Aula Prática 21 e 22/11/17 – Análises Clínicas – Hemato

**Contagem de hemácias:** Determinação de eritrócitos por mm de sangue

Método do Hemocitômetro em Câmara de Neubauer

- Em tubo de ensaio pipetar 4,0 ml de solução de Hayen (diluidor isotônico

contendo um fixador para conservação das células) e 20μl de sangue total (diluição 1:200) - “ 0,02 ml X 3,98ml “

**Solução diluente:**

Citrato de sódio - 3,8g

Fornol a 40% -2,0 mI

Água destilada q.s.p. - 100,0mI

Fixar a lamínula sobre a câmara de Neubauer e preenchê-la com o sangue diluído e

contar os cinco quadrados indicados na imagem abaixo. Para esta contagem pode ser

utilizada a objetiva microscópica de 10x.

Multiplicar o número de hemácias encontradas nos cinco quadrados por 10.000.

3.1.2. Macrodiluição Diluição 1:201 utilizando pipeta automática Técnica:

 - Em um tubo, colocar 4 mL de diluidor - Homogeneizar o sangue;

- Pipetar 20 µL de sangue - Homogeneizar

- Preencher a câmara de Neubauer

4.2. Contagem: Aguardar a sedimentação das hemácias e ao colocar a câmara no microscópio, não inclinar muito para que as células, por gravidade, não se desloquem para um lado só.

Multiplicar o resultado pelo respectivo fator de correção, calculado a partir do método utilizado (micro ou macrodiluição).

Fator de Correção O fator de correção é calculado com base na :

♣ diluição (200 ou 201)

♣ área da câmara onde as células foram contadas (fazer o cálculo para completar 1 mm2 – multiplicar por 5)

♣ altura da câmara (0,1 mm – para corrigir para 1 mm, multiplicar por 10).

 Nº de hemácias por mm3 (µL)= nº de hemácias contadas X Fator de Correção

Portanto:

Microdiluição: 200 x 5 x 10 x he contadas = he contadas x 10000 = he x 106 /mm3

Macrodiluição: 201 x 5 x 10 x he contadas = he contadas x 10050 = he x 106 /mm3



**Hematócrito:**

- Preencher ¾ do volume do tubo capilar, vedar uma das extremidades ( com massa de

modelar ou queimando).

- Colocar o tubo na microcentrífuga **(colocando a parte vedada para fora)**,

- Centrifugar a 10.000 RPM por 5 minutos.

Realizar a leitura em tabela apropriada.

**4.1.2.Dosagem da hemoglobina pelo método da cianometemoglobina**

É o método de referência para a dosagem de hemoglobina. Dosam todas as suas

formas exceto a sulfemoglobina. A desvantagem reside na extrema toxidade do cianeto

usado no preparo do reagente (solução de Drabkin), mas pode ser resolvida pela aquisição

já preparada, de concentração mínima.

Temos usado, com bons resultados, os reagentes *Labtest*; a solução de Drabkin

modificada e o padrão de hemoglobina de concentração conhecida. Calcula-se um fator

determinado a absorbância de 0,02 ml do padrão em 5ml da solução de cianeto, através da

fórmula:



O zero é estabelecido com água destilada em 540nm. O sangue em estudo, diluído de

modo idêntico a padrão (0,02 ml para 5 ml de Drabkin) fornece outro valor de absorbância, que multiplicando pelo fator de g% de hemoglobina pela multiplicação de

cada unidade de leitura pelo fator.

***Hb = Absorbância do paciente X Fator***

**4.1.4.Índices hematimétricos**

Índices hematológicos ou hematimétricos são determinados a partir da contagem

global dos eritrócitos, taxa de hemoglobina e determinação do hematócrito. Tais elementos,

deverão ser padronizados pelo laboratório, fornecendo-se sempre resultados na unidade de

percentagem do normal.

