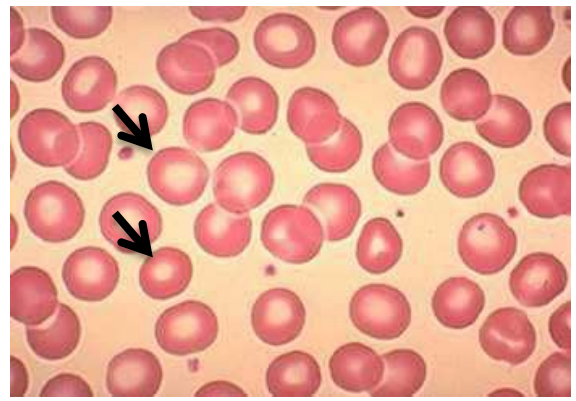


Figura 3: Morfologia do eritrócito na lâmina de microscopia

Fonte: BAIN, B.J., 2006

A forma e a flexibilidade dos eritrócitos vai depender da integridade do citoesqueleto ao qual está ligado a membrana lipídica. O aparecimento de forma anômalas de eritrócitos está relacionado a algum defeito no citoesqueleto ou na membrana (BAIN, 2006).

#### 4.2 Alterações da morfologia eritrocitária

##### 4.2.1 Alterações no tamanho dos eritrócitos

###### Anisocitose

Ocorre quando na análise do esfregaço sanguíneo se observam um aumento da variação no tamanho dos eritrócitos que excede a observada nos indivíduos normais e sadios (BAIN, 2007). Nas contagens fornecidas por equipamentos automáticos, a identificação da anisocitose, geralmente vem acompanhado de um aumento do RDW. A anisocitose é uma característica da maioria das anemias. (HOFFMANN et al.; 2007).

###### Normocitose

É um termo que se usa quando o VCM se apresenta dentro dos padrões de normalidade. É, portanto de se esperar que a análise morfológica do esfregaço sanguínea se apresente com eritrócitos de tamanhos normais (HOFFMANN et al.; 2007).

###### Microcitose

Ocorre quando os eritrócitos estão com diâmetro diminuído. Eritrócitos microcíticos são encontrados no esfregaço sanguíneo quando o diâmetro é inferior a 7 a 7,2  $\mu\text{m}$ . Quando o



número de micrócitos é representativo no sangue, ocorre a diminuição do VCM e consequentemente a microcitose. Em geral, a microcitose está presente na deficiência de ferro (MOREIRA, 2005).

### Macrocitose

Ocorre quando se observa que houve um aumento do tamanho dos eritrócitos. Na análise do esfregaço sanguíneo é observada uma alteração do diâmetro celular, nas análises automatizadas a macrocitose vem acompanhada de um aumento do VCM. Uma das causas mais comuns de macrocitose se devem aos níveis diminuídos da vitamina B12 e de ácido fólico (NASCIMENTO, 2004).

#### 4.2.2 Alteração do conteúdo da hemoglobina

### Hipocromia

É a redução da coloração do eritrócito. A diminuição da síntese de hemoglobina pode estar presente talassemia. Esta diminuição pode estar relacionada com uma redução do CHCM que ocorre após a análise em um equipamento automatizado. O CHCM é um quociente de (massa de hemoglobina média / volume médio) (FAILACE, 2009). Os eritrócitos de crianças saudáveis são frequentemente hipocrômicos, quando comparado com os adultos. Pelo fato da intensidade da coloração dos eritrócitos ser determinada não só pela concentração de hemoglobina mas também pela espessura da célula, a hipocromia também pode ser notada em células que sejam mais delgadas do que as normais, mesmo com concentração e hemoglobina normais (BAIN, 2007).

### Hipercromia

Ocorre quando as células se coram com uma intensidade maior que a normal (OLIVEIRA, 2007). Os eritrócitos coram-se mais intensamente do que os eritrócitos normais, o CHCM pode estar aumentada, indicando que a hipercromia relaciona-se não apenas com a alteração da forma da célula, mas também com o aumento da concentração de hemoglobina (BAIN, 2006).

### Policromasia/ policromatofilia

Ocorre quando o eritrócito possui coloração róseo-azulada, ou seja, este tem afinidade tanto pelos corantes ácidos como a eosina quanto pelos corantes básicos, em consequência da capacitação simultânea de eosina (pela hemoglobina) e de corantes básicos (pelo RNA ribossômico), comum nas anemias hemolíticas (FAILACE, 2004).

#### 4.2.3 Alterações na forma dos eritrócitos

### Poiquilocitose/ pecilocitose

De acordo com Pereira et al 2008, a poiquilocitose é uma alteração na forma da hemácia, ou seja na análise do esfregaço sanguíneo há presença de hemácias com diferentes formas. A pecilocitose também é uma anormalidade encontrada em vários distúrbios hematológicos, que podem causar a produção de eritrócitos anormais pela medula óssea (GONZALEZ; SILVA, 2008). Quando a pecilocitose é extrema, as possibilidades diagnósticas incluem anemias megaloblásticas, entre outros. É importante não confundir deformações nos eritrócitos com pecilocitose. A presença de crioglobulinas pode causar deformação nos eritrócitos, porém a crioglobulina é bastante basófila e não é notada com tanta facilidade, a presença de eritrócitos estranhamente identados fornece uma pista (BAIN, 2007). Dentre as alterações, as que merecem destaque são:

- Esferócito: São eritrócitos com a forma esférica, geralmente apresentam-se circulares e bastante corados devido ao aumento do conteúdo de hemoglobina. Podendo estar presentes nas anemias hemolíticas com os corpos de Heinz.
- Eliptócitos: são eritrócitos alongados. Um número maior de eliptócitos pode ser visto na deficiência de ferro, em alguns pacientes com talassemia, na anemia megaloblástica, na mielofibrose, em síndromes mielodisplásicas.
- Esquisócitos: são eritrócitos deformados e que adquirem morfologia fora dos padrões normais de classificação. As causas mais comuns de formação dos esquisócitos são as anemias hemolíticas microangiopática e mecânica.
- Dacriócitos: são eritrócitos na forma de gota (lágrima). Ocorrem nas mieloproliferações, principalmente na mielofibrose com metaplasia mielóide, talassemias e anemias megaloblásticas.

- Megalócitos: são eritrócitos com formas gigantes e geralmente são policromáticos.

### 4.3 Distúrbios eritrocitários

#### 4.3.1 Anemias

Anemia é definida como uma redução dos níveis de hemoglobina no sangue. Considera-se a presença de anemia se a concentração de hemoglobina ou o hematócrito estiverem abaixo de 95% do intervalo de referência para a idade, sexo e localização geográfica do indivíduo (HENRY, 2008).

A molécula de hemoglobina é o pigmento dos glóbulos vermelhos (eritrócitos) e tem a função vital de transportar o oxigênio dos pulmões aos tecidos. A hemoglobina consiste de dois pares de cadeias polipeptídicas (globina) e quatro grupos heme prostéticos, cada um contendo um átomo de ferro ferroso. A síntese da hemoglobina começa nos precursores eritróides, o átomo de ferro é incorporado a protoporfirina eritrocitária na mitocôndria das células para formação da heme. A síntese da globina ocorre no citoplasma de eritroblastos e reticulócitos (TAVARES; OLIVEIRA, 2009).

As anemias são provocadas por vários fatores e são classificadas segundo dois critérios – morfológico e cinético ou fisiopatológico. Segundo o critério morfológico elas são classificadas em (LORENZI, 2003):

- Macrocíticas: Caracterizadas pela presença de hemácias de grande volume e geralmente hiperocrômicas. Algumas dessas anemias podem ser megaloblásticas.
- Microcíticas: Têm predomínio de hemácias de pequeno volume e pobres em hemoglobina ou hipocrômicas. Incluem-se aqui as anemias ferroprivas.
- Normocíticas: São geralmente normocrômicas. Estão incluídas neste grupo as anemias hemolíticas e as aplasias medulares ou anemias aplásticas.

Os índices hematimétricos, associados às características dos eritrócitos são indicadores importantes da natureza da anemia e permitem sua classificação em microcítica / normocítica / macrocítica (VCM) e hipocrômicas / normocrômicas (HCM).

As anemias hipocrômicas e microcíticas são causadas pela diminuição de hemoglobina no interior do eritrócito, o que torna a hemácia hipocrômica. Na maioria dos casos, essa

diminuição da síntese de hemoglobina é causada pela deficiência de ferro, que por sua vez é a anemia mais comum de ocorrer (GOMES, 2007).

Atualmente, o diagnóstico das anemias é feito através dos parâmetros avaliados no hemograma (eritrograma). Apesar de sua grande utilidade, estes testes são frequentemente onerosos e demandam tempo quando realizados por metodologias manuais (ALFADHLI et al., 2007).

No eritrograma, um grande auxiliar na diferenciação das anemias microcíticas e hipocrômicas é o índice de anisocitose eritrocitária (ADE), diferenciando aquelas anemias com uma população homogênea de eritrócitos, entre elas a talassemia menor e anemia de doença crônica, daquelas que apresentam uma população heterogênea (anemia ferropriva) (MATOS et al., 2008). Além disso, a análise da lâmina ao microscópio também auxilia nessa diferenciação, pois a avaliação da morfologia eritrocitária revela alguns poiquilócitos comuns a cada uma das anemias microcíticas e hipocrômicas, principalmente no que tange à anemia ferropriva e talassemias. E, ainda, a análise microscópica ajuda a confirmar a hipocromia indicada pelo aparelho (NASCIMENTO, 2005).

#### 4.3.2 Defeito de proteínas de membranas

##### *Esferocitose hereditária*

A esferocitose é herdada como um traço autossômico. Ocorre devido a perda de membrana de superfície causada por defeitos de genes relacionados com a produção de proteínas que se interligam em sentido vertical, tendo como apoio as espectrinas para a sustentação da bicamada lipídica da membrana (FERRAZ et al., 2011). Dessa forma, os eritrócitos não conseguem passar pela vasculatura esplênica, como consequência ocorre uma captura dos eritrócitos e um aumento compensatório da produção de hemácias (SACHS, 1995).

##### *Eliptocitose hereditária*

A eliptocitose hereditária resulta em uma variedade genética que altera a integridade do citoesqueleto dos eritrócitos, resultando em eritrócitos elípticos (PIMENTA, 2011). O aparecimento desses eritrócitos elípticos são o resultado de mutações em regiões do gene da

espectrina que são responsáveis pela ligação da espectrina com a proteína do complexo do citoesqueleto dos eritrócitos. Dessa forma, essas mutações fazem com que os eritrócitos percam a capacidade natural que os eritrócitos possuem de se alongarem e voltarem a forma original quando passa pelos microcapilares (OLIVEIRA, 2007).

#### 4.3.3 Hemoglobinopatias

##### *Talassemias*

As talassemias são anemias hereditárias causadas por uma deficiência parcial ou completa da síntese de cadeias globínicas e constituem os distúrbios genéticos mais comuns, causando um grande problema de saúde pública (BARBOSA; CUNHA; BARBOSA, 2007).

A produção das cadeias de globina  $\beta$  é controlada por dois genes. Assim, a mutação em apenas um dos genes causa o traço talassêmico. Na talassemia  $\beta$  menor, observa-se contagem normal ou aumentada de glóbulos vermelhos, ADE menor que 18%, redução discreta da hemoglobina A e aumento da hemoglobina  $A_2$ . A presença de resistência globular aumentada é exame diagnóstico auxiliar. Entretanto, em alguns casos, apenas a análise molecular do DNA pode fornecer o diagnóstico definitivo (TEFFERI, 2003; FIGUEIREDO; VICARI, 2006).

##### *Anemia Falciforme*

A anemia falciforme é caracterizada como uma hemoglobinopatia hereditária autossômica, caracterizada pela presença de Hemoglobina S (HbS). É o resultado de mutação única na posição 6, com substituição do ácido glutâmico por uma valina na cadeia  $\beta$ -globínica. Os eritrócitos com alta concentração de HbS, na presença de condições com baixa tensão de oxigênio ou alterações do pH, apresentam a cristalização da hemoglobina, levando a formação de hemácias em foice (CARVALHO et al., 2006).

Nas anemias falciformes, o esfregaço sanguíneo é caracterizado pela presença de anisocitose, eritrócitos falciformes (drepanócitos), pontilhado basófilo, ocasionais células irregularmente contraídas. A contagem de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas costumam ser elevadas, monócitos e neutrófilos podem conter eritrócitos fagocitados (BAIN, 2006).

#### 4.3.4 Eritroenzimopatias: defeito metabólico

##### *Deficiência de G6PD glicose*

A glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) é a primeira enzima do ciclo das pentoses, possuindo a função de produzir o fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), este é indispensável para manter as proteínas dos eritrócitos em estado reduzido, principalmente a hemoglobina. Com a deficiência de G6PD os eritrócitos ficam mais vulneráveis a grandes agressões oxidativas, como exemplo, em pacientes com estado infeccioso que fez uso de alimentos ricos em nitritos. Em consequência disso, haverá a formação de derivados de oxidação da hemoglobina, levando a destruição precoce dos eritrócitos pelos macrófagos (OLIVEIRA, 2007; BAIN, 2006).

As distensões sanguíneas podem apresentar: anisocitose, pecilocitose, pontilhado basófilo, macrocitose e policromatocitose. Nos casos de episódios hemolíticos há eritrócitos irregularmente contraídos, queratócitos (células mordidas) que pode ter ocorrido pela remoção dos corpos de Heinz (derivados da oxidação) pelo baço, há também a presença de eritrócitos denominados hemiestromas que possuem a hemoglobina retraída formando uma massa densa ocupando a metade da célula (BAIN, 2006).

##### *Deficiência de piruvato quinase*

A piruvato quinase (PK) é uma das últimas enzimas da via glicolítica do metabolismo anaeróbico do eritrócito. A deficiência desta enzima provoca diminuição do ganho energético dos eritrócitos e diminuição de sua vida média na circulação (OLIVEIRA, 2007).

Nos achados laboratoriais podem ser vistos ovalócitos, eliptócitos e eritrócitos espiculados densamente corados. Podem ser visualizadas alterações como policromatocitose, anisocitose e macrocitose. (SCHWEIRGERT et al., 2010).

#### 4.4 Leucócitos

Os leucócitos compreendem a série branca do sangue (BAIN, 2006). Estes desempenham suas funções na defesa do organismo, combatendo as infecções e destruindo as bactérias e vírus presentes no sangue. São classificados em dois grupos, os granulócitos que

possuem grânulos proeminentes no citoplasma das células, e os agranulócitos que não possuem grânulos. Com relação aos granulócitos destacam-se os neutrófilos basófilos e eosinófilos, dos agranulócitos são os linfócitos, plasmócitos e monócitos as principais diferenças entre eles estão basicamente na estrutura celular como pode ser visto na figura 4 (NASCIMENTO, 2006).

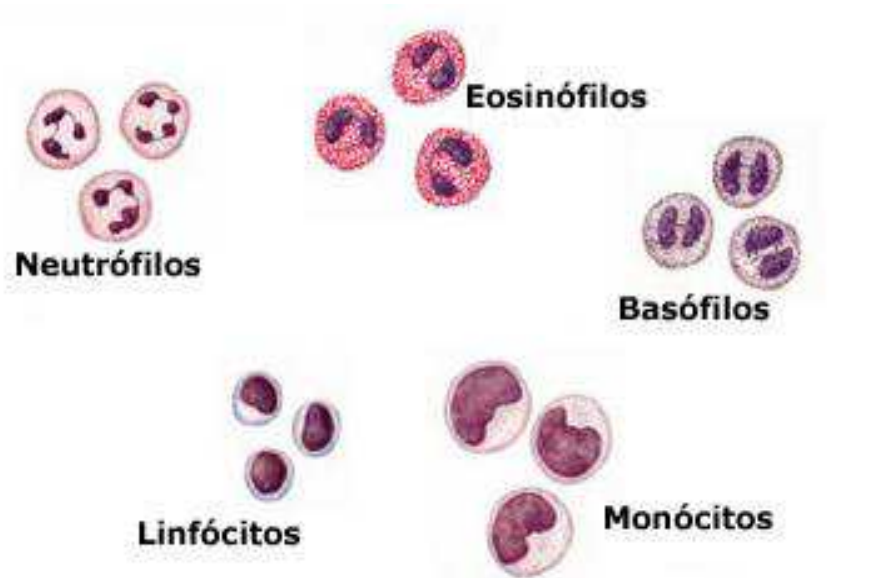


Figura 4: Leucócitos células de defesa

Fonte: <<http://www.mundoeducacao.com/biologia/leucocitos.htm>>

O leucograma estuda a série branca ou leucocitária, através da contagem total de leucócitos/mm<sup>3</sup> de sangue e contagem diferencial de leucócitos (neutrófilo, eosinófilo, linfócito, basófilo e monócito). Os valores a serem observados mostram discretas influências dos seguintes fatores: idade, sexo, condições físicas e emocionais do indivíduo no momento da coleta do sangue, e condições do meio ambiente como calor, frio e altitude. Tais dados quantitativos normalmente variam dentro de certos limites (padrões de normalidade) estabelecidos para determinados grupos de indivíduos, como também nos índices eritrocitométricos (FORTES, 2004).

