



CAMILA PAOLI

MANUAL DE PRÁTICAS LABORATORIAIS

Hematologia e Hemoterapia

**MANUAL DE PRÁTICAS
LABORATORIAIS
Hematologia e Hemoterapia**

CAMILA PAOLI

SUMÁRIO

[Prefácio](#)

[Coleta Sanguínea](#)

[Coleta capilar](#)

[Coleta arterial](#)

[Coleta venosa](#)

[Distendido Sanguíneo e Coloração](#)

[Confecção do distendido](#)

[Coloração Giemsa](#)

[Coloração Panótico](#)

[Determinação do Hematócrito](#)

[Contagem de Eritrócitos](#)

[Índices Hematimétricos](#)

[Contagem Total de Leucócitos](#)

[Fórmula Leucocitária](#)

[Contagem de Plaquetas](#)

[Contagem direta - Método de Ress-Ecker](#)

[Método indireto - Método de Fônio](#)

[Método estimado - Metodologia de Bárbara O'Connor /
Nosanchuck, Chang e Bennet](#)

[Contagem de Reticulócitos](#)

[Pesquisa de Drepanócitos](#)

[Velocidade de Hemossedimentação](#)

[Tipagem Sanguínea](#)

[Tipagem Direta](#)

[Tipagem Reversa](#)

[Teste de D Fraco](#)

[Prova da Antiglobulina Humana](#)

[Teste de Coombs Direto - Antiglobulina Humana Direta](#)

[Teste de Coombs Indireto- Antiglobulina Humana Indireta](#)

[Coagulação - Hemostasia](#)

[Tempo de Sangramento](#)

[Método de Duke](#)

[Método de Ivy](#)

[Prova de Fragilidade Capilar](#)

[Tempo de Coagulação](#)

[Tempo de Retração do Coágulo](#)

[Tempo de Protrombina](#)

Razão Internacionalizada Normalizada -

RNI.....118

[Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada](#)

[Conclusão](#)

[Referências Bibliográficas](#)

Prefácio

PREFÁCIO

O presente manual resulta de uma extensa pesquisa sobre as práticas comumente adotadas nos laboratórios que tratam de hematologia e hemoterapia.

Procurou-se dar atenção aos mais diversos aspectos com que se defrontam os profissionais da área, desde a coleta até a apresentação final dos resultados obtidos com cada exame.

Para cada etapa dos processos, o trabalho aponta minuciosamente todo o material que deve ser utilizado, cada procedimento que deve ser adotado, os cuidados a serem tomados, a forma de obtenção dos resultados, tudo com

vistas à consecução dos objetivos colimados no respectivo exame.

Um ponto que merece destaque é a apresentação não apenas das normas técnicas que devem ser empregadas, mas adentra, ainda, nas razões pelas quais devem ser tomadas determinadas decisões, apontando para os benefícios da direção oferecida, mesmo nos mais simples procedimentos.

Além do contexto de um simples manual, aqui apresentamos ainda, o embasamento teórico necessário ao entendimento sobre a relevância e a significação dos procedimentos a serem adotados, de modo a dar ao leitor a consciência das razões científicas que traspassam a metodologia a ser adotada.

Esse manual não pretende ser exaustivo quanto a todos os procedimentos a serem realizados em um laboratório de hematologia, mas abrange as principais e as mais comuns das situações com que se deparam os profissionais de tais laboratórios.

Assim é que se deu enfoque às formas de coleta e preparo das amostras de sangue, às contagens de eritrócitos, leucócitos, plaquetas, reticulócitos, assim como a determinação do hematócrito e a pesquisa de drepanócitos.

Tratou-se, ainda, das metodologias de aferição da velocidade de hemossedimentação, bem como tipagem sanguínea, teste

do D fraco e as provas de antiglobulina humana.

Uma sessão especial foi dedicada à ao estudo da homeostasia e a suas formas de equilíbrio, enfocando sobre os métodos a serem adotados com vistas a verificar a capacidade de coagulação nas situações em que deva ocorrer, ou a ocorrência de coagulação patológica ou fisiológica, como a formação de trombos.

Nesse sentido, foram abordados os procedimentos destinados a verificação de tempo de sangramento, de fragilidade capilar, de tempo de coagulação, de tempo de retração do coágulo, de tempo de protrombina e de tempo de tromboplastina parcial ativada.

Capítulo 1

Coleta Sanguínea

COLETA SANGUÍNEA

Coleta capilar

Essa coleta é feita para demonstração de tipagem sanguínea, distendido sanguíneo ou controle de glicose. O exame mais comum para esse tipo de coleta é o teste do pezinho, onde são testados o funcionamento da tireoide, fenilcetonúria, hemoglobina S e outras hemoglobinopatias.

Material

- Algodão
- Álcool 70%
- Agulha estéril ou lanceta

- Tubo capilar
- Massinha
- Papel filtro para teste do pezinho

Metodologia

Para a punção digital o dedo de preferência é o anelar, pois é menos caloso. Deve-se controlar a profundidade da punção, não podendo ser muito profunda nem muito superficial. Descartam-se as três primeiras gotas de sangue, pois nelas há uma grande quantidade de líquido intersticial, que pode interferir nos resultados. Para coletar o sangue, encostar de leve o tubo capilar até que o tubo esteja 2/3 do seu volume cheio. Vede a extremidade com massinha.

Para o teste do pezinho, a punção deverá ser feita no calcanhar, coletando o sangue com um papel de filtro específico para esse teste.

Em ambas as punções é importante limpar o local da punção com o auxílio de um algodão embebido com álcool a 70% e identificar o tubo ou papel de filtro com as informações do paciente. Após a punção, pressionar o algodão até o estancamento completo do sangramento.

Coleta arterial

A coleta arterial é a menos usada entre as coletas em uma rotina, pois a coleta é profunda e dolorosa. Ela é usada

quando é necessária a realização de uma gasometria (medição de CO_2 e O_2 arterial). Para essa coleta é feita a punção nas artérias braquial, radial ou femoral.

Material

- ☐ Algodão
- ☐ Álcool 70%
- ☐ Agulha estéril
- ☐ Seringa preparada com heparina
- ☐ Tubo

Metodologia

A punção da artéria pode ser um pouco mais desconfortável que a de uma veia, sendo preciso fazer a assepsia do local, punção firme e profunda na artéria até o sangue fluir pela seringa. Após a remoção da agulha, é necessária uma pressão firme sobre o local, para evitar extravasamento de sangue e hematomas.

Coleta venosa

A coleta venosa é a mais usada na rotina laboratorial por ser a menos incômoda para o paciente, mesmo retirando uma quantidade significativa de sangue para a realização de diversos exames. A punção é usualmente feita na fossa anticubital, podendo também ser feita na mão ou no pé.

Material

- ☐ Algodão
- ☐ Álcool 70%
- ☐ Torniquete
- ☐ Agulha estéril ou lanceta
- ☐ Canhão para coleta a vácuo
- ☐ Tubo de coleta

Metodologia

- ☐ Recepção ao paciente:

Conferir a identidade do paciente e explicar o procedimento. Identificar os exames a serem realizados e separar os tubos necessários [Sangue com EDTA - tampa **roxa** , Soro - tampa **vermelha** ou **amarela** , Sangue citratado (para coagulograma) - tampa **azul** , Fluoreto (glicose) - tampa **cinza** , Heparina - tampa **verde**]. O braço do paciente deve estar em linha reta do ombro ao punho para que as veias fiquem mais acessíveis e o paciente mais confortável. O cotovelo não pode estar dobrado e a palma da mão deve estar virada para cima.

- ☐ Preparação:

Colocar o torniquete a 5cm da fossa anticubital evitando que o fluxo arterial seja interrompido. O torniquete não deve ser deixado no braço por mais de dois minutos para evitar

alterações no cálcio e coagulação, assim como formação de grumos plaquetários. Nesses dois minutos localizar uma veia de bom calibre e fácil acesso. As veias com maior facilidade de encontrar na fossa antecubital são: cefálica, mediana cubital, basílica, mediana basílica, mediana cefálica, antebraquial. Na mão são: veia do dorso da mão, veia marginal da mão. Após a identificação da veia, retirar o torniquete e separar todo o material necessário.

□ Coleta:

Colocar o torniquete 10cm acima do local da punção e sentir a veia a ser puncionada, fazer assepsia do local com algodão e álcool 70%.

Utilizando a seringa: segurar a seringa firmemente, e inserir a agulha em um ângulo oblíquo, com bisel voltado para cima, no interior da veia. Ao perceber sangue no interior da agulha, retirar todo o sangue necessário na coleta, como na figura 1.

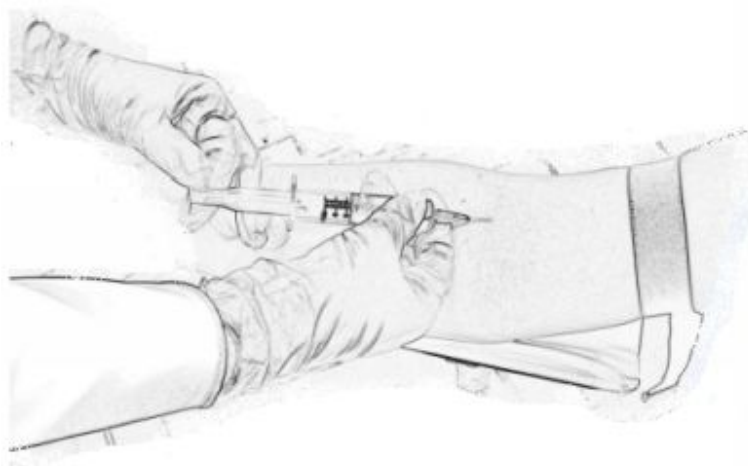


Figura 1 - Coleta venosa com seringa

Utilizando o canhão de coleta a vácuo: inserir a agulha do canhão em um ângulo oblíquo, com o bisel voltado para cima, no interior da veia. Após a inserção da agulha na veia, encaixar o tubo de coleta no canhão, para a coleta do sangue, como na figura 2. O vácuo dentro do tubo é o que permitirá que o tubo se encha. Caso seja necessário encher mais de um tubo, retirar o tubo cheio com cuidado para evitar a movimentação da agulha, e colocar o novo tubo no canhão. Após terminar, retirar o tubo de coleta antes de retirar a agulha.

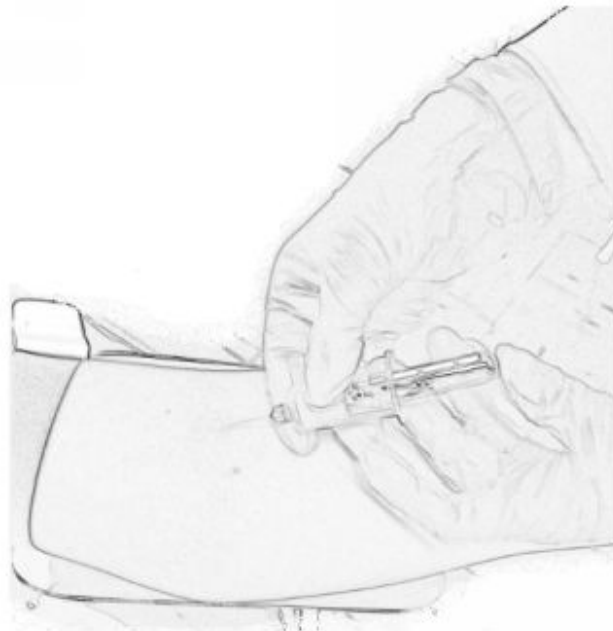


Figura 2 - Coleta venosa com canhão a vácuo

Liberar o fluxo sanguíneo com a retirada do torniquete, retirar a agulha e fazer pressão no local da punção com auxílio de um algodão. Colocar o sangue nos tubos. Descartar a agulha. Verifique se o sangramento estancou e coloque um BloodStop

no local. Libere o paciente indicando onde ele pode interromper o jejum.

Capítulo 2

Distendido Sanguíneo e Coloração

DISTENDIDO SANGUÍNEO E COLORAÇÃO

A confecção de um distendido sanguíneo é o ponto crucial para a realização de um hemograma confiável, por isso deve seguir uma série de padrões de exigências em um bom laboratório. Um bom distendido deve ser livre de falhas, bolhas e paradas, não muito fino nem espesso demais, cauda evidente e livre de falhas. Deve conter três áreas distintas: cabeça, corpo e cauda. O distendido ideal deve ser feito no momento da coleta, com o sangue sem anticoagulantes. Com o uso da coleta a vácuo e da redução do tempo de coleta, o distendido atualmente é feito com sangue com EDTA. Depois que o distendido é realizado, deve secar e corar.

Confecção do distendido

Material

- Sangue com EDTA
- Lâmina de vidro com borda fosca
- Lâmina extensora
- Tubo de hemólise

Metodologia

Antes de fazer o distendido, verificar se a lâmina está limpa e desengordurada e identificar a lâmina com lápis demográfico na borda fosca. Com auxílio do fundo do tubo de hemólise, colocar uma gota do sangue com EDTA a aproximadamente 0,5cm da borda fosca.

Com uma inclinação de 45º, colocar a lâmina extensora a frente da gota de sangue e levemente puxar a extensora até que o sangue, por capilaridade, percorra toda a borda da extensora. Distender a lâmina com movimento uniforme e sem paradas, mantendo a lâmina em contato de modo que se forme uma área franjada na parte final do distendido (cauda).

Após a confecção de um distendido, esperar que seque totalmente para que seja feito a fixação e coloração.

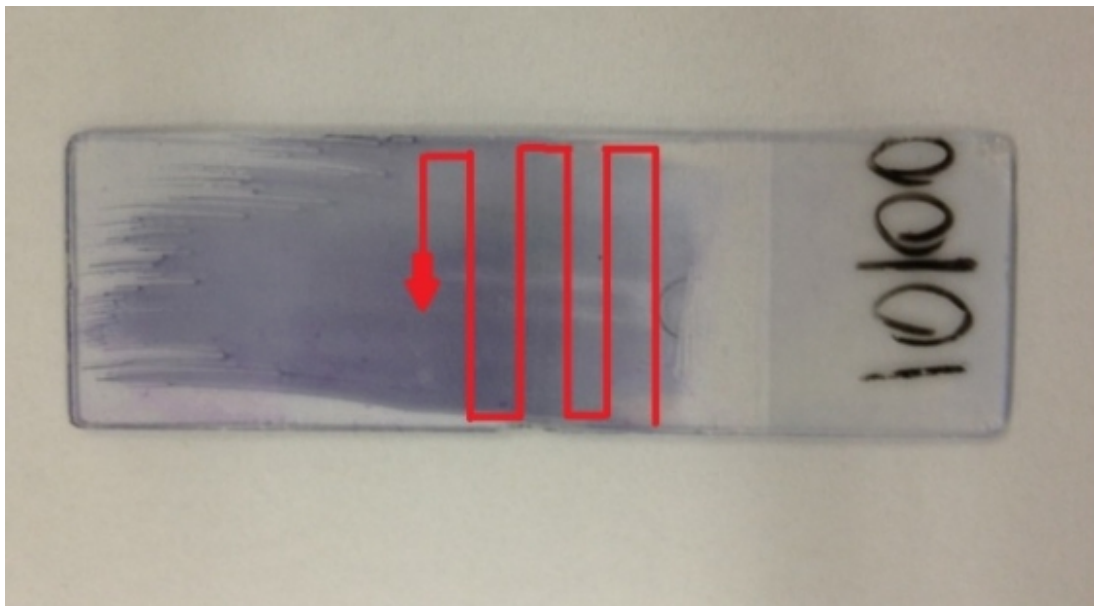


Figura 3 - Distendido sanguíneo corado com Panótico. A seta indica o sentido para leitura da lâmina em zigue-zague

Coloração Giemsa

A coloração criada por Giemsa é uma mistura de azur II (equimolar de azur I e azul de metileno) e eosinato de azur II (combinação de equimolar de azur I, azul de metileno e eosina amarelada). Esse corante pode ser usado em distendidos de sangue periférico, medula óssea ou estudos citológicos. Essa coloração pode ser associada a outras técnicas para uma coloração melhor e mais detalhada.

Material

- Corante Giemsa
- Metanol
- Água corrente
- Suporte para coloração

Metodologia

Após a secagem total do distendido, colocar 20 gotas de metanol sobre o distendido e aguardar por dois minutos a fixação e escorrer o metanol sem lavar. Cobrir toda a superfície do distendido com a solução do corante Giemsa e aguardar por 10 minutos. Lavar a lâmina com água corrente e deixar secar em posição vertical. A coloração deve de um tom róseo uniforme. Caso a cor esteja em um tom avermelhado, o

corante atuou por pouco tempo. Se a cor estiver acinzentada, o corante agiu por muito tempo.

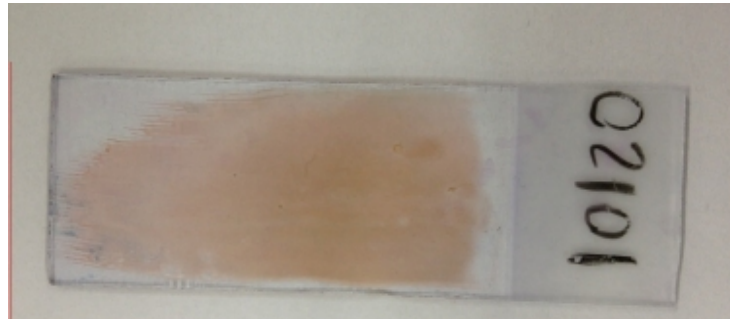


Figura 4 - Distendido corado com Giemsa

Coloração Panótico

A coloração mais utilizada na hematologia é o Panótico, uma das variações do método de Romanowsky, que idealizou um método onde estruturas diferentes poderiam ser coradas com uma solução de mistura de corantes como eosina (cora estruturas acidófilas em rosa) e azul de metileno (cora estruturas basofílicas em azul).

Material

- Metanol
- Corante eosina
- Corante azul de metileno
- Água destilada

Metodologia

A fixação é usualmente feita com metanol, mergulhando a lâmina por 30 segundos. Para a coloração, mergulhar a lâmina em corante eosina por 30 segundos e em azul de metileno por 30 segundos. O excesso do corante deve ser retirado com água destilada. Depois que a lâmina secar naturalmente pode-se observá-la ao microscópio.

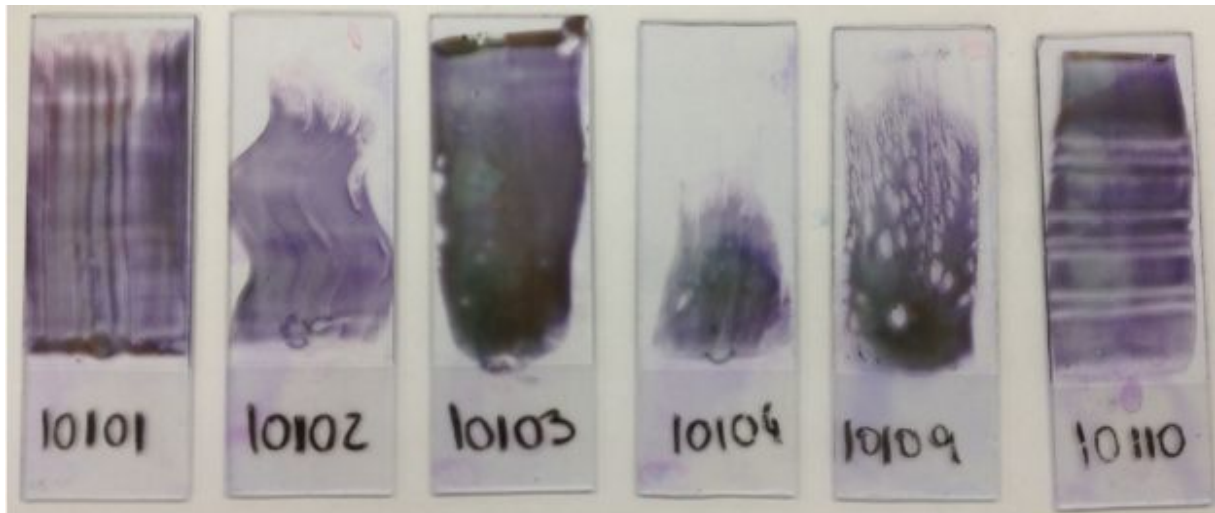


Figura 5 - Erros comum na confecção do distendido sanguíneo

Na figura 5, estão exemplos de distendidos não recomendados para realizar a visualização de células sanguíneas, pois apresentam falhas como:

- Lâmina 10101: A lâmina distensora usada apresentava falhas em sua extremidade, causando ranhuras na extensão do distendido.
- Lâmina 10102: Falta de firmeza na mão, causa distendidos torcidos.