***V.C.M – Volume corpuscular médio***

É o volume médio das hemácias expresso em fentolitros. Representa, portanto, o

quociente de um determinado volume de hemácias pelo número de células contidas no

mesmo volume.

*** (nº eritrócitos)***

***H.C.M. – Hemoglobina corpuscular média:***

É o conteúdo médio de hemoglob ina nas hemácias expresso em picogramas.

Representa, portanto, o quociente de conteúdo de hemoglobina em um determinado volume

de hemácias pelo nº de células contidas no mesmo volume.

******

***C.H.C.M. – Concentração de hemoglobina corpuscular média:***

É a percentagem de hemoglobina em 100ml de hemácias.

******

**8.2. Hemossedimentação (VHS)**

A hemossedimentação mede a estabilidade da suspensão de hemácias no plasma que, por ser menos denso, favorece a sedimentação dos glóbulos pela ação da gravidade, quando colocados numa pipeta graduada de 0 a 200m com 2,5mm d diâmetro interno e 1ml de capacidade.

As hemácias em suspensão no plasma, colocadas na pipeta de Westergren, sofrem sedimentação com velocidade variável em função da concentração de fibrinogênio e globulinas, tamanho e forma das hemácias e alterações elétricas do plasma e dos glóbulos.

Inicialmente ocorre a queda individual das hemácias, seguida pela agregação dos glóbulos com formação de *rouleaux* e aumento da velocidade de hemossedimentação, que se torna constante para diminuir numa fase final, quando os glóbulos se concentram na porção inferior da pipeta. O aumento de fibrinogênio e globulinas é também responsável pela aceleração da hemossedimentação que fornece medida grosseira dessas substâncias no plasma.

*TÉCNICA:*

1. Colher 5ml de sangue do paciente em jejum pela manhã. Não apertar

demasiadamente o garrote, evitando estase venosa.

2. Colocar o sangue no frasco com anticoagulante EDTA e agitar por inversão ou

movimentos circulares até que se dissolva completamente.

3. Com pipeta de Westergren aspirar sangue até exatamente a marca zero.

4. Colocar a pipeta no suporte de modo a permanecer na posição vertical

5. Marcar o tempo.

6. Fazer a leitura em milímetros após uma hora ao nível da separação do plasma e

hemácias.Nas reticulocitoses pode haver uma imprecisão do limite de sedimentação,

dificultando a leitura exata.

**Contagem de reticulócitos:**

- Em um tubo de ensaio colocar 2 gotas de sangue e 2 gotas de azul de cresil brilhante -

incubar 15 minutos em banho- Maria 37º C.

- Fazer o esfregaço e contra corar com Panótico ou Leishman.

Observar de 1000 a 2000 células, marcando a porcentagem de Reticulócitos encontrados.

Cálculo:



**Curva de Fragilidade Osmótica**

Princípio: Os eritrócitos de pessoas portadoras de esferocitose são mais frágeis que os eritrócitos normais em soluções com concentrações diferenciadas de NaCl (0,1%, 0,2% ... a 0,9%). A hemólise dos eritrócitos é avaliada porcentualmente e comparada com o padrão de normalidade.

**Equipamento**

- tubo 12 x 75 mm

- micropipeta de 50 ul

- pipeta de 5 ml

- espectrofotômetro ou fotocolorímetro

Reagentes

1. Solução estoque de NaCl osmoticamente equivalente a 10%
* NaCl 9,0 g
* Na2HPO4 1,3 g
* NaH2PO4 . H2O
* 0,3 g H2O q.s.p. 100 ml
1. Solução trabalho de NaCl 0,1% a 0,9%



Procedimento

a. Identificar em cada tubo de hemólise a concentração da solução de NaCl que o mesmo

receberá (0,1%, 0,2% ... 0,9%).

b. Colocar em cada tubo 5 ml da solução de trabalho para cada concentração.

c. Adicionar em cada tubo **exatamente** 50 ml de sangue total coletado com heparina