#### 4.4.1 Neutrófilos

São células móveis, fagocíticas, que possuem a função de destruir micro-organismos. São produzidos e armazenados na medula óssea e liberados na corrente sanguínea quando ocorre algum processo inflamatório (HOKAMA, 1997). O citoplasma é acidófilo, com muitos

grânulos finos, já o núcleo possui cromatina em grumos, sendo dividido de dois a cinco lóbulos distintos (figura 5), ligados por estreitos filamentos de heterocromatina densa, limitados pela membrana nuclear (BAIN, 2006).

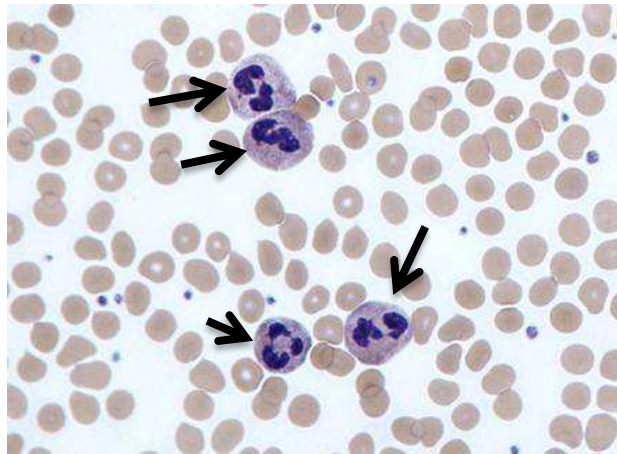


Figura 5: Neutrófilo

Fonte: Disponível em:< [imunologia96.wordpress.com](http://imunologia96.wordpress.com)>

#### 4.4.2 Eosinófilos

São células que são responsáveis por produzir respostas de defesa do organismo quando exposto aos agentes infecciosos (OLIVEIRA, 2007). Possuem em média 13  $\mu\text{m}$  de diâmetro, sendo um pouco maior que o neutrófilo. A estrutura dessas células são similares as dos neutrófilos polimorfonucleares, a diferença é que os grânulos dos eosinófilos são esféricos e consideravelmente maiores do que os neutrófilos, eles enchem o citoplasma e coram-se de laranja-avermelhado (figura 7). Estas células são facilmente reconhecidas pelo seu tamanho e pela cor dos seus grânulos. O citoplasma é levemente basófilo, dessa forma quando ocorre granulação pode-se ver o citoplasma azul-pálido (SIMIONATTO et al., 2009).



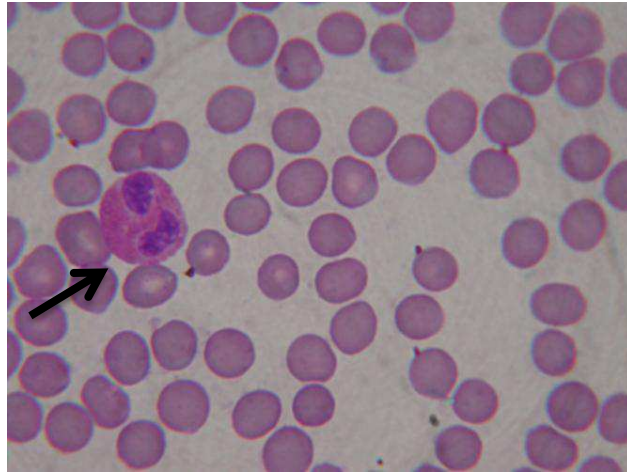


Figura 6: Eosinófilo

Fonte: Disponível em: &lt;aleksandrobio.webnode.com.br&gt;

#### 4.4.3 Basófilos

Os basófilos (figura 8) possuem tamanho semelhante aos neutrófilos, sendo que o núcleo é menos segmentado, é também obscurecido por grânulos preto-purpúreos e os grânulos são maiores e possuem uma forte afinidade por corantes básicos. Em alguns basófilos, a maioria dos grânulos pode não estar presente porque eles são solúveis em água. Em uma extensão sanguínea bem corada, os grânulos são de cor púrpura e o núcleo é ligeiramente mais claro e frequentemente quase escondido pelos grânulos (HENRY, 2008).

Os basófilos são capazes de realizar fagocitose, mas não está muito definido que esta seja a sua principal função. Possui um formato arredondado e irregular. A cromatina é mais grosseira com borda irregular e com ausência de nucléolos (OLIVEIRA, 2007).

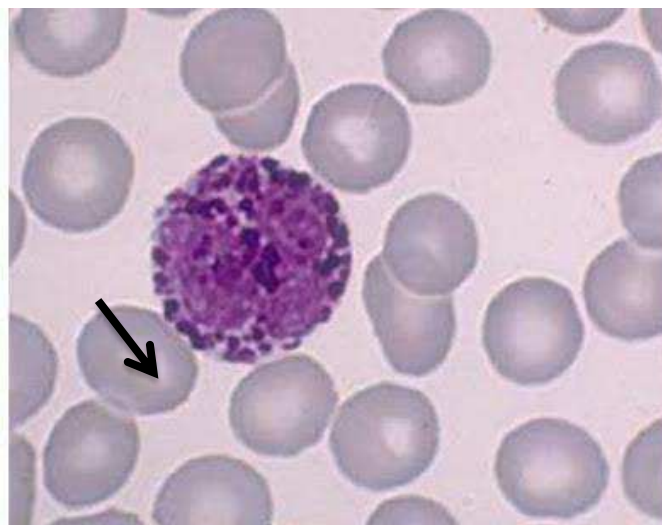


Figura 7: Basófilo

Fonte: Disponível em &lt;professoraangela.net&gt;

#### 4.4.4 Monócitos

O monócito é a maior célula do sangue normal, com diâmetro de 14 a 20  $\mu\text{m}$ . possui um núcleo irregular, frequentemente lobulado, profundamente indentado, ou na forma de ferradura. Ocasionalmente, o núcleo do monócito pode ter aspecto redondo ou oval. Possui uma cromatina mais grosseira em alto relevo e com borda irregular, formato alongado. São células que atuam na defesa do organismo (BAIN, 2006).

O citoplasma é abundante e a cromatina nuclear frequentemente aparece como fitas paralelas finas e separadas por paracromatina bem definida (figura 9). O citoplasma é cinza-azulado e possui um aspecto de vidro de relógio com grânulos azurófilos finos. O núcleo cora-se menos densamente do que os demais leucócitos. Os monócitos produzidos sob condições de estímulo podem evoluir e se transformar em macrófagos. O intervalo de referência é de aproximadamente 0 a  $0,8 \times 10^9/\text{L}$ , dependendo do método utilizado para a contagem diferencial (OLIVEIRA; MENDES, 2010).

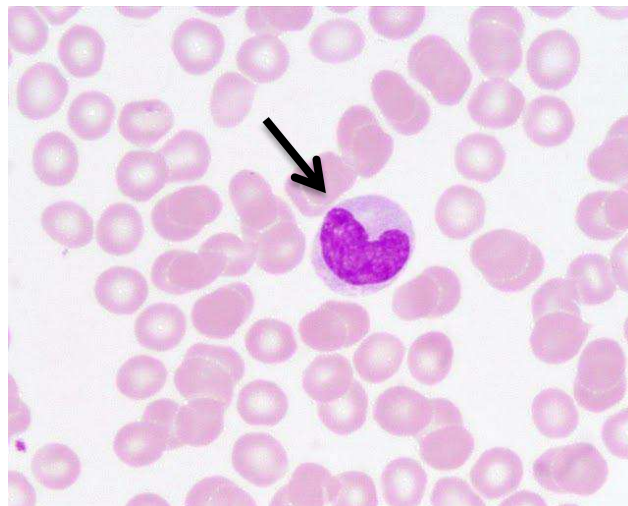


Figura 8: Monócito

Fonte: Disponível em < [www.4shared.com](http://www.4shared.com) >

#### 4.4.5 Linfócitos

São células que respondem aos antígenos, atuam através da produção de anticorpos (linfócitos B) ou por citotoxicidade (linfócitos C) após o contato com determinado antígeno (HOKAMA, 2007). Os linfócitos tem um diâmetro que varia de 10 a 16  $\mu\text{m}$ , sendo portanto um pouco maiores do que as células vermelhas. Os linfócitos são pequenas células mononucleares sem grânulos citoplasmáticos específicos. Os linfócitos têm citoplasma

escasso e núcleo redondo, com cromatina condensada (figura 6) A cromatina cora em azul escuro com o corante de Wright (HENRY, 2008).

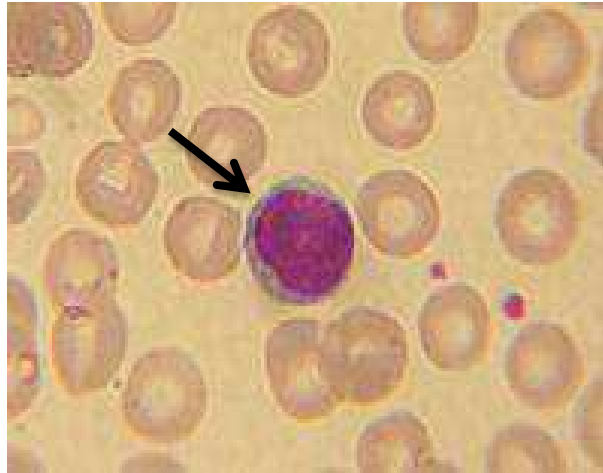


Figura 9: Linfócito visto por microscopia óptica

Fonte: BAIN, 2007

#### 4.5 Distúrbios Leucocitários

Leucocitoses benignas

*Neutropenias*

Neutropenia é a diminuição do número absoluto de neutrófilos na corrente sanguínea (FAILACE, 2007).

*Neutrofilias*

Neutrofilia trata-se do aumento do número de neutrófilos no sangue acima da que seria esperada em um indivíduo sadio. A liberação da medula óssea é aumentada e há diminuição da migração para os tecidos. O número absoluto de linfócitos, monócitos, eosinófilos também aumentam (FAILACE, 2007).

## Leucocitoses malignas

### *Leucemias*

O termo leucemia é derivado do grego e significa "sangue branco". A leucemia caracteriza-se pela produção anormal ou acúmulo de um ou mais tipos de glóbulos brancos. O crescimento de células leucêmicas acaba prejudicando a medula óssea, tornando-a incapaz de manter a produção normal de hemácias, plaquetas e glóbulos brancos (CAVALCANTI, 2009).

De acordo com a Associação da Medula Óssea – AMEO (2014) existem diversos tipos de leucemias, estas são classificadas de acordo com o tempo de sua evolução e do tipo de célula afetada. Em relação a classificação quanto ao tempo de evolução, as leucemias são divididas em Agudas e Crônicas de linhagem linfóide e mielóide.

### *Leucemia linfóide aguda*

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma doença maligna derivada das células linfóides indiferenciadas (linfoblastos) que estão presentes em grande número na medula óssea, no timo e nos gânglios linfáticos. Acumula-se uma grande quantidade de linfoblastos em diferentes etapas da maturação, pois os mesmos mantêm capacidade de multiplicação, mas não possuem a capacidade de diferenciação até formas maduras e normais (LORENZI, 2000).

### *Leucemia linfóide crônica*

A leucemia linfóide crônica (LLC) é uma neoplasia do sistema linfo-hematopoético que possui algumas características epidemiológicas que a distinguem das demais leucemias em diversos aspectos. A LLC é a leucemia mais frequente nos países ocidentais, ocupando 22% a 30% de todas as leucemias em pacientes adultos, sendo extremamente rara nos países asiáticos (YAMAMOTO; FIGUEIREDO, 2005).

### *Leucemia mielóide aguda*

A leucemia mielóide aguda (LMA) é um grupo heterogêneo de doenças clonais do tecido hematopoético, que se caracteriza pela proliferação anormal de células progenitoras da

linhagem mielóide (mieloblastos), ocasionando produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais, com consequente substituição do tecido normal. Desse modo, a infiltração da medula é frequentemente acompanhada de neutropenia, anemia e plaquetopenia. O processo neoplásico que dá origem ao clone leucêmico pode surgir em qualquer estágio do desenvolvimento celular, ou seja, em qualquer fase da hematopoese (SILVA et al., 2006)

#### *Leucemia mielóide crônica*

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença clonal da medula óssea caracterizada por uma excessiva proliferação da linhagem mielóide, seguida por uma perda progressiva da diferenciação celular. A doença é associada a uma anormalidade citogenética específica, ou seja pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph), resultante da translocação entre os cromossomos 9 e 22. O gene híbrido assim formado, BCRABL codifica proteínas com atividade de tirosinoquinases que regulam o crescimento celular (FUNKE et al., 2010).

#### *Eosinofilia*

A eosinofilia ocorre quando o número de eosinófilos está mais alto que o normal, ou seja, maior que  $350 \text{ células/mm}^3$ . Pelo fato de uma das principais funções dos eosinófilos estar relacionada com processos alérgicos e na defesa do organismo contra helmintos, desta forma, encontra-se com níveis aumentados nos processos alérgicos e nas doenças parasitárias (SOUSA, 2014).

#### 4.6 Plaquetas

As plaquetas são produzidas através do processo de diferenciação dos megacariócitos. São células anucleadas que participam do processo da coagulação sanguínea e homeostasia. As plaquetas contém vários tipos de grânulos, como os grânulos fino azurófilos dispersos no citoplasma ou concentrados no centro (BAIN, 2006).

As plaquetas participam do processo de hemostasia através da formação de um tampão plaquetário nos locais de lesão. Esse mecanismo é de extrema importância para os vasos

capilares, arteríolas e vênulas. As plaquetas são formadas através da desfragmentação do megacariócito (figura 10) (HANDIN et al., 2002). No sangue coletado com o anticoagulante EDTA, as plaquetas geralmente permanecem separadas umas das outras, no sangue nativo, as plaquetas mostram uma tendência de se agregar (BAIN, 2006).

As plaquetas normais quando observadas nas extensões sanguíneas preparadas a partir de sangue com EDTA e coradas com corantes Romanowsky, as plaquetas aparecem como estruturas redondas ou ovais com 1 a 3 $\mu$ m de diâmetro. Contém grânulos púrpuros dispersos no citoplasma ou concentrados no centro (granulômero) que são circundados por um citoplasma pálido (HENRY, 2008). O número médio de plaquetas é ligeiramente menor ao nascimento do que em crianças com mais idade e adultos, podendo variar de 84 x 10<sup>9</sup>/L a 478 x 10<sup>9</sup>/L (NATHAN, 1993).

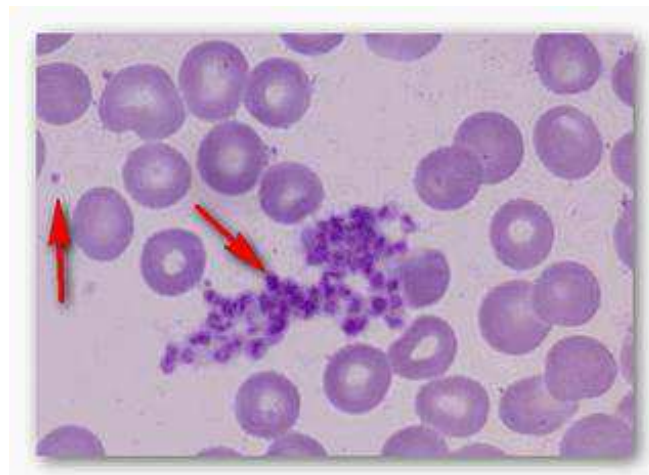


Figura 10: Plaquetas

Fonte:< <http://sil-novidadesemgeral.blogspot.com.br/2011/05/plaquetas-como-contar-e-interpretar-o.html>>

Antes do surgimento da automação, a contagem das plaquetas era feita por duas metodologias, a direta feita pelo método de Brecher & Cronkrite através da câmara de Neubauer e a indireta, por meio da contagem em esfregaço realizada através do método de Fônio (OLIVEIRA, 2007).

