

FASE PRÉ-ANALÍTICA DO HEMOGRAMA

A análise do sangue periférico durante as últimas décadas tem sido realizada por sistemas automatizados que apresentam maior precisão nos resultados e em um menor intervalo de tempo que as técnicas manuais.

Entretanto, com todo o avanço tecnológico, a análise microscópica dos elementos sangüíneos é necessária e imprescindível. A excelência tecnológica dos contadores muitas vezes apontam dúvidas (flags) na identificação de células tornando a microscopia necessária e insubstituível.

Como vários estudos demonstram que a fase pré-analítica concentra cerca de 70% dos erros e fontes de variação associados aos processos laboratoriais, tive como objetivo oferecer conceitos essenciais de nossa prática hematológica a ser usada por laboratoristas com uma visão básica sobre coleta e distensão sanguínea, coloração, métodos de avaliação e contagem em lâmina, bem como dicas importantes capazes de proporcionarem uma microscopia mais segura e de melhor qualidade para a realização de um hemograma satisfatório.

Adriano Machado de Sousa

FASE PRÉ-ANALÍTICA DO HEMOGRAMA

I-INTRODUÇÃO:

A fase pré-analítica de um exame laboratorial corresponde a todos os eventos necessários que antecedem a sua execução propriamente dita. Ela envolve basicamente a história clínica do paciente, os procedimentos de coleta e preparo da amostra. Erros ou maus procedimentos nessa fase podem inviabilizar a exatidão de um resultado.

- CONDIÇÕES PRÉ-ANALÍTICAS:

1-Idade:

Alguns parâmetros hematológicos possuem concentração dependente da idade do indivíduo. Esta dependência é resultante de diversos fatores, como: maturidade funcional dos órgãos e sistemas, conteúdo hídrico e massa corporal.

2-Origem étnica:

Os parâmetros hematológicos são afetados não apenas pela idade, altitude, sexo, fatores biológicos e influências externas, mas também por origem étnica. A contagem leucocitária e a contagem de neutrófilos são mais baixa nos negros que nos brancos. Como no Brasil há uma valorosa mistura racial, torna-se difícil estabelecer valores limites para indivíduos pardos ou miscigenados.

3-Ocupação:

O hemograma constitui um dos exames básicos mais solicitados pelo médico como periódico de características importantes para o trabalhador e a empresa, relacionando seu ambiente de trabalho com doenças profissionais que podem ser provocadas pelo mau uso ou mesmo falhas nas medidas de proteção.

4-Gestante:

As contagens leucocitárias e a contagem de neutrófilos e monócitos aumentam durante a gravidez; ocorre desvio à esquerda e a contagem de linfócitos, eosinófilos diminuem. Pode ocorrer aparecimento de granulações tóxicas e corpos de Döhle devido ao encurtamento de maturação entre promielócitos e granulócitos maduros na medula óssea; tudo isso sem significado patológico. A contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito baixam proporcionalmente pela hemodiluição (aumento plasmático). Essa pseudo-anemia na maioria das vezes é fisiológica.

5-Uso de medicamento, controle de tratamento e Drogas de Abuso:

Este é um item amplo e inclui tanto a administração de substâncias com finalidades terapêuticas. Ambos podem causar variações nos resultados de exames laboratoriais, seja pelo próprio efeito fisiológico *in vivo* ou por interferência analítica, *in vitro*.

6-Postura:

A variação do volume plasmático ao passar-se do repouso (horizontal) à posição vertical ocorre devido ao acúmulo gravitacional e transudação nos membros inferiores, o que pode aumentar as cifras hematimétricas em 2 a 5%.

7-Atividade Física:

O efeito da atividade física sobre alguns componentes sanguíneos, em geral, é transitório e decorre da mobilização de água, da mobilização do pool marginal dos leucócitos para o pool circulante, da mobilização de outras substâncias entre os diferentes compartimentos corporais e das variações nas necessidades energéticas do metabolismo o que pode provocar uma significativa leucocitose.

8-Horário de coleta:

Hemogramas de um mesmo paciente colhido em diferentes horas do dia podem apresentar resultados diferentes de acordo com suas variações hidráticas, variações cíclicas dos diferentes tipos de leucócitos e também das plaquetas nas diferentes horas do dia.

9-Condições físicas do paciente:

É interessante que todos saibam suas contagens basais normais. Tabagistas possuem contagens de leucócitos, eritrócitos e plaquetas maiores que não fumantes.

Obesos apresentam valores leucométricos maiores que não obesos. Estresse e choro excessivo de crianças durante a coleta causam elevação da contagem global de leucócitos e diminuição relativa de eosinófilos.

Febre, frio, calor, são situações que podem gerar variações quantitativas no hemograma

10-Jejum:

- **O período de jejum habitual para a coleta de sangue de rotina é de 8 a 12 horas, podendo ser reduzido a 4 horas, para alguns exames e, em situações especiais, tratando-se de crianças na primeira infância ou lactentes, pode ser de 1 ou 2 horas apenas.**

11-Dieta:

- **A dieta a que o indivíduo está submetido, mesmo respeitado o período regulamentar de jejum, pode interferir na concentração de alguns componentes, na dependência das características orgânicas do próprio paciente.**

COLETA SANGÜÍNEA PARA HEMOGRAMA

- INTRODUÇÃO:

A amostra sangüínea deve ser adequadamente conservada em tubos com substâncias anticoagulantes específicas.

- TIPOS DE ANTICOAGULANTES:

1. **EDTA:** tubo tampa roxa ou lilás. Conserva a morfologia das células sangüíneas (específico para realização do hemograma).
2. **Citrato de Sódio:** tubo tampa azul. Preserva os fatores hemostáticos.
3. **Fluoreto de Sódio:** tubo tampa cinza. Retarda o metabolismo glicolítico.
4. **Heparina:** tubo tampa verde. Conservante multi-funcional, principalmente para aferições gasosas.

COLETA SANGÜINEA (PADRONIZAÇÃO)

CÓDIGOS ALFA E CÓDIGOS DE CORES RECOMENDADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS ADITIVOS *

ADITIVOS	CÓDIGO ALFA	CÓDIGO DE CORES	EXAMES MAIS COMUNS
EDTA ¹ sal dipotássico sal tripotássico sal dissódico	K2 E K3 E N2 E	Lilás Lilás Lilás	Hemograma Plaquetas
EDTA sal dipotássico com gel separador	K2 E	Branca translúcida	Biologia molecular
Citrato Trissódico 9:1 ²	9NC	Azul claro	Testes de Coagulação
Citrato Trissódico 4:1 ²	4NC	Preta	Velocidade de Hemossedimentação
Fluoreto/Oxalato	FX	Cinza	Glicose
Fluoreto/ EDTA	FE	Cinza	Glicose
Fluoreto/Heparina	FH	Verde	Glicose
Heparina de Lítio	LH	Verde	Exames bioquímicos em geral; gasometria (so- mente em seringa pré- heparinizada)
Heparina de Sódio	NH	Verde	Exames bioquímicos em geral
Citrato Fosfato Dextrose Adenina	CPDA	Amarela	Preservação de células
Siliconizado ³	Z	Vermelha	Exames sorológicos e bioquímicos em geral
Ativador de coágulo e gel separador	Ativador de coágulo	Amarela	Exames sorológicos, bioquímicos em geral, drogas terapêuticas e hormônios.

Tabela 2 Recomendações da sequência dos tubos na coleta do espécime diagnóstico de acordo com o CLSI⁽⁹⁾

Sequência dos tubos na coleta do espécime diagnóstico sanguíneo

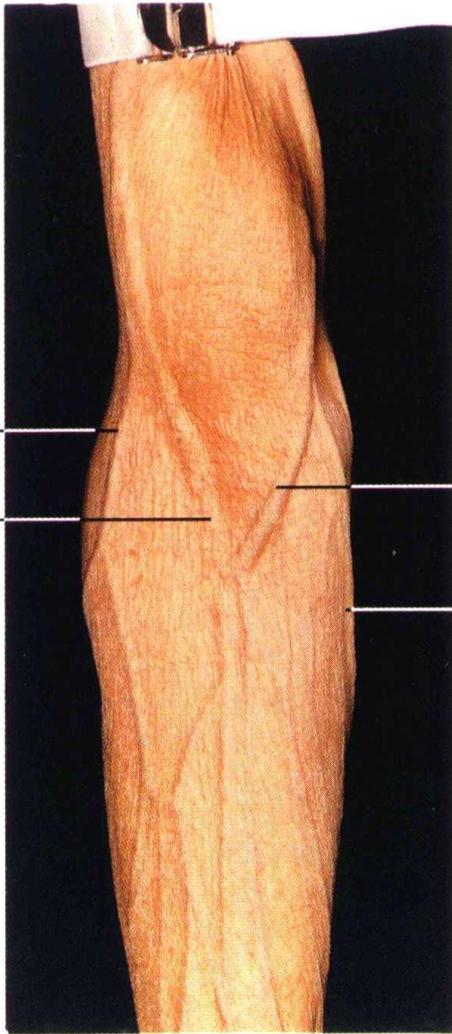
Sequência	Descritivo
1ª	Frasco de hemocultura
2ª	Tubos sem aditivo
3ª	Tubos com citrato de sódio
4ª	Tubos com pró-coagulante e/ou gel separador
5ª	Tubos com heparina
6ª	Tubos com EDTA
7ª	Tubos com inibidor da glicólise

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético.