(preferencialmente) ou EDTA. Homogeneizar suavemente por inversão até completa mistura do sangue na solução.

d. Deixar em repouso por 25 a 30 minutos. Centrifugar todos os tubos por 5 minutos a

2.000 rpm.

e. Retirar o sobrenadante com pipeta Pasteur de cada tubo, transferindo-o para outro

previamente identificado.

f. Fazer a leitura da densidade óptica (DO) de cada tubo em comprimento de onda 415

nm, ou filtro verde. Usar o sobrenadante da solução NaCl 0,9% como branco.

g. A densidade óptica do tubo NaCl 0,1% representará 100% de hemólise, e desse valor

serão calculados por regra de três simples todos os outros valores.

Ex.:

D.O. NaCl 0,1% ------100% lise

D.O. NaCl 0,2% ------x

x = % de lise de NaCl a 0,2%

**Contagem diferencial dos Leucócitos:**

Devido ao tamanho variado dos diferentes glóbulos brancos, sua distribuição no esfregaço

nem sempre é uniforme. Assim nas bordas e na cauda há em maior quantidade neutrófilos, eosinófilos e monócitos; ficando restritos à região central do esfregaço os linfócitos.

Para evitar erros de contagem deve ser feita percorrendo a lâmina toda porém descrevendo

um zigue-zague. Aconselha-se iniciar a contagem da região média do esfregaço (corpo)

para cauda.

Devemos contar 100 leucócitos para soltar o resultado em %. Terminada a contagem

devemos percorrer a lâmina procurando as modificações degenerativas ou granulações

atípicas e observar atentamente como se encontra a série vermelha.

Valores de referência: Relativo (%) Absoluto

Bastonetes 0 a 5 % 0 a 350

Neutrófilos 40 a 75 % 2800 a 5250

Linfócitos 20 a 40 % 1400 a 2800

Eosinófilos 1 a 4 % 70 a 280

Basófilos 0 a 1 % 0 a 70

Monócitos 2 a 8 % 140 a 560

Interpretação: Valores aumentados, quando respeitadas as condições de coleta e

descartadas outras condições fisiológicas que cursam com discreta leucocitose

(gravidez,fumantes), sugerem processos infecciosos ou processos malignos (leucemias

crônicas).

A leucopenia também está relacionada a diversos tipos de infecção (geraIemente viral),

pode ser genética, causada por drogas ou neoplasias.

**Contagem de Plaquetas: Liquido de REES**

**REAGENTES:**

Cada 100 mL do produto contém:

Citrato de Sódio ----------------------- 3,8%

Formol a 40% -------------------------- 0,2%

Azul de cresil brilhante --------------- 0,1%

Água destilada ------------------------- 100 mL

**ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES:**

O corante deve ser mantido no frasco original, bem vedado, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

**PROCEDIMENTO TÉCNICO:**

**1) Filtrar a solução antes do uso!**

2) Preencher a pipeta de Thoma, para glóbulos vermelhos, com sangue (colhido com EDTA) até a marca 0,5 e em seguida preencher com líquido diluente até a marca 101 (diluição 1/200). Caso se use sangue capilar, a pipeta

de Thoma deve ser preenchida primeiramente com sangue até a marca 1. A seguir, completar com líquido diluente até a marca 101 (diluição 1/100);

3) Agitar por 15 minutos (se possível, em agitador mecânico);

4) Desprezar as primeiras gotas (só contém o corante) que fluem da pipeta e então preencher a câmara de Neubauer, mantendo-a em câmara úmida por 20 minutos

5) Levar em seguida a câmara ao microscópio e efetuar a contagem das plaquetas no retículo central (nos 25 quadrados: área total de contagem = 1 mm2). Nesta técnica, as plaquetas apresentam-se coradas em azul e

refringentes.

**Contagem de Plaquetas: Becher e Cronkite**

Solução de Oxalato de Amônio 1%

Diluir o sangue total 1/20. Deixar 20 min. de repouso.