#### 4.6.1 Anormalidades morfológicas das plaquetas:

- Plaquetas gigantes ou macroplaquetas: Expressam turnover acelerado e são observadas quando há destruição periférica exagerada, como na púrpura trombocitopênica idiopática, tromboes extensas e na síndrome de Bernard-Soulier.
- Micromegacariócitos: São encontrados nas síndromes mieloproliferativas e mielodisplásicas.
- Anisocitose plaquetária: É a observação de plaquetas de tamanho variado (normal, micro e macroplaquetas) sem predomínio de nenhuma das formas, observada em situações em que existe aceleração do processo de produção, como nas síndromes mieloproliferativas, mielodisplásicas e disfunções plaquetárias.
- Plaquetas dismórficas: Apresentam morfologia bizarra, como na síndrome de Bernard-Soulier e na púrpura trombocitopênica idiopática crônica.
- Hiperplaquetemia: Plaquetas aumentadas em número. Normalmente observadas em: Doenças mieloproliferativas, artrite reumatóide, doenças inflamatórias crônicas e doenças malignas.
- Plaquetopenia ou trombocitopenia: Plaquetas diminuídas em número. Normalmente observadas em: Síndromes de Aldrich e de Bernard-Soulier (hereditárias), púrpura trombocitopênica idiopática e secundária a drogas (adquirida); Algumas infecções virais e bacterianas (SANTOS, GALVÃO, OLIVEIRA; 2008).

## 5 HEMOGRAMA

### 5.1 Coleta de sangue

Para uma exata contagem de glóbulos e uma correta interpretação da microscopia, é necessário que o sangue seja coletado com o anticoagulante adequado. Esta pode ser feita a qualquer hora do dia, não há necessidade de jejum para pacientes de dietas leves, entretanto deve-se evitar coletas após as refeições aguardando pelo menos 3 horas para se fazer a coleta (OLIVEIRA et al., 2003; BAIN, 2006).

No adulto o sangue é geralmente coletado de veias da fossa antecubital (figura 11), com agulha e seringa ou tubo a vácuo. Agulhas de 0,9 e 0,8 mm de calibre são próprias para

adultos, enquanto que para crianças ou adultos com veias muito finas, o ideal são agulhas de 0,7 e 0,6 mm (BAIN, 2006).



Figura 11: (A) Veias anticubitais utilizadas na coleta de sangue, (B) punção venosa utilizando a seringa e agulha, (C) punção venosa a vácuo.

Fonte: Disponível em: <[enfermagemcontinuada.blogspot.com](http://enfermagemcontinuada.blogspot.com)>

## EDTA

O ácido etileno diaminotetracético (EDTA) ou sais de sódio ou de potássio do são os anticoagulantes de escolha para o hemograma. Sua ação anticoagulante se fundamenta na formação de quelatos insolúveis com o cálcio presentes no sangue. O EDTA ocasiona a quelação do fator IV ( $\text{Ca}^{2+}$ ) na cascata da coagulação, sendo essencial em várias etapas da coagulação e atuando como um mediador, bem como na relação célula a célula durante as reações da coagulação (HARR et al., 2005; TAVARES,2009; OLIVEIRA, 2010). Desta forma, o EDTA atua bloqueando o cálcio ionizado por quelação, levando a formação do complexo EDTA-Cálcio. Assim o efeito da cascata de coagulação (dependente de cálcio) é paralisado, inibindo as conversões da protombina em trombina e a ação da trombina no fibrinogênio, que forma a fibrina (coágulo) (PIMENTA, 2011).



### 5.1.2 Hemólise

A hemólise é definida como a liberação dos constituintes intracelulares para o plasma, ou seja, quando ocorre o rompimento dos eritrócitos e a liberação da hemoglobina. Dessa forma, deve-se atentar para a homogeneização do tubo, evitar a exposição do material a altas temperaturas ou luz, evitar o contato direto do sangue com gelo em casos de envios de amostras para outras unidades, evitar a refrigeração por longos períodos devendo ser resfriadas entre 2 e 8°C (SILVA, 2006).

### 5.2 Hemocitômetro

A câmara de Neubauer (hemocitômetro) é composta por uma lâmina de microscopia, bem mais alta do que uma lâmina normal, onde existe uma câmara gravada no vidro. Ao lado da câmara existem dois suportes que mantêm uma lamínula especial de quartzo a  $10^{-1}$ mm acima do chão da câmara, como pode ser observado na figura 12. Desta forma, quando é colocado uma solução na câmara, a profundidade da solução é conhecida, como pode ser observado na figura 13 (LUCARINI; SILVA; BIANCHI; 2004).

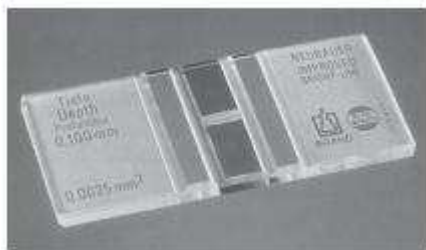


Figura 12: Câmara de Neubauer

Fonte: LUCARINI, SILVA, BIANCHI; 2004

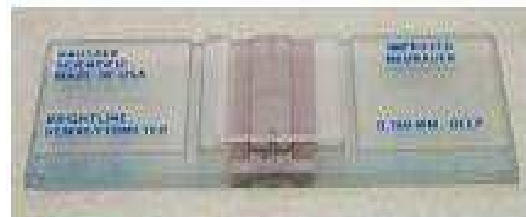


Figura 13: Câmara de Neubauer com lamínula

Fonte: LUCARINI, SILVA, BIANCHI; 2004

Esta câmara também possui marcações que a dividem em quadrantes de dimensões conhecidas e cada câmara possui nove quadrados de contagem (figura 14). Observando-se a Câmara de Neubauer na figura 15, nota-se que existem três tipos diferentes de quadrados de contagem diferenciados em A, B, e C. Desta forma, percebe-se que estes quadrantes tem dimensões diferentes, permitindo que sejam realizadas contagens de células de tamanho

diferentes. Células grandes são contadas no quadrante A, intermediárias no quadrante B e as células pequenas no quadrante C (LUCARINI; SILVA; BIANCHI, 2004).

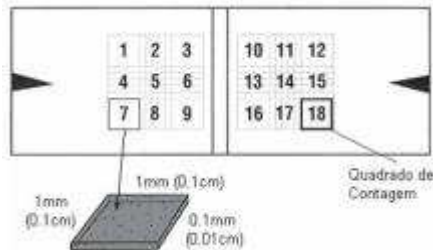


Figura 14: Quadrantes da Câmara de Neubauer

Fonte: LUCARINI, SILVA, BIANCHI; 2004

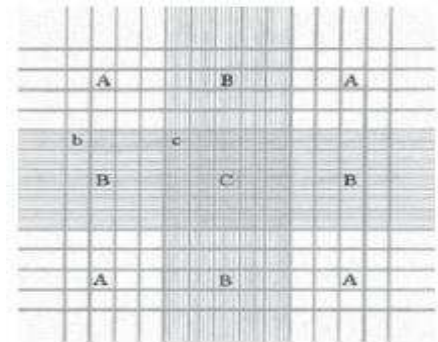


Figura 15: Quadrados de contagem da Câmara de Neubauer

Fonte: LUCARINI, SILVA, BIANCHI; 2004

A precisão da contagem manual utilizando esta metodologia vai depender de alguns fatores, tais como (LUCARINI; SILVA; BIANCHI, 2004):

- Mistura correta da amostra, a fim de que se tenha uma mistura homogênea e que não possua bolhas;
- Número de câmaras contadas;
- Número de células contadas.

### Contagem

A contagem dos eritrócitos é feita da seguinte forma: deve-se somar o número total de eritrócitos obtidos após a contagem de cada um dos cinco quadrados do quadrante central da câmara (quatro laterais e um do centro) ou seja, 1/5 do quadrante central (OLIVEIRA et al., 2003).

### Cálculo da contagem por mm<sup>3</sup>

De acordo com Oliveira 2007, cada um dos nove quadrantes secundários da câmara tem capacidade de conter 0,1 mm<sup>3</sup> de volume. Como todo quadrante secundário central contém

um volume de  $0,1 \text{ mm}^3 = 1/10 \text{ mm}^3$ ,  $1/5$  desse quadrante central =  $1/10 \times 1/5 = 1/50 \text{ mm}^3$ ; e a diluição é de  $1/200$ .

Dessa forma, temos:  $1/50 \times 1/200 = 1/10.000$ , que é o fator de correção pra transformar  $1/10.000$  do  $\text{mm}^3$  em  $1\text{mm}^3$  será o próprio 10.000.

Desse modo,

$\text{N}^\circ$  de eritrócitos /  $\text{mm}^3 = (\text{soma da contagem dos cinco quadrados do quadrante central}) \times 10.000$

### Vantagens e desvantagens

Segundo Oliveira 2007, caracteriza a contagem manual de eritrócitos em hemocítômetro trabalhosa e imprecisa. Pois para que um resultado seja considerado como satisfatório, é necessário bastante tempo, experiência e controle rígido no uso do hemocítômetro e contagens repetidas para a mesma amostra. Pelo fato dos leucócitos não serem lisados nos procedimentos de diluição, dessa forma estão presentes na contagem de eritrócitos, assim, se o paciente possuir alguma alteração no número de leucócitos, este irá interferir na contagem dos eritrócitos.

## 5.3 Esfregaço sanguíneo em lâmina

### 5.3.1 Método da cunha

Após a coleta, o material é encaminhado para o setor da hematologia para ser processado a leitura automática e/ou análise do esfregaço. Uma gota de sangue de 2 a 3 mm de diâmetro é colocada com o auxílio de um capilar ou pipeta, na extremidade da lâmina de vidro limpa e isenta de pó que deve estar sobre uma superfície plana. Outra lâmina é apoiada na extremidade sem sangue da primeira, com uma inclinação de aproximadamente  $45^\circ$ . A lâmina inclinada é deslizada até a gota de sangue e com um movimento suave e uniforme é empurrada a lâmina espalhadora com velocidade demorada até que todo o sangue tenha se espalhado em uma extensão moderadamente fina. A lâmina espalhadora deve estar limpa, seca e ligeiramente mais estreita do que a primeira lâmina, para que as margens possam ser facilmente examinadas com o microscópio (figura 16) (BARBOSA; ARRUDA; DINIZ, 2006).

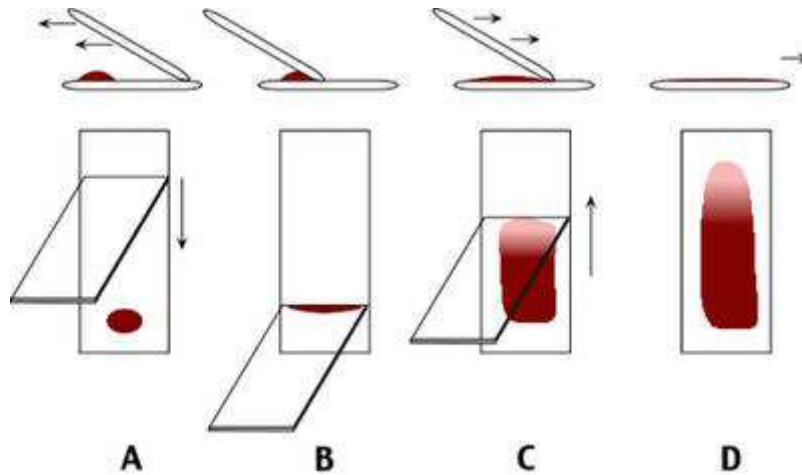


Figura 16: Distensão sanguínea

Fonte: < <http://biologia206.blogspot.com.br/2011/07/tecnica-de-esfregaco-de-sangue.html> >

## 5.4 Coloração do Esfregaço

### 5.4.1 Método original de Romanowsky

Não há um consenso entre os laboratórios para a melhor escolha do corante, mas todos os corantes em uso baseiam-se no de Romanowsky, um protozoologista russo do final do século XIX (BAIN, 2006). Trata-se de uma mistura de azul de metileno (corante básico) e de eosina (corante ácido) para corar o núcleo e o citoplasma das células sanguíneas respectivamente. Os corantes policromos (contendo azul de metileno e eosina) são atualmente bastante utilizados nos laboratórios de hematologia, visto que eles coram de modo diferenciado a maioria das estruturas normais e anômalas do sangue (HENRY, 2008).

A coloração deve ser feita em pH adequado. Quando o pH é muito baixo, os componentes basófilos (grânulos que se coram na cor púrpura) não se coram adequadamente, os eosinófilos ficam na cor vermelho brilhante e os leucócitos ficam pálidos. Quando o pH é muito alto, fica mais difícil distinguir a policromatofilia (afinidade por dois corantes) dos eritrócitos, os grânulos dos eosinófilos coram-se em azul escuro ou cinza e os neutrófilos (grânulos) coram-se excessivamente, simulando granulações tóxicas (BAIN, 2006).

Os componentes básicos da tiazina consistem em azul de metileno (tetrametiltionina) e em proporções variadas, seus análogos que são: azur B (trimetiltionina), azur A

(dimetiltionina assimétrica), dimetiltionina simétrica e azur C (monometiltionina) (LILLIE, 1977). Quase todos os corantes de Romanowsky são dissolvidos em álcool metílico e combinam a fixação com a coloração. Entre os métodos mais conhecidos estão os corantes de Giemsa e Wright (figura 17) (HARR et al., 2005).



Figura 17: Procedimento de coloração para esfregaços sanguíneos

Fonte: < <http://www.biomedicinapadrao.com.br/2013/10/corantes-usados-no-esfregaco.html>>

## 6 ERITROGRAMA: CONTAGEM DE ERITRÓCITOS

### 6.1 Contagem manual em hemocítômetro

Consiste na quantificação do número de eritrócitos por  $\text{mm}^3$  ( $\mu\text{L}$ ) de sangue em uma câmara específica (hemocítômetro) após a diluição da amostra de sangue para que seja evitado a lise dos eritrócitos. Esta contagem é feita utilizando a câmara de Neubauer (OLIVEIRA, 2007).

No entanto, a contagem em hemocítômetro requer considerável experiência por parte dos técnicos (LASSEN; WEISNER, 2007), sem contar que o tempo necessário para leitura de cada amostra inviabilizaria a rotina de grandes laboratórios, pois, em média, é necessário cerca de 30 minutos entre recebimento do material no laboratório e contagem dos eritrócitos. Em virtude desta limitação do teste, novos métodos são estudados a fim de otimizar a rotina laboratorial, sem perder a confiança no teste (FAILACE; PRANKE, 2009).

### 6.2 Contagem de eritrócitos automatizada

A contagem dos eritrócitos é feita no mesmo canal da contagem das plaquetas, a diferenciação entre ambas é feita pelo volume ou pelo índice de refração associados ou por meio de fluorocromos. A contagem automática dos eritrócitos é bem mais precisa e exata quando comparada com a manual, esta é realizada pelo princípio da impedância. (HOKAMA, 2007)

### 6.3 Hemoglobina

Caracteriza-se como sendo bastante relevante para a determinação do eritrograma. A dosagem da hemoglobina pode ser determinada manual ou automaticamente utilizando o princípio da espectrofotometria em ambos (OLIVEIRA, 2007).

Para a dosagem de hemoglobina (Hb), é necessário um volume predeterminado de sangue total, cuidadosamente homogeneizado com um diluente (cianeto ou dimetil lauril amina) que lisa eritrócitos, devido seu caráter hipotônico e pela presença de um detergente lítico não-iônico, produzindo uma solução de hemoglobina. A dosagem então é feita medindo-se a densidade óptica (ou absorvância) da solução de hemoglobina em comprimento de onda apropriado (BAIN, 2006).