PRINCIPAIS SITIOS VENOSOS

2 Veia
basílica

1 Veia
cubital
média



3 Veia
cefálica

4 Veia
cefálica
acessória

1. **Veia cubital média,**
2. **Veia basilíca;**
3. **Veia cefálica;**
4. **Veia cefálica acessória.**

COLETA SANGÜÍNEA PARA HEMOGRAMA

GARROTEAMENTO:

- **O tempo de garroteamento deve ser observado e o recomendado é que não ultrapasse de um minuto, após este tempo ocorre aumento da pressão intravascular no local, facilitando a saída de líquido e de moléculas pequenas para o espaço intersticial, resultando em hemoconcentração relativa.**

SANGUE TOTAL X ANTICOAGULANTE

- A relação sangue total x anticoagulante deve ser respeitado de tal modo que todo cálcio presente na amostra seja quelado pelo anticoagulante e todo anticoagulante neutralizado pelo cálcio. A presença de coágulos e/ou micro coágulos pode ocorrer devido a não observação desta relação.
- A homogeneização deve ser feita suavemente por inversão conforme ilustrado, no mínimo por cinco vezes:

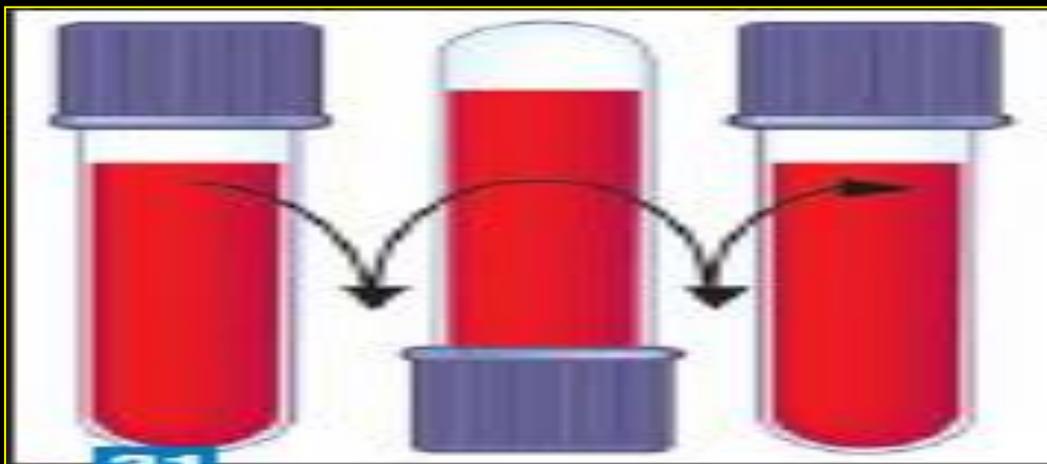


Tabela 3

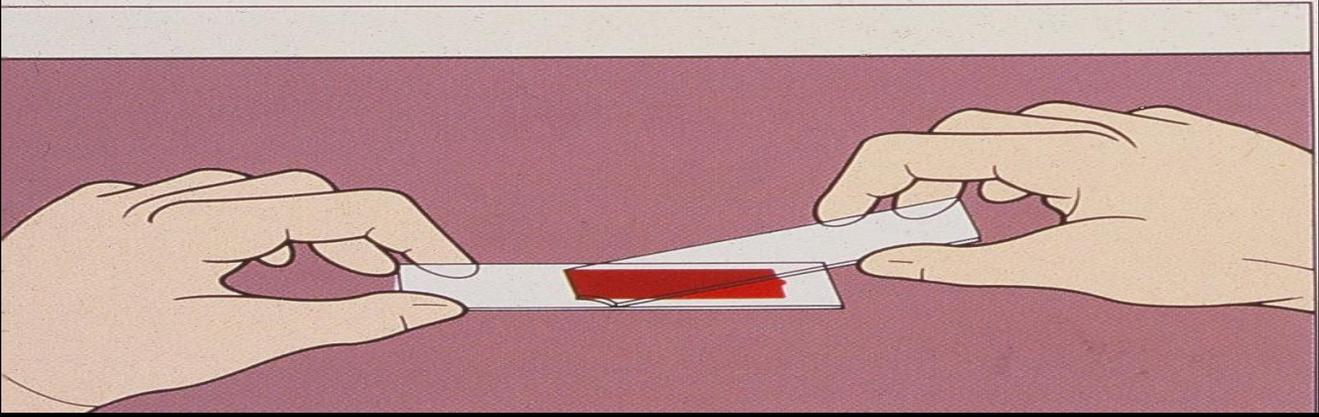
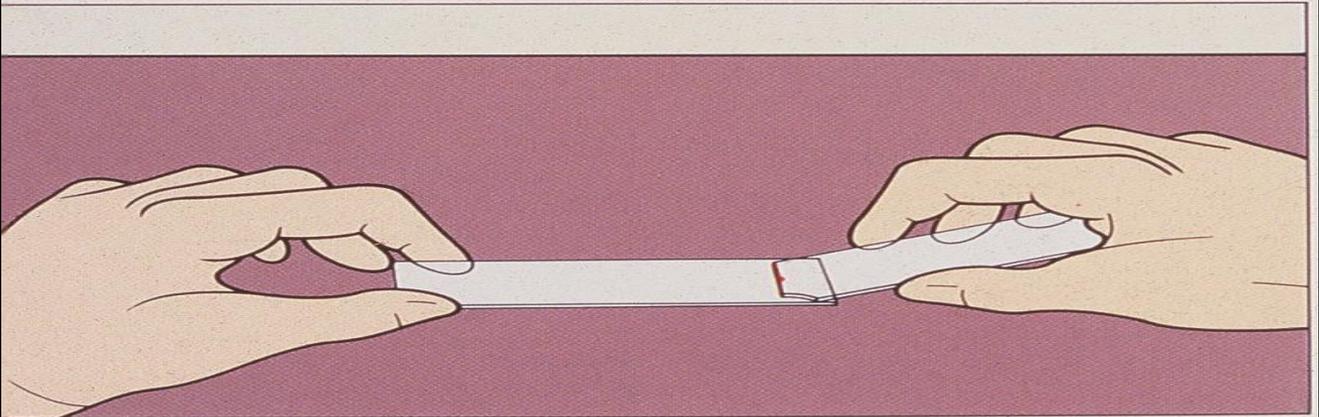
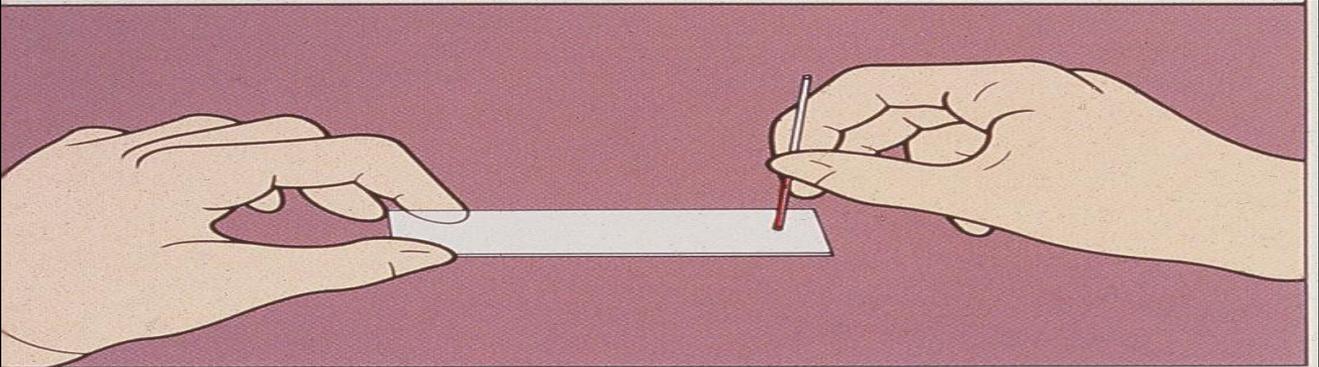
Homogeneização do espécime diagnóstico conforme o tipo de aditivo e a respectiva orientação do fornecedor^(34, 36, 37)

Descrição do aditivo	Becton Dickinson®	Greiner bio-one®	Sarstedt®
Tubos sem aditivo	Não é necessária	5 a 8 vezes	10 vezes
Tubos com citrato de sódio	5 a 8 vezes	5 a 8 vezes	10 vezes
Tubos com pró-coagulante e/ou gel separador	5 a 8 vezes	5 a 8 vezes	10 vezes
Tubos com heparina	8 a 10 vezes	5 a 8 vezes	10 vezes
Tubos com EDTA	8 a 10 vezes	5 a 8 vezes	10 vezes
Tubos com inibidor da glicólise	8 a 10 vezes	5 a 8 vezes	10 vezes

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

CONFECÇÃO DE LÂMINA PARA HEMOGRAMA

- **As lâminas de vidro devem estar limpas, secas, desengorduradas e sem ranhuras para iniciar a confecção;**
- **O distensor deve estar limpo, seco, desengordurado, sem ranhuras e mais estreito que a lâmina de microscopia para que os elementos celulares possam ser observados nas bordas sem nenhuma dificuldade;**
- **Colocar uma gota de sangue (5 a 10 uL) aproximadamente a 1cm da extremidade da lâmina;**
- **Caso o sangue utilizado seja obtido por punção digital, desprezar a primeira gota;**
- **Usando um distensor colocado com uma inclinação de 45° em relação à primeira;**
- **Deslizá-lo rapidamente e de maneira uniforme.**



INTERFERENTES NOS RESULTADOS DO HEMOGRAMA

- FALTA DE MANUTENÇÃO E CALIBRAÇÃO NO EQUIPAMENTO
- TURBIDEZ DA AMOSTRA:

{	Hemólise
	Lipemia
	Bilirrubina
	Glóbulos Brancos Elevados
- CRIOGLOBULINAS
- CRIOAGLUTININAS
- MICRÓCITOS, ESQUISÓCITOS E PLAQUETAS GIGANTES
- QUIMIOTERÁPICOS / CITOTÓXICOS :
PODEM AUMENTAR A FRAGILIDADE DOS GLÓBULOS BRANCOS E/OU DAS PLAQUETAS ORIGINANDO RESULTADOS DEMASIADAMENTE BAIXOS

COLETA SANGÜÍNEA-HEMÓLISE



A hemólise provoca diminuição da hematimetria, do hematócrito, aumento da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

Os restos dos glóbulos vermelhos (estroma) destruídos podem ser contados como plaquetas no contadores hematológicos provocando um falso aumento na contagem das plaquetas.

COLETA SANGÜÍNEA-LIPEMIA



Provoca aumento na dosagem da hemoglobina e interfere na contagem diferencial em alguns contadores hematológico

CORANTES HEMATOLÓGICOS

- Os corantes atuais se baseiam no método de Romanowsky, onde se utiliza um corante ácido e um básico.
- Eles são uma mistura de sais ácidos (eosina) e sais básicos (azul de metileno e oxidação de seus produtos- azures de metileno).
- A eosina, por ser um corante ácido, tem afinidade por estruturas celulares básicas e o azul de metileno, por ser um corante básico tem afinidade por estruturas celulares ácidas.

TIPOS DE CORANTES PARA HEMOGRAMA

1. **May-Grünwald - Giemsa**: É a associação de duas técnicas de coloração. Onde a primeira provém do corante ácido May-Grünwald, pouco específico para o núcleo com a segunda técnica, a de Giemsa, que apresenta afinidade nuclear por ser básico.
2. **Wright e Leishmann**: É o corante que associa o corante ácido eosina com o básico azul de metileno ao mesmo tempo. Diminuindo o tempo de coloração.
3. **Panóptica**: É a mais recente, que utiliza um fixador (metanol), um corante ácido e logo após um básico. Este método é realizado em segundos.