- Lâmina 10103: O distendido ficou espesso devido ao excesso de sangue colocado na lâmina.

- Lâmina 10104: A pequena quantidade de sangue na lâmina ocasionou um distendido muito curto.

- Lâmina 10109: A lâmina suja ocasiona bolhas de gordura em toda a extensão do distendido. Para evitar as bolhas, limpar bem as lâminas antes do distendido.

- Lâmina 10110: Interrupções na extensão do distendido são devido à falta de firmeza durante a realização do mesmo. Firmar as mãos antes de iniciar o distendido, evita esse tipo de falha.

Evitando esses erros, o distendido deve ocupar dois terços da extensão da lâmina e conter cabeça, corpo e calda bem definidos, sem excesso de sangue, para que o mesmo seja fino e a coloração fixe de forma correta para facilitar a visualização.

Capítulo 3

Determinação do Hematócrito

DETERMINAÇÃO DO HEMATÓCRITO

O hematócrito é a porcentagem de mililitros de hemácia por decilitro de sangue, ou seja, volume de hemácias em uma amostra de sangue. De acordo com Wintrobe, o sangue deve ser colocado em um tubo graduado e centrifugado até a sedimentação completa das hemácias.

Macrohematócrito

O método descrito por Wintrobe é o de Macrohematócrito, onde é utilizado um tubo graduado, que deve ser centrifugado por trinta minutos devido à baixa rotação da centrífuga.

Material

- Sangue total com EDTA
- Tubo graduado de Wintrobe
- Seringa com agulha de biópsia
- Centrífuga

Metodologia

Com a ajuda da agulha de biópsia, coloque o sangue no tubo graduado de Wintrobe, cuidando para não formar bolhas, até a marca 100. Coloque o tubo na centrífuga a 3.000rpm por 30 minutos. Após esse tempo, retire o tubo da centrífuga evitando agitar o tubo, e observe a coluna de hemácias. No topo da coluna de hemácias há a camada leucocitária, que deve ser descartada na hora de observar o valor. O valor achado na graduação corresponde ao valor em porcentagem do hematócrito.

Microhematócrito

Com a fabricação da microcentrífuga, essa técnica foi melhorada para reduzir o tempo da técnica e a quantidade de sangue utilizado devido à alta rotação da microcentrífuga (até 15.000rpm) que fornece uma sedimentação em até cinco minutos, utilizando-se de tubos capilares.

Material

- ☐ Sangue total com EDTA
- ☐ Tubo capilar
- ☐ Microcentrífuga
- ☐ Massinha de modelar
- ☐ Escala para microhematócrito

Metodologia



Figura 6 - Microhematócrito corretamente preenchido

Preencher o tubo capilar com o sangue com EDTA até dois terços do seu volume, utilizando-se da capilaridade do tubo para preenchê-lo. Selar o tubo com a massinha de modelar (aproximadamente 5mm). Fazer o microhematócrito sempre em duplicata para assegurar um resultado correto.

Colocar o tubo na microcentrífuga com a parte selada virada para o exterior, observando a numeração de cada paciente na centrífuga, lembrando-se de balanceá-la, como na figura 6. Ligar a centrífuga a 15.000rpm por cinco minutos.

Para fazer a leitura, utilizar a escala para microhematócrito, colocando o tubo na escala, posicionando o final do plasma na linha 100 e o início da coluna de hemácias na linha zero. Após achar a posição correta do tubo, identificar a linha ao fim da camada de hemácias sem contar com a massa leucocitária. O valor encontrado corresponde ao valor em porcentagem do hematócrito.



Figura 7 - Microcentrífuga calibrada com tubos capilares

Valores de referência

- 36% a 46% para mulheres
- 41% a 51% para homens
- 34% a 44% para crianças

Discussão



Figura 8 - Microhematócrito após centrifugação: observe o plasma e a coluna de hemácias e a massinha

Alguns fatores podem influenciar na leitura do resultado como, por exemplo, o excesso de massinha de modelar na vedação, bolhas de ar no tubo, erro na leitura (leitura a partir da massinha ou contando com a camada leucocitária).

O resultado alterado pode indicar diversas patologias ou apenas condições fisiológicas. Por isso, a partir desse resultado devem ser feitos outros exames para fechar o diagnóstico.

Um resultado acima do esperado pode indicar aumento do tamanho ou volume das hemácias, como acontece em altas altitudes, policetemias ou poliglobulinas. Desidratação também pode ser a causa de um aumento de hematócrito devido à hemoconcentração que ocorre nesses casos.

Resultados menores do que o esperado pode ser decorrente de uma baixa de eritrócitos (anemias) ou por aumento de H_2O , como ocorre na hidratação venosa. Insuficiência renal crônica, hemólises, hemorragias, hipertireoidismo e cirrose também podem ocasionar valores alterados.

Capítulo 4

Contagem de Eritrócitos

CONTAGEM TOTAL DE ERITRÓCITOS

Os eritrócitos são os elementos figurados mais numerosos do sangue. São células bicôncavas e anucleadas com aproximadamente 7 μ de diâmetro. Sua superfície bicôncava aumenta a superfície de contato para facilitar a troca gasosa, que é a principal função dessas células. Essas células utilizam a glicose como fonte de energia, mas como não possuem mitocôndrias para realizar a fosforização oxidativa para produzirem ATP, o ATP é produzido a partir do lactato. São células muito acidófilas devido ao grande teor de hemoglobina, que compõem 32% do peso total da hemácia.

A contagem de eritrócitos é utilizada para detectar anomalias como anemia e policetemia ao determinar o número de eritrócitos. É importante também a observação de eritrócitos anômalos que podem indicar alguns estados patológicos.

Eritropoiese

A eritropoiese é o processo de produção e maturação dos eritrócitos, que se inicia na medula óssea com uma célula-tronco pluripotente. Dois fatores estimulam a eritropoiese: CFU-E e eritropoetina (EPO).

Esses fatores atuam na célula pluripotente que se transforma em uma célula eritroblástica indiferenciada, o proeritroblasto, que tem capacidade de se dividir sucessivamente e perder seus nucléolos, formando as células eritroblásticas, já com volume plasmático bem menor, embora continuem a acumular hemoglobina no citoplasma. As células vão sofrendo

desnucleação e perdendo o excesso de membrana que cerca o ácido desoxirribonucleico até ser expulso da célula.

Esse processo segue até o eritroblasto basofílico ser transformado em eritroblasto policromatoso, uma célula com menor citoplasma e núcleo e que possui grandes grupamentos de cromatina, e eritroblasto ortocromatoso. Esse último pode perder o núcleo através do citoplasma, sobrando assim um eritrócito jovem, denominado reticulócito. O reticulócito é uma célula que já circula no sangue, porém ainda deve passar por maturação na corrente sanguínea para se tornar um eritrócito maduro.

Os eritrócitos têm vida média de 120 dias, e após esse período são destruídos pelo baço, processo conhecido como hemocaterese.

Morfologia eritrocitária

- Microcitose: São hemácias com diâmetro inferior a $6,5\mu$.
- Hipocromia: São hemácias com menos hemoglobina, o que altera sua cor.
- Macrocitose: É o aumento no tamanho das hemácias.
- Anisocitose: Hemácias de tamanhos variados.
- Ovalócitos: Hemácias ovaladas

- Estomatócitos: Hemácias com uma fenda linear central.
- Drepanócitos: Hemácias em forma de foice.
- Dacriócitos: Hemácias em forma de lágrimas.
- Equinócios: Hemácias crenadas.
- Acantócitos: Hemácias com espículos irregulares.
- Codócitos: Hemácias em forma de sino.
- Poiquilocitose: Hemácias de formatos variados.

Soluções diluidoras

- Líquido de Hayen: Composto por 0,5g de bicarbonato de mercúrio, 1g de cloreto de Sódio, 5g de sulfato de Sódio e 200ml de água destilada.
- Líquido de Dacie: Composto por 3,8g de citrato de sódio, 2ml de formol a 40% e 200ml água destilada.
- Líquido de Gower: Composto por 12,5g de sulfato de sódio, 33,3ml de ácido acético glacial e 200ml de água destilada.
- Solução salina a 0,85%: 8,5g de cloreto de sódio e 1.000ml de água destilada

Contagem de eritrócitos

Material

- ☐ Sangue com EDTA
- ☐ Líquido diluidor
- ☐ Câmara de Neubauer
- ☐ Tubo de ensaio
- ☐ Pipeta de vidro 5ml
- ☐ Pipeta semi- automática

Metodologia

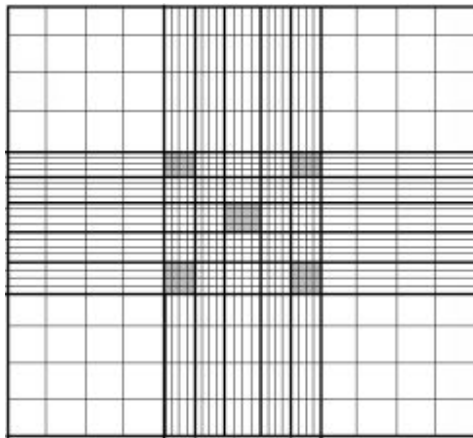
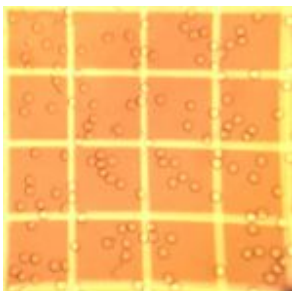


Figura 9 - Esquema da câmara de Neubauer. Em destaque, onde realizar a contagem de eritrócitos.

Com auxílio da pipeta de vidro, colocar 4ml do líquido diluidor a sua escolha em um tubo de ensaio. Adicionar 0,02ml de sangue bem homogeneizado, lembrando-se de limpar a parte exterior da ponteira e misturar bem. Preparar a câmara de Neubauer e colocar a mistura em um retículo da câmara, evitando bolhas e extravasamento do líquido. Aguardar três a cinco minutos para a sedimentação das células.

Após esse tempo, focalizar em objetiva de 40x. A contagem deve ser feita no quadrante central da câmara, em todos os vinte e cinco quadrados ou em cinco (quatro laterais e o central), como na figura 9.



Os eritrócitos apareceram como pequenos círculos birrefringentes, como na figura 10.

Cálculos

Figura 10 - Eritrócitos na câmara de Neubauer

Valor das hemácias contadas nos cinco quadrados, multiplicando por 200 referente à diluição, por 5 pelos quadrados não contados (se contar os vinte e cinco quadrados, não multiplicar por 5), por 10 do fator de correção da lamínula.

Simplificando, o cálculo base é:

$$\text{Hm contadas} \times 5 \times 10 \times 200$$

ou

$$\text{Hm contadas} \times 1.0000$$

Valores de referência

- 4.000.000 a 5.000.000 por μl de sangue para mulheres
- 4.500.000 a 5.500.000 por μl de sangue para homens

□ 5.500.000 a 7.000.000 por μl de sangue para recém-nascidos

Discussão

O valor de eritrócitos é um valor usado para analisar duas principais alterações sanguíneas, mas também é importante analisar os eritrócitos em um distendido corado, para analisar a morfologia.

Anemia: Quando ocorre redução no número de eritrócitos, e possível redução no valor de hemoglobina. Pode ser um falso resultado devido a uma hidratação venosa (hemodiluição).

Poliglobulinas: Quando ocorre aumento no número de eritrócitos. Pode ser causado por desidratação ou uso de diuréticos. É comum em moradores de altas altitudes, pacientes com DPOC ou outra alteração respiratória (a eritrocitose auxilia no transporte de oxigênio). Pode ser encontrada em algumas hemoglobinopatias ou na policetemia vera, que é uma doença mieloproliferativa.

Índices Hematimétricos

Os índices hematimétricos são parâmetros que fornecem informações acerca do tamanho dos eritrócitos, da concentração de hemoglobina, do peso da hemoglobina em uma hemácia média e da variação de tamanho entre os eritrócitos. Os índices são usados na avaliação inicial do

diagnóstico das anemias e, quando associado aos achados clínicos podem auxiliar no diagnóstico empírico. Os índices hematimétricos são:

Volume corpuscular médio (VCM).

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

O VCM é calculado a partir da razão entre o hematócrito e a quantidade de hemácias, multiplicado por 10 e é expresso em fentolitros (fl). Os valores normais para o VCM estão entre 80 e 100fl.

Um VCM elevado indica hemácias macrocíticas, ou seja, de tamanho aumentado. Um VCM reduzidos indica hemácias microcíticas, ou seja, hemácias pequenas. Esse índice pode ser usado para diferenciar vários tipos de anemia como, por exemplo, anemias por carência de ácido fólico provocam macrocitose, enquanto anemias ferroprivas se apresentam com hemácias pequenas.

Hemoglobina Corpuscular Média (HCM).

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb}}{\text{Hm}} \times 10$$

O HCM é o valor médio da hemoglobina em cada hemácia, e por isso seu cálculo é a razão do valor de hemoglobina e a quantidade de hemácias do paciente multiplicados por 10.

Esse índice é expresso em picogramas (pg) e seus valores normais variam de 26 e 35 pg.

Em quantidades baixas, o HCM indica uma redução na concentração de hemoglobinas nos eritrócitos, o que gera uma hipocromia, enquanto valores aumentados do HCM indicam aumento na quantidade de hemoglobina nos eritrócitos logo, esses estão hiperocrômicos.

Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

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

O CHCM é o índice que compreende a quantidade de hemoglobina em um total de eritrócitos, por isso é calculado com a razão da hemoglobina pela porcentagem de hematócrito e o valor é multiplicado por 100 para o resultado ser em gramas por decilitros (g/dl).

Esse índice, tal como o HCM, avalia a hemoglobina nas hemácias e também pode indicar hipocromia ou hiperocromia. Seu valor de referência é de 31 a 36 g/dl.

Variação de tamanho entre os eritrócitos (RDW).

O RDW avalia a anisocitose, variação de tamanho das hemácias. Esse não é um índice que pode ser calculado, então para a obtenção do RDW deve ser usado um aparelho automatizado. O valor de referência é de 11,5 a 15%, já que

naturalmente existe uma pequena diferença entre os eritrócitos.

Quando elevado, significa que existem muitas hemácias de tamanhos diferentes circulando. Isso pode indicar hemácias com alterações na sua morfologia, como por exemplo, em anemias ferroprivas ou falciforme, onde existe diversos eritrócitos alterados.

Capítulo 5

Contagem Total de Leucócitos

CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS

Leucócitos são um grupo de células sanguíneas formado por dois principais tipos: granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e os agranulócitos (linfócitos e monócitos). Essas células desempenham um papel essencial na defesa do organismo e são as únicas células nucleadas normalmente encontradas no sangue dos mamíferos. Eles são os principais responsáveis pela imunidade humoral (produção de anticorpos) e são capazes de atravessar paredes dos capilares para entrar em outros tecidos (diapedese).

Os granulócitos possuem núcleo segmentado e grânulos em seu citoplasma. Cada granulócito possui grânulos específicos. Os neutrófilos possuem grânulos finos e levemente rosados, enquanto os eosinófilos possuem grandes grânulos alaranjados e os basófilos possuem grânulos grosseiros e escuros que recobrem todo o citoplasma. Essas células possuem função de fagocitose de microorganismos invasores e liberação de substâncias inflamatórias.

Os agranulócitos são os linfócitos, que são células pequenas e arredondadas com uma grande relação núcleo-citoplasma. Os monócitos, mesmo sendo classificados como agranulócitos, possuem finos grânulos basofílicos em seu citoplasma e um núcleo caracterizado por uma invaginação. Os linfócitos possuem como principal função a produção de anticorpos, enquanto os monócitos são os principais fagócitos do organismo.

Granulopoiese

Uma célula-tronco totipotente pode dar origem a duas linhagens: mielóide e linfóide. Os granulócitos são formados a partir da linhagem microorganismos que é estimulada por fatores de crescimento microorganismos específicos para cada tipo celular.

Para que a célula-tronco siga para a linhagem mielocítica ela sofre influência do CSF-GM.

Os neutrófilos são formados pela influência das citocinas IL-1, IL-2 e TNF. Essas citocinas atuam sobre as células da linhagem microorganismos para que amadureçam e se transformem em mieloblasto neutrofílico (grande célula com núcleo grande, citoplasma basofílico) e se transformam em promielócito que por sua vez amadurecem até virarem mielócitos e posteriormente em metamielócitos que ainda se encontram na medula óssea. A próxima fase de maturação são os bastonetes, que já podem ser encontrados na corrente

sanguínea, onde amadurecem e se tornam neutrófilos segmentados.

Os eosinófilos têm uma maturação semelhante aos neutrófilos, porém as citocinas que atuam nessa linhagem são IL-3, SCF e IL-4. A partir da célula precursora da linhagem microorganismos, as citocinas atuam para estimular a produção de eosinófilos. A primeira célula é o mielócito eosinofílico que amadurece se transformando em metamielócito eosinofílico e depois em bastonete eosinofílico. Por fim, a célula madura que já está presente na corrente sanguínea é o eosinófilo.

Outro granulócito que segue a mesma linha de maturação é o basófilo. As citocinas que atuam na maturação de um basófilo são IL-3, IL-5 e SCF. Quando essas citocinas atuam sobre as células primordiais na linhagem microorganismos, dão origem ao mieloblasto basofílico que matura para o promieloblasto, que por sua vez se transforma em mielócito e em seguida em metamielócito para amadurecer e se transformar em bastonete basofílico que sai da medula óssea e por fim vira um basófilo maduro.

Agranulopoiese

Além dos granulócitos, existem ainda dois outros tipos de leucócitos. São eles os linfócitos e monócitos.

Os monócitos têm origem na linhagem microorganismos, e quando o CFU-M atua, existe o estímulo para produção de monoblastos, que se transformam em promonócitos e por fim maturam até virarem monócitos. Os monócitos são encontrados no sangue, e quando existe uma demanda dessas células em tecidos, eles se transformam em macrófagos.

Os linfócitos são oriundos na linhagem linfóide onde atuam as citocinas SCF, IL-4, FLT-34, IL-3, IL-1, IL-6 e IL-7 para a produção de linfócitos B. Um linfoblasto B é estimulado para maturar, inicialmente para prolinfócito B, depois para linfócito B médio e por fim se transforma em um linfócito pequeno B. Esse último pode ser estimulado para se transformar em um plasmócito, se ele for ativado para começar a produção de anticorpos. Os linfócitos B são produzidos e amadurecidos na medula óssea. Em contrapartida, os linfócitos T são produzidos na medula óssea e maturados em outros órgãos hematopoiéticos. Essas células são produzidas com o estímulo das citocinas IL-2, SCF, IL-8, FLT-3L, IL-3, L-1, IL-6 e IL-7 que atuam sobre o precursor linfóide e estimulam o linfoblasto (que antes estavam na medula óssea, e depois se dirigem para a região cortical, onde os receptores são induzidos e as células vão, pelos vasos linfáticos até o timo/intestino) a se transformar em prolinfócito T, depois em linfócito T médio e posteriormente em linfócito T pequeno. Durante a primeira infância, o linfócito T é maturado no timo, porém com a atrofia progressiva desse órgão, o intestino assume a função de amadurecer essas células.

Técnica

Líquido Diluidor

O líquido diluidor para contagem de leucócitos é o líquido de Turk, composto por 2ml de ácido acético glacial, 10ml de azul de metileno a 1% ou violeta genciana e quantidade suficiente para (q.s.p.) 100ml de água destilada. O ácido acético glacial causa hemólise em células anucleadas, ou seja, destrói as hemácias. O azul de metileno ou violeta genciana cora os leucócitos, facilitando a visualização dessas células.