#### 6.3.1 Dosagem de hemoglobina manual

##### *Método da cianoemoglobina*

O sangue é diluído em uma solução de ferricianeto de potássio e cianeto de potássio. O ferricianeto de potássio oxida as hemoglobinas em hemiglobina, e o cianeto de potássio fornece íons cianeto (CN<sup>-</sup>) para formar HiCN (cianometahemoglobina, cor vermelho alaranjada), que é medida fotolorimetricamente em 540 nm ou em filtro verde (HENRY, 2008).

Na técnica, após a lise dos eritrócitos o pigmento hemoglobínico liberado será medido em um espectrofotômetro e os resultados serão comparados com os valores de absorvância de uma solução padrão de concentração conhecida (OLIVEIRA, 2007).

## 6.4 Hematócrito

É a relação entre o volume relativo ocupado pelos eritrócitos e o plasma em uma amostra de sangue. O hematócrito é expresso em porcentagem por volume. Por exemplo, um hematócrito de 25% significa que há 25 mililitros de eritrócitos em 100 mililitros de sangue. O termo "hematócrito" foi criado em 1903 e vem do grego hemat = sangue + krites, julgar = julgar ou avaliar o sangue (GOMES et al., 2007).

De acordo com o DeCS ( Descritores em Ciências da Saúde) o volume é medido por centrifugação em um tubo graduado ou contadores automáticos de células sanguíneas. O hematócrito é um indicador do estado dos eritrócitos em doenças, por exemplo em estados de anemia apresentam-se valores baixos, enquanto que em casos de policitemia (aumento da massa total de eritrócitos no sangue) os valores são altos.

### 6.4.1 Microhematócrito

Corresponde ao volume compacto dos glóbulos vermelhos em relação ao volume total de sangue em um capilar de vidro, obtido após microcentrifugação de 11.000 rpm por 5 minutos (BAIN, 2006) (Anexo 3).

### 6.4.2 MACROHEMATÓCRITO (MÉTODO DE WINTROBE)

Corresponde ao volume compactado dos glóbulos vermelhos em relação ao volume total de sangue em um tubo de Wintrobe, obtido após microcentrifugação de 3.000 rpm por 30 minutos (FREITAS, 2012).

### 6.4.3 Hematócrito nos contadores automáticos

Segundo Oliveira 2007, a contagem automática do hematócrito é feita pela inversão da fórmula do VCM proposta por Wintrobe, onde:

$$\text{VCM} = \frac{\text{Ht (hematócrito)} \times 10}{\text{E (eritrócito)}}$$

Assim,

$$Ht = \frac{VCM \times E}{10}$$

Os contadores da Sysmex<sup>®</sup> e da ABX<sup>®</sup> determinam o hematócrito direto por automação e o VCM é calculado pela fórmula anteriormente descrita.

### Vantagens e desvantagens

O hematócrito nos contadores é mais exato do que por centrifugação, pois no caso da centrifugação pode haver o encarceramento de plasma entre os eritrócitos após a centrifugação, e dessa forma eleva o valor do hematócrito manual de 0,5 a 1,5% quando comparado com o hematócrito automatizado.

## 6.5 Índices hematimétricos

São parâmetros que avaliam indiretamente as características dos eritrócitos quanto ao volume conteúdo de hemoglobina. Estes índices são determinados em instrumentos de impedância elétrica. Os índices hematimétricos compreendem o VCM, o HCM e o CHCM. Estes índices podem ser obtidos facilmente através de fórmulas utilizando-se o hematócrito e hemoglobinometria. O VCM é um índice que tem como objetivo informar sobre a média do tamanho dos glóbulos vermelhos (eritrócitos). O HCM é caracterizado como a média do conteúdo (peso interno) da hemoglobina de uma população de eritrócitos. O CHCM fornecerá informações sobre a concentração de hemoglobina nos eritrócitos. (BOURNER; DHALIWAL; SUMMER, 2005)

### 6.5.1 Volume Corpuscular Médio (VCM)

É um índice útil na classificação das anemias. A anemia classifica-se como normocítica quando os valores do VCM se encontram dentro da normalidade, macrocítica quando o VCM está elevado ou microcítica quando o VCM se encontra reduzido. É geralmente determinado por métodos automáticos, mas pode ser calculado pelo quociente entre o hematócrito e o número de eritrócitos que ocupam esse volume. Expresso em femtolitros (fL ou  $\times 10^{-15}$ ) (OLIVEIRA, 2007; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2004).



$$\text{VCM} = \frac{\text{Ht} \times 10}{\text{E}}$$

### 6.5.2 Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

É a medida do conteúdo de hemoglobina por eritrócito. Pode ser calculada a partir da concentração de Hb e do número de eritrócitos (OLIVEIRA,2007; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2004).

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb (hemoglobina)} \times 10}{\text{E}}$$

### 6.5.3 Concentração Média de Hemoglobina Corpuscular

Este índice está relacionado com a concentração média de hemoglobina por eritrócito. É a base da classificação da cromia, ou seja, avalia a cor dos eritrócitos onde esta é determinada de acordo com a concentração de hemoglobina (OLIVEIRA, 2007). Dessa forma, temos: normocromia diz respeito a CHCM dentro dos valores de referência; hipocromia ocorre com a diminuição da coloração normal dos eritrócitos, ou seja, possui baixa concentração interna de hemoglobina. A hipercromia ocorre com o aumento da coloração normal dos eritrócitos. o CHCM é determinado pela seguinte fórmula: (OLIVEIRA,2007; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2004).

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hb} \times 100}{\text{Ht}}$$

### 6.5.4 RDW-CV

É calculado como um coeficiente de variação da frequência dos volumes eritrocitários. O RDW é um uso exclusivo da tecnologia. É notável a reprodutibilidade do RDW o torna um índice de grande confiabilidade para avaliar qual o limite normal de hemoglobina de cada

indivíduo. Valores de RDW alterados, mesmo para indivíduos com níveis de hemoglobina normais, sugere alteração eritrocitária (OLIVEIRA, 2007; NASCIMENTO, 2006).

## **7 LEUCOGRAMA**

### **7.1 Contagem total de leucócitos, técnica manual**

A contagem total de leucócitos é realizada através do hemocitômetro de Neubauer, para laboratórios de pequenas rotinas e que não tenham automação (OLIVEIRA, 2007). Após a diluição da amostra de sangue com solução que promove a lise de eritrócitos e plaquetas, a contagem é feita nos quatro quadrados laterais da câmara de Neubauer (L1 + L2 + L3 + L4) (OLIVEIRA, 2007). Dessa forma, deve-se contar os leucócitos contidos nos quatro milímetros angulares, multiplicar o valor encontrado por 50 e expressar o resultado em leucócitos/mm<sup>3</sup> de sangue (PEREIRA et al., 2008).

#### **7.1.1 Contagem diferencial de leucócitos, técnica manual**

A contagem diferencial de leucócitos circulantes é realizada utilizando-se o esfregaço de sangue corado com Romanowsky, sendo contados 100 leucócitos para cada amostra, percorrendo-se campos contínuos em ziguezague ou na longitudinal (MALOK et al., 2007) No método longitudinal, para realizar a contagem dos leucócitos, deve-se percorrer a lâmina ao longo do esfregaço junto à borda lateral da cauda. Já em relação ao método ziguezague, a contagem inicia-se na borda lateral penetrando no corpo da lâmina em movimento ziguezague, contar 100 leucócitos classificando-os para ambos os métodos. Em uma contagem diferencial, deve-se desprezar a cabeça e a cauda do esfregaço (figura 18), utilizando-se apenas o corpo uma vez que na cabeça da lâmina as células geralmente encontram-se muito juntas e dificultando a visualização, já na cauda as células estão muito escassas e a contagem pode não ser bastante representativa. (LIMA et al., 1992)



Figura 18: Contagem de leucócitos no esfregaço

Fonte: <[http://adamogama.blogspot.com.br/2011/08/contagem-diferencial-de-leucocitos\\_25.html](http://adamogama.blogspot.com.br/2011/08/contagem-diferencial-de-leucocitos_25.html)>

O exame dos esfregaços é feito ao microscópio com a objetiva de imersão, contando-se no mínimo 100 leucócitos, percorrendo-se as bordas laterais e o corpo das lâminas, durante a contagem para cada tipo de célula visto no microscópio, deve-se ser apertado o botão referente aquele tipo de leucócito no aparelho representado pela seguinte figura 19. A contagem diferencial de leucócitos pode ser em valores absolutos (tipo de leucócito/mm<sup>3</sup> de sangue) e relativos (tipo de leucócito %). A partir do valor relativo calcula-se o valor absoluto, associando-se o valor relativo ao valor global de leucócitos (LEONART, 2009).



Figura 19: Contador diferencial de leucócitos

Fonte: <<http://www.centerkit.com.br/produtos/contador-diferencial-de-cel--sang---mod--ccs-02>>

### 7.1.2 Contagem de leucócitos automatizada

Os contadores Coulter T-890, ABX-micro, CELM CC 530 ou CC 550, fazem a contagem dos leucócitos automática, utilizando as seguintes tecnologias: impedância, citometria de fluxo, citoquímica e radiofrequência. Os valores absolutos para cada subtipo de leucócito são estabelecidos de maneira similar ao método manual para a contagem de leucócitos, ou seja, através de regra de três simples com base no valor absoluto global automatizado e nos valores relativos obtidos no esfregaço. A contagem diferencial para leucócitos é feita pelos equipamentos Bayer modelo Advia-120, Coulter modelos Gen-S,

Cell-Dyn modelos 3000, 3500, Sysmex modelos TX 2000, Horiba ABX modelo pentra DX-120 (OLIVEIRA, 2007).

A metodologia de análise é a mesma utilizada para os eritrócitos. Devido ao custo ser relativamente baixo, tempo reduzido, maior precisão nos analisadores, os instrumentos semi-automatizados são raramente utilizados nas análises clínicas (HENRY, 2008).

## 8 PLAQUETOGRAMA: CONTAGEM DAS PLAQUETAS

As plaquetas podem ser contadas no hemocitômetro em sangue total diluído (com eritrócitos intactos ou lisados) ou em plasma rico em plaquetas (separado por sedimentação ou por centrifugação). Se houver plaquetas grandes, prefere-se o método do sangue total ao plasma rico em plaquetas, pois por serem grandes e pesadas, corre o risco de perde-las nos procedimentos de preparação. Prefere-se o plasma rico em plaquetas em casos de baixa contagens (BRAIN, 2007).

O oxalato de amônio, que lisa os eritrócitos, quando utilizado como diluente irá produzir uma contagem mais alta e mais exata do que o formol-citrato, que deixa os eritrócitos intactos (LEWIS, 2006). As plaquetas podem ser vistas na câmara de contagem com microscópio óptico ou contraste de fase. Quando se usa o microscópio óptico, pode-se acrescentar o azul-brilhante-de-cresil ao diluente, onde esta irá corar as plaquetas em azul claro facilitando a identificação (BRAIN, 2007).

### 8.1 Índices Plaquetários

#### MPV

O MPV (*Mean Platelet Volume*) – Volume plaquetário médio tem se mostrado útil na diferenciação de alterações plaquetárias de origem central (medular) ou periférica (vasos). Nas alterações medulares, aparece diminuído, já que as plaquetas têm um índice de produção diminuído e as que estão em circulação são velhas e de pequeno volume. Nas alterações periféricas, acontece o oposto, já que o turnover elevado faz com que haja aumento de macroplaquetas circulantes (HENRY, 2008).

## PDW

O PDW (*Platelet Distribution Width*) – Reflete a variação no volume das plaquetas. Este índice pode fornecer informações evolutivas dos pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática (PTI). Um aumento de valores indica um número elevado de megacariócitos de reposição plaquetária, refletindo-se também nos níveis do PDW, que sobe devido à anisocitose criada pela presença concomitante no sangue periférico de diferentes volumes plaquetários (BAIN, 2007).

## 9 METODOLOGIAS NOS CONTADORES HEMATOLÓGICOS AUTOMATIZADOS

### 9.1 Impedância

A automação no laboratório clínico é o termo utilizado para descrever a aplicação da tecnologia aos aspectos fundamentais da produção dos resultados em laboratório clínico. O processo de automação no laboratório foi primeiramente descrita por Wallace Coulter em 1956, onde a contagem de células era feita pelo método da impedância. Este método depende do fato dos glóbulos vermelhos serem pobres condutores de eletricidade, enquanto certos diluentes são bons condutores; essa diferença forma a base desse sistema de contagem. Dois eletrodos de platina mergulhados separadamente por um orifício de 60 a 100 micrometros de diâmetro, sendo um no interior do equipamento e outro no líquido contendo as partículas a serem contadas, permite que cada partícula que passe pelo orifício desloque o volume de líquido, modificando de forma mensurável a impedância proporcional ao volume deslocado. Esses pulsos são amplificados e contados num volume de sangue predeterminado. Este princípio ilustrado na figura 20 é utilizado em instrumentos comercializados pela Coulter, Sysmex, Abbott (Cell Dyn 3.500), ABX (micros 60, Pentra 120), e outros (BACALL, 2009).

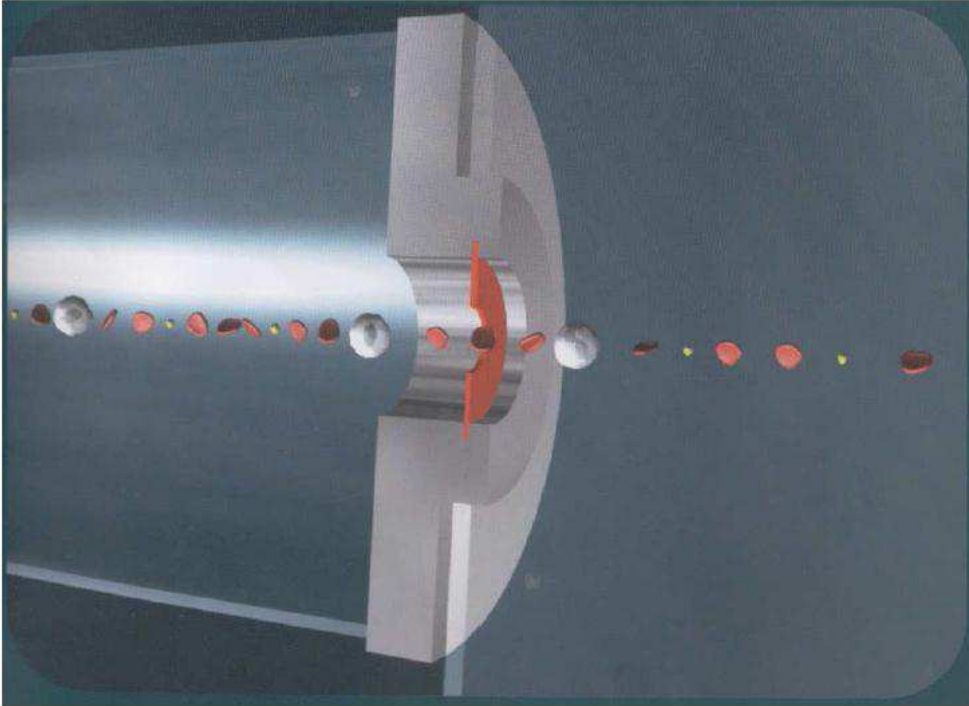


Figura 20: Metodologia de impedância

Fonte: <[www.cenapro.com.br](http://www.cenapro.com.br)>

## 9.2 Espectrofotometria

A espectrofotometria é uma técnica que utiliza a luz para medir as concentrações das soluções, baseado na interação da luz com a matéria. O equipamento possui uma fonte de luz que pode ser de deutério (emite luz UV) ou de tungstênio (emite luz visível), o monocromador transforma a luz incidida em vários comprimentos de onda, dessa forma, é selecionado o comprimento de onda em que a amostra é analisada. A cubeta que é o recipiente propício para conter a amostra para ser analisada, o detector que é um dispositivo que detecta a fração de luz que foi absorvida pela amostra e a que foi transmitida, em seguida transfere o resultado para o visor acoplado ao aparelho (SKOOG; WEST; HOLLER, 1995).