COLORAÇÃO HEMATOLÓGICA - DICAS

1. O segredo de uma boa coloração está em descobrir o pH ideal e o tempo correto para fixação e coloração do corante.

2. Colorações excessivamente ácidas:

Macroscopicamente os esfregaços apresentam um tom mais para róseo ou vermelho desbotado. Microscopicamente os eritrócitos são excessivamente alaranjados ou até vermelhos, os leucócitos geralmente são com tonalidade pálida sem nenhum contraste com o citoplasma. O citoplasma dos linfócitos e monócitos não se cora. Os grânulos dos eosinófilos ficam corados, mas sem brilho e os grânulos secundários dos neutrófilos pouco se coram ou não se coram.

3. Causas:

Tempo de coloração insuficiente, corante excessivamente ácido ou pH do tampão ou da água muito baixo.

COLORAÇÃO HEMATOLÓGICA-DICAS

4. Colorações excessivamente alcalinas:

Macroscopicamente os esfregaços apresentam um tom esverdeado. Microscopicamente os eritrócitos são vistos de cor esverdeada ou até verde azulada o que dificulta a visualização da policromasia. Os leucócitos apresentam uma coloração excessivamente generalizada com cromatina profundamente corada em púrpura-azulado o que dificulta o contraste com o citoplasma com intensa basofilia. Os grânulos dos eosinófilos coram-se de azul-escuro, e os grânulos dos neutrófilos normais apresentam-se excessivamente corados, simulando granulações tóxicas.

5. Causas:

Esfregaço muito grosso, pH elevado da água ou do tampão, corante excessivamente alcalino ou tempo excessivo de coloração.

AVALIAÇÃO DE UMA COLORAÇÃO SATISFATÓRIA

- Eritrócito : Salmão ou levemente rosado
- Plaquetas : Azuladas e os grânulos púrpura
- Eosinófilos : Grânulos (laranja vivo)
- Monócitos : Citoplasma cinza-azulado e grânulos citoplasmático finos na cor vermelho púrpura suave

Eritrócitos : SALMÃO OU LEVEMENTE ROSADO



Plaquetas: azuladas e os grânulos púrpura



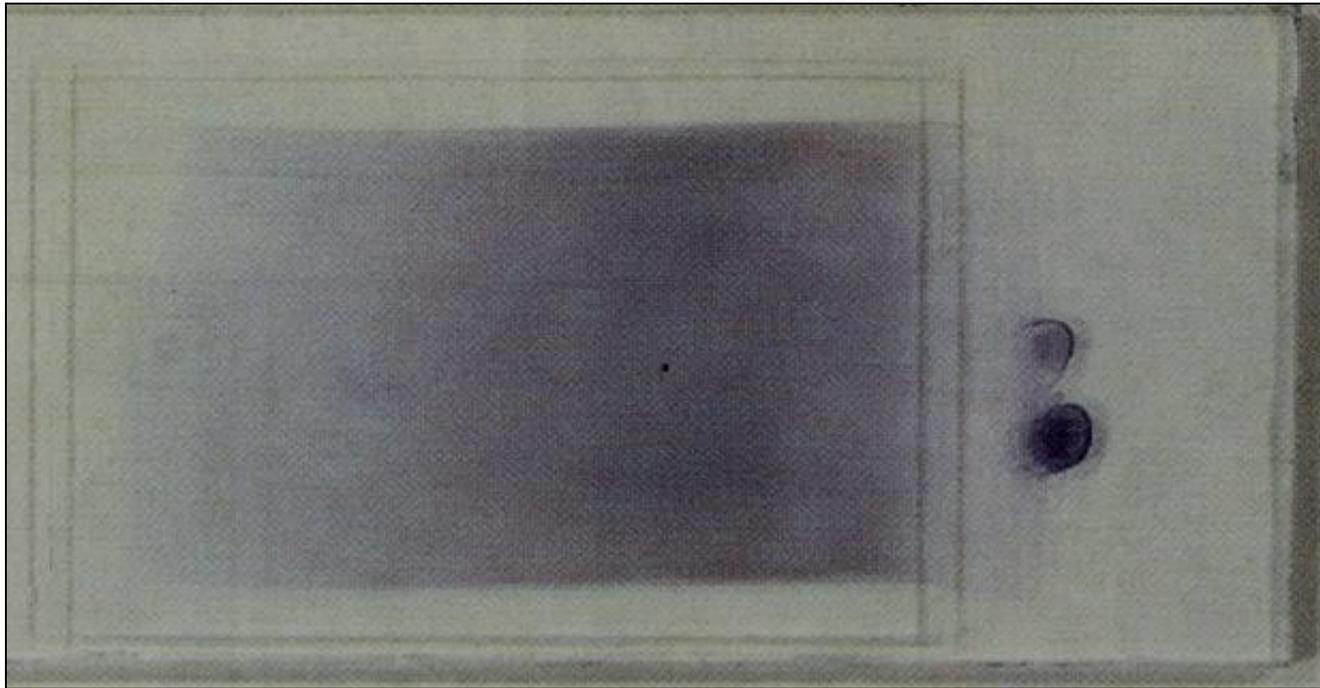
Eosinófilos : Grânulos (laranja vivo)



Monócitos : Citoplasma cinza-azulado e grânulos citoplasmáticos finos na cor vermelho púrpura suave



DISTENSÃO SATISFATÓRIA



Comentário: A distensão deverá ocupar 2/3 da lâmina de microscopia, apresentar cabeça, corpo, cauda e bordas bem definidas

DISTENSÃO SANGÜINEA E SUA AVALIAÇÃO

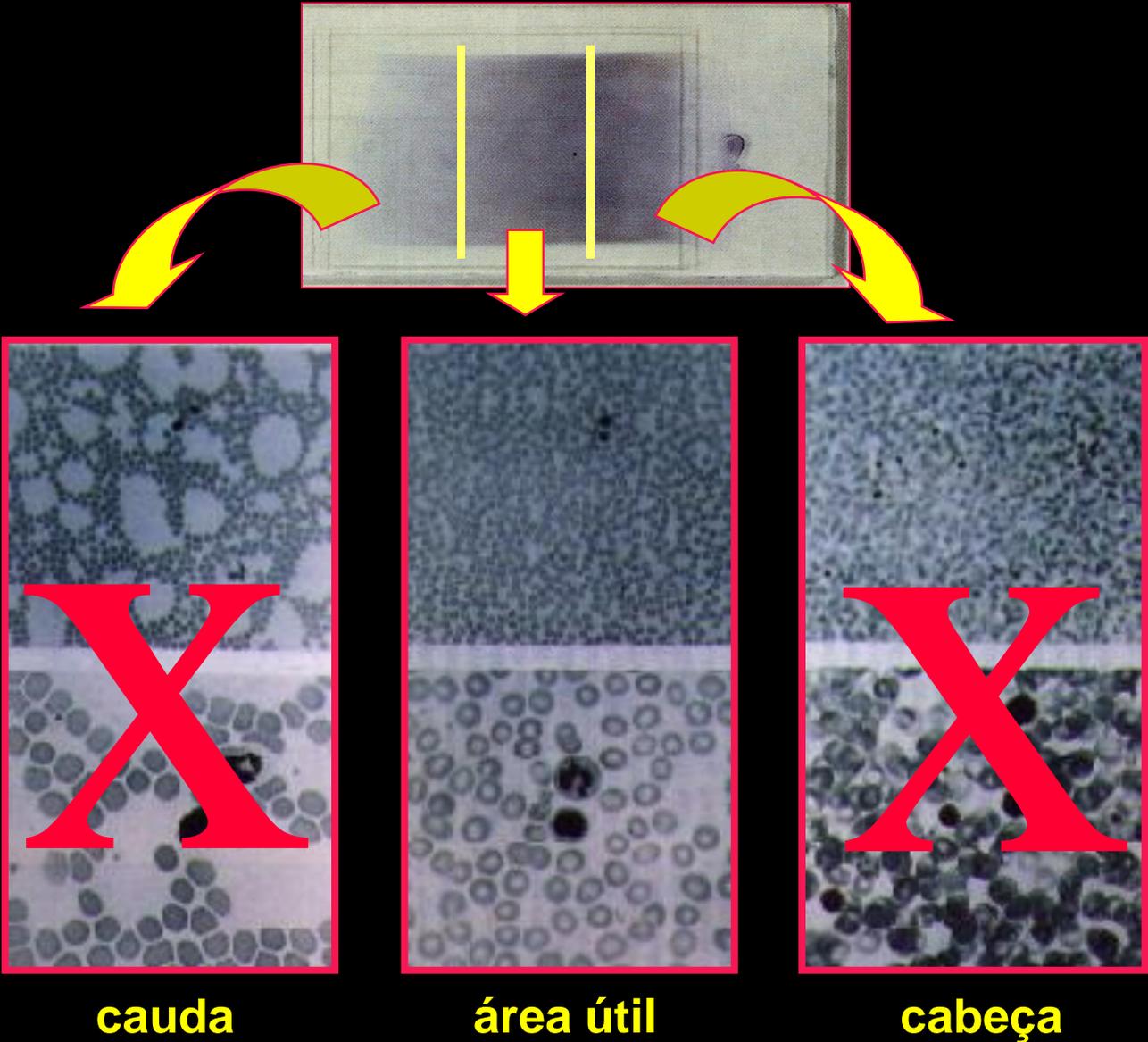
O esfregaço bem feito é composto por três porções; espessa, média e fina.

Na Porção Espessa ou cabeça as células se congestionam, dificultando análise.