Material

- Líquido diluidor - Líquido de Turk
- Tubo de hemólise
- Pipetas semi-automáticas
- Câmara de Neubauer

Metodologia

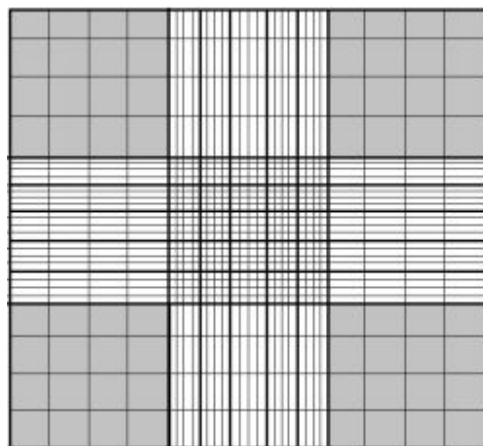


Figura 11 - Esquema da câmara de Neubauer. Em destaque, onde realizar a contagem de leucócitos



Figura 12 - Leucócitos na câmara de Neubauer

O método manual mais utilizado nos laboratórios é a contagem manual alternativa, que utiliza a mesma diluição da pipeta de Thoma, porém em um tubo de hemólise. Deve-se 0,4ml do líquido de Turk em um tubo de hemólise e adiciona-se 0,02ml da amostra de sangue e homogeneíze. Colocar a diluição na câmara de Neubauer sem bolhas ou extravasamento e aguardar cinco minutos para a sedimentação. Após esse tempo, fazer a contagem dos leucócitos nos quatro quadrantes laterais, como na figura 11.

Os leucócitos apareceram como pequenos círculos com núcleo, como na figura 12. Nessa técnica não é possível identificar os diferentes tipos de leucócitos.

Cálculos

Depois da contagem dos leucócitos nos quadrantes laterais, multiplicar o valor encontrado por 20, referente à diluição, e por 10, referente ao fator de correção da lamínula e dividir o resultado por 4, referente aos quatro quadrantes contados. Assim temos:

$$\text{Leucócitos} = \frac{\text{Leucócitos contados} \times 20 \times 10}{4}$$

ou

$$\text{Leucóцитos} = \text{Leucóцитos contados} \times 50$$

Valores de referência

- Recém-nascidos: 10.000 a 25.000/ μl
- Crianças até seis anos: 6.000 a 16.000/ μl
- Crianças de seis a doze anos: 4.600 a 13.000/ μl
- Adultos: 4.600 a 11.000/ μl

Discussão

Resultados alterados nesse exame podem indicar algumas patologias ou alterações patológicas. Quando o valor está acima dos valores de referência está ocorrendo uma leucocitose. Quando a leucopenia é leve (entre 12 mil e 20 mil leucóцитos por μl), indica infecções não piogênicas, intoxicações ou traumatismos, mas também pode ser devido a condições fisiológicas como gravidez, menstruação ou atividade física recente.

Quando a leucopenia é moderada (15 mil a 30 mil leucóцитos por μl), é sugestivo de infecções piogênicas e quando a contagem de leucóцитos está acima de 30 mil, caracterizando uma leucopenia severa, deve-se pesquisar leucemias.

Quando o valor encontrado está abaixo dos valores de referência, é um quadro de leucopenia e pode ser um indicativo de infecções virais, invasão ou substituição do tecido hematopoiético por neoplásico ou consumo de algumas medicações (antiarrítmicos, antibióticos, anticonvulsivantes, anti-hipertensivos e cortisona, por exemplo) ou substâncias tóxicas. Em formas graves, pode sugerir quadro de anemia aplástica.

Capítulo 6

Fórmula Leucocitária

FÓRMULA LEUCOCITÁRIA

A fórmula leucocitária é o exame que analisa a morfologia dos leucócitos em uma lâmina corada, e faz parte do leucograma. Esse exame tem como finalidade a análise e distinção dos leucócitos a fim de identificar possíveis patologias e alterações fisiológicas.

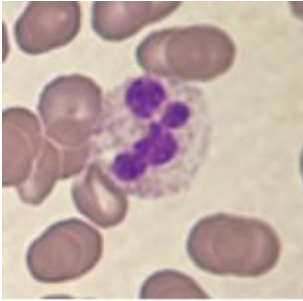
Técnica

Após a confecção adequada de um distendido corado, focalizar na objetiva de 40x e observar os leucócitos.

A análise pode ser em zigue-zague ou longitudinal para evitar a contagem da mesma célula por mais de uma vez. Deve ser feita a contagem de 100 células, anotando a morfologia de cada célula. Ao final, calcular a porcentagem de cada tipo de célula (fórmula leucocitária relativa) e calcular a fórmula leucocitária total, multiplicando a porcentagem pelo total de leucócitos e dividindo por 100. Esse cálculo indica o número

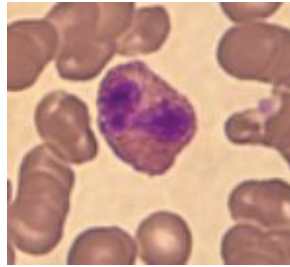
total de cada tipo de leucócito circulante por cada microlitro de sangue.

Leucócitos



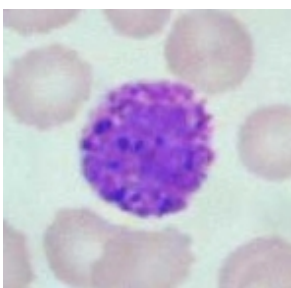
**Figura 3 -
Neutrófilo**

Neutrófilos: são os leucócitos mais numerosos em adultos. Desempenham função fagocitária e podem conter granulações tóxicas. Os neutrófilos mais encontrados no sangue são os segmentados, que são a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos. Esses são caracterizados por serem células de aproximadamente 12-15 μ m, com citoplasma acidófilo com grânulos e núcleo polilobulado (normalmente de três a cinco lóbulos). Se forem encontrados segmentados com mais ou menos lóbulos, esses devem ser contados separadamente e aparecer no laudo como presença de neutrófilos hipersegmentados/hipossegmentados, juntamente com a quantidade encontrada por 100 neutrófilos totais. Os bastonetes são morfológicamente similares aos segmentados, porém seus núcleos ainda não sofreram lobulações, por isso apresentam um núcleo único delgado. Os segmentados devem ser 50% a 60% dos leucócitos totais, enquanto os bastonetes (formas mais jovens de neutrófilos) são encontrados até 3%.



**Figura 4 -
Eosinófilo**

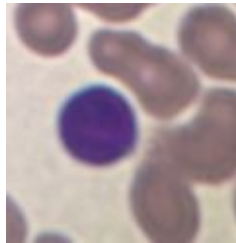
Eosinófilos: essas células são muito acidófilas e possuem granulações. Esses grânulos possuem uma enzima específica e têm papel importante contra o ataque de parasitas. Essa enzima é conhecida PBP embora existam outras granulações nos eosinófilos. Os eosinófilos também são ricos em lipídeos e quando devidamente estimulados, podem apresentar vacuolizações. Na lâmina essa célula possui 12-17 μ m de diâmetro, aparece corada em vermelho alaranjado, com grânulos citoplasmáticos e núcleos bilobulados. No distendido é normal observar de 3% a 5% de eosinófilos.



**Figura 5 -
Basófilo**

Basófilos : são os leucócitos mais raros (até 1%), possuem afinidade com corantes básicos e possuem grandes granulações. Os grânulos são a principal característica dessas células e são reservatório de histamina e outros mediadores

químicos. Os basófilos são encontrados em reações alérgicas e durante essas reações, degranulam com o objetivo de atacar o agente alergênico. Na lâmina são células com 10-15 μ m de diâmetro, com núcleo segmentado, pode ser ofuscado pela grande quantidade de grânulos grosseiros, que são a célula com uma coloração fortemente basofílica.



**Figura 6 -
Linfócitos**

Linfócitos : os linfócitos são responsáveis pela imunidade celular e humoral do corpo. São células arredondadas com 10-12 μ m de diâmetro, núcleo circular fortemente corado e citoplasma escasso. Os linfócitos podem ser de dois tipos, linfócitos B e linfócitos T. Os linfócitos T são timo dependentes e responsáveis pela imunidade celular. Os linfócitos B são responsáveis pela imunidade humoral e são produtores de anticorpos. Em um distendido não é possível diferenciar linfócitos T e B, sendo possível encontrar linfócitos de 20% a 35%.



Figural7 - Monócito

Monócitos: os monócitos são os maiores fagócitos circulantes com aproximadamente 20 μ m. Possuem núcleo irregular com envaginações e citoplasma abundante e acidófilo. O citoplasma possui poucos grânulos e alguns vacúolos. Essas células têm a capacidade de se infiltrarem no tecido, recebendo aí, o nome de macrófago. No sangue, sua morfologia é muito variável, mas se mantendo dentro das características descritas.

Alterações

Em um distendido observar, além da porcentagem de leucócitos, se há outras alterações como: morfologia (atípicas), quantidade, granulações, manchas e blastos.

□ Neutropenia: redução na contagem de neutrófilos. Pode ser devido a uma redução na produção pela medula óssea ou aumento da destruição dessas células.

□ Neutrofilia: aumento na contagem de neutrófilos. Infecções bacterianas, inflamação ou necrose tecidual, neoplasias e uso de algumas medicações, como o corticóide. Pode ocorrer um aumento de neutrófilos após

atividade física excessiva, porém nesse caso ocorre uma falsa neutrofilia.

□ Eosinopenia: redução na contagem de eosinófilos. Ocorre na fase inicial de infecções agudas, em choques, queimaduras, síndrome de Cushing, esforço físico, coma diabético, porfiria, entre outras.

□ Eosinofilia: aumento na contagem de eosinófilos. Essas células aparecem em maior quantidade em infecções parasitárias por helmintos, em hipersensibilidades, tumores (ósseos, ovarianos, etc.) e dermatoses. Pode ocorrer uma situação chamada “Eosinofilia familiar” onde, por uma alteração genética, ocorre um aumento de eosinófilo fisiológico.

□ Basofilia: aumento na contagem de basófilos. Aparece em algumas leucemias, anemias hemolíticas, sinusites crônicas, nefroses, doença de Hodgkin.

□ Linfopenia: redução na contagem de linfócitos. É encontrada em imunodeficiências, infecções graves, cirrose hepática, doença de Hodgkin, fase aguda da gripe, linfomas, entre outras várias situações.

□ Linfocitose: aumento na contagem de linfócitos. É comum na convalescência de infecções agudas, mononucleose infecciosa, infecções crônicas como a tuberculose e a sífilis, em leucemias e linfomas. Em

crianças de até três anos, esse aumento é fisiológico e normal.

□ Monocitopenia: redução na contagem de monócitos. Ocorre na fase aguda de infecções e em estados de desnutrição.

□ Monocitose: aumento na contagem de monócitos. Pode ser devido a algumas infecções bacterianas (tuberculose, febre tifoide, endocardite bacteriana subaguda), infecções por protozoários, doença de Hodgkin e leucemia monocítica.

□ Desvio à esquerda: é a presença de células que normalmente não são encontradas no sangue, apenas na medula óssea. Desvio leve à esquerda é a presença de células não tão imaturas, como o metamielócito, mielócito e prolinfócito. O desvio severo à esquerda é a presença de células mais imaturas como linfoblasto e mieloblasto. Essa alteração indica aceleração na produção das células, o que não viabiliza o amadurecimento correto das células.

□ Neutrófilos hipersegmentados: são neutrófilos com núcleos hiperlobulados, ou seja, com mais de cinco lóbulos. Isso ocorre com o envelhecimento da célula e deficiência na destruição correta dessa célula.

□ Neutrófilos hipossegmentados: são neutrófilos com núcleos hipolobulados, ou seja, com menos de dois lóbulos. Ocorre na aceleração de produção na medula óssea, não viabilizando o amadurecimento correto da célula.

□ Células hipergranulares: células com aumento anormal de grânulos pode indicar infecções ou neoplasias, como muitas leucemias.

Capítulo 7

Contagem de Plaquetas

CONTAGEM DE PLAQUETAS

Plaquetas são células pequenas e incompletas derivadas de restos citoplasmáticos de seus precursores. Possuem tamanho médio de 3 a 4 μ e por isso tendem a se agregarem e aderirem a superfícies estranhas do endotélio vascular. Elas possuem limites irregulares, o que auxilia na adesão dessas células. As plaquetas são de extrema importância na hemostasia, primeiramente pela formação do tampão plaquetário e liberação de substâncias vasoconstritoras. A contagem de plaquetas pode ser feita por três técnicas diferentes: Contagem direta (contagem com líquido de Ressa-Ecker), indireta ou estimada (as últimas duas são por contagem em lâmina).

Plaquetopoiese

As plaquetas têm origem a partir da linhagem microorganismos que com a influência de fatores de crescimento como IL-3, IL-6, IL-11 e CFU-MEG, ocorre a

formação do megacarioblasto que ao amadurecer se transforma em promegacarioblastos, megacariócitos basofílicos, megacariócitos ácidofílicos que por sua vez têm seu citoplasma fragmentado para formar as plaquetas.

Líquido de Ress-Ecker

Solução composta de:

- 3,8g de citrato de sódio
- 2,0ml de formol 40%
- 0,05g azul de crezil brilhante
- q.s.p. 100ml com água destilada

O líquido deve ser homogeneizado e centrifugado a 2.500rpm por 30 minutos e separa-se o sobrenadante. O sobrenadante deve ser filtrado e guardado em um frasco âmbar em geladeira. O líquido sempre deve ser filtrado antes do uso, pois o azul de crezil brilhante pode precipitar em baixas temperaturas e suas partículas podem ser confundidas com plaquetas.

Para garantir que partículas do líquido interfiram na contagem, é aconselhável realizar uma contagem na câmara de Neubauer com o líquido e contar a quantidade de partículas nos quadrantes centrais. Se esse valor for superior a 5.000, centrifugar e refiltrar o líquido para refazer a contagem.

Contagem direta - Método de Ress-Ecker

A metodologia de Ress-Ecker original foi criada para contagem a partir de punções digitais, onde era posto sulfato de magnésio a 14% no local da punção e depois se adicionava o líquido de Ress-Ecker para fazer a contagem. Atualmente a metodologia usada é modificada para utilizar sangue coletado com EDTA e essa é a contagem com o Padrão Ouro em contagem de plaquetas.

Material

- Sangue colhido com EDTA
- Solução diluidora- Líquido de Ress-Ecker
- Tubo de hemólise
- Câmara de Neubauer
- Placa de Petri
- Algodão
- Água
- Pipeta semi-automática

Metodologia

Preparar diluição 1:200 com 4ml do líquido de Ress-Ecker e 0,02ml de sangue bem colhido e bem homogeneizado. Colocar a solução na câmara de Neubauer e colocar a câmara em uma câmara de Petri, ao lado de um algodão embebido de água, para evitar desidratação da solução enquanto se aguarda 15 minutos para a precipitação das plaquetas. Após

os 15 minutos, contar as plaquetas nos 25 quadrantes centrais na objetiva de 40x. O líquido de Ress-Ecker não destrói os eritrócitos, então é importante saber diferenciar as hemácias (formas maiores e bicôncavas) das plaquetas (menores e bifformes).

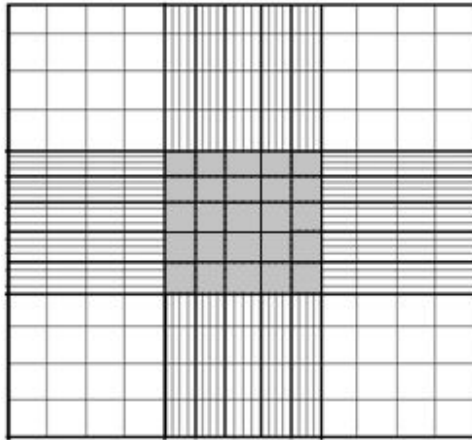


Figura 18 - Esquema da câmara de Neubauer. Em destaque onde realizar a contagem de plaquetas

Cálculos

Quando as plaquetas são contadas em todos os quadrantes centrais, o cálculo é:

$$\text{Plaquetas contadas} \times 200 \times 10$$

Onde os 200 são referentes à diluição e os 10 são referentes ao fator de conversão da lamínula. Quando a contagem é feita apenas em cinco dos quadrantes centrais o cálculo deve ser multiplicado por 5.

Método indireto - Método de Fônio

A metodologia criada por Fônio é bastante econômica e de fácil execução, por esse motivo é bastante usada em laboratórios. As plaquetas devem ser contadas em lâmina juntamente com as hemácias.

Material

- Sangue colhido com EDTA
- Lâminas com borda fosca
- Panótico

Metodologia

A contagem deve ser feita em um distendido sanguíneo corado com Panótico na objetiva de 100x. Contar 1.000 hemácias e anotar o número de plaquetas encontradas. Para facilitar a contagem, usar um retículo de Miller, que é um adaptador de contagem ocular que separa visualmente as áreas para contagem de plaquetas e hemácias.

Cálculos

Para efetuar os cálculos pelo método de Fônio, saber o valor das hemácias por mm^3 .

$$\begin{array}{l} 1.000 \text{ hemácias} \quad \text{----} \quad n^{\circ} \text{ de plaq contadas} \\ \text{Hm/mm}^3 \quad \text{-----} \quad \text{plaq/mm}^3 \end{array}$$

Método estimado - Metodologia de Bárbara O'Connor / Nosanchuck, Chang e Bennet

Material

- Sangue colhido com EDTA
- Lâminas com borda fosca
- Panótico

Metodologia de Bárbara

No distendido corado, na objetiva de 100x, contar as plaquetas em dez campos.

Cálculos de Bárbara

Multiplicar o valor de plaquetas contados por 13.000.

Metodologia de Nosanchuck

No distendido corado, na objetiva de 100x, contar as plaquetas em oito campos.

Cálculos de Nosanchuck

Calcular a média dos valores encontrados por campo e multiplicar por 2.000.

Valores de referência

Os valores de referência para plaquetas são:
150.000 a 400.000 por mm^3

Discussão

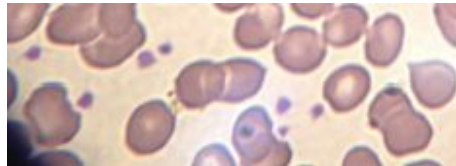


Figura 19 - Plaquetas são pequenas estruturas arroxeadas por entre as hemácias

As plaquetas são muito importantes para a hemostasia, pois são elas que dão início à coagulação. Qualquer alteração nas plaquetas pode causar um distúrbio na hemostasia. Na contagem de plaquetas podemos identificar as alterações quantitativas, para mais ou para menos. A partir dessa identificação, outros exames devem ser feitos para identificar a causa.

Quando o valor de plaquetas está acima de 400.000 plaquetas por mm^3 , o paciente está apresentando uma plaquetocitose ou trombocitose. Essa alteração pode ser primária ou secundária.

A trombocitose primária é causada por alteração na medula por doenças mieloproliferativas como a mielofibrose e leucemia megaloblástica. Cerca de 30% dos pacientes com essa alteração são assintomáticos. Aos que apresentam sinais e sintomas, os mais comuns são fenômenos tromboembólicos, que são a maior causa de óbitos desses pacientes.

A trombocitose secundária é caracterizada por um aumento da estimulação para a produção de plaquetas ou redução no sequestro de plaquetas pelo baço. Essa estimulação pode ser devido a anemias regenerativas pós-hemorragia aguda ou hemólise, por anemias ferroprivas, endocrinopatias e inflamações, recuperação de trombocitopenias imuno-mediadas e uso de algumas medicações como corticóides antibióticos e quimioterápicos. Fraturas, traumas em tecidos moles, exercício físico excessivo e estresse causam contração esplênica, o que reduz a função do baço, que acaba não retirando da circulação as plaquetas velhas, causando assim um aumento do número dessas células. Pacientes que tiveram o baço removido (esplenectomia) também vão apresentar esse aumento de plaquetas por não retirarem as plaquetas mais antigas da circulação.

Quando o paciente apresenta com número de plaquetas inferior as 150.000mm^3 é característico de uma plaquetopenia ou trombocitopenia. A trombocitopenia pode ocorrer por diversos fatores como diminuição na produção, redução da vida útil das plaquetas, aumento de destruição,

perda de plaquetas, hemorragias, coagulação intravascular disseminada, toxinas, envenenamento, ofidismo, hemodiluição, aumento do sequestro esplênico, hipotermia severa, neoplasias (carcinomas, sarcomas, linfoma, leucemias), doenças infecciosas (babesiose, cinomose, parvovirose, erlichiose, endotoxemia, histoplasmosse, leishmaniose, leptospirose) e medicamentos (quimioterápicos, paracetamol, estrógeno, furosemida, penicilina, sulfas, tetraciclina).