Figura 21: Espectrofotometria

Fonte: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAFiGEAK/espectrometros-espectrofotometros>>

A espectrofotometria é usada de modo universal para a dosagem de hemoglobina, os equipamentos diferem entre si com relação à conversão da hemoglobina antes da colorimetria: cianometemoglobina (Beckman Coulter), hemoglobina-lauril-sulfato de sódio (Advia e Sysmex), metemoglobina-imidazol (Cell-Dyn). (FAILACE et al., 2009)

A hemoglobina é dosada por espectrofotometria utilizando-se de agentes líticos com cianeto (Coulter T-890®), ou livres de cianeto, como o lauril-sulfato (Sysmex XS 1000i®). (BORGES; SIQUEIRA, 2009)

### 9.3 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica bastante empregada nos exames laboratoriais. Na hematologia, esta técnica permite a quantificação das células sanguíneas e a contagem diferencial dos leucócitos, sendo assim é a metodologia mais utilizada nos exames para a realização do hemograma automatizado. (HENRY, 2008)

O princípio de citometria de fluxo é feita através do direcionamento dos elementos celulares por uma tubulação delgada, envolvidos em um solvente até passar pelo ponto de análise ou *flow cell*, em seguida serão aplicadas as demais tecnologias para quantificação e diferenciação das células, como o laser, corrente contínua para impedância e corrente em radiofrequência para determinar a estrutura interna das células (BORGES; SIQUEIRA, 2009). Um bom exemplo de equipamento automático que utiliza a metodologia da citometria de fluxo é o Sysmex UF 100. (BOTTINI; GARLIPP, 2006)

A aplicação da citometria de fluxo nos laboratórios tem sido muito ampla. Os citômetros de fluxo modernos podem realizar até 70.000 eventos por segundo. As análises incluem o número de células, o tamanho das células e a presença de marcadores de superfície e citoplasmáticos. O equipamento Technicon H3 (atualmente Bayer) utiliza esta técnica para

realizar as contagens de eritrócitos, leucócitos e plaquetas e também consegue diferenciar os tipos de leucócitos. (HENRY, 2008)

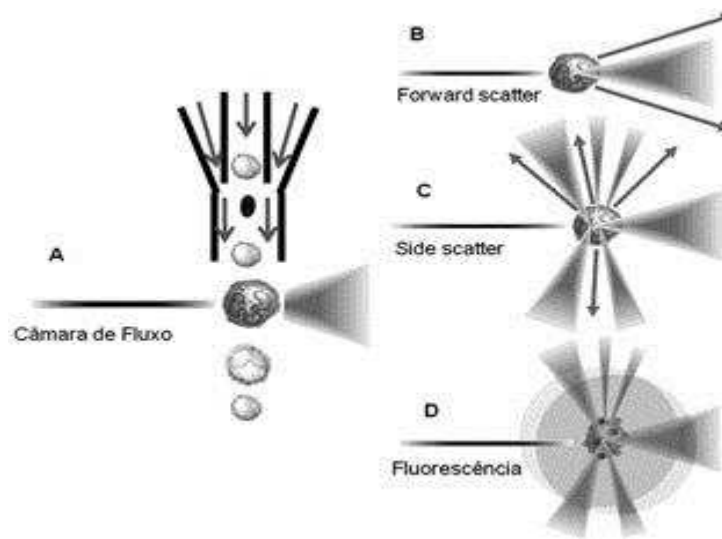


Figura 22: Citometria de fluxo

Fonte: < [http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id\\_materia=5170](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=5170)>

#### 9.4 Radiofrequência

A radiofrequência ou RFID (*Radio Frequency Identification*) é uma tecnologia que através da frequência de rádio, capta as informações de células armazenadas em microchips. Um dos princípios de funcionamento da tecnologia RFID é a radiação eletromagnética. Define-se a radiação eletromagnética como sendo ondas de energia elétrica e magnética que são irradiadas juntas através do espaço e, entende-se por radiação, a propagação de energia através do espaço na forma de ondas ou de partículas. (National Research Council, 2004; Young e Freedman, 2004).

Quando a radiação eletromagnética atravessa um condutor elétrico induz uma corrente elétrica no condutor, sendo este efeito utilizado pelas antenas das etiquetas RFID de forma a fornecer energia ao microchip para ser ativada e realizar as operações de leitura/escrita e transmissão das informações para a antena detectora (National Research Council, 2004; Young e Freedman, 2004).



## 10 MODELOS DE CONTADORES AUTOMATIZADOS

### 10.1 Beckman Coulter

O sistema Coulter de contagem baseia-se no clássico princípio da impedância elétrica, possuem também um sistema VCS (volume, condutividade e scater) para a contagem diferencial de leucócitos oferecendo maior sensibilidade, especificidade e eficiência (COULTER, 2014). Esta tecnologia permite diferenciar linfócitos, monócitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos e reticulócitos com base no volume da célula, na sua condutividade, estrutura e forma (VCS) (OLIVEIRA, 2007)

Assim, sinais elétricos de baixa frequência emitidos pelas células definem seu volume, sinais de alta frequência (radiofrequência) definem a condutividade interna e a dispersão (scater) define a granularidade e formato da célula (OLIVEIRA, 2007).

### 10.2 Sistema Sysmex® Modelo Xe 2100

É capaz de analisar 150 amostras por hora e possui 32 parâmetros utilizando os princípios: impedância, colorimetria sem cianeto (lauril sulfato de sódio), radiofrequência e citometria de fluxo (com e sem fluorescência) e foco hidrodinâmico como pode ser visto na figura 23 (OLIVEIRA, 2007). A Sysmex adaptou as técnicas básicas de citometria de fluxo tradicional utilizando o corante de polimetina, altamente específico, agilizando assim a rotina no setor de hematologia dos laboratórios clínicos (SYSMEX, 2014).

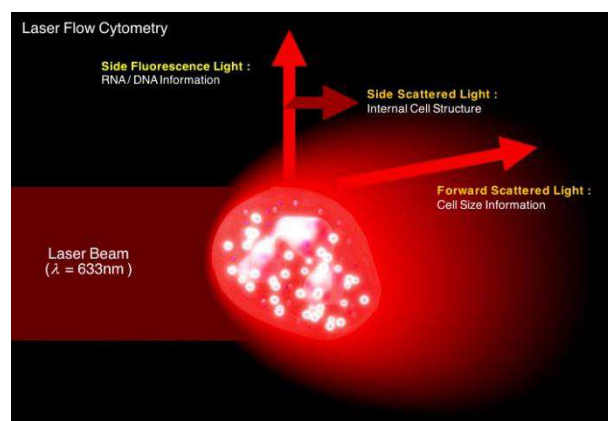


Figura 23: Citometria de fluxo com fluorescência

Fonte: Disponível em: < <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100-Hematology-Analyzer.aspx>>

## Contagem de eritrócitos e plaquetas

No canal dos eritrócitos (RBCs) e plaquetas (PLTs) as células são contadas usando o método de impedância e foco hidrodinâmico (figura 24) que minimiza os fenômenos de coincidência e recirculação. A intensidade do pulso elétrico de cada eritrócito analisado é proporcional ao volume da célula. Parte do sangue aspirado é diluído com solução isotônica de NaCl. O hematócrito (HCT) é diretamente determinado através da detecção individual do volume de cada eritrócito, ou seja é obtido com o somatório de todos os volumes de todos os eritrócitos contados. Mesmo com as amostras em concentrações extremamente baixas ou altas, os analisadores Sysmex contam os eritrócitos e plaquetas com precisão e exatidão (OLIVEIRA, 2007).

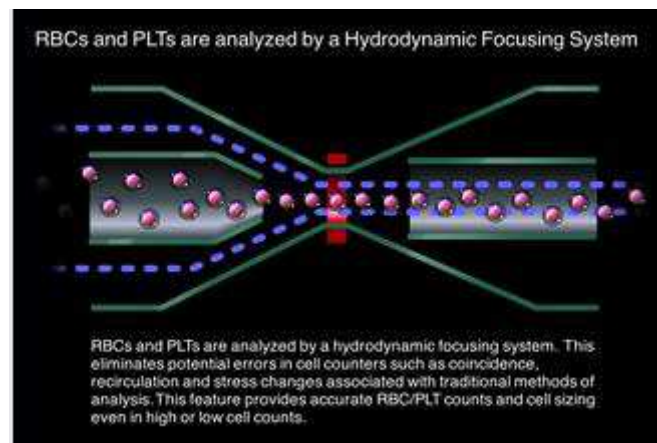


Figura 24: Sistema de foco hidrodinâmico Sysmex XE 2100

Disponível em: < <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100-Hematology-Analyzer.aspx>>

## Determinação de hemoglobina

O método utilizado pela Sysmex para determinação da hemoglobina é o lauril sulfato de sódio (SLS), livre de cianeto, que transforma a hemoglobina em um complexo corado que tem seu pico de máxima absorção de luz em 555nm (SYSMEX, 2014). A hemoglobina é analisada em um canal separado, desta forma, pode ser utilizado um agente lítico mais potente que o cianeto de potássio simples permitindo que os leucócitos sejam lisados, minimizando a interferência de concentrações elevadas de leucócitos (OLIVEIRA, 2007).

## Diferencial leucocitária

É utilizado um segundo tipo de abertura de impedância para a contagem global e diferencial em três partes de leucócitos (linfócitos, monócitos e granulócitos), no qual são mensuradas simultaneamente a corrente direta e a radiofrequência emitidas pela célula quando passa por uma abertura de 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro (OLIVEIRA, 2007).

A marcação por fluorescência é um marco para a diferencial leucocitária que revela a relação núcleo-citoplasma em cada célula corada individualmente permitindo que os analisadores da Série-XE diferenciem seis populações de leucócitos. A combinação da dispersão lateral de luz (complexidade interna da célula), da dispersão frontal (volume celular) e da fluorescência (quantidade de material genético - DNA/RNA) diferencia as classes leucocitárias (SYSMEX, 2014).

## Contagem de reticulócitos

O XE-2100 quantifica os reticulócitos e eritroblastos usando um reagente (auramina O) que após a lise dos glóbulos vermelhos, encolhe e ligeiramente mancha o núcleo dos eritroblastos. O reagente não altera a forma dos leucócitos, mas marca as organelas citoplasmáticas e o núcleo (NASCIMENTO et al., 2010). Utilizando o método de coloração com fluorocromo auramina O que cora o RNA do reticulócito. Desta forma são detectados com base no grau de fluorescência emitido de cada reticulócito, após serem iluminados por uma luz laser de argônio (OLIVEIRA, 2007).

## 10.3 Sistema Abbott<sup>®</sup> Modelo Cell-Dyn Sapphire

### Contagem global e diferencial de leucócitos

O Cell-Dyn Sapphire utiliza para a contagem diferencial de leucócitos a tecnologia MAPSS. Parte do sangue aspirado é diluído em solução (contendo oxalato de amônio) que mantém os leucócitos em seu estado natural e destrói, por lise, os eritrócitos e plaquetas (OLIVEIRA, 2007).

### Contagem de reticulócitos

Usando o indicador de fluorescência vermelha (figura 25), cada amostra é analisada para a presença de células nucleadas de sangue vermelho (NRBCs). A medição do DNA fluorescente então identifica NRBCs melhorando a capacidade de detectar com precisão algumas patologias (SAPPHIRE, 2015).

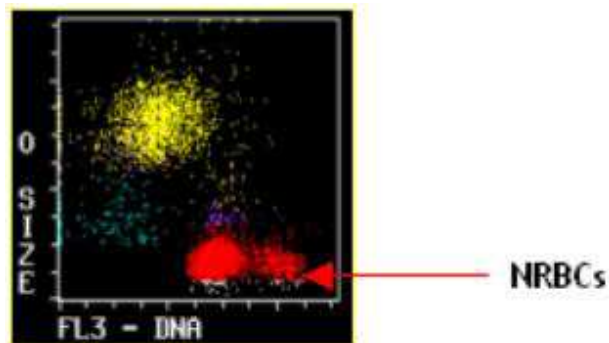


Figura 25: Histograma dos reticulócitos

Fonte: GHAZALI et al., 2007.

### Contagem de plaquetas

A contagem de plaquetas é considerado o um dos parâmetros clinicamente mais importantes de CBC. O CELL-DYN Sapphire <sup>TM</sup> utiliza várias tecnologias para fornecer o mais alto grau de precisão para este resultado crítico (SAPPHIRE, 2015).

O Sapphire difere dos demais contadores Cell-Dyn devido fornecer 27 parâmetros incluindo CD3, CD4, CD8 e CD61. O equipamento utiliza como princípios de análise a tecnologia laser, impedância elétrica e dispersão de luz de marcadores fluorescentes. Possuindo capacidade total de realizar a contagem de 106 amostras/hora (DIAGNOCEL, 2014). Além disso, utiliza um canal específico para hemoglobina, um para leucócitos, plaquetas, eritroblastos, reticulócitos, PLT/CD61, CD3, CD4 e CD8 (utilizando o canal de dispersão óptica/fluorescência) (figura 26) (OLIVEIRA, 2007). A grande inovação mercadológica do Sapphire é que ele funciona como híbrido de contador de células-citômetro de fluxo, o que traz a vantagem de trabalhar com os CD3, CD4 e CD8 (OLIVEIRA, 2007).

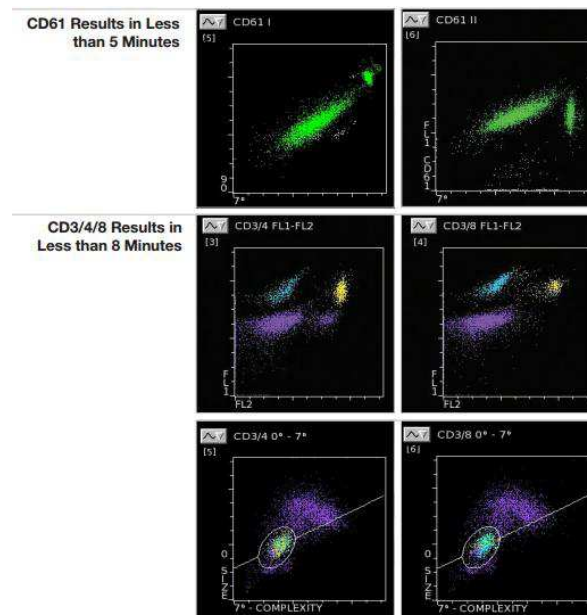


Figura 26: Histograma para linfócitos

Fonte: <[https://www.abbott.ch/fileadmin/docs/ADD/1\\_Systeme\\_und\\_Tests/2012\\_add\\_001I\\_7\\_AD024\\_3EU2011\\_CELL-DYN\\_Sapphire.pdf](https://www.abbott.ch/fileadmin/docs/ADD/1_Systeme_und_Tests/2012_add_001I_7_AD024_3EU2011_CELL-DYN_Sapphire.pdf)>

#### 10.4 Sistema Abx<sup>®</sup> Modelo Pentra Dx 120

A tecnologia utilizada pelos contadores da ABX, em especial o Pentra DX 120, baseia-se em seis métodos de análise que incluem, isolada ou simultaneamente, a impedância, a fotometria, a citometria de fluxo, a fluorometria, a citoquímica e o sistema DHSS. A contagem global de células é feita por impedância e fotometria (dosagem de hemoglobina), a contagem diferencial de leucócitos é feita simultaneamente através da impedância, citometria de fluxo, citoquímica e DHSS (OLIVEIRA, 2007).

##### Sistema DHSS

Trata-se de uma patente da ABX para a contagem diferencial de leucócitos baseada em um sistema sequencial hidrodinâmico duplo que permite medir o volume da célula e seu conteúdo em um único fluxo celular (ARROYO et al., 2005).

Um dispositivo de tempo é aplicado em duas contagens em um mesmo fluxo contínuo, em momentos distintos, dessa forma a passagem da célula pelo sistema de abertura de impedância elétrica é combinada com sua passagem posterior através de um feixe de luz, este faz a absorção da célula (em um período de tempo menor) e determina o seu conteúdo. Este

tempo reduzido evita por exemplo a contagem de bolhas, resultando em uma diferenciação mais exata entre as células (OLIVEIRA, 2007).

### 11.5 Sistema Bayer® Modelo Advia 120

#### Dosagem de hemoglobina

O sangue que foi aspirado é diluído com a solução de óxido de dimetil lauril amina a 2% (agente surfactante) e cianeto de potássio em solução alcalina de borato em pH 11,3 para que os eritrócitos sejam lisados liberando a hemoglobina (ADVIA 120 HEMATOL. SIST., 2014). Quando são lisados, ocorre a emulsificação dos restos celulares deixando o meio reacional turvo. Assim após a lise a hemoglobina é liberada e por conseguinte é desnaturada formando a cianometahemoglobina que pode ser medida fotocolorimetricamente (OLIVEIRA, 2007).