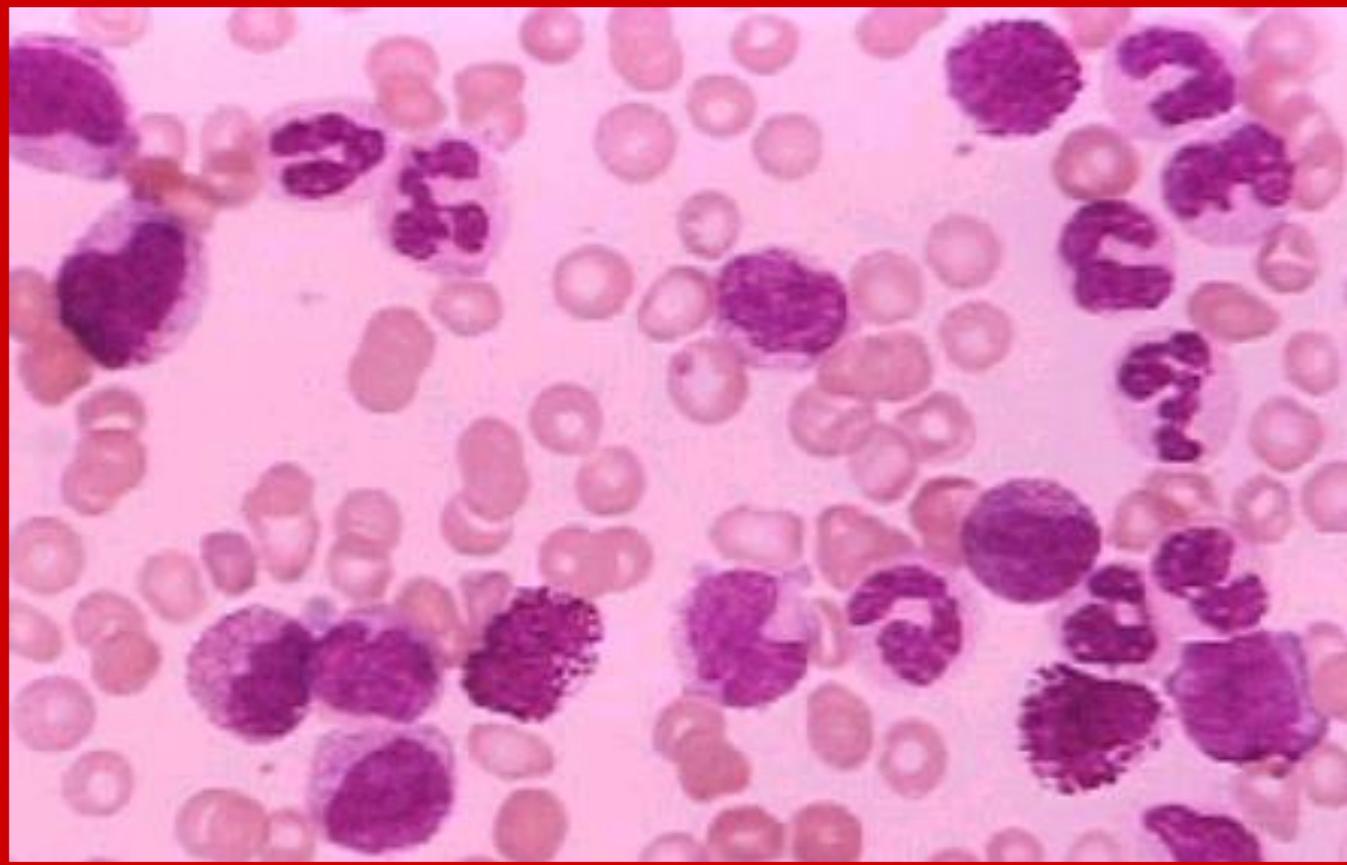
Na Porção Média ou área útil se concentram as células com distribuição homogênea, perfeitas para análises.

Na Porção Fina ou cauda a disposição de eritrócitos e leucócitos é defeituosa, com células deformadas artefactualmente.

ÁREA ÚTIL PARA AVALIAÇÃO CITOLÓGICA



ÁREA ÚTIL DA DISTENSÃO PARA AVALIAÇÃO E CONTAGEM



Não há sobreposição eritrocitária e nem condensação dos leucócitos

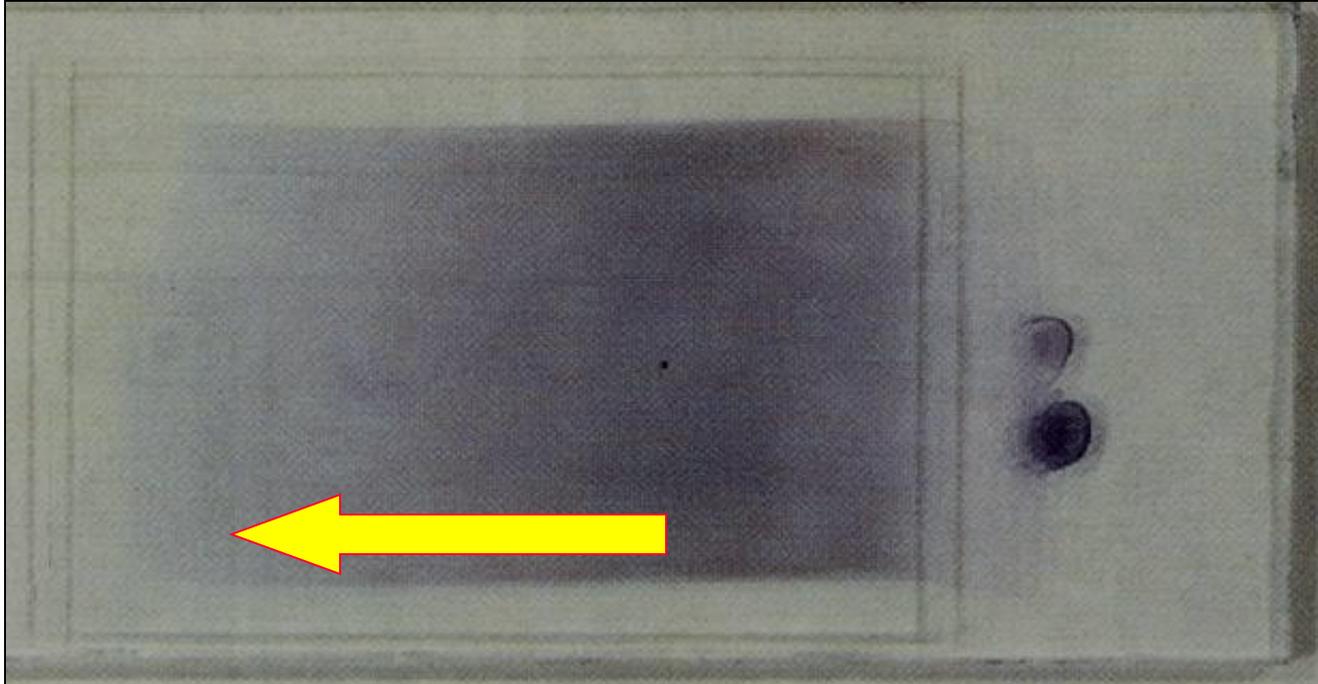
DISTENSÃO SANGÜINEA E SUA AVALIAÇÃO

- Erros decorrentes a avaliação em local inadequado do esfregaço (distensão):
- Local muito espesso (cabeça): Dificuldade de avaliação da cromatina nuclear dos leucócitos, falsa linfocitose e monocitopenia. Dificuldade de avaliação da morfologia eritrocitária.
- Local muito fino (cauda): Aumento indevido de monócitos e polimorfonucleados. Para análise morfológica eritrocitária pode ocorrer possível mascaramento de hipocromia e falsos esferócitos.
- Leitura excessiva nas bordas: Aumento excessivo de monócitos e neutrófilos.
- Leitura excessiva no centro: Aumento indevido de linfócitos.

CONTAGEM E AVALIAÇÃO EM LÂMINA

- É o estudo dos elementos celulares do sangue espalhados em camada única sobre a superfície de uma lâmina de microscopia.
- A distensão ou esfregaço fornece uma distribuição irregular dos elementos celulares.
- As células de maior densidade correspondem à série mielóide, acumulam-se nas margens e cauda.
- As células de menor densidade correspondem à série linfóide, que tendem a uma distribuição central.

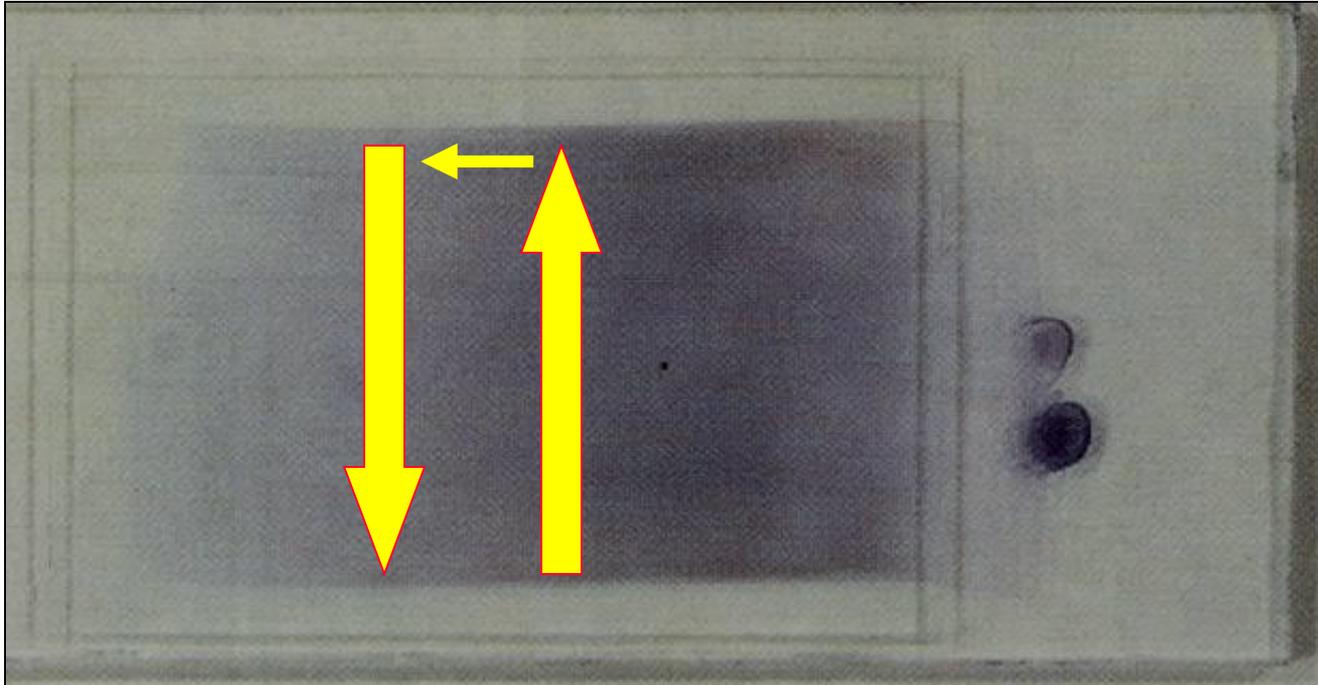
Métodos de Contagem em Lâmina



Comentário :