Antes de qualquer diagnóstico, é necessário realizar outros exames para definir qual a causa da alteração e assim indicar o tratamento correto.

Erros podem ocorrer durante a realização do exame, por isso, qualquer resultado suspeito deve ser repetido e redobrar os cuidados com as seguintes situações:

- Uso de vidraria suja, pois plaquetas podem aderir à sujeira;
- A solução diluidora por não ter sido filtrada corretamente;
- Observar se o sangue está parcialmente coagulado ou com grumos plaquetários.

Capítulo 8

Contagem de Reticulócitos

CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

Os reticulócitos são os precursores das hemácias, sendo assim uma forma intermediária uma hemácia jovem. Os reticulócitos são células nucleadas, possuindo ácido

ribonucleico como material reticular e ainda sintetizam hemoglobina. Eles possuem diâmetro levemente maior do que as hemácias (8 μ). Essas células possuem vida útil de 24 a 48 horas na corrente sanguínea, porém em casos de anemias hemorrágicas agudas, a vida útil pode se estender de três a sete dias.

A contagem de reticulócitos é considerada o melhor parâmetro da avaliação da eritropoiese. Essas células dão importantes, pois refletem a reatividade da medula óssea, ou seja, se houver um aumento de reticulócitos, pode indicar hematopoiese acelerada. Os reticulócitos só são revelados com uma coloração supra-vital, como o azul de cresil brilhante, pois os reticulócitos sofrem morte somática após a retirada do organismo, sendo, porém, corados antes que toda essa atividade vital seja extinta.

Contagem de reticulócitos

Corante

O corante usado para visualização de reticulócitos é o azul de cresil brilhante, composto por:

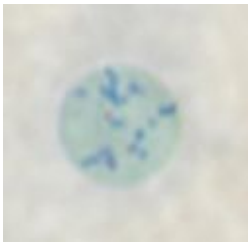
- 1,0g de azul de cresil brilhante
- 0,4g de citrato de sódio
- q.s.p. 100ml de cloreto de sódio a 0,85%

Diluir o azul de cresil brilhante com o citrato de sódio e completar a solução com cloreto de sódio a 0,85% até a solução final ter 100ml. Guardar a solução em vidro âmbar, devidamente identificado. Essa solução deve sempre ser filtrada antes do uso.

Material

- Azul de cresil brilhante
- Papel de filtro
- Béquer
- Banho-maria a 37°C
- Lâmina
- Pipeta semi-automática
- Corante Panótico

Metodologia



**Figura 20 -
Reticulócitos
corados com
corante supravital**

Homogeneizar bem o sangue e refiltrar o azul de cresil brilhante. Em um tubo de ensaio, colocar duas gotas do sangue para duas gotas do corante (ou na mesma proporção). Quando o hematócrito está baixo, colocar duas gotas de sangue para uma gota de corante, e quando o hematócrito está alto, colocar uma gota de sangue para duas gotas de corante. Homogeneizar a mistura e levar para Banho-maria a 37°C por 15 minutos para dar estrutura mais homogênea e facilitar a visualização.



Figura 21 - Reticulócito corado com corante supravital e contracorado com panótico

Preparar três lâminas com distendido. Após a secagem da lâmina, pode-se contra-corar com Panótico, para facilitar a visualização dos reticulócitos, como na figura 21.

No microscópio com objetiva de 40x, contar 1.000 hemácias e anotar o número de reticulócitos. Para fazer os cálculos, é necessário saber os valores de hematócrito e hemácias.

Cálculos

Porcentagem de reticulócitos

O cálculo é feito com uma regra de três, onde se multiplica os reticulócitos contados por 100 e divide por 1.000 hemácias, encontrando assim a porcentagem de reticulócitos.

$$X\% \text{ de ret.} = \frac{\text{ret. contados} \times 100}{1.000 \text{ hemácias}}$$

Reticulócitos por litro

Os resultados devem ser liberados em porcentagem, reticulócitos/litro e em mm^3 , então devemos calcular também:

$$\text{Ret por Litro} = x\% \text{ reticulocitos} \times \text{Hemácias/L}$$

Reticulócitos por milímetro cúbico

O cálculo é o mesmo utilizado para reticulócitos por litro, substituído as hemácias/L por hemácias/mm³, ou seja:

$$\text{Ret por mm}^3 = x\% \text{ reticulocitos} \times \text{Hemacias/mm}^3$$

Índice reticulocítico

O IR é calculado multiplicando a porcentagem de reticulócitos pelo hematócrito do paciente, dividido pelo hematócrito médio. Dividir tudo por N, que é o número de dias estimados para produção do reticulócito seguindo a tabela:

HT	N
Maior ou = 40%	1
Entre 30- 40%	1,5
Entre 20- 30%	2
Menor ou = 20%	2,5

Tabela 1 - Número estimado em dias para produção de reticulócitos, segundo o hematócrito

$$\text{IR} = \text{reticulocitos em \%} \times \frac{\text{Ht do pac}}{\frac{\text{Ht médio}}{N}}$$

Hematócrito médio:

Mulheres: 42%

Homens: 47%

Valores de referência

Reticulócitos

□ 0.5% a 2,0%

□ 25..000 a 75..000/mm³

□ 25 a 75

Gigas/Litro

IR

□ Menor que 2,0%

Discussão

Valores altos normalmente são devidos a uma esferocitose, anemia falciforme, paciente em tratamento de anemia carencial, DHRH, anemia aguda pós-hemorrágica.

Já os valores baixos são normalmente causados devido à anemia megaloblástica, aplasia de medula, infiltração da medula por leucemia.

Em casos de anemia ferropriva em tratamento, os reticulócitos devem estar altos, mas sem o tratamento os resultados devem ser baixos.

Capítulo 9

Pesquisa de Drepanócitos

PESQUISA DE DREPANÓCITOS

A doença falciforme é uma doença hereditária caracterizada pela presença de hemácias falciformes (drepanócitos) no sangue. Essa doença é formada por um conjunto de alterações genéticas com característica comum à presença do gene da hemoglobina S. Esse gene tem característica recessiva, ou seja, para apresentar essa doença, o paciente deve apresentar dois genes recessivos para a hemoglobina S (HbSS). Quando o paciente possui apenas um gene alterado, dizemos que ele possui um traço falcêmico (HbSA).

Essa hemoglobina S(HbS) causa alteração na forma das hemácias, mudando seu formato e se assemelhando a uma foice. Essa alteração reduz a tensão de oxigênio, e quando há uma redução de temperatura, as hemácias tornam-se rígidas, podendo causar uma vaso-oclusão.

A hemoglobina S (Hb S) é uma variante de hemoglobina associada a uma mutação no gene β -globínico, que codifica as cadeias β da Hb. A mutação ocorre no cromossomo 11, no gene da cadeia β , onde o ácido glutâmico (localizado na posição 6 do códon 6) é substituído pela valina.

A doença falciforme causa uma série de alterações após o sexto mês de vida (antes disso o bebê está protegido pela quantidade de hemoglobina fetal que supre suas necessidades). As principais alterações são:

Anemia

Redução da quantidade de hemácias, pois as hemácias falcêmicas possuem vida útil reduzida (12 a 20 dias), quando comparados a hemácias normais (90 a 120 dias).

Sequestro esplênico

Devido à redução da função esplênica, o baço pode acumular uma quantidade excessiva de sangue em seu interior, causando anemia periférica e esplenomegalia.

Crise vaso-oclusiva

As hemácias falciformes são pouco elásticas e móveis o que pode ocasionar um acúmulo de hemácias em vasos mais finos, impedindo a circulação correta e a distribuição de oxigênio. Esse bloqueio causa vermelhidão, dor e inchaço, e ocorre normalmente nas extremidades, onde a luz dos vasos é mais restrita.

Devido à redução da vida útil dos drepanócitos, essas hemácias são destruídas com mais frequência, ocasionando um aumento de bilirrubina, que pode causar icterícia e escurecimento da urina. Quando essas características são

aumentadas, analisar o nível de anemia, pois pode estar aumentado.

Infecções e estado febril

Crianças com alterações falciformes possuem maior facilidade de contrair infecções por bactérias encapsuladas, devido à deficiência na função do baço (órgão que auxilia no combate contra essas bactérias). Qualquer início de febre (acima de 37,5°C) em crianças deve ser levado em consideração para possíveis infecções. Deve-se ter o cuidado de fazer o uso de antibióticos profiláticos para evitar infecções mais graves como pneumonias, meningites, osteomielites e sepse.

Técnica

A pesquisa de drepanócitos é feita pelo método do metabissulfito de sódio, que é um agente redutor de oxigênio que simula a baixa tensão de oxigênio nos capilares in-vivo.

Metabissulfito de sódio

- 0,2g de metabissulfito de sódio
- q.s.p. 10ml com água destilada

Material

- Sangue bem colhido e homogeneizado com EDTA
- Metabissulfito de sódio a 2%
- Lâmina e lamínula
- Câmara úmida

Metodologia

Colocar uma gota (aproximadamente 0,05ml) de sangue na lâmina. Adicionar duas gotas de metabissulfito de sódio sobre o sangue e misturar com a lamínula. Colocar a lamínula sobre a mistura e deixar repousar por 30 minutos na câmara úmida, após vedar a lamínula. Observar ao microscópio com aumento de 400x e procurar indícios de hemácias falciformes.

Se encontrar presença de hemácias falciformes, o resultado é positivo. Caso o resultado seja negativo, reanalisar as lâminas após seis horas e após vinte e quatro horas.

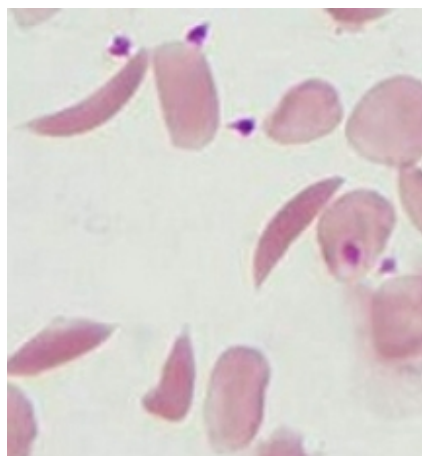


Figura 22 - Hemácias falciformes ou drepanócitos

Discussão

Anemia de células falciformes ocorre nas pessoas homozigóticas para o gene S. O teste positivo com o padrão falciforme ocorre na forma assintomática heterozigótica e na forma hemolítica homozigótica. Para a distinção das duas condições é feita a eletroforese de hemoglobina.

A lâmina deve ser lida novamente após seis e vinte e quatro horas por algumas hemoglobinas demorarem a se falsear. Entre elas estão as hemoglobinas SS, que demoram até três horas, as hemoglobinas SC e SD, que demoram de seis a doze horas, e a hemoglobina AS, podendo demorar entre 12 e 24 horas.

Capítulo 10

Velocidade de Hemossedimentação

VELOCIDADE DE HEMOSSEDIMENTAÇÃO

A velocidade de hemossedimentação (VHS) é um exame que avalia a estabilidade de suspensão das hemácias no plasma. Esse exame tem como princípio a utilização da gravidade para avaliar a sedimentação eritrocitária em uma pipeta graduada chamada de pipeta de Westergreen. O exame é considerado uma prova de atividade inflamatória, porém não é específica, pois além de considerar quantidade de fibrinogênio e globulinas, também considera as alterações nas hemácias e alterações elétricas no plasma e nas células.

Durante a sedimentação, a agregação dos eritrócitos acontece sob influência das forças de Wan der Waals,

ocorrendo assim a agregação e a sedimentação na porção inferior da pipeta. Esse processo é rápido, e por isso podemos observar o final de toda a sedimentação em uma hora, quando efetuamos a leitura dos resultados.

Técnica

Material

- Aparelho e suporte de Westergreen
- Sangue colhido com EDTA
- Solução salina a 0,9%
- Tubo de penicilina
- Cronômetro

Metodologia

Antes de iniciar o teste, diluir o sangue com solução salina para neutralizar o EDTA da amostra, que acelera o VHS, para assim obter um resultado confiável. Essa diluição deve ser feita homogeneizando 2ml da amostra com 0,5ml de solução salina em um tubo de penicilina e depois completar a pipeta de Westergreen até a marca zero, evitando bolhas. A pipeta deve ser colocada no suporte com cuidado, para evitar perda de material. Com auxílio do cronômetro, deve se marcar uma hora, e após esse período, observar até qual graduação ocorreu sedimentação (qual o número que marca a coluna vermelha).

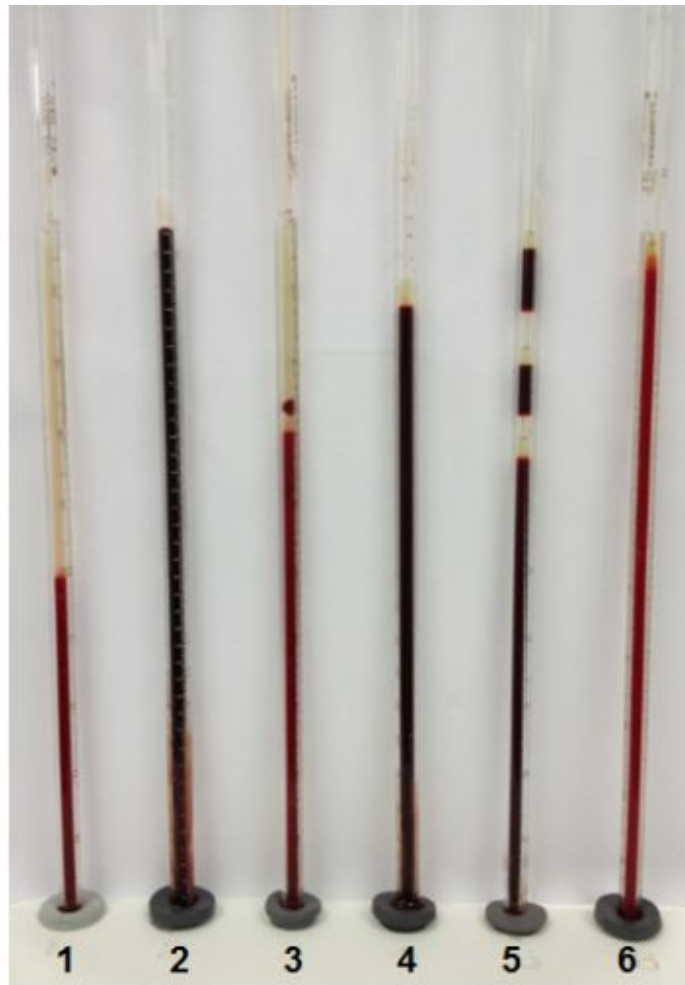


Figura 23 - Pipetas de Westergreen no suporte.

Valores de referência

Os valores podem alterar com o gênero, idade e algumas condições fisiológicas:

- Homens até 50 anos: até 15mm
- Homens > 50 anos: até 25mm
- Mulheres até 50 anos: até 20mm
- Mulheres > 50 anos: até 30mm
- Gestantes com até 20 semanas: 46mm
- Gestantes > 20 semanas: 70mm

Alterações

A alteração mais comum no teste de VHS é a velocidade de hemossedimentação acelerada que pode indicar uma inflamação, porém deve-se investigar também anemias, doenças reumáticas, infartos, neoplasias malignas, leucemias e outras alterações. Considerar possível gestação, climas mais quentes, período menstrual e infância, que também podem alterar os valores. O aumento pode estar relacionado a erros técnicos (pipetagem errada, coleta errada) e alterações eritrocitárias (anemia, macrocitose, esferocitose).

Alguns fatores podem retardar a velocidade de sedimentação dos eritrócitos, como poliglobulia, microcitose, erros técnicos (demora na execução do exame, pipetas descalibradas) e podem indicar policetemia vera, choque e hipofibrinogenia congênita.

É importante lembrar que esse teste não é um exame específico, ou seja, não existe possibilidade de diagnóstico apenas com esse exame. O VHS é usado apenas como exame complementar e para acompanhamento.

Na figura 23 pode-se observar seis testes diferentes. No primeiro, o VHS está muito baixo. No segundo, o sangue ultrapassou a marca zero da pipeta. No terceiro existe um grumo plaquetário e o teste deve ser refeito. No quarto houve extravasamento de sangue ao colocar a pipeta no suporte, abaixando assim o nível de sangue da pipeta. No quinto

existem bolhas na pipeta, o que invalida o teste. No sexto o VHS está corretamente feito e com resultado normal.

Capítulo 11

Tipagem Sanguínea

TIPAGEM SANGUÍNEA

Existem vários grupos sanguíneos herdados independentemente entre si. São mais de 39 grupos, entre eles podemos citar os sistemas ABO, Rh, Kell, Duffy, Lewis, etc. O sistema ABO é o mais imunogênico, ou seja, tem maior capacidade de provocar a produção de anticorpos. O sistema Rh é o segundo sistema mais imunogênico, e por isso a tipagem sanguínea básica é composta desses dois sistemas.

Os antígenos do sistema ABO são principalmente localizados na superfície dos eritrócitos, mas também podem ser encontrados em outras células, e são determinados por genes localizados no cromossomo 9. Os genes codificam a produção de enzimas como a glicosil transferase que ligam diferentes carboidratos, específicos para cada tipo sanguíneo, ao terminal galactose de uma cadeia oligossacarídea.

Em todos os indivíduos existe a expressão do antígeno H que vai atuar na substância precursora produzindo uma glicosil transferase específica (α 2 fucosil transferase) que atua sobre substâncias precursoras, adicionando L-Fucose, com ajuda de um nucleotídeo específico, formando o antígeno H. É nesse antígeno H que os açúcares específicos serão ligados.

Existem alguns raros indivíduos que não possuem o gene H, logo não produzem o antígeno H e a L-Fucose. Nesses indivíduos, mesmo que genotipicamente de grupos sanguíneos diversos, eles não apresentaram nenhum açúcar terminal em suas células, pois esses açúcares não têm onde se ligar. Na tipagem sanguínea ABO, eles se apresentam como indivíduos tipo O, mas Deve-se ter cuidado, pois mesmo apresentando-se como O, eles não possuem o antígeno L-Fucose em suas células, logo não podem receber transfusão de indivíduos O.

Em indivíduos do tipo A, o açúcar terminal é o N-acetil D-galactosamina que se liga ao antígeno H com auxílio do nucleotídeo UDPGalNAC.

Em indivíduos B, o D-galactose é o açúcar terminal adicionado ao antígeno H com o auxílio do nucleotídeo UDPGal.

Os indivíduos AB têm ambos os açúcares/antígenos sobre suas células.

Já os do grupo O não têm uma transferase funcional, e, portanto, não transferem açúcar do tipo A nem do B, embora produzam a enzima H e com isso possuem o açúcar L-fucose.

O sistema Rhesus tem sua expressão controlada por genes localizados no cromossomo 1. Um desses genes codifica uma proteína que expressa um antígeno D. Esse antígeno é o principal do sistema Rh, embora existam outros menos

antigênicos. Os indivíduos que expressam esse antígeno são chamados de Rh positivos, e os que não expressam, são os Rh negativos.

A tipagem direta determina da presença ou ausência dos antígenos ABO nas hemácias do receptor enquanto a tipagem reversa determina a presença ou ausência de anticorpos plasmáticos contra antígenos do Sistema ABO. Essas são técnicas complementares e devem ser feitas concomitantemente para se obter a tipagem correta do paciente.

Em recém-nascidos não se faz a tipagem reversa, pois, mesmo embora já exista a produção de anticorpos, os níveis desses anticorpos só são detectáveis após os seis meses de vida, com produção total dos cinco a dez anos de vida. Por esse motivo a tipagem reversa não é realizada em recém-nascidos, uma vez que os anticorpos do sistema ABO não estão presentes no nascimento e quando encontrados são de origem materna.

Tipagem Direta

Material

- Sangue colhido com EDTA
- Solução salina 0,85 %
- Tubos de ensaio
- Pipetas semi-automáticas

- Centrífuga
- Reagentes para tipagem ABO e Rh

Metodologia

Em um tubo devidamente identificado para cada paciente, colocar 0,5ml de sangue e 3ml de solução salina. Centrifugar a 3.000rpm por cinco minutos. Esse processo é para lavar o sangue, ou seja, retirar impurezas e microcoágulos e assim evitar resultados errôneos.