#### Contagem de eritrócitos e plaquetas

É determinado com base no sinal laser de neon hélio disperso a baixo ângulos ( $2^\circ$  e  $3^\circ$  graus). A concentração interna de Hb e índice de refração das plaquetas são determinadas com base no sinal de luz disperso a ângulos altos ( $5^\circ$  a  $15^\circ$ ) (OLIVEIRA, 2007).

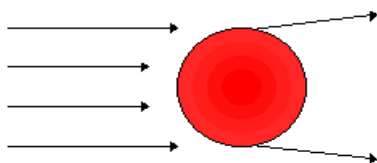


Figura 27: Contagem de eritrócitos

e plaquetas por angulação

Fonte: ADVIA 120, 2014.

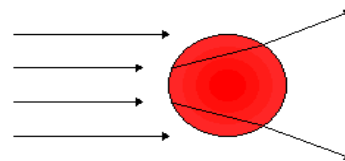


Figura 28: Contagem de eritrócitos

e plaquetas por angulação

Fonte: ADVIA 120, 2014.

A análise das plaquetas o sistema Advia 120 tem como princípio um sistema 2D de análise bidimensional que se baseia na análise integrada das medições de eritrócitos e plaquetas. O sangue aspirado é diluído e ocorre a transformação dos eritrócitos e plaquetas em esferas. A diferenciação das plaquetas das demais células é feita através de estudo comparativo entre a dispersão de luz em baixos e altos ângulos. O citograma mostra as

plaquetas de 0 a 30 fL (OLIVEIRA, 2007; ADVIA 120, 2014). Com base na teoria de Mie de dispersão de luz para esferas homogêneas, os sinais de dispersão da luz de baixo ângulo e de alto ângulo para cada célula são transformados em volume e valores de índice de refração (ADVIA 120, 2014).

#### Canal WBC/Perox

Nesse canal é feita a contagem global de leucócitos e também a contagem diferencial (monócitos, linfócitos, basófilos, neutrófilos e eosinófilos). Na primeira fase é utilizado o agente peroxidase 1 (duodecilsulfato de sódio - SDS) formaldeído e sorbitol diluídos em um tampão. O SDS causa a lise dos eritrócitos enquanto que o formaldeído + sorbitol causa a desidratação e fixação dos leucócitos (OLIVEIRA, 2007).

#### Canal WBC/baso e lobularidade

No canal da contagem dos basófilos e da lobularidade celular é utilizado o reagente (uma mistura que combina solução ácida - ácido hidrocloreídico e ácido pitálico- com um surfactante – reagente lítico de pH extremamente baixo) que lisa os eritrócitos as plaquetas e destrói o citoplasma de todos os leucócitos, exceto o dos basófilos (OLIVEIRA, 2007).

## **11 ALARMES SINALIZADOS PELOS CONTADORES AUTOMÁTICOS**

Apesar do grande avanço tecnológico da área da hematologia, na maioria das vezes a observação microscópica da distensão sanguínea é necessária, tendo em vista que alguns equipamentos ainda não diferenciam determinados tipos ou alterações celulares, como neutrófilos mais jovens ou "bastonetes", inclusões citoplasmáticas e vacuolizações citoplasmáticas, dentre outras alterações onde estes limitam-se apenas a emitir alarmes ou flags sobre possíveis ocorrências (BORGES; SIQUEIRA, 2009).

Assim, a liberação direta dos resultados do exame somente é possível para hemogramas normais, sem nenhuma presença de alteração. Os resultados com flags, não dispensam a revisão da lâmina por um profissional capacitado e experiente para realizar este serviço (BORGES; SIQUEIRA, 2009).

A sensibilidade da automação na detecção das anormalidades, bem como a confiança na liberação destes resultados somente é possível se o aparelho estiver bem calibrado, desta

forma a manutenção, o monitoramento dos aparelhos, como calibrações e análises de amostras controle, é de extrema importância na rotina laboratorial (PINTO, 2007).

## 12. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 12.1 Análise do eritrograma

O eritrograma é um exame que avalia a série vermelha do sangue, ou seja onde é feita a contagem dos eritrócitos. Nos equipamentos automáticos a contagem dos eritrócitos é realizada no mesmo canal da contagem das plaquetas, a diferenciação entre ambos é feita com base no volume. No eritrograma são avaliados vários parâmetros, tais como: hemácias, hematócrito, hemoglobina, e índices hematimétricos que são VCM, HCM, CHCM e RDW (HENRY, 2008).

**Tabela I: Parâmetros e metodologias do eritrograma para hemoglobina, hematócrito e hemácia por diferentes equipamentos automatizados hematológicos.**

<u>EQUIPAMENTOS</u>	<u>PARÂMETROS e METODOLOGIAS</u>		
	<u>Hb</u>	<u>Ht</u>	<u>Hm</u>
Beckman Coulter (Coulter Gen S LH-750)	Método colorimétrico (cianeto)	Cálculo	Impedância
Sysmex (XE 2100, XE 2000)	Método colorimétrico (lauril sulfato de sódio)	Determinado	Impedância com foco hidrodinâmico
Abbott (Cell-Dyn Sapphire, Cell- Dyn 3000)	Método colorimétrico (cianeto)	Cálculo	Impedância com foco hidrodinâmico e citometria de fluxo
ABX (Pentra DX- 120)	Método colorimétrico (cianeto)	Cálculo	Impedância sem foco hidrodinâmico
Bayer (Advia 120)	Método colorimétrico	Cálculo	Impedância com foco hidrodinâmico e pelo Canal óptico (luz a laser de neon hélio);



	(dimetil lauril amina)		
--	------------------------	--	--

Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito, Hm: hemácia.

Nos equipamentos Coulter® (Gen S™, LH-750), Sysmex® (XE 2100, XE 2000), Abbot Diagnostics® (Cell-Dyn Sapphire), ABX (Pentra DX-120), e Bayer® (Advia-120), a contagem de eritrócitos é feita pelo método da impedância, sendo realizada no mesmo canal das plaquetas. De todos os instrumentos estudados, a diferença entre os eritrócitos e plaquetas está justamente no tamanho celular, onde as células com até 20fL eram creditadas como plaquetas e células com mais de 20fL eram creditadas como eritrócitos (BAIN, 2006).

### **HEMÁCIA**

Todos as hemácias das máquinas são contadas pela impedância, porém o Advia 120 possui um sistema óptico detector de luz laser para contar os eritrócitos. Nestes contadores, os eritrócitos são convertidos em esferas de patente da Bayer, que proporciona uma mais acurada contagem das células sanguíneas (OLIVEIRA, 2007).

### **HEMOGLOBINA**

A dosagem da hemoglobina possui similaridades quanto a utilização do reagente cianeto nos equipamentos Beckman Coulter, Abbott e ABX (tabela 1) já o equipamento da Bayer utiliza o dimetil lauril amina, o da Sysmex utiliza o reagente lauril sulfato de sódio, estes dois últimos reagentes apresentam a vantagem quando comparados com o cianeto, pois eles atuam como um agente surfactante causando a hemólise dos eritrócitos e leucócitos e também a emulsificação dos restos celulares e lípides plasmáticos (OLIVEIRA, 2007)

Nos equipamentos da Beckman Coulter® (Gen S™, LH-750), Abbot Diagnostics® (modelos antigos: Cell- Dyn 3000) e ABX Pentra DX-120, a dosagem da hemoglobina é realizada no mesmo canal da contagem dos leucócitos, por isso que não é possível que seja utilizado um reagente que possa lisar simultaneamente os leucócitos e/ou digerir os lípides em excesso. Enquanto que nos contadores da Sysmex (XE 2100), Abbot Diagnostics® (Cell-Dyn Sapphire) e Bayer (Advia-120) difere dos demais contadores por possuir um canal específico para a dosagem de Hb (OLIVEIRA, 2007).

O contador Advia-120 possui a capacidade de fazer a determinação da concentração interna de hemoglobina de cada eritrócito, o que permitiu a determinação direta da CHCM por

laser. Além disso, o fato de converter isovolumetricamente os eritrócitos em esferas, permite uma acurada e precisa determinação do volume e da concentração de hemoglobina (OLIVEIRA, 2007).

### **HEMATÓCRITO**

Com relação ao hematócrito, todos os equipamentos fazem o cálculo através da fórmula de Wintrobe  $VCM = HcT \times 10/RBC$ , entretanto no equipamento Sysmex XE-2100 o Hct é determinado e não calculado, ou seja ele é obtido como a soma dos pulsos de todos os eritrócitos conferidos (somatório de todos os volumes de todos os eritrócitos contados) no volume da amostra analisada que corresponde a 100% (OLIVEIRA, 2007).

### **ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS**

Após a avaliação das células no canal RBC/PLT, são determinados o número de eritrócitos e plaquetas e são fornecidos os histogramas – curva de distribuição das células por volume e por concentração de hemoglobina para RBC e PLT que são ajustados para uma curva de distribuição log normal (curva de Gauss) para a obtenção de parâmetros de tamanho como: VCM, RDW, HcT. Quando surgem alterações morfológicas são emitidos alarmes (flags), o que obriga o profissional do laboratório a rever a distensão sanguínea (OLIVEIRA, 2007).

**Tabela II: Parâmetros e metodologias de eritrograma para índices hematimétricos por diferentes equipamentos automatizados hematológicos.**

	<b><u>PARÂMETROS e METODOLOGIAS</u></b>			
<b><u>EQUIPAMENTOS</u></b>	VCM,	HCM	CHCM	RDW
Beckman Coulter (Coulter Gen S LH-750)	Cálculo	Cálculo	Cálculo	Medido
Sysmex (XE 2100, XE 2000)	Cálculo	Cálculo	Cálculo	Medido
Abbott (Cell-Dyn Sapphire)	Cálculo	Cálculo	Cálculo	Medido
ABX	Cálculo	Cálculo	Cálculo	Medido
Bayer (Advia 120)	Cálculo	Derivada do	Derivada do	Medido

		laser	laser	
--	--	-------	-------	--

RDW – SD: red blood cel distribution width (amplitude de distribuição do volume dos eritrócitos com base no desvio padrão), CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, VCM: volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média (HCM),

O VCM em todos os equipamentos estudados é calculado através da impedância elétrica ou dispersão óptica. Onde cada eritrócito que passa por uma abertura emite um sinal elétrico que é contado e simultaneamente tem seu volume medido, assim a soma de todos os volumes, dividido pelo número de eritrócitos contados será o VCM (OLIVEIRA, 2007).

Nos instrumentos Coulter (Gen S e LH-750), Sysmex® (XE 2100, XE 2000), Abbot Diagnostics® (Cell-Dyn Sapphire), ABX (Pentra DX-120) a determinação do VCM e da contagem dos eritrócitos deriva do Hct, enquanto que a HCM é obtida por meio de cálculos em todos os equipamentos estudados, exceto para o Advia 120 que realiza a dosagem do HCM através do laser (OLIVEIRA; BAIN, 2007).

No Advia 120, a HCM é obtida como média do conteúdo de hemoglobina (CH) de cada eritrócito, assim a CH é obtida como produto da concentração de hemoglobina de cada eritrócito pelo seu volume correspondente. De posse da CH de cada eritrócito é calculado a HCM derivada do laser como média (OLIVEIRA, 2007).

A CHCM é obtida por meio de cálculos com exceção do Advia 120 que além de fazer a CHCM indireta pela fórmula de Wintrobe, conseguem medir por laser a concentração interna de Hb em cada eritrócito, desta forma faz um somatório e divide-o pelo número de eritrócitos contados, o resultado corresponde a CHCM direta (OLIVEIRA; FAILACE, 2007).

A variação de tamanho dos eritrócitos é mensurado através do (RDW) e colocado na forma de um histograma (BAIN, 2007). O RDW é um valor obtido diretamente do analisador por medir o grau de difusão da luz através das partículas entre 360 e 36 fL. A difusão da luz é afetada pela forma e tamanho dos eritrócitos. Por esta razão, todas as células são uniformizadas de forma esférica, fazendo com que somente um fator afete a difusão de luz, que é o tamanho das células (FAILACE, 2007).

## 12.2 Análise do leucograma

O leucograma consiste da parte do hemograma onde são analisados os leucócitos, as células de defesa do organismo. Atualmente a grande maioria das contagens totais e

diferenciais de leucócitos é feita em equipamento automático onde são classificados em cinco categorias: neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos (BAIN, 2007).

**Tabela III: Parâmetros e metodologias de leucograma por diferentes equipamentos automatizados hematológicos.**

<b>PARÂMETROS e METODOLOGIAS</b>					
<b>EQUIPAMENTOS</b>	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos,	Monócitos	Basófilos
Beckman Coulter (A T 5diff , Gen S™)	Impedância; Radiofrequência; Canal óptico (luz a laser de neon hélio); Citometria de fluxo; VCS; Foco hidrodinâmico.	Impedância; Radiofrequência; Canal óptico (luz a laser de neon hélio); Citometria de fluxo; VCS; Foco hidrodinâmico.	Impedância; Radiofrequência; Canal óptico (luz a laser de neon hélio); Citometria de fluxo; VCS; Foco hidrodinâmico.	Impedância; Radiofrequência; Canal óptico (luz a laser de neon hélio); Citometria de fluxo; VCS; Foco hidrodinâmico.	Impedância; Radiofrequência; Canal óptico (luz a laser de neon hélio); Citometria de fluxo; VCS; Foco hidrodinâmico.
Sysmex (XE 2100)	Impedância; Radiofrequência; DC (corrente direta); Citometria de fluxo;	Impedância; Radiofrequência; DC (corrente direta); Citometria de fluxo;	Impedância; Radiofrequência; DC (corrente direta); Citometria de fluxo;	Impedância; Radiofrequência; DC (corrente direta); Citometria de fluxo;	Impedância; Radiofrequência; DC (corrente direta); Citometria de fluxo; Baso-lobularidade
Abbott (Cell-Dyn Sapphire)	Impedância; Citometria de fluxo; Dispersão de luz e fluorescência; Canal óptico (MAPSS);	Impedância; Citometria de fluxo; Dispersão de luz e fluorescência; Canal óptico (MAPSS);	Impedância; Citometria de fluxo; Dispersão de luz e fluorescência; Canal óptico (MAPSS);	Impedância; Citometria de fluxo; Dispersão de luz e fluorescência; Canal óptico (MAPSS);	Impedância; Citometria de fluxo; Dispersão de luz e fluorescência; Canal óptico (MAPSS);
Horiba (Pentra 120)	Impedância; Citometria de fluxo; Transdutor de sinal óptico e um detector de abertura acoplados em sistema de foco hidrodinâmico (Sistema DHSS); Canal óptico (DHSS) Citoquímica;	Impedância; Citometria de fluxo; Transdutor de sinal óptico e um detector de abertura acoplados em sistema de foco hidrodinâmico (Sistema DHSS); Canal óptico (DHSS) Citoquímica;	Impedância; Citometria de fluxo; Transdutor de sinal óptico e um detector de abertura acoplados em sistema de foco hidrodinâmico (Sistema DHSS); Canal óptico (DHSS) Citoquímica;	Impedância; Citometria de fluxo; Transdutor de sinal óptico e um detector de abertura acoplados em sistema de foco hidrodinâmico (Sistema DHSS); Canal óptico (DHSS) Citoquímica;	Impedância; Citometria de fluxo; Transdutor de sinal óptico e um detector de abertura acoplados em sistema de foco hidrodinâmico (Sistema DHSS); Canal óptico (DHSS) Citoquímica;  Baso-lobularidade
Bayer (Advia 120)	Impedância; Citometria de fluxo; Citoquímica/peroxidase ; Óptico	Impedância; Citometria de fluxo; Citoquímica/peroxi dase; Óptico	Impedância; Citometria de fluxo; Citoquímica/peroxi dase; Óptico	Impedância; Citometria de fluxo; Citoquímica/pero xidase; Óptico	Impedância; Citometria de fluxo; Citoquímica/peroxidas e; Óptico  Baso-lobularidade

VCS: Volume, Condutividade, Scatter; DHSS: double hydrodynamic sequential system; MAPSS: multi angle polarized scatter separation.