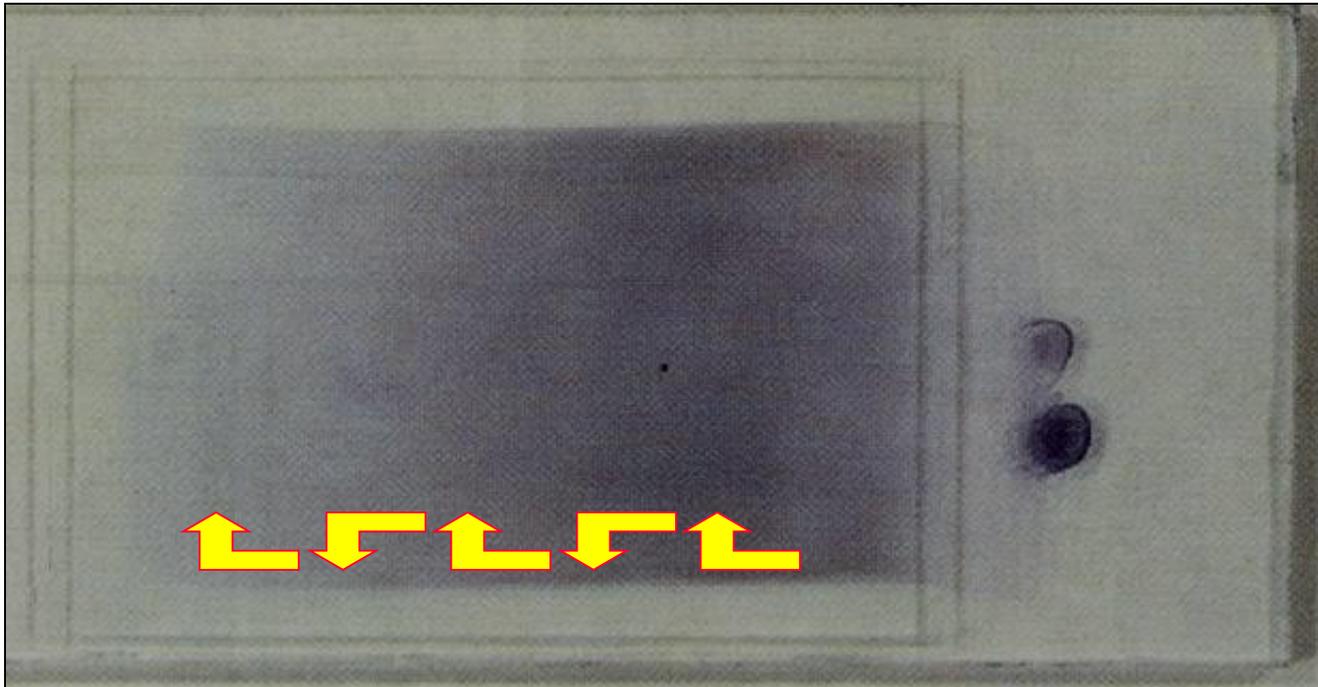
Células de maior densidade localizam-se nas bordas. Compensa a distribuição entre o centro e o corpo, mas não entre o centro e a borda.

Métodos de Contagem em Lâmina



Comentário : Células de menor densidade localizam-se ao centro. Compensa a má distribuição entre o centro e a borda, mas não entre o corpo e extremidade. Obrigatoriamente deve-se chegar até a outra borda; caso a contagem termine antes de se chegar ao outro lado deve-se contar mais 100 ou 200 células até que se chegue à outra borda.

Métodos de Contagem em Lâmina



Comentário :

Está a meio caminho entre os dois métodos.

Quanto mais células forem contadas menor o erro e mais próximo da realidade do paciente.

ERROS RELACIONADOS AO TEMPO, EXPOSIÇÃO E ESTOCAGEM DAS AMOSTRAS

- A estocagem da amostra por tempo excessivo provoca profundas alterações morfológicas das células sanguíneas pela ação do EDTA e pela depleção de ATP do meio.
- O esfregaço sanguíneo deve ser realizado sem anticoagulante ou o mais rápido possível (menos de 2 horas de contato com EDTA).
- Lâminas realizadas de amostras estocadas, mesmo de 2 a 8^o C ocorrem lise celular, principalmente dos granulócitos, o que pode levar a uma falsa leucopenia com neutropenia, falso desvio à esquerda, pseudovaculização citoplasmática, pseudo linfocitose relativa com alteração da morfologia nuclear.
- Na série vermelha além da hiperidratação dos eritrócitos com conseqüente aumento do VCM, pode ocorrer equinocitose indevida. Na série plaquetária ocorre agregação *in vitro* e conseqüentemente falsa plaquetopenia.

Exposição excessiva ao EDTA

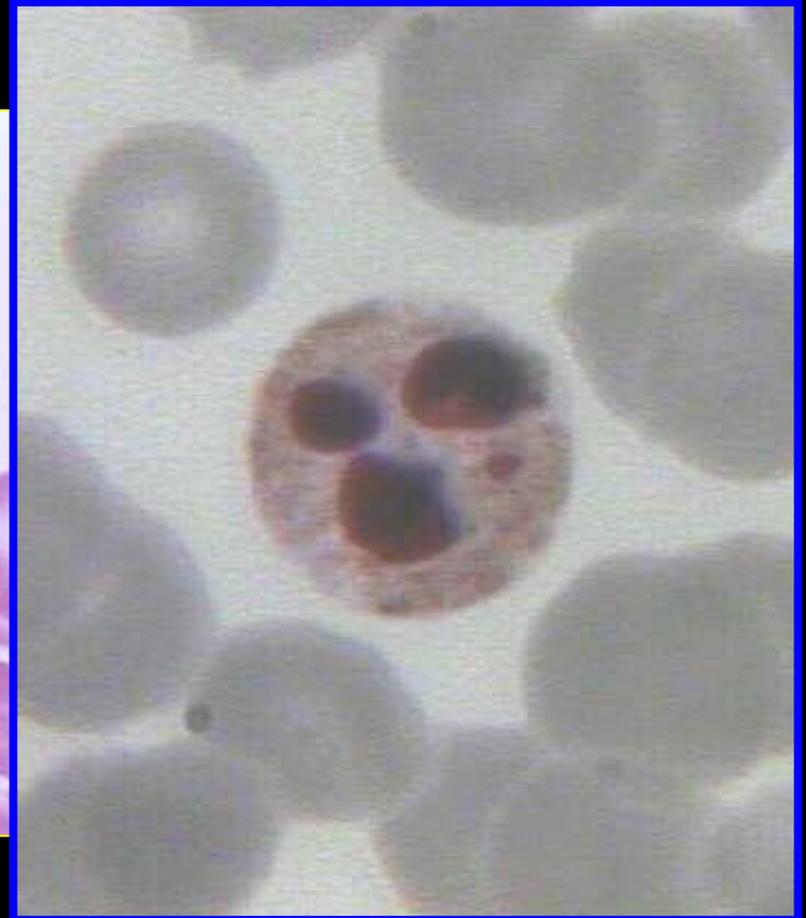


Comentário: Eritrócitos com crenação (equinocitose) e degeneração neutrofílica

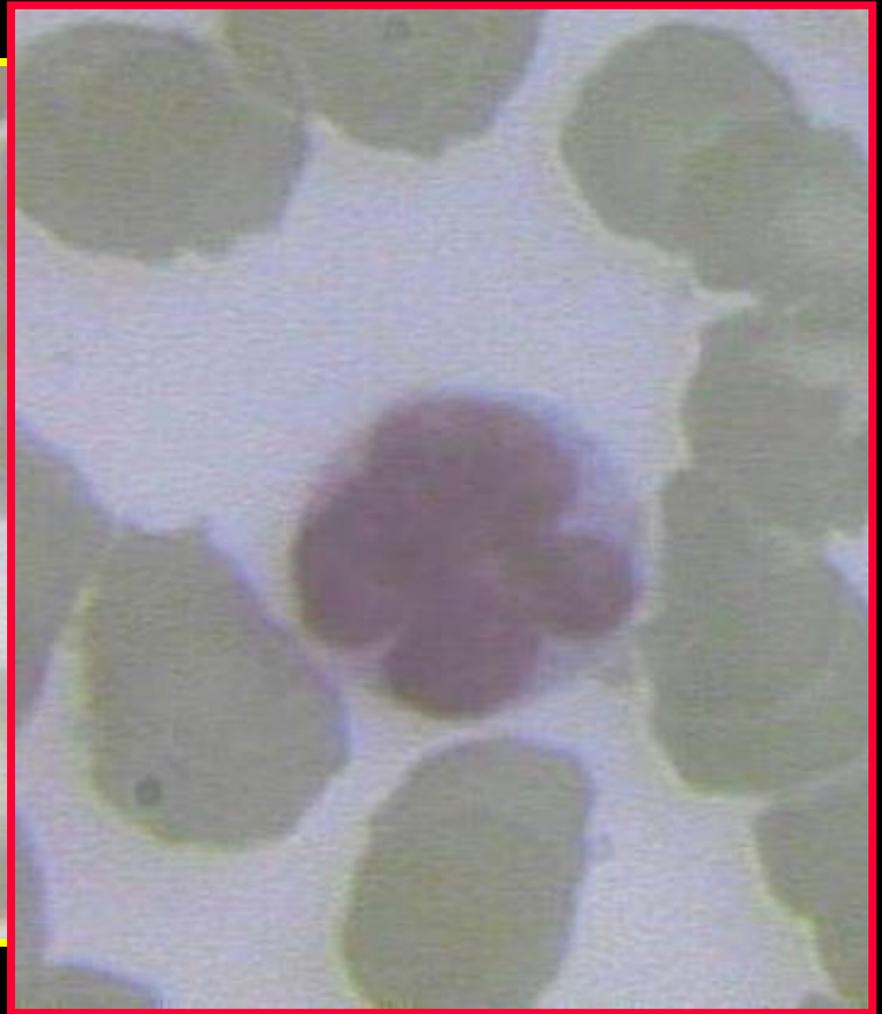
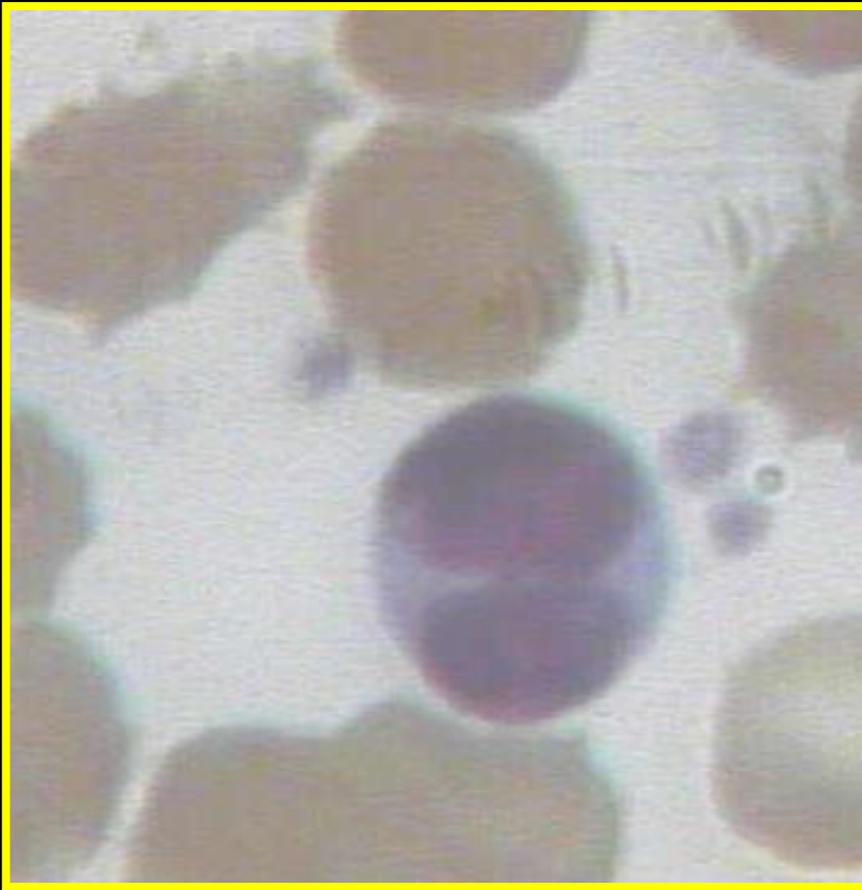