Depois da centrifugação, retirar todo o sobrenadante e repetir a operação duas vezes (total de três lavagens). Na última lavagem, retirar o sobrenadante, e ressuspender as hemácias.

Em outro tubo, preparar uma suspensão de hemácias entre 2 a 5% identificado como solução de hemácias (colocar 100µl do sangue lavado mais 1.900µl de solução salina).

Identificar quatro tubos como A, B, AB e D. Em cada tubo, colocar 100µl da suspensão de hemácias. Pingar uma gota do respectivo reagente (anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D). Centrifugar os quatro tubos a 1.000rpm por um minuto e agitar os tubos.

Leitura de resultados

Nos tubos em que o botão não se desfaz, o resultado é positivo, mas é necessário prestar atenção, pois o botão pode

se fragmentar parcialmente, sem de fato se desfazer. Nesses casos, olhar os tubos contra a luz, e caso exista qualquer resíduo de agregação, considerar o resultado como positivo.

Exemplos:

A	B	AB	D	Resultado
+	-	+	+	A Rh+
+	-	+	-	A Rh-
-	+	+	+	B Rh+
-	+	+	-	B Rh-
+	+	+	+	AB Rh+
+	+	+	-	AB Rh-
-	-	-	+	O Rh+
-	-	-	-	O Rh-

Tabela 2 - Resultados de tipagem ABO e Rh

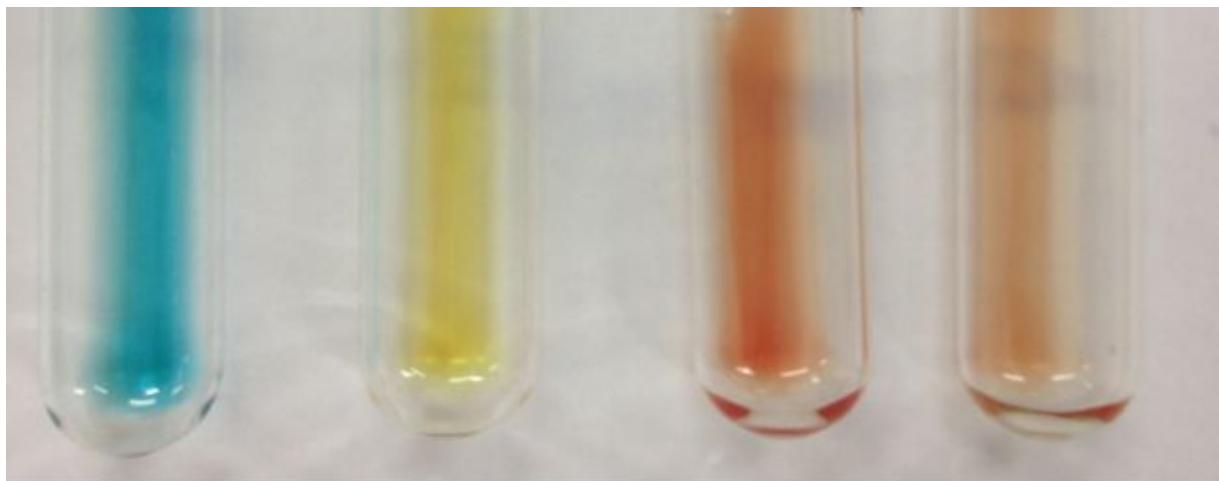


Figura 24 - Tubos com tipagem ABO e Rh. A falta de aglutinação nos tubos indica que a amostra é tipo "O" Rh negativo

Na figura 24 não temos aglutinação em nenhum tubo (A, B, AB e D, respectivamente), logo o fenótipo do paciente é O Rh negativo.

Nos casos de Rh negativo, colocar o tubo em Banho-maria a 37°C por 15 minutos e repetir a centrifugação para confirmar o resultado. Se a negatividade do Rh persistir, confirmar com o teste do D fraco.

Na figura 25 houve aglutinação em todos os tubos. A aglutinação nem sempre pode se apresentar como um botão grande, então observar em todos os tubos se existe a presença de microaglutinações, que torna a reação positiva. Nesse caso, o paciente possui um fenótipo AB Rh positivo.

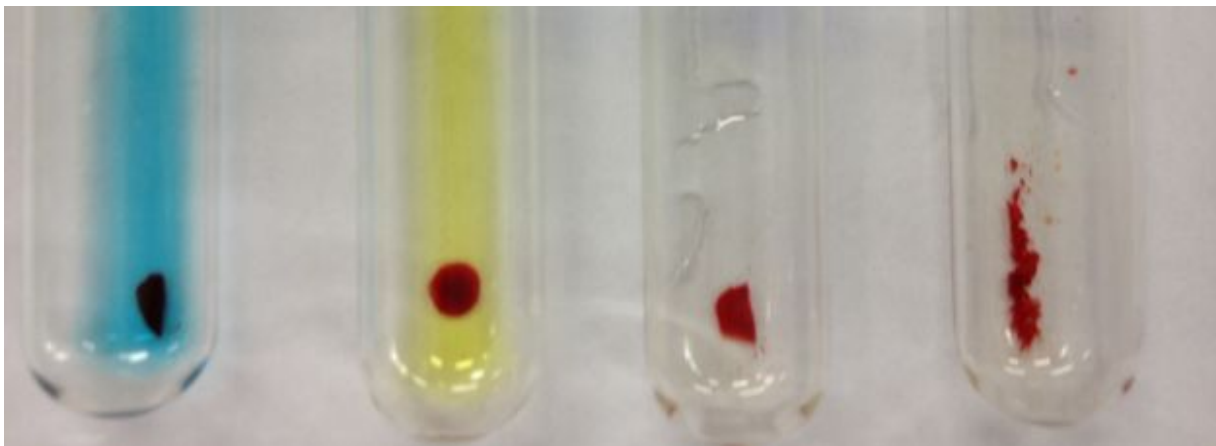


Figura 25 - Tubos com tipagem ABO e Rh. A aglutinação em todos os tubos indica que a amostra é tipo "AB" Rh positivo.

Tipagem Reversa

Material

- ☐ Sangue colhido com EDTA
- ☐ Solução salina 0,85 %
- ☐ Tubos de ensaio
- ☐ Caneta para retroprojetor
- ☐ Pipeta semi-automática
- ☐ Centrífuga
- ☐ Reagentes para tipagem reversa

Metodologia

O procedimento da tipagem reversa é quase idêntico ao da direta, porém feito com o soro e/ou plasma do paciente. Para obtenção do soro, centrifuga-se o sangue total. O sobrenadante será o soro.

Em dois tubos identificados como A e B, colocar 100µl do soro em cada tubo. Nesse caso é colocada uma gota da suspensão de hemácias fenotipadas A1 e B referente a cada tubo, identificando assim se o paciente possui o anticorpo referente aquele antígeno.

Centrifugar a 1.000rpm por um minuto os dois tubos.

Leitura de resultados

No tubo em que houve aglutinação, indica a presença do anticorpo contra aquele antígeno. Já os não aglutinados são os que identificam o grupo do paciente.

Exemplos:

Anti-A1	Anti-B	Resultado
+	-	B
-	+	A
-	-	AB
+	+	O

Tabela 3 - Resultados de tipagem reversa

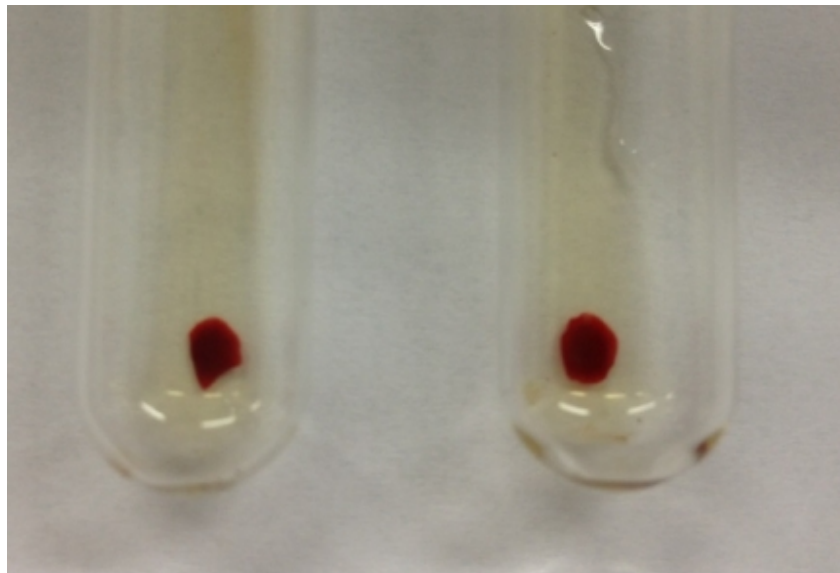


Figura 26 - Tubo de tipagem reversa. Aglutinação em ambos os tubos indica tipo sanguíneo "O"

Discussão

A tipagem sanguínea, juntamente com outros testes pré-transfusionais, é de extrema importância para se evitar ocorrências de reações hemolíticas intravasculares agudas, principalmente num sistema doador-receptor.

A escolha do sangue se baseia em que o indivíduo não pode ser transfundido com um sangue que possua um antígeno que ele não tem, pois o anticorpo presente no seu plasma, contra esse antígeno, iria reagir com essas hemácias transfundidas.

Este sistema ABO, também pode ocasionar incompatibilidade materno-fetal, com desenvolvimento da doença hemolítica peri-natal. Apresenta também importância em transplantes renais ou cardíacos, com menor papel nos hepáticos ou de medula óssea. Em alguns processos pode ocorrer a perda parcial do antígeno A ou B, como em algumas leucemias.

O resultado da tipagem reversa deve ser compatível com o resultado da tipagem direta, confirmando que o indivíduo apresenta anticorpos para tipos sanguíneos diferentes do seu próprio. Caso exista uma discrepância entre os resultados, deve-se considerar erros laboratoriais, tais como:

- Troca de amostras
- Identificação inadequada
- Hemólise
- Reagentes fora de validade

- Soluções contaminadas
- Temperatura inadequada de armazenamento e centrifugação
- Falha humana

Considerando essas possíveis falhas, repetir as duas técnicas e comparar novamente o resultado. Se a discrepância persistir, solicitar uma nova amostra com histórico do paciente para avaliar outras causas associadas a algumas patologias.

Capítulo 12

Teste de D Fraco

TESTE DO D FRACO

Quando ocorre um resultado de Rh negativo durante uma tipagem sanguínea, é necessária a confirmação desse resultado, segundo a Portaria nº 1.376/1993, que define como obrigatória a realização de prova direta e reversa do Sistema ABO e teste do D fraco para Sistema Rh.

A investigação dos antígenos Rh fracos, segundo a legislação, deve ser feita por meio de incubação a 37°C e com acréscimo de albumina bovina a 22% para acelerar a reação e centrifugação dos tubos de ensaio.

É possível também, a determinação direta do D fraco pelo método de gel-centrifugação, onde o Rh fraco é determinado diretamente através da intensidade de aglutinação, classificada em ausente ou, se positiva, em intensidades de (+) até (++++).

O teste do D fraco é uma técnica de extrema importância para evitar transfusões equivocadas de um paciente D fraco para um Rh negativo, o que ocasionaria em uma reação transfusional potencialmente fatal.

Técnica

Material

- Sangue colhido com EDTA
- Solução salina 0,85 %
- Tubos de ensaio
- Pipetas semi-automáticas
- Centrífuga
- Soro Anti-D
- Albumina bovina
- Suspensão de Controle (O Rh+)
- Banho Maria

Metodologia

Preparar uma suspensão de hemácias (1,9ml de salina + 0,1ml de sangue do paciente) e outra suspensão com a amostra Controle-Suspensão de controle (O Rh+).

Identificar três tubos como 1- D Fraco, 2 - Controle positivo, 3 - Controle negativo. Nos tubos, colocar, respectivamente:

	D fraco	C+	C-

Suspensão de Hm 2 a 5%	2 gotas	-	2 gotas
Suspensão controle de Rh +	-	2 gotas	-
Soro anti-D	2 gotas	2 gotas	-
Albumina Bovina	2 gotas	2 gotas	2 gotas

Tabela 4 - Teste do D fraco

Até o momento da adição do soro anti-D, é a fase de sensibilização, onde as hemácias estão sendo sensibilizadas ao fixarem anticorpos incompletos na superfície das hemácias, pois se houver presença de anticorpos incompletos, eles grudam na hemácia, porém não aglutinam.

Incubar os tubos por uma hora, quando não há albumina. Para acelerar o processo, adiciona-se albumina bovina 20 a 22% ou Biopeg (embora menos usado, pois é mais rigoroso quanto à temperatura de 37°C, e qualquer alteração pode alterar o processo, impedindo a ação do IgM). Com a albumina, bastam quinze minutos em banho-maria, para ocorrer a reação do IgG em meio proteico.

Após esses 15 minutos, começa a segunda fase, ao lavar três vezes com solução salina para retirar anticorpos anti-linfocitários e proteínas que podem alterar o resultado. Depois da última lavagem, adiciona-se o soro de Coombs. Com a

adição do soro, tem-se a anti-IgG humana, que se adere na IgG promovendo a segunda fase (fase da aglutinação). Levar os tubos novamente à centrífuga.

Leitura de resultados

Os resultados devem ser:

- ☐ Controle positivo: sempre aglutina
- ☐ Controle negativo: nunca aglutina (a não ser que o paciente tenha uma desordem autoimune chamada anemia hemolítica autoimune. Nesse caso tratar a anemia e depois repetir o exame).
- ☐ D fraco: Se aglutinar, o paciente é Rh negativo D fraco positivo. Se não aglutinar, o paciente é Rh negativo D fraco negativo.

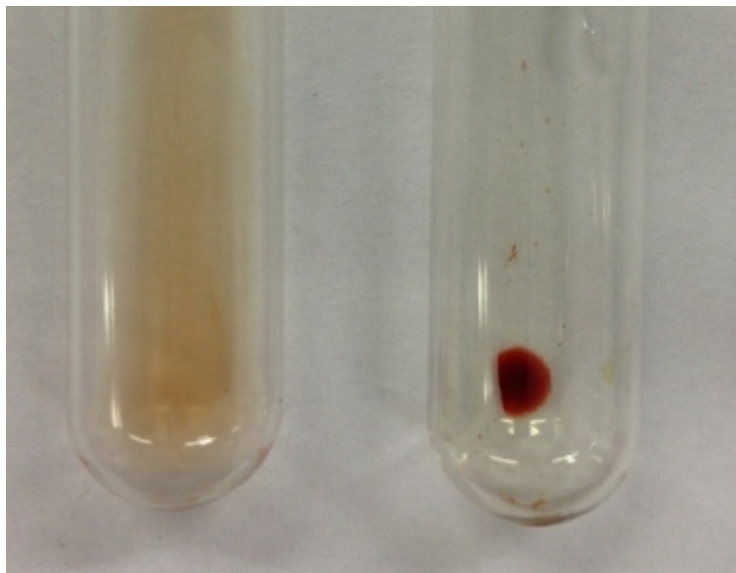


Figura 27 - Controle negativo e Controle positivo respectivamente

Capítulo 13

Prova da Antiglobulina Humana

PROVA DA ANTIGLOBULINA HUMANA

Teste de Coombs Direto e Indireto

O teste de Coombs é o principal teste de aglutinação artificial em imuno-hematologia, permite avaliar a existência de anticorpos não aglutinantes ou incompletos na membrana eritrocitária.

Os eritrócitos se comportam como partículas eletronegativas, e como consequência dessa negatividade, gera forte repulsão entre as células, que as impedem de aglutinarem em meios onde existe uma elevada força iônica, como no meio salino. A diminuição da carga elétrica dos eritrócitos ou elevação da força iônica pode forçar a aglutinação dessas células. A ligação de determinados anticorpos à superfície eritrocitária pode reduzir a carga elétrica das hemácias, provocando sua aglutinação.

Os anticorpos humanos são divididos em:

- Anticorpos completos: são aqueles que causam aglutinação das hemácias por diminuição das forças de repulsão das mesmas. Com isso ocorre a diminuição do Potencial Elétrico (Potencial Zeta). Então se utiliza o Teste de Coombs Direto, que vai detectar nas hemácias *in vivo* as frações do complemento. A aglutinação vai ocorrer quando os anticorpos alcançarem o Potencial Zeta Crítico, que é o mínimo da diferença do potencial

elétrico. O que vai permitir a ligação do anticorpo e fazê-lo chegar ao PZ crítico é o sistema revelador.

□ Anticorpos incompletos: são aqueles que não promovem a aglutinação direta, apesar de o anticorpo reagir com o antígeno presente. Para se promover a aglutinação usa-se meio artificial (sistema revelador).

Esse teste é dividido em duas modalidades diferentes: o teste de Coombs direto e o indireto.

O Coombs direto demonstra hemácias sensibilizadas por anticorpo ou frações do complemento. A positividade desse teste pode indicar doença hemolítica do recém-nascido, anemia hemolítica autoimune, hemólise induzida por drogas e reações hemolíticas pós-transfusionais.

O Coombs indireto demonstra a presença de anticorpos antieritrocitários que podem ser encontrados no soro de gestantes Rh negativas com suspeita de sensibilização por antígenos do sistema Rh e também pode ser usado em provas de compatibilidade pré-transfusionais e determinação de antígenos eritrocitários não evidenciados pela aglutinação direta.

Teste de Coombs Direto - Antiglobulina Humana Direta

O teste de Coombs direto é um teste simples que permite a detecção de anticorpos ou frações do complemento na superfície eritrocitária. A realização desse teste depende do

soro de antiglobulina humana, pois depende da reação das hemácias com esse soro.

Material

- Banho-maria a 37°C
- Centrífuga
- Solução salina a 0,85%
- Soro anti-D
- Soro de antiglobulina humana
- Tubos de hemólise
- Suspensão de hemácias O Rh positivo
- Cronômetro

Metodologia

Lavar as hemácias do paciente e fazer uma suspensão de hemácias entre 2% a 5% identificada como solução de hemácias (colocar 100µl do sangue lavado mais 1.900µl de solução salina).

Identificar três tubos de hemólise como 1- teste, 2 - Controle + e 3 - Controle -.

Em cada tubo colocar os seguintes reagentes:

	Tubo teste	Controle +	Controle -
Suspensão de hemácias do paciente	2 gotas	---	---

Suspensão de hemácias O Rh + controle	---	2 gotas	2 gotas
Soro anti-D	---	2 gotas	---
Albumina bovina	2 gotas	2 gotas	2 gotas

Tabela 5 - Teste da Antiglobulina Humana Direta

Incubar os tubos no Banho-maria por 15 minutos. Depois, lavar os tubos com solução fisiológica por três vezes e por fim, retirar todo o sobrenadante. Acrescentar duas gotas de soro de Coombs em cada tubo e centrifugar a 1.000rpm por um minuto.

O controle positivo deve aglutinar, enquanto o negativo não deve. Se houver alteração nesses controles, o teste deve ser refeito.

Se houver anticorpos ou frações do complemento ligado às hemácias, esse teste irá produzir um complexo com um antígeno eritrocitário, que ativará a via do complemento. Se isso ocorrer, haverá aglutinação, o que é a positividade do exame.

Um teste positivo pode indicar anemia hemolítica autoimune. O paciente deve ser tratado e deve repetir o teste em seis meses.

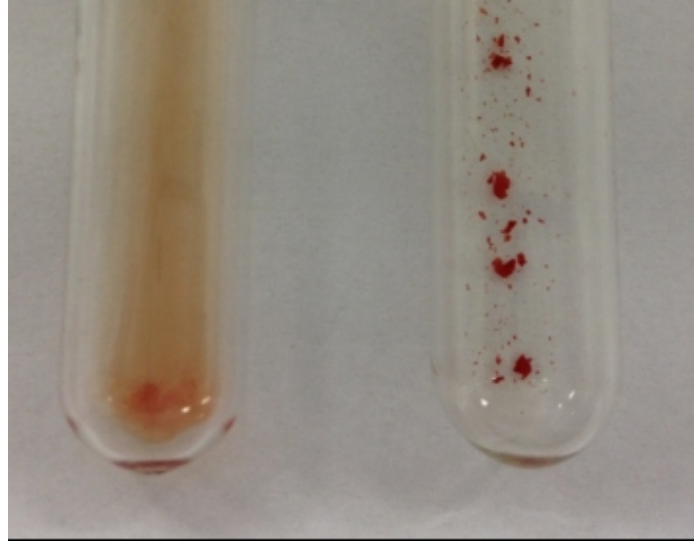


Figura 28 - Controle negativo e Controle positivo respectivamente

Teste de Coombs Indireto- Antiglobulina Humana

Indireta

O teste de Coombs indireto permite a identificação de anticorpos irregulares no soro do paciente. Esse teste não identifica o anticorpo, mas permite confirmar a presença de um auto-anticorpo ou alo anticorpo circulante. É importante a realização desse exame em gestações com possibilidade de incompatibilidade entre o Rh materno-fetal e na triagem pré transfusional, para prevenir reações hemolíticas transfusionais.