O princípio da impedância juntamente com a citometria de fluxo é também uma metodologia utilizada pelos contadores hematológicos para a contagem de leucócitos, como

para os modelos: Coulter (A T 5diff , Gen S<sup>TM</sup> ), Roche Diagnostics® , (Sysmex XE 2100), Abbot Diagnostics® ( Cell-Dyn Sapphire), Bayer Advia-120.

O leucograma feito pelos instrumentos da Beckman-Coulter analisa os leucócitos e os diferencia através da tecnologia VCS, onde V representa o volume medido por impedância, C a condutividade em frequência de ondas de rádio (radiofrequência), e S é o laser scatter (FAILACE, 2007). O instrumento da Beckman-Coulter, o contador A T 5diff fornece os cinco elementos diferenciais de leucócitos através de dois canais: a contagem de leucócitos e de basófilos são feitas por impedância após lise diferencial, os basófilos são mais resistentes à perda do citoplasma em meio ácido. Os outros elementos são identificados no segundo canal, com uma combinação da medida de volume (impedância) e citoquímica e absorvância (negroclorazol). Esse corante liga-se aos grânulos do eosinófilo fortemente, neutrófilos (de modo intermediário) e dos monócitos (fracamente), sendo que os linfócitos não se coram (BACALL, 2009).

O equipamento XE-2100 apresenta a inovação tecnológica do sistema corrente direta (dc) e sem foco hidrodinâmico. Os instrumentos da Sysmex que incorporam citometria de fluxo fluorescente com fluorescência nos múltiplos canais fornecem a contagem diferencial através do laser, corrente contínua para impedância e corrente em radiofrequência para determinar a estrutura interna das células. (BACALL, 2009).

Desta forma, os leucócitos são permeabilizados para que o DNA e RNA da célula sejam marcados por uma cor fluorescente. A partir disto, então, as células são categorizadas de acordo com o seu “side scattered” (dispersão lateral) e a intensidade da fluorescência. O diferencial de leucócitos é feito em 5 populações: linfócitos, monócitos , eosinófilos e neutrófilos e basófilos (NASCIMENTO, 2006).

Os contadores da Horiba (Pentra XD-120), da Abbott (Cell-Dyn Sapphire), e da Bayer (Advia-120) utilizam a metodologia óptica pra detectar leucócitos. Nos contadores da marca Horiba, possui um transdutor de sinal óptico e um detector de abertura de impedância acoplados em um sistema de foco hidrodinâmico, mais conhecido como sistema DHSS (*double hydrodynamic sequential system*) – sistema sequencial hidrodinâmico duplo. Nesse sistema o foco hidrodinâmico limita a zona de sensibilidade de volumes, fazendo com que as células que passam pelos detectores sejam contadas de modo exato e tenham mensurados seus pulsos elétricos de baixa frequência e seus caracteres ópticos. Ou seja, este sistema permite a contagem e a definição dos volumes leucocitários, e a transmissão óptica determina a complexidade interna da célula. O sistema DHSS inclui a impedância para medir o volume e

citometria celular que por meio da absorção de luz halogênica, mede a complexidade interna da célula, associado a um sistema de citoquímica (OLIVEIRA, 2007).

Neste sistema, o foco hidrodinâmico é utilizado para reduzir o fluxo da amostra para 25µm de diâmetro. Uma fonte de hélio neon é utilizada como fonte emissora de luz, e cada célula é caracterizada individualmente através de quatro ângulos específicos: 0 grau, 10 grau, 90 graus polarizado e 90 graus despolarizados que são capazes de avaliar simultaneamente o tamanho, a complexidade interna, a dispersão de luz polarizada e despolarizada respectivamente. Além disso, os dois primeiros ângulos diferenciam os monócitos, linfócitos e neutrófilos enquanto que os dois últimos diferenciam os eosinófilos e basófilos (OLIVEIRA, 2007).

O contador Cell-Dyn Sapphire, traz também uma tecnologia para a contagem diferencial em cinco partes através do canal óptico (MAPSS). A tecnologia MAPSS usa fluorescência ligada em 3 cores para aumentar a quantidade de resultados reportados na primeira passagem, incluindo eritroblastos e células envelhecidas ou não viáveis (ABBOTT, 2014). Na impedância, apesar desse sistema não utilizar o foco hidrodinâmico, a abertura utiliza um transdutor patenteado pela própria empresa (placa transdutora de Von Behrens) que evita a reentrada de células na zona de contagem. O sistema MAPSS trata-se de um sistema de separação dos tipos celulares através de múltiplos ângulos para detecção de luz polarizada. (LEHTO & HEDBERG, 2007).

O modelo Advia-120, traz a inovação na análise dos leucócitos uma vez que o método de análise consiste em duas fases de reações citoquímicas utilizando três reagentes peroxidase distintos. Na primeira fase, uma parte da amostra é diluída com o reagente peroxidase 1 (contém duodecilsulfato de sódio – SDS, formaldeído e sorbitol). O formaldeído + sorbitol causa a desidratação e fixação dos leucócitos e o SDS causa a lise dos eritrócitos. Na segunda fase, são utilizados os reagentes peroxidase 2 (4-cloro-1-naftol) e 3 (peróxido de hidrogênio) que não formam nenhum precipitado escuro nos linfócitos, nos monócitos que possuem atividade peroxidase, formam-se pequenos precipitados, já os eosinófilos e neutrófilos formam precipitados mais escuros (OLIVEIRA, 2007).

O Advia 120 possui um parâmetro diferenciado dos demais equipamentos que está associado à contagem diferencial a quantificação do percentual de linfócitos e blastos atípicos. Não sofre interferência das hiperleucocitoses, expandiu a linearidade da contagem de leucócitos 200 a 400.00/mm<sup>3</sup>. Para a análise da amostra sanguínea o contador faz a divisão em canais distintos canal WBC/Perox e canal WBC/baso-lobularidade (OLIVEIRA, 2007).

O XE 2100, o Pentra DX-120, o Advia-120 realizam a contagem de basófilos e lobularidade celular utilizando um reagente que lisa os eritrócitos, plaquetas e destrói o citoplasma de todos os leucócitos com exceção dos basófilos. A amostra diluída passa por um sistema de abertura de impedância simples no qual os basófilos são contados (OLIVEIRA, 2007).

O Cell-Dyn Sapphire além da impedância e da citometria de fluxo, traz a inovação da contagem pelo sistema óptico MAPSS que analisa o tamanho, a complexidade interna, a dispersão de luz polarizada e despolarizada, promovendo desta forma uma análise mais detalhada da célula, gerando resultados mais confiáveis. Enquanto isso o modelo Pentra DX-120 apresenta a inovação do sistema DHSS, tratando-se de um sistema sequencial hidrodinâmico duplo, em que diferentemente dos demais contadores, este sistema permite medir o volume da célula e seu conteúdo em um único fluxo celular (OLIVEIRA, 2007).

### 12.3 Análise do plaquetograma

**Tabela IV: Análise das plaquetas, volume plaquetário médio e amplitude de distribuição das plaquetas feita pelos equipamentos automatizados hematológicos.**

	<u>PARÂMETROS e METODOLOGIAS</u>		
<u>EQUIPAMENTOS</u>	PLT,	VPM,	PDW
Beckman Coulter (Coulter LH-750, T-890)	Impedância	Impedância	Impedância
Sysmex	Impedância com foco hidrodinâmico. Óptico	Impedância com foco hidrodinâmico.	Impedância com foco hidrodinâmico.
Abbott (Cell-Dyn Sapphire)	Impedância	Impedância	Impedância
Horiba (Pentra 120)	Impedância sem foco hidrodinâmico	Impedância sem foco hidrodinâmico	Impedância sem foco hidrodinâmico
Bayer (Advia 120)	Impedância; Óptico (laser)	Impedância; Óptico (laser)	Impedância; Óptico (laser)

PLT: plaquetas; VPM: volume plaquetário médio; PDW: paked cel distribution width - amplitude de distribuição (volumétrica) das plaquetas.

Os equipamentos e modelos (tabela 4) apresentam semelhanças na metodologia empregada pra contar as plaquetas, visto que todos realizam a contagem das plaquetas por meio da impedância. Outra semelhança encontrada entre os aparelhos foi que em todos a

contagem das plaquetas é feita no mesmo canal dos eritrócitos e também as células abaixo de 20fL eram consignadas como plaquetas enquanto que as células acima de 20fL eram consignadas como eritrócitos. Alguns além da impedância possuem alguns requisitos a mais para aperfeiçoar a contagem, gerando um diferencial entre as máquinas (OLIVEIRA, 2007).

Como exemplo de contadores hematológicos que utilizam o princípio da impedância para a contagem de plaquetas temos os equipamentos Coulter (T-890 , S-Plus, MAX-MTM, STKSTM e Gen STM ), Roche Diagnostics® , (Sysmex XT 2000i , XE 2100D, XE-5000), Abbot Diagnostics® ( Cell-Dyn 4000 e Sapphire). No equipamento Pentra DX 120 da ABX/Horiba a contagem de plaquetas é feita no mesmo canal dos eritrócitos porém a contagem é feita por meio da impedância sem o foco hidrodinâmico, assim a edição de pulsos é feita apenas para os sinais elétricos de trajetória axial de modo a evitar que células que possam ter recirculado na zona de contagem sejam eliminados (OLIVEIRA, 2007).

Já os contadores como o Technicon® H-6000 e Bayer® Advia 120 utilizam além da impedância o princípio óptico para a contagem de plaquetas (COMAR; SILVA, 2009) No Advia-120 as plaquetas são transformadas em esferas em seguida são submetidas ao laser e a luz dispersa é convertida em volume e índice de refração (BAIN, 2007). Entretanto, possui um sistema duplo (impedância + óptico) para avaliação das plaquetas, fato que permitiu uma melhor diferenciação entre as partículas plaquetárias e as não plaquetárias, garantindo uma maior segurança nas contagens de amostras plaquetopênicas, além de avaliar o volume e o índice de refração das plaquetas. Possui também alertas decorrentes da presença de plaquetas anormais ou atípicas, por aumento de tamanho ou fragmentação que são minimizados pelo uso da contagem óptica (OLIVEIRA, 2007).

Os contadores automáticos ADVIA-120, Coulter STKS, H1 System (Technicom-Bayer) e Coulter T-890 demonstraram boa precisão e exatidão em amostras plaquetopênicas obtidas em laboratório de hematologia a partir de amostras normais. Apenas o ADVIA-120, que utiliza dois princípios de contagem (volume e índice de refração), demonstrou boa correlação com o método de referência recomendado pelo Comitê Internacional de Estandarização em Hematologia (ICSH, 1984/1988) para as amostras dos pacientes trombocitopênicos ( $r = 0,947$ ). Entretanto, todos os aparelhos pediram nova contagem de plaquetas (flags) para as amostras trombocitopênicas (COMAR; SILVA, 2009).

O método mais recentemente desenvolvido para contagem de plaquetas utiliza anticorpos monoclonais específicos e fluorescentes contra as glicoproteínas da superfície da membrana plaquetária, CD41 (GPIIa) e CD61 (GPIIIa), conjuntamente com análise através de citometria de fluxo (BAIN et al., 2006). Atualmente, o analisador hematológico comercialmente disponível que oferece esta tecnologia é o Cell-Dyn Sapphire . Este método



tem demonstrado ótima precisão e exatidão na contagem de plaquetas, especialmente em amostras trombocitopênicas, e tem sido proposto pela ISLH (International Society for Laboratory Hematology) como o novo método de referência (LEWIS, 2006; BRIGGS, 2007). O XE-5000 utiliza a fluorescência, mas sem a presença de monoclonais.

Cuidados devem ser tomados quando se compara dois contadores diferentes, pois existem diversos valores de referência empregados pelas máquinas e que podem não coincidirem entre si. Estas diferenças podem ser ilustradas pela comparação entre os intervalos de referência entre os contadores Sysmex e Technicon, onde os valores de referência para o PDW e VPM são respectivamente 8 a 13fL e 9 a 14fL (para o contador Sysmex) e 7,4 a 11,2fL e 44 a 56% (para os contadores Technicon) (COMAR; SILVA, 2009).

### 13. CONCLUSÃO

No passado, os exames laboratoriais eram realizados de modo artesanal, com a utilização de técnicas manuais, as quais tinham um componente maior de variação. Além disto, os métodos laboratoriais eram desprovidos de uma padronização capaz de garantir a sua exatidão, dificultando sobremaneira a comparação dos resultados observados em diferentes laboratórios.

Nos dias atuais, a rapidez e a qualidade tornaram-se itens fundamentais na liberação de laudos de exames laboratoriais. A realização do hemograma automatizado com contagem diferencial de leucócitos foi um avanço para os laboratórios, uma vez que aumentou a capacidade de produção do mesmo, permitindo maior agilidade na entrega de resultados ao paciente. Vale ressaltar também que os equipamentos atuais utilizam metodologias combinadas para diferenciação e quantificação celular, trabalhando com menor volume de amostra, analisando uma maior quantidade de parâmetros em menor tempo.

De acordo com as diferentes metodologias empregadas para a realização do hemograma observa-se que dentre os equipamentos estudados entre eles o Coulter (T-890 , S-Plus, MAX-M<sup>TM</sup>, STKS<sup>TM</sup> e Gen S<sup>TM</sup>), Roche Diagnostics® , (Sysmex XT 2000i , XE 2100D, XE-5000), Abbot Diagnostics® (Cell-Dyn 4000 e Sapphire), observa-se que a maioria utiliza a impedância e citometria de fluxo para identificar as células sanguíneas, sejam elas eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A diferença entre um e outro equipamento está no fato de alguns possuírem algum tipo de parâmetro que avalia de modo mais detalhado as células sanguíneas.

Com isso pode-se concluir que todas as máquinas desempenham funções semelhantes entre si, ou seja, contar células e classificá-las de acordo com o seu tamanho e grau de complexidade interna (granulosidade). Dessa forma, a automação dos equipamentos hematológicos é uma ferramenta que veio para auxiliar o profissional dentro do laboratório de análises clínicas. Os efeitos trazidos pela automação mudaram a rotina dos laboratórios, tornando-os mais eficientes e ágeis, além de apresentarem uma melhor qualidade nos resultados.

A automação permitiu ao laboratório melhorar a precisão dos ensaios. Os instrumentos automatizados são projetados para realizar funções repetitivas sem erros nos resultados, se os equipamentos tiverem manutenção adequada. Dessa forma, os equipamentos automatizados são projetados para contar e medir o tamanho da célula, sendo assim, capazes de identificar e diferenciar cada tipo de célula sanguínea como por exemplo neutrófilos, eosinófilos, monócitos e bastão através de suas estruturas celulares.

Os analisadores automatizados permitem aos laboratórios processar um grande volume de exames muito rapidamente. Centenas de exames podem ser realizados em uma hora por esses analisadores automatizados. Esse aumento na resolução dos exames tem sido possível porque muitas das etapas manuais tornaram-se automatizadas

O processo de implantação de modelos automáticos nos exames laboratoriais traz credibilidade para o profissional que utiliza deste serviço e para os clientes que são beneficiados com este se o manuseio do equipamento for feito de maneira correta, por profissionais capacitados, além disto, deve ser feita a devida manutenção do equipamento com o uso dos calibradores e também a padronização dos serviços prestados.

## REFERÊNCIAS

ALFADHLI, S.M; AL-AWADHI, A.M; ALKHALDI, D. Validity assessment of nine discriminant functions used for the differentiation between iron deficiency anemia and thalassemia minor. **Journal of Tropical Pediatrics**, 2007.

ARROYO, M.E. Analytic Performance of the PENTRA 80 Automated Blood Cell Analyzer for the Evaluation of Normal and Pathologic WBCs. **American Society for Clinical Pathology**, 2005.

ADVIA 120 HEMATOLOGY SYSTEM Disponível em:  
<<http://www.healthcare.siemens.com/hematology/systems/advia-120-hematology-system>>  
Acesso em 5 dez 2014

BACALL, N.S.; Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos. **Revista brasileira de hematologia**, 2009.

BAIN, B.J. **Células sanguíneas: um guia prático**. 4º ed, Artmed, São Paulo, 2006.

BARBOSA, F.T.; CUNHA, R.M.; BARBOSA, L.T. Doença de von Willebrand e anestesia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, 2007.