Comentário:

neutrófilo em degeneração (Exposição excessiva ao EDTA)
lembrando um eritroblasto



Comentário:
**Degeneração neutrofílica por exposição
excessiva ao EDTA .**

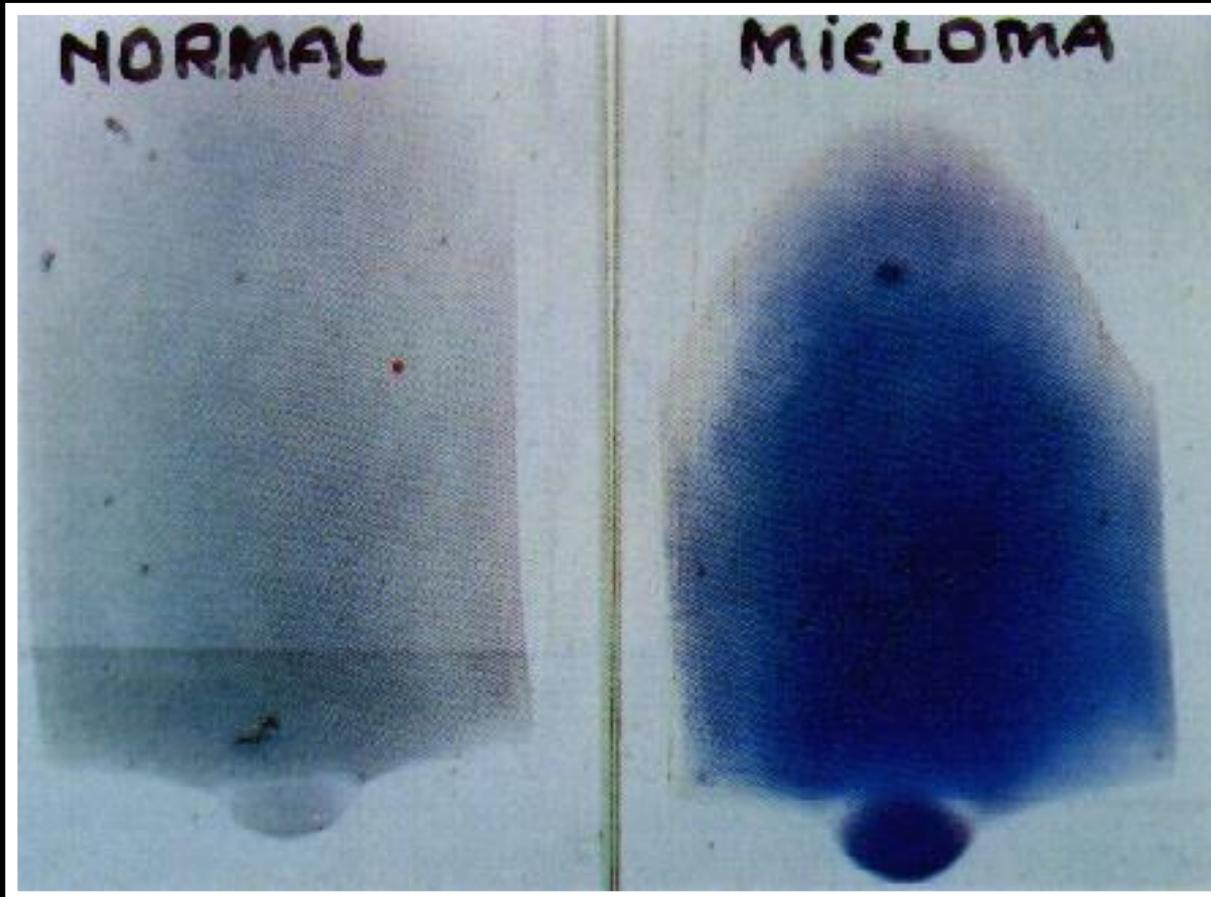


Comentário:
**Modificação nuclear devido a exposição
excessiva ao EDTA**

Exame das Distensões - Dicas

- Devem-se examinar as distensões sangüíneas de forma sistemática para confirmar se ela está adequada ou se há características anormais ou de coloração.
- Macroscopicamente a alteração mais comum na coloração é o aumento da coloração azul causada por hipergamaglobulinemia decorrente de uma paraproteína (mieloma múltiplo), ou também do aumento reacional das imunoglobulinas (na cirrose, algumas viroses e na artrite reumatóide).
- Ocasionalmente, as alterações macroscópicas podem ser causadas por precipitações de crioglobulinas.

Análise Macroscópica



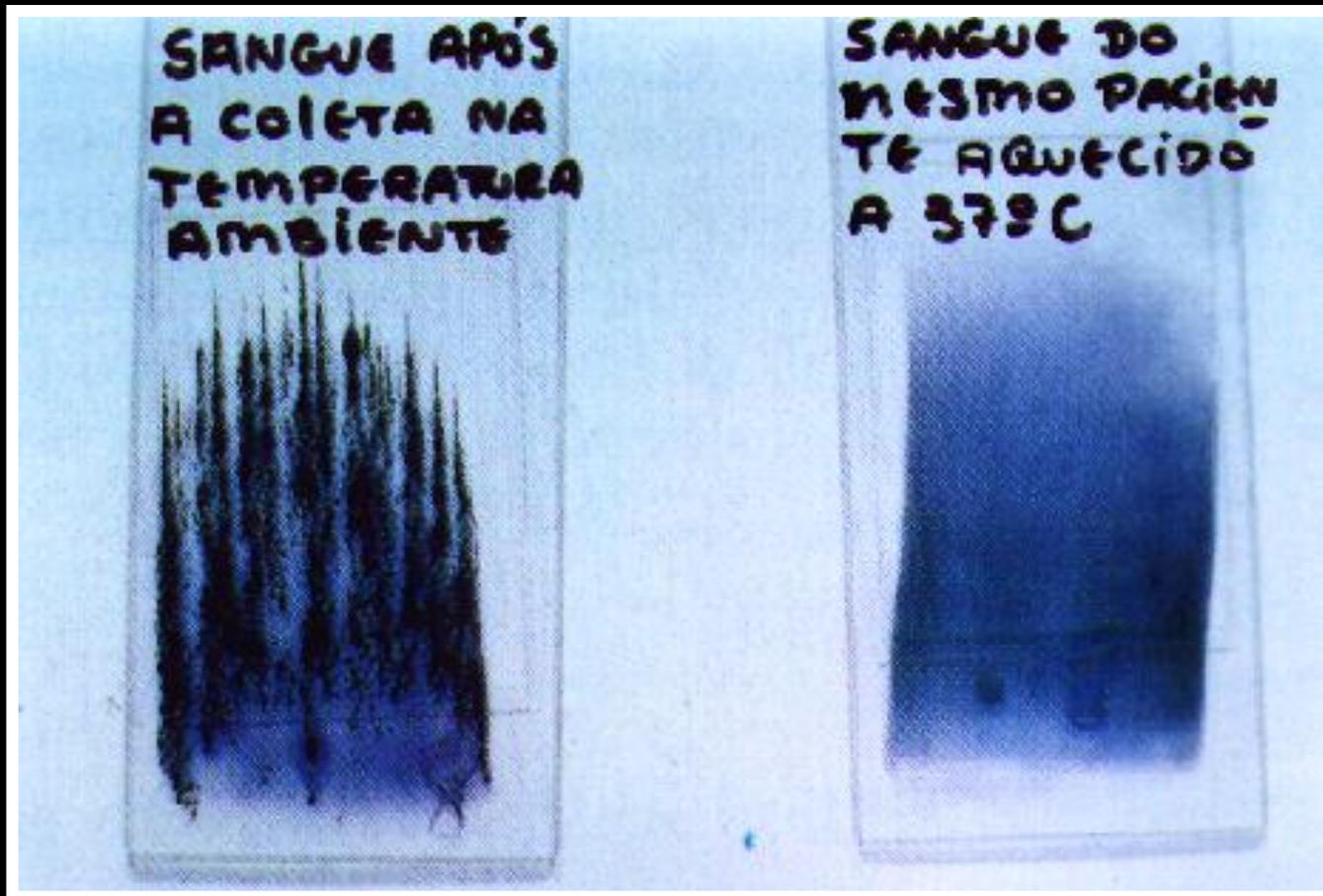
Mieloma: mudança de coloração devido à presença de imunoglobulinas anormais.