Material

- Banho-maria a 37°C
- Centrífuga
- Solução Salina a 0,85%

- ☐ Soro anti-D
- ☐ Soro de Antiglobulina Humana
- ☐ Tubos de hemólise
- ☐ Suspensão de hemácias O Rh positivo
- ☐ Cronômetro

Metodologia

Após a obtenção do soro ou plasma, identificar três tubos de hemólise como 1-teste, 2 - Controle + e 3 - Controle-. Colocar em cada tubo o seguinte:

	Tubo teste	Controle +	Controle -
Soro ou plasma do paciente	2 gotas	---	---
Suspensão de hemácias O Rh +	---	2 gotas	2 gotas
Soro anti-D	---	2 gotas	---

Tabela 6 - Teste da Antiglobulina Humana Indireta

Incubar os tubos em Banho-maria por uma hora ou adicionar duas gotas de albumina bovina em cada tubo para reduzir o

tempo de incubação para quinze minutos. Após o período de incubação, lavar os três tubos com solução salina três vezes.

Pode ser que após nessa etapa, já seja possível observar aglutinação no tubo de teste. Se houver aglutinação é porque existem anticorpos completos no soro. Havendo ou não a aglutinação, continuar o teste. Na última lavagem retirar todo o sobrenadante e adicionar duas gotas de antiglobulina humana em cada tubo. Centrifugar por um minuto a 1.000rpm. Observar se há aglutinação no tubo teste. O controle positivo aglutina-se, enquanto o negativo não. Existindo alteração nesses controles, o teste deve ser refeito. Se não foi observada aglutinação nas etapas anteriores e, ao final do teste, houve a coagulação, isso indica presença de anticorpos incompletos.

Se o teste foi positivo em uma gestante, o cuidado deve ser maior durante toda a gravidez e principalmente durante o parto. A gestante deverá tomar a vacina Rhogam (anti-Rh), para evitar hemólise devido à incompatibilidade materno-fetal, principalmente se for uma segunda gestação.

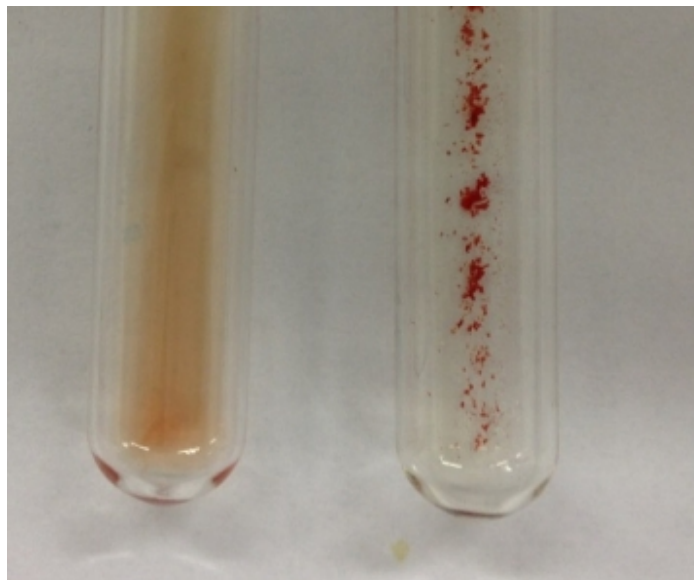


Figura 29 - Controles negativo e Controles positivo respectivamente

Capítulo 14

Coagulação - Hemostasia

COAGULAÇÃO - HEMOSTASIA

Hemostasia é o fenômeno fisiológico que mantém o sangue em seu estado líquido e é responsável pelo equilíbrio de todo o sistema de coagulação. Esse equilíbrio basicamente consiste em manter o corpo livre de alterações como trombose ou hemorragia. O sangue mantém-se fluido dentro dos vasos, sem que extravase (o que caracterizaria uma hemorragia) ou coagule (o que caracterizaria um trombo). Esse equilíbrio é decorrente de uma vasta interação entre diversos fatores que possibilitam um sistema de coagulação normal. Um estado hemostático normal é mantido por vários fatores como o equilíbrio entre os fatores pró-coagulantes e anticoagulantes e depende da atividade plaquetária normal e da resistência e contratilidade normal dos vasos sanguíneos.

Uma lesão vascular desencadeia a hemostasia primária que acaba na formação do tampão plaquetário. A coagulação acontece concomitantemente a esse processo, e no final do processo ocorre a fibrinólise, que é a retirada do tampão plaquetário e por fim a reconstrução tecidual.

A hemostasia primária engloba os componentes do endotélio vascular e plaquetas, resultando na formação do tampão plaquetário. Proteínas da coagulação formarão a fibrina, que reforça o tampão plaquetário, formando um trombo estável. O sistema fibrinolítico irá dissolver o tampão gradativamente, no fim, irá restaurar o fluxo sanguíneo normal.

As células endoteliais modificam sua estrutura logo após o incidente, para liberar substâncias que ajudarão na formação do tampão. Em vasos sanguíneos de grande calibre, há necessidade de reconstrução cirúrgica para estancar o sangramento, pois a grande pressão não permite a formação de um tampão adequado. Em vasos de calibres médios e pequenos, a regeneração ocorre de forma instantânea pelo processo de hemostasia, coagulação e fibrinólise. Essas células secretam substâncias químicas que ativam e desativam esses processos, pelo mecanismo de *feedback*. Quando essas células são ativadas, liberam substâncias pró-coagulantes, gerando uma ação positiva na cascata de coagulação. Quando está desativada, libera substâncias anticoagulantes, com a ação de inibir a cascata de coagulação. Ao mesmo tempo em que as células endoteliais lesadas estimulam a agregação plaquetária e a ação dos

fatores pró-coagulantes, isso caracteriza a ação positiva sobre a cascata de coagulação. Quando há o estímulo no sentido de controlar a agregação e coagulação por meio de síntese dos fatores antiagregantes e anticoagulantes, está ocorrendo a ação negativa das células endoteliais.

Pró-coagulantes / Ação +	Anticoagulantes / Ação -
Fator tecidual	Uroquinase
Fator de Von Willebrand	Óxido Nítrico
Inibidores do Plasminogênio	ADPase
IL-1, TNF- α	Glicosaminoglicona-GAS
Endotelina-1	Proteínas C e S
	Trombomodulina
	Ativadores do Plasminogênio
	Prostaciclina

Tabela 7 - Fatores Pró-coagulantes e Anticoagulantes

Plaquetas

As plaquetas têm como função a capacidade de aderir colágeno, agregação plaquetária, liberação de ADP pelos grânulos plaquetários, síntese de prostaglandina que reduz o fluxo sanguíneo, síntese de tromboxana, que auxilia a agregação plaquetária, síntese de serotonina que atua na vasoconstrição e possui os receptores para fatores de Von Willebrand.

As plaquetas são formadas por três zonas:

A *zona periférica*, que é a parede externa da membrana celular, onde são encontrados antígenos plaquetários MPA, enzimas fosfolipídios e glicoproteínas. Cada glicoproteína tem uma função importante:

- A GPIa se liga ao colágeno na fase inicial da adesão plaquetária ao endotélio.
- A GPIb é o receptor do fator de Von Willebrand e atua na fixação da plaqueta ao endotélio vascular.
- A GPIIb-IIIa é responsável pela agregação plaquetária.
- A GPIV é o receptor da tromboplastina.

A *zona de citossol* é onde é encontrado o citoplasma, que é rico em actina e miosina que atuam na mudança da forma plaquetária e na retração do coágulo.

A *zona das organelas* possui corpos densos formados por 65% de ADP e ATP, serotonina, pirofosfato, antiplasmina. Os grânulos α possuem proteínas de adesão, fatores de coagulação, PDGF, FP4, TGF β . A GPIIbIIIa também é encontrada nesta zona, assim como a GPIV.

As plaquetas liberam uma molécula derivada do ácido araquidônico e que está envolvido na agregação e em pequena vasoconstrição. Essa molécula é o tromboxane. A serotonina, potente vaso constritor, também é liberada pelas plaquetas,

assim como os fosfolipídios, que induzem fatores da coagulação a se ativarem.

Coagulação

Quando ocorre lesão vascular, há a liberação dos fosfolipídios que seguem pela via de inibição plaquetária e resultam em prostaciclina que tem efeito inibidor sobre a ação plaquetária para evitar exageros.



Esquema 1 - Esquema geral

Na lesão, as plaquetas se aderem ao colágeno das células endoteliais, alterando sua morfologia e desencadeando a reação de agregação.

A agregação e adesão plaquetária dependem do endotélio lesado que, ao liberar prostaciclina, atua na diminuição da adesão e agregação. Concomitantemente, a GPIa se liga ao colágeno exposto promovendo a alteração da função plaquetária pelos microtúbulos, liberando substâncias (serotonina, que promove vasoconstrição; fosfolipídios, que liberam fibrinogênio, formando a fibrina e dando estabilidade ao coágulo; tromboxana, que promove agregação plaquetária, promovendo vasoconstrição e auxiliando na formação do coágulo).

O mecanismo de coagulação se inicia imediatamente após o traumatismo na parede vascular em tecidos adjacentes. O contato do sangue com o endotélio lesado ou com o colágeno promove início da via extrínseca.

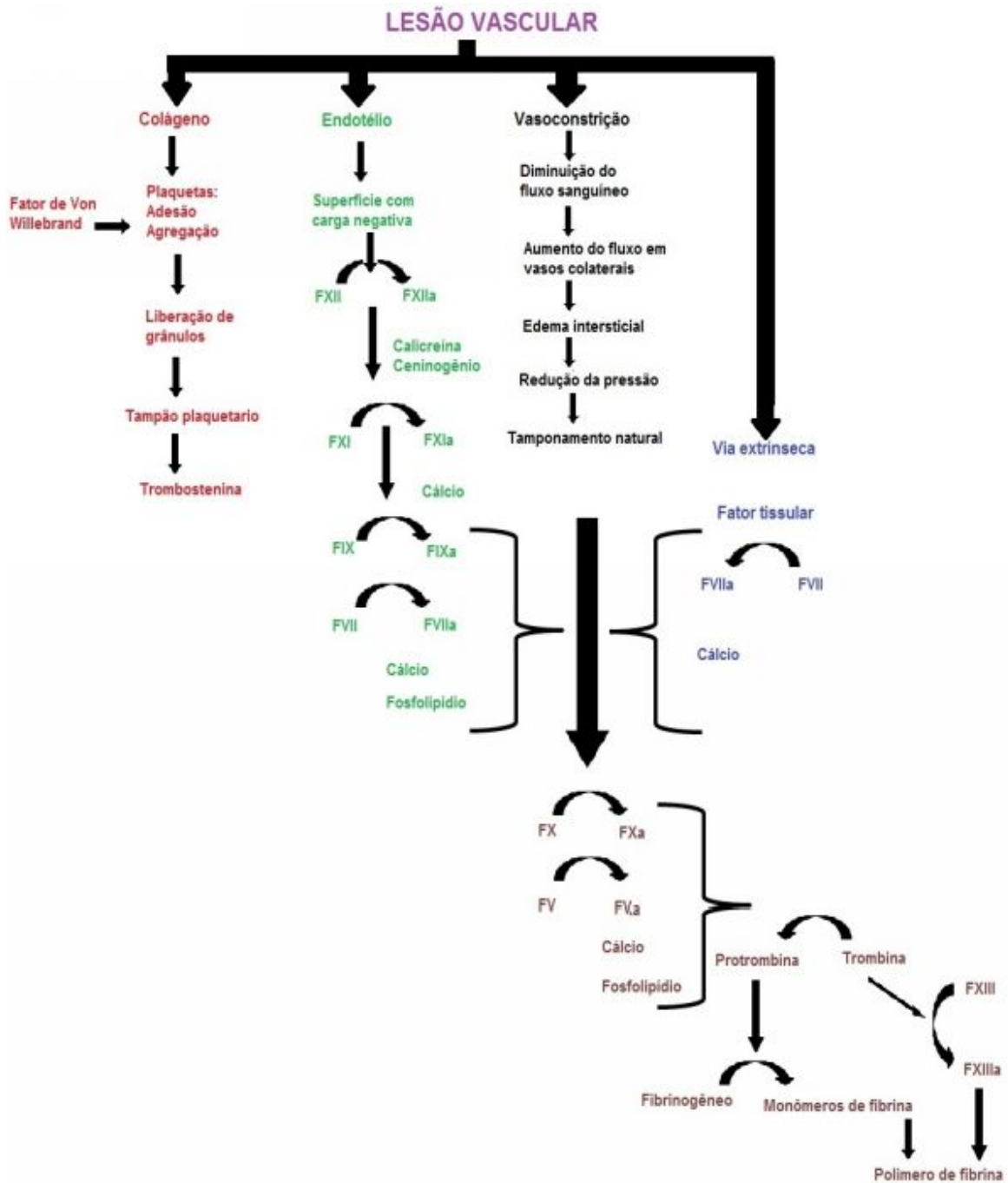
Via extrínseca

Inicialmente ocorre a liberação do fator tecidual (tromboplastina), após a lesão da parede vascular onde ocorre a ativação do FVII e em seguida, juntamente com o cálcio, ativam o FX. O FXa, juntamente com o cálcio e o FV ativam a pró-trombina e seguem para a via comum. O FV é cofator e quando ele se encontra em falta, o fosfolípido plaquetário age na protrombina, que se transforma em trombina, que estimula o FV. Toda essa via demora cerca de quinze segundos após a injúria tecidual.

Via intrínseca

Consiste em um conjunto de proteínas que estão sob a forma de zimogêneos, formam dois grupos: As enzimas/serinas/proteases (fatores XII, XI, X, IX, VII, II, XIII) e os cofatores (V, VIII, cininogênio de alto peso molecular). A injúria tecidual ativa o FXII (que é ativado pelas cargas negativas da superfície, colágeno ou endotoxina). Para o cofator XIa e a pré-caliceína efetuarem adsorção à superfície em que está ligado o FXIIa é necessário que o cininogênio de alto peso molecular (HMWK) atue. O cofator XIa e o cálcio

ativam o FIX que, juntamente com o FXIII e o cálcio, ativam o FX.



Esquem2 - Cascata de coagulação

Via comum

O FX é o fator comum de ambas as vias, que se juntam na via comum e ativam o FV com o auxílio do cálcio, eles ativam a protrombina, que se transforma em trombina. O FVIII é ativado pela trombina e os fosfolipídios plaquetários auxiliam na ativação da protrombina em vez do FXa. Esse processo é um pouco mais lento, demorando de um a seis minutos.

A coagulação sanguínea consiste em transformar o fibrinogênio, proteína solúvel do plasma, em fibrina, polímero insolúvel, por ação da trombina. A fibrina forma uma rede elástica de fibras que consolida o tampão plaquetário, transformando-o em tampão hemostático. A trombina resultante da via comum estimula a formação da fibrina que é estabilizada pelo FXIIIa.

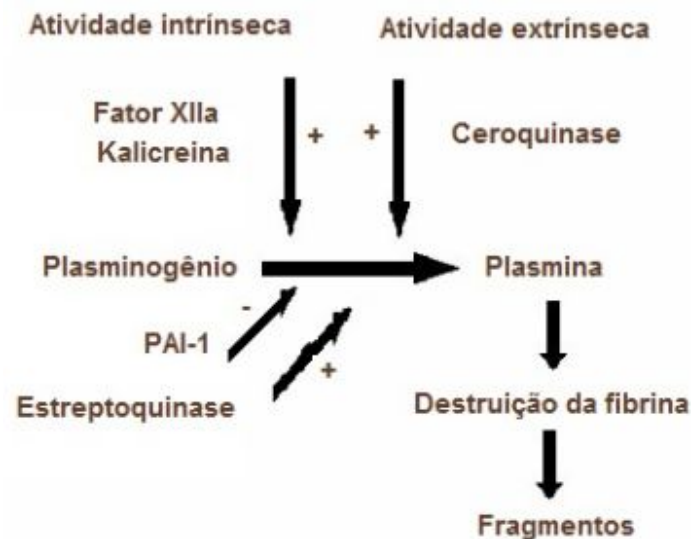
No processo final da coagulação ocorre a transformação de fibrinogênio e fibrina e, após 48 a 72 horas, as células endoteliais se regeneram e começam a secretar enzimas que irão destruir o coágulo no processo conhecido como fibrinólise.

Fibrinólise



Esquema 3 - Fibrinólise

Esse é o mecanismo de dissolução enzimática do coágulo que se forma após lesão vascular, permitindo a recanalização do vaso lesado e tamponado. A enzima responsável pela fibrinólise é a plasmina, que, quando ativada, se transforma em plasminogênio. Existem substâncias ativadoras e inibidoras do plasminogênio, que confere um equilíbrio do processo.



Esquema 4 - Atividade intrínseca e extrínseca da coagulação

Os fatores fibrinolíticos começam a ser sintetizados desde o início do processo da hemostasia, já com o objetivo de destruir a fibrina após o restabelecimento do tecido lesionado. Da mesma forma que os fatores anticoagulantes são importantes para evitar trombose, os fatores fibrinolítico e plasminogênio também são fundamentais nesse sentido.

Coagulograma

O coagulograma é dividido em duas partes:

- Coagulograma tipo I, que consiste nos testes de tempo de sangramento, prova de fragilidade capilar, tempo de coagulação do sangue total e medida de retração do coágulo.
- Coagulograma tipo II, que consiste de todo o coagulograma tipo I mais TP, TTPa e dosagem de fibrinogênio.

Avaliando o resultado dos exames, pode-se supor uma determinada alteração. O coagulograma é um conjunto de exames de triagem, ou seja, eles avaliam se há ou não uma alteração qualquer e podem indicar uma determinada alteração, porém para diagnóstico, devem ser feitos exames específicos para cada suspeita.

Capítulo 15

Tempo de Sangramento

TEMPO DE SANGRAMENTO

O tempo de sangramento é um teste que avalia a duração de uma pequena hemorragia provocada superficialmente na pele e faz parte do Coagulograma do tipo I. Essa técnica é imprecisa, pois depende de muitos fatores externos como o modelo de lanceta utilizada, força e pressão aplicadas durante a punção.

Essa técnica avalia a resposta da parede capilar à lesão e defeitos na hemostasia primária. Seu resultado é apenas qualitativo devido às diversas interferências que podem afetar os resultados e, por esse motivo, a técnica está caindo em desuso.

Método de Duke

Material

- Lancetas esterilizadas
- Papel de filtro
- Cronômetro

Metodologia

Com o auxílio de um algodão embebido em álcool, fazer a assepsia da polpa digital do dedo anelar do paciente. Aguardar a evaporação do álcool e realizar a punção na região lateral da polpa, sem pressionar o dedo. A punção deve ser firme, e no momento que se observa a primeira gotícula de sangue, disparar o cronômetro.

A cada 30 segundos, absorver a gota de sangue, com o papel filtro, sem encostar na incisão. No momento em que não se observa nenhuma gota sendo absorvida pelo papel filtro, parar o cronômetro. O valor do tempo de sangramento do paciente é o tempo marcado no fim do sangramento. O tempo de precisão é de 30 segundos, já que a análise da incisão é feita de 30/30 segundos.

Valores de referência

Até três minutos

Método de Ivy

A metodologia proposta por Ivy é similar à técnica de Duke, e está sujeita aos mesmos erros e falta de padronização. Essa técnica já foi adaptada para utilização de um dispositivo que padronizou as incisões, reduzindo os erros de procedimento.