BRIGGS, C; HARRISON, P; MACHIN, S.J. Continuing developments with the automated platelet count. **International Journal of Laboratory Hematology**, 2007.

BORGES, L.F.; SIQUEIRA, L.O.; Validação de tecnologia 5diff do analisador hematológico Sysmex XS-1000i para laboratório de pequeno/médio porte. **Revista brasileira de hemograma e hemoterapia**, 2009.

BOTTINI, P. V.; GARLIPP, C. R.; Urinálise: comparação entre microscopia óptica e citometria de fluxo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2006.

BARBOSA, D.L.; ARRUDA, I.K.G; DINIZ, A.S. Prevalência e caracterização da anemia em idosos do Programa de Saúde da Família. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, 2006.

BECKMAN COULTER. Disponível em: <<https://www.beckmancoulter.com>> Acesso em: 2 dez 2014.

BOURNER G, DHALIWAL J, SUMNER J. Performance evaluation of the latest fully automated hematology analyzers in a large, commercial laboratory setting: a 4-way, side-by-side study. **Laboratório de Hematologia**, 2005.

CARVALHO, M.C et al. Anemia Ferropriva e Anemia de Doença Crônica: Distúrbios do metabolismo do ferro. **Revista Segurança alimentar e nutricional**, Campinas, 2006.

CARVALHO, W.F. **Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia**. 6º edição – Belo Horizonte: COOPMED ed, 1994.

CAVALCANTI, A.S. **Manual do paciente: Leucemia mielóide crônica**. HEMORIO, 2009.

COMAR, S.R.; DANCHURA, H.S.M.; SILVA, P.H. Determinação laboratorial e aplicação clínica dos parâmetros de volume plaquetário. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 2009.

COMAR, S.R.; DANCHURA, H.S.M.; SILVA, P.H. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.31, n 6, 2009.

DIAGNOCEL. Disponível em: <<http://diagnocel.com.br/produtos/hematologia/hematologia/cell-dyn-sapphire> > Acesso em 01/12/2014.

DUSSE L.M.S; VIEIRA, L.M; CARVALHO, M.G. Pseudotrombocitopenia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2004.

FAILACE, Rafael; PRANKE, Patrícia. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de hemogramas através de contadores eletrônicos. **Revista brasileira de hematologia**, 2009.

FAILACE, Renato et al . **Hemograma: manual de interpretação**. 5 ed, Porto alegre: Artmed, 2009.

FERRAZ, S.T et al. Anemia Ferropriva na infância: uma revisão para profissionais da atenção básica. **Revista de Atenção Primária a Saúde**, 2011.

FIGUEIREDO, M.S; VICARI P. **Diagnóstico Diferencial das Anemias**. In: Lopes AC, editor. Tratado de Clínica Médica. 1ª ed. São Paulo: Rocca, 2006.

FORTES, E.A.M. **MORFOLOGIA, ERITROGRAMA E LEUCOGRAMA DO SANGUE PERIFÉRICO DE EMA (Rhea americana, Linnaeus, 1758)**, Piauí, 2004.

FREITAS, R. Estudo Comparativo entre dois métodos para determinação do hematócrito. **XI seminário de extensão da metodista**, 2012.

FUNKE, V.M. et al. Leucemia mieloide crônica e outras doenças mieloproliferativas crônicas. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, [S.I.], 2010.

GOMES, K.R. et al. Avaliação do hematócrito e da proteína plasmática em sangues hemodiluídos. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, 2007.

GROTTO, H.Z.W. O hemograma: importância para a interpretação da biópsia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.I.] 2009.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. Patologia clínica veterinária: texto introdutório. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2008.

HANDIN, R.I. et al. Sangramento e Trombose. **Harrison Medicina Interna**, 15ª Ed, Rio de Janeiro, 2002.

HARR, K.E. et al. Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons. **Veterinary Clinical Pathology**, Columbia, 2005.

HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20<sup>a</sup> ed. Barueri, São Paulo. 2008.

HOKAMA, N.K., MACHADO, P.E.A. Interpretação clínica do hemograma nas infecções. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, 1997.

HOFFMANN, L.P. et al. Avaliação dos índices hematimétricos emitidos pelos contadores hematológicos Pentra 120 Range e Sysmex XT-2000i. **Sociedade brasileira de análises clínicas**, 2007.

LEONART, M. S. S. A importância do controle de qualidade para a contagem de reticulócitos por métodos visual e automatizado. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, 2009.

LEWIS, S.M; BAIN, B.J; BATES I. Dacie and Lewis Practical Haematology. 10. ed., **Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier**, 2006.

LIMA O.A. et al. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**, 1992.

LORENZI, F. T. **Manual de Hematologia**. Editora MEDSI, Rio de Janeiro, 2003.

LUCARINI, A.C.; SILVA, L.A.; BIANCHI, R.A.C.; Um sistema para a contagem semi-automática de microorganismos. **Revista pesquisa e tecnologia frei** N° 26, 2004.

MALOK, M et al., Comparison of two platelet count estimation methodologies for peripheral blood smears. **Clin Lab Sci.**, 2007.

MATOS, J. F et al. O papel do RDW, da morfologia eritrocitária e de parâmetros plaquetários na diferenciação entre anemias microcíticas e hipocrômicas. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia**, 2008.

MELO, S.K.M. et al., Índices hematimétricos e bioquímica sanguínea no cavalo de cavalgada em condições tropicais. **Companhia de Animais Brasileira**, Goiânia, 2013.

MESSIAS, J.B., et al. Parâmetros hematológicos de *Rattus norvegicus* obtidos através de método automatizado e não automatizado. **Medicina veterinária**, Recife, 2009.

MOURA, R.A. et al. **Técnicas de laboratório**. 3<sup>a</sup> ed., Ed. Atheneu, 1992

NASCIMENTO, et al. Utilização da Automação em Hematologia Sysmex 2100 Roche para a Contagem de Células do Líquido Cefalorraquidiano. **Ciência em movimento**, [S.I.], 2010.

NASCIMENTO, M.L.P. Importância do volume reticulocitário médio para a evidência da macrocitose. **NewsLab**, 2004.

NASCIMENTO, M.L.P.; A Hemodiluição da Gestação e os Indicadores para Anemias após Automação Hematológica. **NewsLab**, 2005.

NASCIMENTO, M.L.P.; SILVA, L.L. Comparação da frequência de morfologias eritrocitárias adquiridas entre as avaliações por automação e por estudo morfológico. **Labor News**, 2006.

National Research Council; Young e Freedman. Disponível em: <[issuu.com/miragempro/docs/mecatronica\\_atual\\_60](http://issuu.com/miragempro/docs/mecatronica_atual_60)> Acesso em: 15 dez 2014.

NETO, J.F.N.; JUNIOR, R.B.O.; Novas tecnologias em patologia clínica. **Revista GoldBook inovação em tecnologia e em educação em saúde**, 2012.

OLIVEIRA, C.A.; MENDES, M.E. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. 1<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: **Control Lab**, 2010.

OLIVEIRA, R.A.G.; **Hemograma: como fazer e interpretar**. São Paulo: livraria médica paulista editora, 2007.

OLIVEIRA, R.A.G et al. Is automated platelet counting still a problem in thrombocytopenic blood?. **Jornal online**, Sao Paulo, 2003.

PEDROSA, WILLIAM. **HERMES PARDINI. MANUAL DE EXAMES**. 2013/2014.



PIMENTA, LIDIANE. Anticoagulantes na prática clínica. **Labor News 227, News lab 108, Laes e Haes 194**, 2011.

PEREIRA, P.M. et al. Contagem de reticulócitos de cães saudáveis ou anêmicos pela citometria de fluxo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]**, 2008.

PINTO,

Relatório de hematologia: <<http://pt.scribd.com/doc/105027638/Relatorios-de-Hematologia-Hematocrito-Esfregaco-Sanguineo>> Acesso em 19/11/2014.

ROSENFELD, Ricardo. Hemograma. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, 2012

SACHS, L. The adventures of a biologist: prenatal diagnosis, hematopoiesis, leukemia, carcinogenesis and tumor suppression. **Advances in Cancer Research**, 1995.

SANTOS, M.E.; GALVÃO, T.; OLIVEIRA, A.L.M.; Tamanho de plaquetas e doença vascular. **NewsLab**, 2008.

SIMIONATTO, M. et al. Analysis of manual reticulocyte counting in Clinical Laboratories of Ponta Grossa and Campos Gerais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Paraná, 2009.

SAPPHIRE

Disponível

em:

<[https://www.abbott.ch/fileadmin/docs/ADD/1\\_Systeme\\_und\\_Tests/2012\\_add\\_001I\\_7\\_ADO243EU2011\\_CELL-DYN\\_Sapphire.pdf](https://www.abbott.ch/fileadmin/docs/ADD/1_Systeme_und_Tests/2012_add_001I_7_ADO243EU2011_CELL-DYN_Sapphire.pdf)> Acesso em: 10 jan 2015.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. **Fundamentals of analytical chemistry**. Saunders College Publishing, 7ª edição, 1995.

SYSMEX. Disponível em: <<https://www.sysmex.com>> Acesso em: 10 jan 2015.

SILVA, G.C. et al. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2006.

SILVA, P.F.N. et al., Correlação entre o hemocítômetro e outras técnicas de rotina para a contagem do número de plaquetas em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (H.V.-UEL). **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 4, p., out./dez. 2007.

SCHWEIRGERT, A. et al. Avaliação da contagem plaquetária pelo contador automático QBC Vet Autoread® comparado com estimativa em esfregaço sanguíneo e contagem em hemocítômetro. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, out./dez. 2010

SOUSA, W.M. Incidência de Protoparasitas Associados à Eosinofilia no Município de Brejo Santo, Ceará. **NewsLab**, 2014.

TAVARES-DIAS, M.; OLIVEIRA, S.R. A review of the blood coagulation system of fish. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, 2009.

TEFFERI, A. Anemia in adults: a contemporary approach to diagnosis. **Mayo Clin Proc.** 2003.

VELOSO et al. Avaliação dos critérios adotados no interfaceamento dos resultados dos hemogramas automatizados. **Revista saúde e ambiente**, 2011.

YAMAMOTO, M.; FIGUEIREDO, V. L. P.. Epidemiologia da leucemia linfocítica crônica e leucemia linfocítica crônica familiar. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2005

## ANEXOS

## ANEXO 1

CONTAGEM DAS CÉLULAS NO HEMOCITÔMETRO**Contagem manual de eritrócitos****Procedimento técnico**

1. Sangue total em EDTA;
2. Líquido diluidor\*;
3. Pipeta graduada de 5mL;
4. Frasco tipo penicilina;
5. Lenço de papel ou gaze;
6. Câmara de Neubauer com lamínula;
7. Microscópio óptico comum.

\*Opções para líquidos diluidores:

<b>SOLUÇÃO DE FORMOL-CITRATO</b>	
Citrato de sódio	3,8g
Formol a 40%	2mL
Água destilada qsp	100mL

<b>SOLUÇÃO FORMOL-SALINA</b>	
Citrato de sódio	1,7g
Formol a 40%	2mL
Água destilada qsp	200mL

**Contagem manual de leucócitos****Procedimento técnico**

1. Amostra de sangue total com EDTA;
2. Líquido diluidor de Turk;
3. Pipeta graduada de 2,0mL ou 1,0mL;
4. Micropipeta de 20 $\mu$ L;

5. Tubo de hemólise;
6. Lenço de papel ou gase;
7. Câmara de Newbauer com lamínula;
8. Microscópio óptico comum.

## ANEXO 2

### PROCEDIMENTO TÉCNICO PARA USO DO ANTICOAGULANTE

#### Procedimento técnico

1. Gotejar uma gota do anticoagulante EDTA em tubo de ensaio;
2. Transferir para o tubo 5mL de sangue recém-colhido e homogeneizar cuidadosamente por inversão;
3. Utilizar o sangue total ou plasma para a indicação específica (DOLES,2010).

## ANEXO 3

### TÉCNICA PARA COLORAÇÃO DE LÂMINA

#### Corante de Wright

Trata-se de uma solução de eosina em álcool metílico e uma mistura complexa de tiazinhas, incluindo azul de metileno (de 50% a 75%), azur B (10% a 25%) e de outros derivados (LUBRANO, 1977).

Procedimento (HENRY, 2008):

- 7 A fixação e a coloração devem ser feitas pela imersão das lâminas em frascos contendo os reagentes e cobrindo-se horizontalmente (observe a figura) nos suportes com os reagentes;
- 8 A fixação é feita por um a dois minutos por metanol (1° frasco);
- 9 A seguir, a lâmina é exposta a uma solução não diluída do corante por dois minutos (2° frasco);
- 10 Em seguida, sem remover o corante da lâmina, uma quantidade igual do tampão é adicionada (3° frasco).
- 11 A lâmina é lavada, por 30 segundos, com água;
- 12 A lâmina é mantida a temperatura ambiente e em posição horizontal inclinada, para que depois de secas, possam ser vistas os elementos celulares no microscópio óptico.

As lâminas (extensões) coradas com a coloração Wright apresentam uma cor rosada quando observadas a olho nu, a cor da extensão deve ser uniforme. Os eritrócitos apresentam-se na cor rosada enquanto que os núcleos dos leucócitos são púrpuros e a cromatina claramente diferenciada, os grânulos dos eosinófilos apresentam-se vermelho alaranjado. Os basófilos apresentam-se púrpuros-escuros, o citoplasma dos linfócitos geralmente é azul claro e o dos monócitos é azul pálido (HENRY, 2008).

### Corante giemsa

Os corantes de May Grünwald e Giemsa podem ser usados em conjunto na coloração hematológica, ou separadamente como no caso da coloração de Giemsa simples, em procedimentos que demoram entre 15 e 20 minutos (CLARK, 1973; MOURA, 1992).

#### Coloração de May Grünwald - Giemsa

- Cobrir a lâmina com o corante de May Grünwald e deixar atuar por 2 minutos;
- Acrescentar 20 gotas (1 mL) de água destilada tamponada pH 7,0-7,2 e deixar atuar por 1 minuto e homogeneizar assoprando com uma pipeta ;
- Escorrer sem lavar;
- Cobrir com a solução de Giemsa diluída (1 gota de corante de Giemsa para cada 1 mL de água destilada tamponada pH 7,0-7,2) e deixar atuar por 13-15 minutos (o laboratório deve avaliar o tempo em função da espessura de esfregaços ou em suas preferências);
- Lavar com água destilada tamponada pH 7,0-7,2 e deixar secar em posição vertical.

#### Coloração de Giemsa simples

- Cobrir a lâmina com metanol puro e deixar atuar 3 minutos;
- Escorrer;
- Cobrir com a solução de Giemsa diluída (1 gota de corante de Giemsa para cada 1 mL de água destilada tamponada pH 7,0-7,2) e deixar atuar por 13-15 minutos (o laboratório deve avaliar o tempo em função da espessura de esfregaços ou em suas preferências);
- Lavar com água destilada tamponada pH 7,0-7,2 e deixar secar em posição vertical (CLARK, 1973; MOURA, 1992).

## TÉCNICA PARA DETERMINAÇÃO DO MICROHEMATÓCRITO

- 1º passo: aspirar (com o auxílio de um capilar de vidro) amostra de sangue total, preenchendo cerca de 2/3 do tubo capilar;
- 2º passo: limpar o capilar com papel absorvente;
- 3º passo: vedar a parte oposta à que foi utilizada para a aspiração do sangue;
- 4º passo: colocar o tubo capilar em microcentrífuga ( parte vedada para o sentido de fora);
- 5º passo: centrifugar por 5 minutos a 11.000 rpm;
- 6º passo: realizar a leitura.

A leitura deve ser feita ajustando-se o limite superior da camada plasmática do tubo capilar na parte superior da escala, enquanto que o limite inferior deve ser ajustado na parte inferior da escala. (OLIVEIRA, 2007)

### Vantagens e desvantagens

Os tubos capilares podem quebrar na hora de ajustar a extremidade e podendo causar lesões penetrantes, com inoculação de sangue no operador. Ou então os tubos podem quebrar dentro da centrífuga, podendo levar a transmissão viral. Há também causas de falta de exatidão e de reprodutibilidade no microhematócrito, pelo fato das pequenas dimensões do tubo, dessa forma a leitura fica um pouco dificultada (BAIN, 2007).