Análise Macroscópica



Precipitação macroscopicamente de Crioglobulinas

Análise Macroscópica



Acentuada aglutinação devido à potente crioaglutinina que foi corrigida após aquecimento possibilitando a avaliação e a contagem citológica

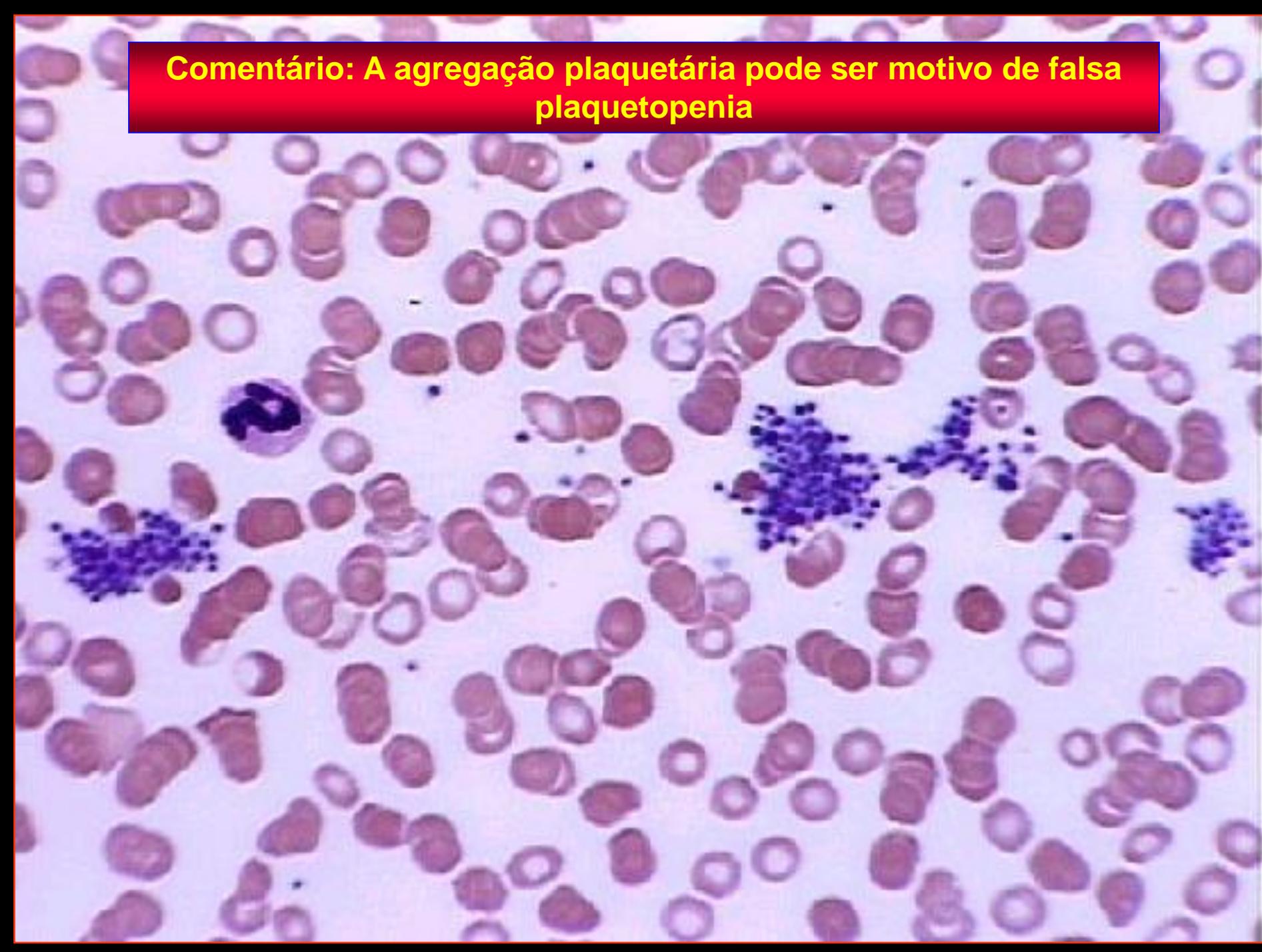
Exame das Distensões - Dicas

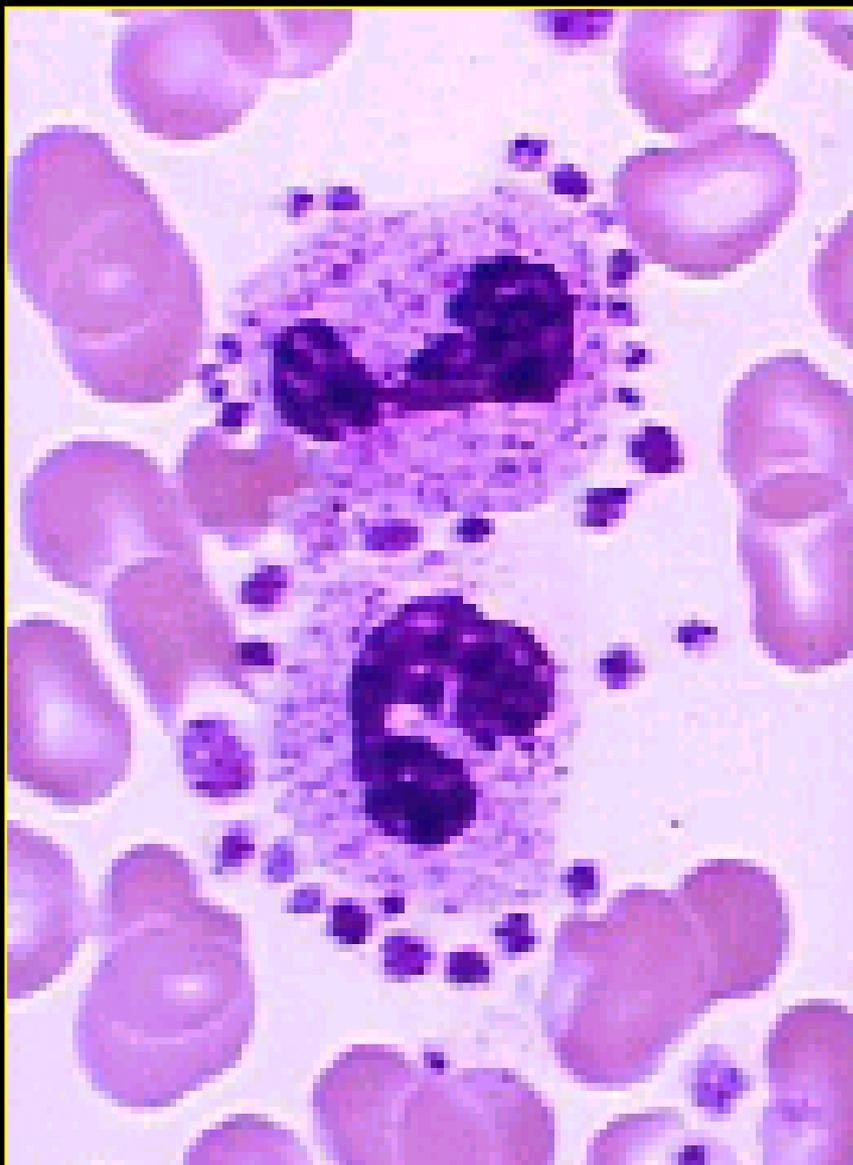
- Microscopicamente a avaliação deve ser feita com pequeno aumento (10x e 40x) para ter noção do numero de células por campo e detectar uma leucopenia, leucocitose, plaquetopenia ou plaquetose. Pesquisar conglomerado de células tumorais ou presença de células anormais quando pouco frequentes. Observar se há empilhamento eritrocitário (*rouleaux*); aglutinação eritrocitária, leucocitária e plaquetária. Nos casos de plaquetopenia procurar satelitismo plaquetário, aglutinação plaquetária e/ou filamentos de fibrina.

Comentário: As plaquetas devem estar distribuídas uniformemente (distensão com EDTA) ou pouco agregadas (distensão sem EDTA)



Comentário: A agregação plaquetária pode ser motivo de falsa plaquetopenia



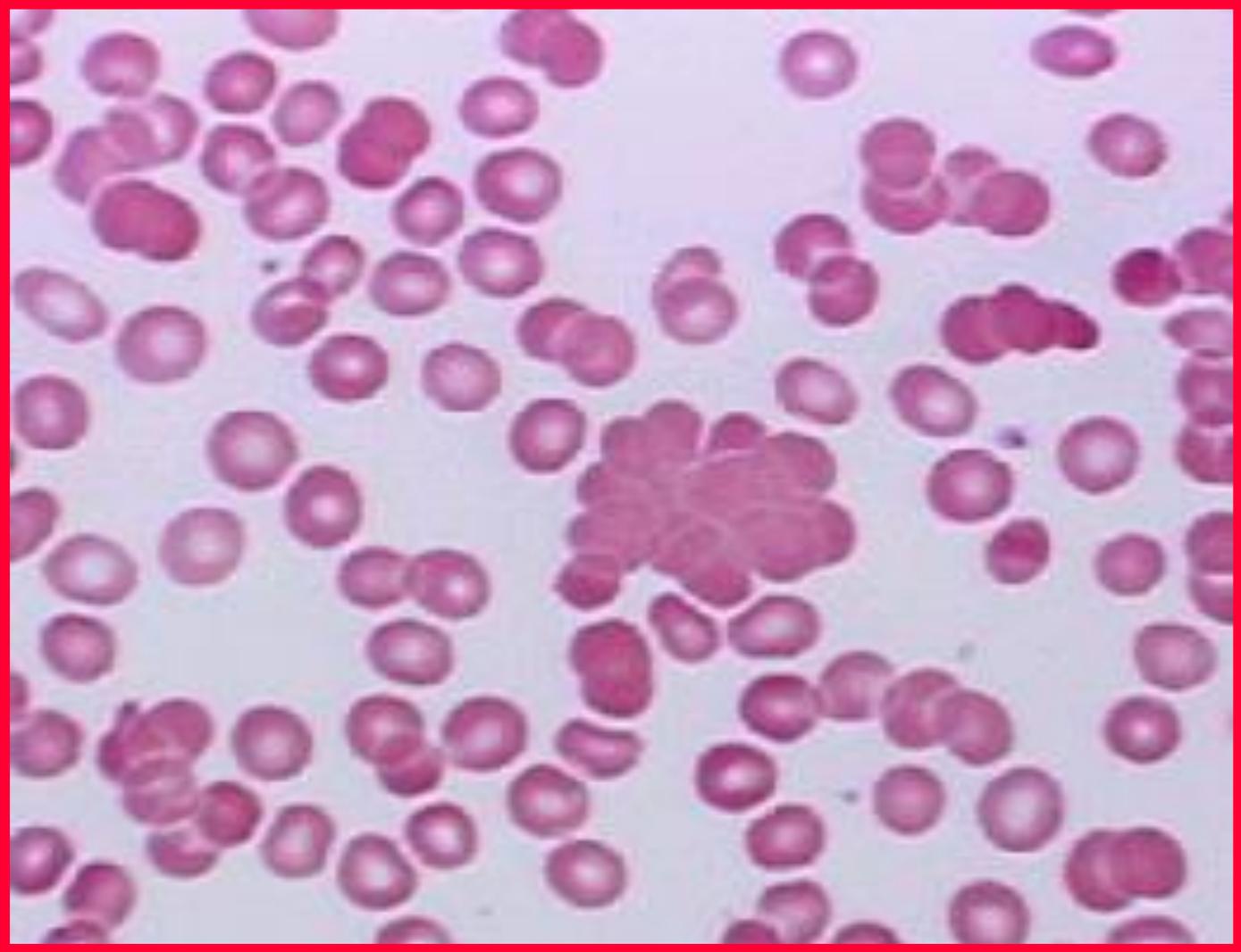


Satelitismo plaquetário:

**Fenômeno raro “*in vitro*”,
ocorre em alguns pacientes
em exposição do sangue ao
EDTA.**

**Motivo de falsa
plaquetopenia.**

**Comentário: deve-se colher o
sangue com o anticoagulante
citrato para uma contagem de
plaquetas mais acurada**

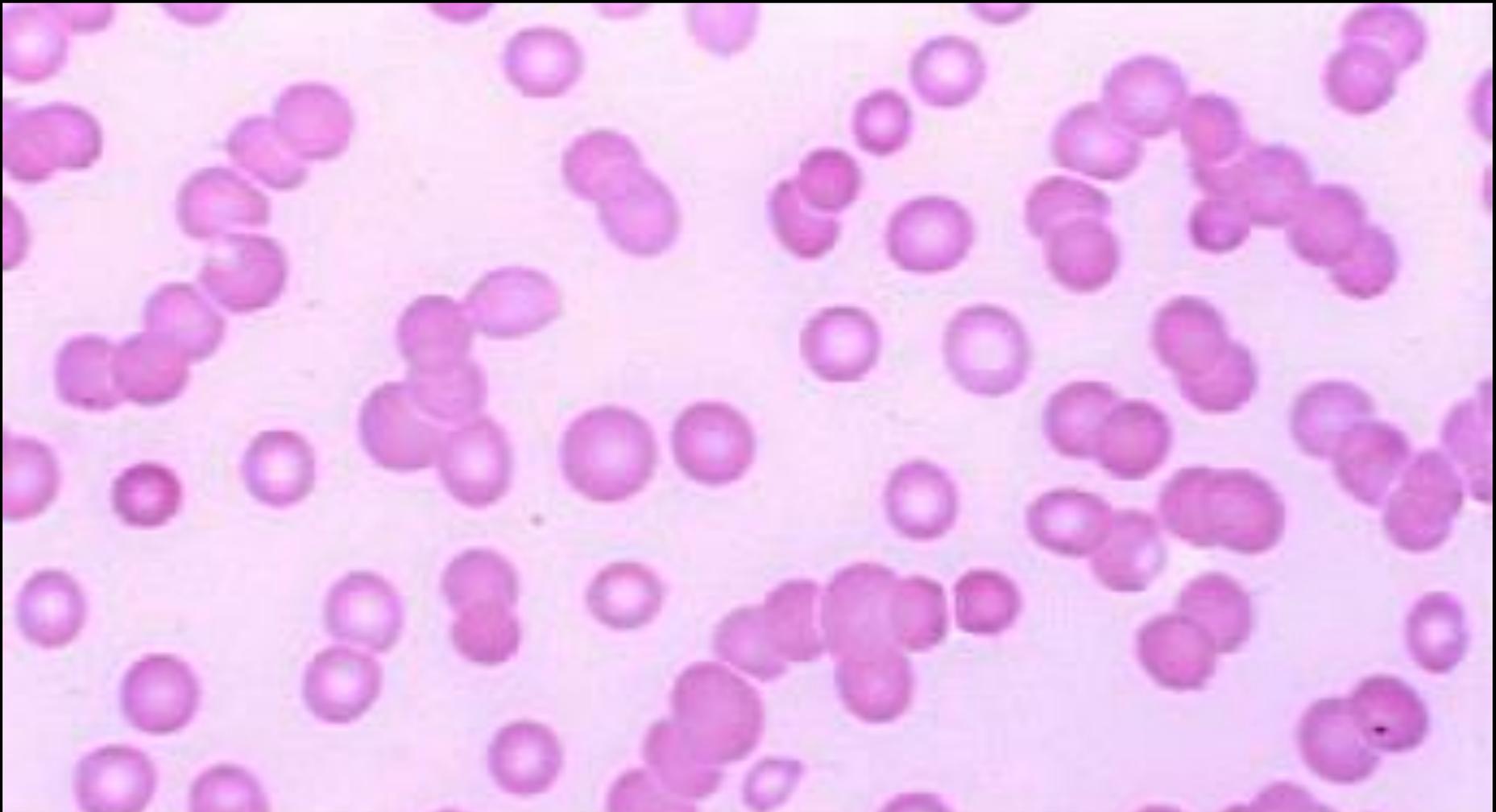


AGLUTINAÇÃO ERITROCITÁRIA:

Formação de aglomerados irregulares de eritrócitos.

Ocorre quando os eritrócitos estão revestidos por anticorpos.

Sugere-se título elevado de crioaglutininas



ROULEAUX: empilhamento eritrocitário observado na região útil da distensão sangüinea. Ocorre quando há um aumento na concentração plasmática de proteínas de alto peso molecular.

Principais causas: gravidez (aumento fibrinogênio), processos inflamatórios, discrasias das células plasmáticas (mieloma múltiplo- presença de paraproteína monoclonal).

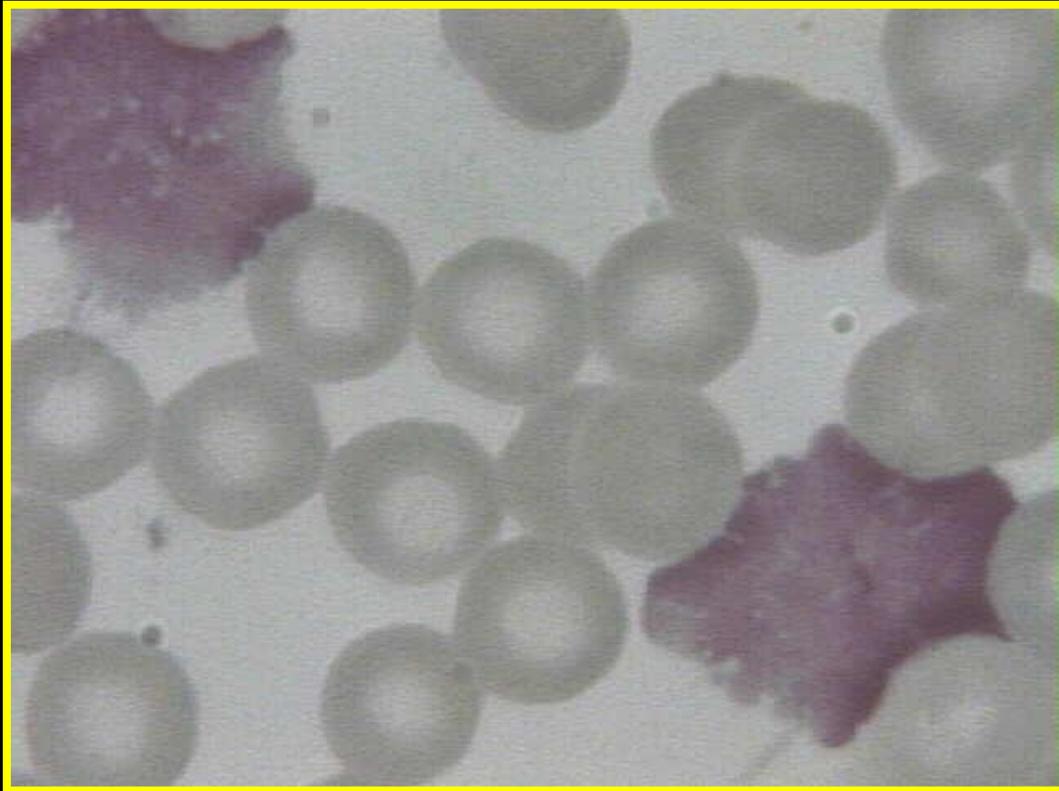
Rouleaux: empilhamento eritrocitário observado na região útil da distensão sangüinea



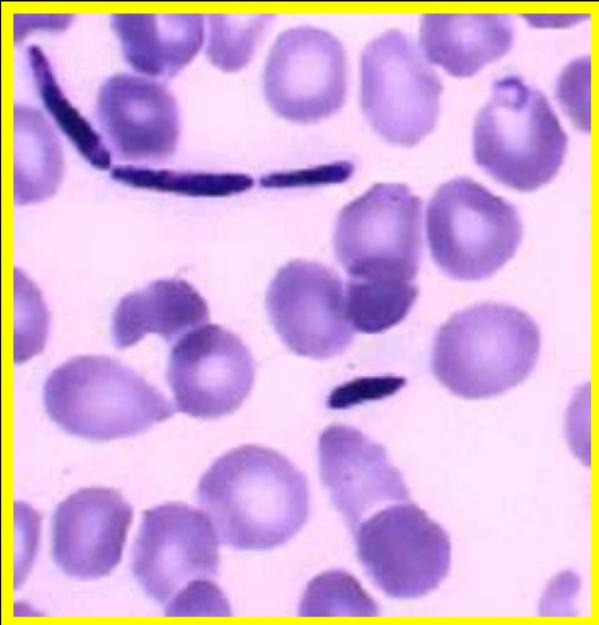


Comentário: Toda distensão sangüínea inicialmente deve-se analisar a sua distribuição celular, se o número está aumentado ou diminuído, qual o tipo predominante, se as formas são normais e/ou imaturas, as alterações morfológicas e inclusões, e então realizar a contagem diferencial.

MANCHAS NUCLEARES



Algumas manchas nucleares podem ser normais devido a pressão durante a realização da distensão sangüínea, mas o excesso delas com predomínio de linfócitos em pacientes adultos com mais de 40 anos, pode ser sugestivo de patologias como exemplo: doença linfoproliferativa crônica.



Hifas fúngica



Histoplasma



Candida albicans

Em pacientes neutropênicos febris ou com deficiência imunológica podem ser observados fungos livres ou dentro de neutrófilos e/ou monócitos na distensão sangüínea .

REFERÊNCIA

ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - São José do Rio Preto – SP

BAIN, BJ. Células sangüneas. Ed Artes médicas. 2.ed, São Paulo.

FAILACE, RENATO. Hemograma manual de interpretação. 4 ed, artmed, 2006.

HASSHIMOTO, Y. & SILVA P. H. Interpretação Laboratorial do Leucograma Robe Editorial, 2003.

HOFFBRAND, AV & PETTIT JE. Atlas Colorido de Hematologia Clínica 3 ed Manole.

LIMA-OLIVEIRA, G J. Bras. Patol. Med. Lab. vol.45 no.6 Rio de Janeiro Dec. 2009

ROSENFELD, R. Fundamentos do Hemograma – Guanabara Koogan, 2007.