Material

- Lancetas esterilizadas
- Papel de filtro
- Esfignomanômetro
- Cronômetro

Metodologia

Inflar o esfignomanômetro a 40mmHg em um braço onde nenhuma tenha sido puncionada recentemente. Analisar a região volar do antebraço para encontrar uma região onde não existam veias superficiais ou lesões. Fazer a assepsia do local e esperar a evaporação do álcool. Observar se o esfignomanômetro está na marca de 40mmHg (manter essa pressão durante todo o teste) e fazer duas incisões paralelas e em ângulo reto com o eixo longitudinal do antebraço, separadas por cinco a 10cm. Acionar o cronômetro imediatamente após as punções.

A cada 30 segundos, absorver a gota de sangue, com o papel filtro, sem encostar nas incisões. No momento em que não se observa nenhuma gota sendo absorvida pelo papel filtro em ambas as incisões, parar o cronômetro e retirar o esfignomanômetro.

O valor do tempo de sangramento do paciente é o tempo marcado no fim do sangramento. O tempo de precisão é de 30 segundos, já que a análise da incisão é feita de 30/30 segundos.

Valor de referência

Até sete minutos

Discussão

Quando o resultado do teste está alterado, refazê-lo redobrando os cuidados em relação às possíveis falhas de procedimento (de preferência utilizar lanceta com 1,5mm de profundidade, com punção firme e rápida, evitando encostar o papel de filtro nas incisões). Se o resultado persistir, esse tempo de sangramento alterado indica alguma alteração na formação do tampão plaquetário. Essa alteração pode indicar plaquetopenia, doença de Von Willebrand, mieloma múltiplo, uremia, insuficiência hepática, doença de Glazmann, síndrome de Bernard-Soulier, uso de alguns medicamentos como a aspirina.

Esse teste não fecha diagnóstico, e é utilizado apenas como triagem. Pacientes com resultados alterados devem fazer exames complementares (coagulograma do tipo II, dosagem de fatores da coagulação, por exemplo) para se achar a causa da alteração.

Capítulo 16

Prova de Fragilidade Capilar

PROVA DE FRAGILIDADE CAPILAR

A prova de fragilidade capilar é baseada na técnica de Rumpel-Leed, que testa a resistência capilar sobre condições de anoxia e pressão sanguínea capilar aumentada por meio de um esfignomanometro. A fragilidade capilar é caracterizada por pequenos extravasamentos de sangue sob a pele que geralmente ocorrem por pequenas alterações nos capilares.

Técnica

Material

- ☐ Esfignomanometro
- ☐ Cronômetro
- ☐ Estetoscópio
- ☐ Caneta
- ☐ Lâmina

Metodologia

A técnica consiste na aferição da pressão arterial do paciente, e fazendo-se uma média da pressão sistólica e diastólica. Após medir a pressão do paciente, marcar com uma caneta qualquer marca ou sinal que possa ser confundido com uma petéquia após o exame.

Colocar o esfignomanometro aproximadamente 5cm acima da fossa anticubital e inflá-lo até a média das pressões medidas. Deixar o braço do paciente na altura do coração e marcar cinco minutos no cronômetro.

Após os cinco minutos, retirar o esfignomanômetro do braço do paciente e pedir para que ele movimente o braço para liberar a pressão e então verificar o surgimento de petéquias.

Leitura de resultados

Até seis petéquias na fossa antecubital, o resultado é negativo. Mais de seis petéquias, o resultado é +/4+. Petéquias que descem o braço até 1/3 do comprimento, ++/4+, até 2/3 do braço, são +++/4+, e se as petéquias chegarem até o punho ou mão, ++++/4+.

Algumas petéquias podem se formar tardiamente, até 24 horas após o exame, por isso deve-se informar o paciente que fique atento ao surgimento de petéquias, e caso isso ocorra, informar ao paciente que é necessário voltar ao posto para verificar o resultado.

Caso o seja positivo, repetir o exame no outro braço, para confirmar o resultado. Depois de confirmada a alteração, observar outros resultados do Coagulograma para fechar um diagnóstico.

Discussão

Os resultados podem ser difíceis de interpretar caso o paciente já apresente petéquias ou áreas vermelhas na pele. Para um diagnóstico correto, levar em consideração outros exames e dados clínicos além desse exame. Resultados falso-positivos podem ocorrer antes ou depois da menstruação e na pós-menopausa. O teste positivo pode ocorrer em patologias que se desenvolvem com a fragilidade capilar como os defeitos na síntese do colágeno e deficiência de vitamina C, em pacientes com plaquetopenia, como as púrpuras (trombocitopênica idiopática, púrpura trombocitopênica pós-

infeciosa, púrpura de Henoch-Schoenlein) e em pacientes com telangectasia hereditária hemorrágica.

A predisposição genética é um fator que causa positividade no teste. Exames realizados em mulheres em determinados períodos do ciclo menstrual, também mostram uma relação com os níveis hormonais.

Situações de estresse, ansiedade e depressão, podem provocar equimoses durante esse teste. Essas situações são mais comuns no sexo feminino, e são denominadas como Púrpura por Melancolia. O mecanismo que leva aos sangramentos nessas situações ainda é desconhecido.

A fragilidade capilar não requer tratamento específico, a não ser em casos de diagnóstico de alguma coagulopatia. As equimoses e petéquias desaparecem espontaneamente em poucos dias. O diagnóstico diferencial deve ser feito com diminuição do número de plaquetas ou alterações nos fatores de coagulação. Quando esses dois exames estão normais e o valor da prova de fragilidade capilar está aumentado, o diagnóstico de Fragilidade Capilar está confirmado.

Capítulo 17

Tempo de Coagulação

TEMPO DE COAGULAÇÃO

O tempo de coagulação corresponde ao tempo gasto para o sangue coagular quando retirado do organismo, e por isso pode avaliar de maneira global os fatores relativos ao sistema de coagulação. Esse é um teste que avalia a via intrínseca da

coagulação, e depende dos fatores de coagulação VIII, IX, X, XI e XII, e das proteínas pré-calicreína, cininogênio de alto peso molecular e íons de cálcio.

Técnica

Material

- Tubos de hemólise
- Cronômetro
- Banho-maria a 37 °C
- *Kit* para coleta sanguínea venosa

Metodologia

Para a realização desse exame é necessário preparar o paciente para uma boa punção, higienizando o local da coleta, colocando o torniquete no momento da coleta, e não o deixando por mais de dois minutos (sendo o ideal a coleta sem o torniquete). A punção deve ser feita com seringa, e no momento em que o sangue é visto no êmbolo, disparar o cronômetro. Coletar 2ml de sangue, colocando 1ml em cada tubo (tubo 1 e tubo 2), pré-aquecido em Banho-maria a 37 °C. Esperar três minutos no cronômetro a partir do momento em que o sangue entrou em contato com o embolo. Após os três minutos, colocar os tubos novamente em banho Maria. Inverter o tubo 1 a cada um minuto até o sangue coagular. Nesse momento comece a inverter o tubo 2 a cada trinta

segundos. Quando o tubo 2 coagular, parar o cronômetro e anotar o tempo.

Valores de referência

Somar o tempo em minutos de coagulação do primeiro tempo ao tempo em segundos da coagulação do segundo tubo.

O resultado da coagulação em até 11 minutos é normal.

Discussão

Os resultados do teste de coagulação podem sofrer alterações se o Banho-maria não estiver bem calibrado ou se o cronômetro não for acionado imediatamente após a punção. Alterações também podem ser vistas caso o tubo usado esteja sujo, ou se o tubo for siliconizado (o tempo de coagulação nesses tubos pode chegar a 40 minutos).

Tempo prolongado da coagulação quase sempre significa severas hemofilias (1/3 dos pacientes com hemofilia não apresentam alteração nesse teste), presença de anticoagulante circulante (inibidor de fator VIII ou inibidor lúpico, por exemplo) ou deficiência de fator XII. Pacientes com tratamento com heparina também podem apresentar resultado alterado.

Capítulo 18

Tempo de Retração do Coágulo

TEMPO DE RETRAÇÃO DO COÁGULO

A retração do coágulo depende principalmente da quantidade e atividade das plaquetas. O fibrinogênio também interfere no resultado, pois o retículo de fibrina conserva o soro por capilaridade, logo, se a quantidade de fibrinogênio estiver aumentada, o tempo de retração do coágulo estará reduzida. Eritrócitos e leucócitos não influenciam diretamente na retração do coágulo, porém, em caso de grandes alterações na quantidade dessas células, o volume do soro é alterado, o que altera o resultado do teste. A trombina é outro fator que atua diretamente na retração do coágulo. E então quanto maior a quantidade de trombina, maior o grau de retração do coágulo.

Um coágulo inicial contém todos os elementos do sangue e após a retração completa do coágulo, o soro é expulso da malha de fibrina. Essa expulsão é decorrente da ação direta das plaquetas na malha de fibrina, e por isso permite avaliar a porcentagem da retração em relação ao volume de soro obtido após uma retração do coágulo.

Técnica

Material

- Material para punção venosa;
- Tubo graduado;
- Borracha adaptável ao tubo;

- Fio de cobre do mesmo comprimento do tubo;
- Banho-maria a 37°C;
- Cronômetro.

Metodologia

Coletar pelo menos 5ml de sangue venoso do paciente com cuidado para que a coleta seja livre de traumas, evitando assim grumos plaquetários na amostra. Encher o tubo graduado até a marca de 5ml, fixar o fio de cobre na borracha adaptável ao tubo e mergulhar a extremidade curvada deste fio no sangue, até metade da coluna líquida. Colocar o tubo em Banho-maria por uma hora e meia. No período de uma hora, o coágulo já deve estar formado e o soro separado. Cuidadosamente, retire o fio de cobre com o coágulo aderido e aguarde de dois a três minutos para escorrer o soro preso na malha de fibrina.

Centrifugar o tubo graduado para poder identificar o volume de soro expelido durante a coagulação, descontar o volume eritrocitário residual liberado pelo coágulo.

Cálculos

O valor de retração do coágulo é calculado em porcentagem e pode ser feito usando dois cálculos distintos.

$$RC = \frac{\text{Volume do Soro} \times 100}{\text{Volume do Sangue Total}}$$

O volume do soro é o valor encontrado no tubo graduado após a centrifugação. Esse valor deve ser multiplicado por 100 para se identificar quantos ml de soro são obtidos a partir de 100ml de sangue. O volume do sangue total é equivalente aos 5ml de sangue colocados no tubo antes da retração do coágulo.

Como os valores 100 e 5 são constantes, podemos simplificar a fórmula multiplicando o volume do soro encontrado por 20.

$$RC = \text{Volume do Soro} \times 20$$

Outro cálculo que pode ser utilizado para determinação do valor de retração do coágulo é:

$$RC = \frac{\text{Volume de Sangue} - \text{Volume do Soro}}{\text{Volume de sangue}} \times \frac{\text{Ht do Paciente}}{\text{Ht normal (45\%)}} \times 100\%$$

Para a utilização deste cálculo é necessário saber o valor do hematócrito do paciente. Podemos simplificar essa equação para:

$$RC = \frac{5 - \text{Volume do Soro}}{5} \times \frac{\text{Ht do Paciente}}{45} \times 100$$

Em ambas as equações, teremos como resultado a porcentagem de retração do coágulo.

Valores de Referência

Retração do coágulo de 48 a 64%

Discussão

A retração do coágulo é a fase final do processo de coagulação e é um indicador direto da função plaquetária. A quantidade de trombina, fibrinogênio e células sanguíneas pode interferir no resultado desse teste. Em situações como anemia, púrpura trombocitopênica idiopática, leucemia, lúpus eritematoso, septicemia, tromboastemia e outras coagulopatias, pode reduzir o volume do coágulo. Já nas policetemias, o coágulo pode estar aumentado devido à grande quantidade de células. A rede de fibrina é proporcional à quantidade de fibrinogênio. A hemossedimentação acelerada e as hemácias no fundo do tubo podem causar alterações na retração do coágulo.

O ideal é encontrar um coágulo firme e bem retraído, o que indica uma função normal e quantidade normal de plaquetas.

Capítulo 19

Tempo de Protrombina

TEMPO DE PROTROMBINA

O tempo de protrombina (TP) é uma medida laboratorial para avaliar a via extrínseca da coagulação (FII, FV, FXII, FX e fibrinogênio). A maioria desses fatores são vitaminas K-dependentes, ou seja, o TP também pode ser usado para auxiliar o estudo de coagulopatia secundária às doenças hepatobiliares durante o tratamento e quando há suspeitas de carência de vitamina K. A tromboplastina tecidual em presença de cálcio ativa todo o sistema extrínseco da coagulação, por isso esse teste é baseado na adição dessa

substância no plasma para observar o tempo da reação final de um coágulo sólido.

Esse teste pode auxiliar no acompanhamento no uso de anticoagulantes e na avaliação de risco cirúrgico.

Devido às diferenças dos reagentes utilizados em vários laboratórios, a OMS recomenda uma padronização utilizando o INR (*International Normalized Ratio*). O INR é a relação do TP do paciente com o TP de um *pool* normal

Técnica

Material

- Banho-maria a 37°C;
- Centrífuga;
- Cronômetro;
- Tubos de hemólise;
- Tubos com citrato de sódio 3,8g/dl
- Solução de tromboplastina
- Cloreto de cálcio 0,025

Metodologia

Toda a técnica deve ser realizada em duplicata para garantir um resultado confiável. A coleta do sangue deve ser sem traumatismos e contaminação por líquido tissular e deve ser colocada em um tubo de citrato, para que este seja centrifugado para a obtenção do plasma sanguíneo. Colocar três tubos de hemólise identificados como: PAC1, PAC2 (amostras em duplicata do paciente) e PC (plasma de controle normal). Colocar em cada tubo PAC 0,1ml de plasma do paciente e 0,1ml de plasma do controle no tubo controle. Acrescentar em todos os tubos 0,1ml da solução de tromboplastina e deixar os tubos em Banho-maria por dois minutos.

Valores de Referência

Valores normais: 11 e 14 segundos.

O resultado também poderá ser liberado em forma de porcentagem do normal, segundo uma curva de diluição do plasma normal. Para esse tipo de resultado o valor de referência é de 70 a 100% do padrão.

Discussão

Tempo TP aumentado pode indicar deficiência dos fatores FII ou FVII, sendo muito rara a deficiência no FV e FX.

Tempo TP reduzido pode ser recorrente à interação com anticoagulantes como os barbituratos, vitamina K,

anticoncepcionais e alguns diuréticos. Antes de liberar algum resultado alterado, observar se o plasma estava velho, com hemólises, se houve contaminação por fator tecidual, se as vidrarias estavam contaminadas por detergente ou trombina, se houve erros de pipetagem ou de visualização do coágulo. Caso seja observada qualquer uma das falhas mencionadas acima, refazer o teste redobrando o cuidado em relação aos erros proceduais.

Razão Internacionalizada Normalizada - RNI

Com o resultado desse exame, podemos calcular o RNI, que é uma razão criada pela Organização Mundial da Saúde para padronizar o resultado do teste, levando em consideração os diferentes tipos de fator tissular utilizados nos testes. Cada fabricante fornece o número do ISI utilizado no seu *kit*. Para fazer esse cálculo, Deve-se observar o ISI na bula do *kit* usado para cada teste.

$$RNI = \left(\frac{\text{TP do paciente}}{\text{TP do plasma controle}} \right)^{\text{ISI}}$$

O cálculo é feito com a razão do TP do paciente sobre o TP do plasma controle e o resultado é elevado ao valor do ISI do *kit* utilizado.

A tabela abaixo pode ser usada para facilitar os cálculos para encontrar o RNI.

Um RNI igual a 1,00 indica um sangue com coagulação normal. Valores entre 0,85 e 1,20 estão dentro dos valores de referência de normalidade. Pacientes com tromboembolismo precisam manter o RNI entre 2,0 e 3,0, controlando com anticoagulantes para reduzir o risco de trombozes. Valores entre 3,0 e 5,0 de RNI apresentam uma anticoagulação perigosa, e os pacientes devem procurar orientação para controle da alteração. Valores de RNI acima de 5,0 indicam uma anticoagulação excessiva e maior risco de sangramentos espontâneos, inclusive de acidente vascular espontâneo hemorrágico, por isso, o controle do RNI deve ser feito com grande rigor.

TP da amostra controle	11 s	11,5 s	12 s	12,5 s	13 s	13,5 s	Atividade (%)	R	RNI
TP do teste	11	11,5	12	12,5	13	13,5	100	1,00	1,00
	11,2	11,7	12,2	12,8	13,3	13,8	93,6	1,02	1,02
	11,3	11,8	12,4	12,9	13,4	13,9	91,0	1,03	1,03
	11,6	12,1	12,6	13,1	13,7	14,2	87,1	1,05	1,07
	11,7	12,2	12,7	13,3	13,8	14,3	85,4	1,06	1,08
	12,1	12,7	13,2	13,8	14,3	14,9	78,6	1,10	1,13
	12,3	12,9	13,4	14,0	14,6	15,1	76,3	1,12	1,15
	12,7	13,2	13,8	14,4	15,0	15,5	72,1	1,15	1,20
	13,0	13,6	14,2	14,8	15,3	15,9	68,7	1,18	1,23
	13,3	13,9	14,5	15,1	15,7	16,3	65,4	1,21	1,27
	13,8	14,4	15,0	15,6	16,3	16,9	61,5	1,25	1,33
	14,6	15,3	16,0	16,6	17,3	17,9	55,0	1,33	1,42
	15,3	16,0	16,7	17,4	18,1	18,8	51,4	1,39	1,51
	15,8	16,6	17,3	18,0	18,7	19,4	48,3	1,44	1,57
	16,2	16,9	17,6	18,4	19,1	19,8	46,9	1,47	1,62
	16,7	17,5	18,2	19,0	19,8	20,5	44,3	1,52	1,69
	17,2	17,9	18,7	19,5	20,3	21,1	42,6	1,56	1,75
	17,6	18,4	19,2	20,0	20,8	21,6	40,5	1,60	1,80
	17,8	18,6	19,4	20,2	21,1	21,9	40,2	1,62	1,83
	18,2	19,0	19,8	20,6	21,5	22,3	38,5	1,65	1,88
	18,5	19,3	20,2	21,0	21,8	22,7	37,4	1,68	1,92
	18,9	19,8	20,6	21,5	22,4	23,2	36,3	1,72	1,97
	19,3	20,1	21,0	21,9	22,8	23,6	35,7	1,75	2,02
	19,8	20,7	21,6	22,5	23,4	24,3	34,3	1,80	2,08
	20,4	21,3	22,2	23,1	24,1	25,0	32,4	1,85	2,16
	20,9	21,9	22,8	23,8	24,7	25,7	31,3	1,90	2,23
	21,5	22,4	23,4	24,4	25,4	26,3	30,6	1,95	2,31
	22,0	23,0	24,0	25,0	26,0	27,0	29,6	2,00	2,38
	22,7	23,7	24,7	25,7	26,8	27,8	28,1	2,06	2,47
	23,7	24,7	25,8	26,9	28,0	29,0	26,4	2,15	2,60
	24,2	25,3	26,4	27,5	28,6	29,7	25,5	2,20	2,68
	25,3	26,5	27,6	28,8	29,9	31,1	24,3	2,30	2,83
	26,4	27,6	28,8	30,0	31,2	32,4	23,1	2,40	2,99
27,6	28,9	30,1	31,4	32,6	33,9	21,7	2,51	3,16	
30,8	32,2	33,6	35,0	36,4	37,8	18,5	2,80	3,62	
33,0	34,5	36,0	37,5	39,0	40,5	17,2	3,00	3,95	
36,3	38,0	39,6	41,3	42,9	44,6	15,2	3,30	4,45	
38,5	40,3	42,0	43,8	45,5	47,3	14,6	3,50	4,79	
44,0	46,0	48,0	50,0	52,0	54,0	12,1	4,00	5,66	

Tabela 8 - Razão Internacionalizada Normalizada*

Capítulo 20

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA

Esse teste avalia a eficiência da via intrínseca da coagulação (fatores XII, XI, IX e VII) por meio da medição do tempo

necessário para formação de um coágulo de fibrina após a adição de emulsão de cálcio e fosfolípido a uma amostra de cálcio. Um ativador é usado para diminuir o tempo de coagulação.

O Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) consiste na determinação do tempo de coagulação do plasma citratado após a adição de um fator de fase de contato da coagulação e um reagente, a cefalina, que substitui o fosfolípido da membrana plaquetária. O cálcio reverte à ação do citrato e é por isso o último reagente a ser adicionado. O ativador de fase de contato que é colocado em acesso vai ativar o FXII na presença de pré-caliceína e cininogênio de alto peso molecular. E o FXIIa vai transformar o FXI em FXIa. O FXIa ativa o FIX, e este, junto com o FVIII-C, que atua como cofator vai ativar o FX, que ativa o FII na presença do FV e do fosfolípido de membrana plaquetária, que no TTPa, é representado pelo ativador de fase de contato. O FII ativado (trombina) coagula o fibrinogênio, transformando-o em fibrina. Esse ativador de fase de contato não possui atividade de fator tecidual, isto é, não é capaz de ativar o FVII da coagulação. Por este motivo, ele é chamado de tromboplastina parcial.

Técnica

Material

- Tubo de hemólise;

- Tubo de citrato de sódio 3,8 g/dl;
- Cloreto de cálcio 0,025M;
- Cefalina de caôlin;
- Tromboplastina parcial;
- Cronômetro;
- Banho-maria a 37°C.

Metodologia

A coleta do sangue deve ser sem traumatismos e sem contaminação por líquido tissular e deve ser colocada em um tubo de citrato, para que este seja centrifugado para a obtenção do plasma sanguíneo. Identificar dois tubos de hemólise, PAC e ICT, em Banho-maria a 37°C, adicionar 0,1ml do plasma do paciente em seu respectivo tubo e 0,1ml de Cefalina caôlin, agite o tubo e encube-o a 37°C por quatro minutos. Rapidamente, adicione 0,2ml da solução de cloreto de cálcio e dispare o cronômetro. Aguarde 30 segundos e comece a inverter o tubo a cada segundo, observando o momento em que ocorre a coagulação. Pare o cronômetro e anote o valor. Repita o procedimento para o tubo controle usando um plasma controle. O resultado da TTPa será a razão entre o plasma do paciente sobre o plasma normal.

Valor de referência

De 40 a 60 segundos, a razão deve ser igual ou menor a 1,2.

Discussão

Um TTPa prolongado pode indicar uma deficiência de determinados fatores de coagulação do plasma. Esses fatores abrangem praticamente todos os fatores da cascata de coagulação, com exceção do FVII, que é exclusivo da via extrínseca. Terapia com anticoagulante como a varfarina e heparina ou a presença de produtos de divisão da fibrina podem também aumentar o TTPa. Se esse teste der alterado e o TP do paciente também, indica deficiência dos seguintes fatores: X, V e II. O TTPa pode indicar uma hemofilia ou estados hemofíloides.

Conclusão

CONCLUSÃO

Este manual foi elaborado seguindo as técnicas mais comuns hoje adotadas no Brasil. Não pode, todavia, deixar de olhar para o futuro, que aponta para uma contínua evolução e ampliação do conhecimento científico, que produz a necessidade de uma constante revisão dos procedimentos outrora considerados como o mais avançados.

Deve-se ter em conta, ainda, que cada laboratório possui regras próprias que, quando se chocarem com as do presente manual, devem ser adotadas. Tal não invalida as técnicas aqui descritas, mas apenas confirma que a ciência não é unidirecional, pois permite a divergência de procedimentos com vistas a um mesmo fim.

É fundamental observar-se que as técnicas aqui adotadas devem, ainda, ser complementadas por outras que não foram objeto do presente trabalhos, em especial, as relativas à segurança física dos laboratórios e à prevenção contra a infecção do ambiente ou dos técnicos por microrganismos patogênicos presentes das amostras.

Outro aspecto que deve ser observado é o descarte do material, que deve se submeter a regras a serem emitidas pelos laboratórios e pelos órgãos de vigilância sanitária federal e estaduais.

Espera a autora, com a presente obra, contribuir para o aperfeiçoamento da prática laboratorial de hematologia e hemoterapia, e, no sentido oposto, receber dos usuários um *feedback* sobre a aplicabilidade das técnicas tratadas e dos aperfeiçoamentos que o desenvolvimento científico tornar recomendáveis.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., et al. **Molecular Biology of the cell.** 4. ed.. New York, Garland Science, 2002.

ALTERS, S. **Biology - Understanding life.** 3. ed., Sudbury, MA, Jones and Bartlett Publishers, 1999.

AMABIS, J.M., MARTHO, G. R. **Biologia das Células.** 2. ed.. São Paulo, Moderna, 2004.

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS, **Technical Manual**, 12. ed., Bethesda, Md., Public Relations Department ; AABB, 1996.

ANVISA. RESOLUÇÃO. **RDC Nº 153, DE 14 DE JUNHO DE 2004: Regulamento técnico para os procedimentos hemoterápicos** . [s.ed.], Brasília - DF, 2004.

AUCLERC, P. C. JUNQUEIRA G. : **MINI-ENCICLOPÉDIA DE HEMATOLOGIA**. [s.l.], Andrei, 2011.

AVEIRO, M. A. **Citologia** . [s.ed.], Lisboa, 1975.

AZEVEDO, C. **Biologia Celular e Molecular** . 4. ed.. Lisboa, Lidel Edições Técnicas Ltda., 2005.

BAIN J.B. **Células Sanguíneas: um guia prático** . 3. ed.. Porto Alegre, Artmed., 2004.

BAYNES, J.W. **Bioquímica Médica** . 2. ed., [s.l.], Elsevier, 2006.

BECKER, W.M., KLEINSMITH, L.J. e HARDIN, J. **The World of the Cell** . 4. ed., San Francisco, The Benjamin/Cumming Publishing Company, 2000.

BELLINGHAM . **Testes diagnósticos ilustrado em hematologia**. 1. ed., [s.l.], Revinter, 1997.

BENNETT, E. P., et al. **Genomic cloning of the human histo-blood**

group ABO locus . [s.ed.], Biochem Biophys Res Commun, 1995.

BORDIN, J., LANGHI, J.D.M., COVAS, D.T. **Hemoterapia Fundamentos e Prática**. [s.ed.], São Paulo, Atheneu, 2007.

BOUCHER, B. A., TRAUB, O. **Achieving hemostasis in the surgical field** . [s.ed.], [s.l.], Pharmacotherapy, 2009.

BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R. **Fundamentos de Química Clínica** . 6. ed., Elsevier, [s.ed.], 2008.

CAMPBELL, N. A. e REECE, J. B. **Biology**. 7. ed., San Francisco, Pearson-Benjamin Cummings, 2005.

CARBALLAL, E. M., MARTINS, A. V. **Tipagem sanguínea**. [s.ed.], Duque de Caxias, 2007.

CARSON, S. I. DUFF, A., POSES, R. M. **Effect of anaemia and cardiovascular disease on surgical mortality and morbidity** . Lancet, 1996

CARVALHO, W. F. **Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno Hematologia**. [s.ed.], Belo Horizonte, Coopmed., 1999.

CONTROL LAB. **Controle interno de coagulação** . [s.ed.], Rio de Janeiro, 2006.

COOPER, G. M. e HAUSMAN, R. E. **The Cell: a molecular approach** . 4.

ed., Washington, ASM Press., 2007.

CORWIN H. C., PARSOUNET K. C., Ettinger A. **RBC transfusion in the ICU; is there a reason?** [s.ed.], Chest. 1999.

COVAS, D. T., LANGHI J. D. M. BORDIN, J. O. __ **Hemoterapia: Fundamentos e Prática** . [s.ed.], São Paulo. Atheneu, 2007.

d'ONOFRIO, G., et al. **Automated measurement of red blood cell microcytosis and hypochromic in iron deficiency and β thalassemia trait. Arch.** [s.ed.], [s.l.], Phatol. Lab. Med., 1992.

d'ONOFRIO, G., et al. **Simultaneous measurement of reticulocyte and red blood cell indices in healthy subjects and patients with microcytic and macrocytic anemia.** [s.ed.], Blood, 1995.

DACIE, V., LEWIS, S.M. **Practical Hematology.** 8. ed., Churchill Livingstone, 1995.

DAHLBÄCK, B. **Protein S and C4b-binding protein: components involved in regulation of the protein C anticoagulant system** . [s.ed.], [s.l.], Thromb Haemost, 1991.

DAVENPORT . **ABC da química básica do sangue.** 1. ed.. São Paulo, Atheneu. 2007.

DAVIE, E.W., RATNOFF, O.D. **Waterfall sequence for intrinsic blood clotting.** [s.ed.], [s.l.], Science, 1964.

EDGINGTON, T. S., et al. **The structural biology of expression and function of tissue factor.** [s.ed.], [s.l.], Thromb Haemost, 1991.

ERICHSEN, E. S., et al. **Medicina Laboratorial para o Clínico** . Ed. Médica. Belo Horizonte, [s.ed.], 2009.

FABER, J. L., RUBIN, E. **Patologia** . 3 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2002.

FAILACE, R. **Hemograma manual de interpretação.** 5. ed., Failace & Cols - Artmed., [s.l.]; [s.d.].

FAMADAS, **Hemopatias malignas: Classificações clínicas, citológicas e histopatológicas.** [s.ed.], Revinter.

FERREIRA, O., et al. **Avaliação do conhecimento sobre hemoterapia e segurança transfusional de profissionais de Enfermagem** . Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia, 2007. pp. 160-167.

FISHBANE S., et al. **Reticulocyte hemoglobin content in the evaluation of iron status of hemodialysis patients** . [s.ed.], Kidney Int, 1997.

FLORIZANO, A. A. T., FRAGA, O. S. **Os Desafios da Enfermagem frente aos avanços da hemoterapia no Brasil** . Revista Meio Ambiente Saúde, 2007. pp. 282-295.

FRANCO, R. F. **Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise** . Medicina. [s.ed.], Ribeirão Preto, 2001

FREUND, M. **Hematologia microscópica prática**. 9. ed., [s.l.], Editora Santos. Fritz Heckner, [s.d.].

G., A. Z. W. **Interpretação clínica do Hemograma** . Editora Atheneu

GIRELLO, A.L., KÜHN, T. I. B. B. **Fundamentos da Imunohematologia Eritrocitária** . São Paulo, SENAC, 2002.

GREER J.P., et al. **Wintrobe's Clinical Hematology**. Lipincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2009.

HANDIN R.I., LUX S.E., STOSSEL T. P. **Blood: principles and practice of hematology** . 2. ed., Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2003.

HARMENING, D. **Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão** . 2ª ed.. Rio de Janeiro, Revinter. 2006.

HASHIMOTO,Y., SILVA, P.H. **INTERPRETAÇÃO LABORATORIAL DO ERITROGRAMA**. São Paulo, Lovise Ltda. 1999.

HAYHOE, et al. **Citologia hematológica**. 3. ed., São Paulo, Artes Médicas. 1997.

HECKNER, F., LEHMANN, H.P., KAO, Y.S. **Hematologia Microscópica**

Prática: Manual para o Laboratório e Prática Clínica. 3ª ed.. São Paulo, 1989.

HENRY, J. B. **Clinical Diagnosis and Management, Laboratory Methods** . 20. ed., Manole, 2008.

HILLMAN . **Manual de série vermelha.** [s.ed.], [s.l.], Santos (Grupo GEN). [s.d.]

HOFFBRAND, A. V., MOSS, P., PETIIT, J.E.: **Fundamentos em Hematologia** . 5. ed.. Porto Alegre, Artemed. 2008.

_____ ; _____. **Hematologia Clínica Ilustrada: Manual e Atlas Colorido** . 3. ed., São Paulo, Manole, 2001.

Hoffman M. **A cell-base model of coagulation and the role of factor VIIa.** [s. ed.], [s. l.], Blood Rev. 2003.

_____ ; **Remodeling the blood coagulation cascade** . J. Thromb Thrombolysis, 2003.

KALIKS, AURO DEL GIGLIO, R. **Princípios da hematologia clínica** . [s.ed.], [s.l.], Manole, [s.d.].

KARP, G. **Cell and Molecular Biology.** 4. ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 2005.

KÜHN, T. I. B. B. **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária.** 2. ed., [s.l.], SENAC., [s.d.].

LEE, G. R. **Wintrobe's Clinical Hematology** . 12. ed., São Paulo, Manole. 1999.

LEWIS S. M., BAIN B. J., BATES I. **Hematologia prática de Dacie e Lewis.** 9. ed., Porto Alegre, Artmed. 2006.

LICHTMAN, M. A., et al. **Hematology** . [s.ed.], USA, McGraw-Hill Medical, 2006.

LORENZI, T.F. **Manual de Hematologia - Propedêutica e Clínica.** 4. ed.. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2006.

LORENZI, T.F., et al. **Atlas de hematologia: Clínica hematologia ilustrada.** [s.ed.], Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2006.

LOTSPEICH-STEININGER, C.A. **Introduction to hemostasis: Clinical hematology.** [s.ed.], New York, J.B. Lippincott, 1992.

MARINI, J.J . **Transfusion trigger and occam's rusty razor.** [s.ed.], [s.l.], Crit. Care Med, 1998.

MARSHALL, A. L., et al. **MANUAL DE HEMATOLOGIA.** [s.ed.], [s.l.], Artmed., [s.d.].

MATOS, J. F., et al. **O hemograma nas anemias microcíticas e hipocrômicas: aspectos diferenciais.** [s.ed.], [s.l.], JBPML, 2012.

MILLER, O., et al. **Laboratório para o Clínico** . 8. ed.. São Paulo: Atheneu, 1999.

MONROE, D. M., HOFFMAN, M. **The coagulation cascade in cirrosis** . [s.ed.], [s.l.], Clin Liver Dis, 2009.

NAOUM, P. C., NAOUM, F. A. **Doença das células falciformes.** [s.ed.], [s.l.], Sarvier, 2004.

NAOUM; P. C . **Hemoglobinopatias e talassemias.** [s.ed.], [s.l.], Sarvier (Almed), [s.d.].

NOVARETTI, M. C., CHAMONE, D. A. F., LLACER, P. E. D. **Manual de transfusão sanguínea.** [s.ed.], [s.l.], Roca, [s.d].

OHLIN, A. K., MORSER, J., OHLIN, H. **Soluble thrombomodulin antigen in plasma is increased in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy.** [s.ed.], [s.l.], Thromb Res, 1996.

OLIVEIRA, R. **Hemograma: como fazer e interpretar** . [s.ed.], São Paulo, Livraria Médica Paulista, 2007.

RAPAPORT, S.I. **Hematologia.** 2. ed., São Paulo, Roca. 2006.

RAVEL, R. **Laboratório clínico** . 6. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1997.

RIDDEL, J. P.J., AOUISERAT, B. E., MIASKOWSKI, C., LILLICRAP, D. P. **Theories of blood coagulation** . [s.ed.], [s.l.], J Pediatr Oncol Nurs, 2007.

SEELEY, R. R., STEPHENS, T. D. , TATE, P. **Anatomia & Fisiologia** , 6. ed., [s.l.], 2003.

SHAUNA, C. ANDERSON, K. B . **Atlas de hematologia.** [s.ed.], Santos (Grupo GEN), [s.d.].

SILVA, F. A., **Manual de condutas em Hemoterapia** , 2. ed., Rio de Janeiro, UFRJ, 2011.

SIMON, T. I., ALBERTSON, D. C., AUBUCHON, I. **Practice parameters for the use of RBC, Practice guidelines** . [s.ed.], [s.l.], Arch Pathol, lab med, 1998.

VACULLETE DO BRASIL , **Guia prático para coleta de sangue.** [s.ed.], Campinas, São Paulo, [s.d.].

VALEN, G., SIRGURDARDOTTIR, O., VAAGE, J. **Systemic release of thrombomodulin, but not from the cardioplegic, reperfused heart during open heart surgery.** Thromb Res, 1996.

VIVAS, W. L. P. **Manual prático de hematologia** . [s.ed.], PROEAD-UNIT. São Paulo, 2007.

WALLACE, E. L., SURGENOR, D. M. **Collection and transfusion of blood and blood components in the United States** . [s.ed.], Transfusion, 1995.

WALLACJ, J. **Interpretation of Diagnostic Tests**. 6. ed.. [s.l.], Little, Brown, 1996.

WALTERS, N. J., BARBARA, H. E., REYNOLDS, A. P. **Laboratório Clínico** . 3. ed., Porto Alegre, Artmed. 1998.

WATKINS, W. M. **Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group systems**. New York, Ed. Advances in Human Genetics. 1980. Vol. 10.

WILLIAMS. **Hematology**. 8. ed.. [s.l.], Ed. McGraw-Hill, 2010.

YAMAMMOTO, F., et al. **Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system**. [s.ed.], [s.l.], Nature, 1990.

YOSHIDA, A., YAMAGUCHI, Y. D., DAVE, V. **Immunologic homology of human blood group glycosyltransferases and genetic background of blood group (ABO) determination**. Blood, 1979.

ZAGO, M.A., FALÇÃO, R.P., PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática** . [s.ed.], São Paulo, Atheneu. 2005.

ZAGO, M.A., et al. **Racial heterogeneity of DNA polymorphisms linked to the A and the O alleles of the ABO blood group gene.** [s.ed.], [s.l.], Ann. Hum. Genet, 1996.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

[Figura 1 - Coleta venosa com seringa](#)

[Figura 2 - Coleta venosa com canhão a vácuo](#)

[Figura 3 - Distendido sanguíneo corado com Panótico. A seta indica o sentido para leitura da lâmina em zigue-zague](#)

[Figura 4 - Distendido corado com Giemsa](#)

[Figura 5 - Erros comum na confecção do distendido sanguíneo](#)

[Figura 6 - Microhematócrito corretamente preenchido](#)

[Figura 7 - Microcentrífuga calibrada com tubos capilares](#)

[Figura 8 - Microhematócrito após centrifugação. Observa-se o plasma, coluna de hemácias e massinha.](#)

[Figura 9 - Esquema da câmara de Neubauer. Em destaque, onde realizar a contagem de eritrócitos.](#)

[Figura 10 - Eritrócitos na câmara de Neubauer](#)

[Figura 11 - Esquema da câmara de Neubauer. Em destaque, onde realizar a contagem de leucócitos](#)

[Figura 12 - Leucócitos na câmara de Neubauer](#)

[Figura 13 - Neutrófilo](#)

[Figura 14 - Eosinófilo](#)

[Figura 15 - Basófilo](#)

[Figura 16 - Linfócitos](#)

[Figura 17 - Monócitos](#)

[Figura 18 - Esquema da câmara de Neubauer. Em destaque onde realizar a contagem de plaquetas](#)

[Figura 19 - Plaquetas são pequenas estruturas arroxeadas por entre as hemácias](#)

[Figura 20 - Reticulócitos corados com corante supra-vital](#)

[Figura 21 - Reticulócitos corados com corante supra-vital e contracorado com panótico](#)

[Figura 22 - Hemácias falciformes ou drepanócitos](#)

[Figura 23 - Pipetas de Westergreen no suporte.](#)

[Figura 24 - Tubos com tipagem ABO e Rh. A falta de aglutinação nos tubos indica que a amostra é tipo "O" Rh negativo](#)

[Figura 25 - Tubos com tipagem ABO e Rh. A aglutinação em todos os tubos indica que a amostra é tipo "AB" Rh positivo.](#)

[Figura 26 - Tubo de tipagem reversa. Aglutinação em ambos os tubos indica tipo sanguíneo "O"](#)

[Figura 27 - Controle negativo e Controle positivo respectivamente](#)

[Figura 28 - Controle negativo e Controle positivo respectivamente](#)

[Figura 29 - Controle negativo e Controle positivo respectivamente](#)

ÍNDICE DE ESQUEMAS

[Esquema 1 - Esquema geral](#)

[Esquema 2 - Cascata da coagulação](#)

[Esquema 3 - Fibrinólise](#)

Esquema 4 - Atividade intrínseca e extrínseca da coagulação

Todos os esquemas
contidos nesse manual
foram feitos e adaptados
por: Camila Paoli e Milton
Rego de Paula Junior

ÍNDICE DE TABELA

[Tabela 1 - Número estimado em dias para produção de reticulócitos, segundo o hematócrito](#)

[Tabela 2 - Resultados de tipagem ABO e Rh](#)

[Tabela 3 - Resultados de tipagem reversa](#)

[Tabela 4 - Teste do D fraco](#)

[Tabela 5 - Teste da Antiglobulina Humana Direta](#)

[Tabela 6 - Teste da Antiglobulina Humana Indireta](#)

[Tabela 7 - Fatores Pró-coagulantes e Anticoagulantes](#)

[Tabela 8 - Razão Internacionalizada Normalizada*](#)