

1

HEMOGRAMA

INTRODUÇÃO E FILOSOFIA DE TRABALHO

O Hemograma é a semiologia das células do sangue. A avaliação *quantitativa* é totalmente automatizada, feita em contadores eletrônicos. Os glóbulos são contados e medidos um a um, a hemoglobina dosada por colorimetria, tudo com inacreditável exatidão; o *software*, em contínua atualização, deriva de um número cada vez mais amplo de dados que, de inicialmente experimentais, rapidamente se transformam em informações de utilidade clínica. A avaliação *qualitativa* – identificação dos subtipos celulares e das anormalidades morfológicas relevantes, especialmente da série vermelha – ainda não chega à perfeição da tecnologia numérica. Embora o advento do Sysmex CellaVision permita identificação computadorizada da morfologia microscópica dos leucócitos por comparação com um banco de dados, o olho humano ao microscópio, que criou a Hematologia e a acompanha desde o fim do século XIX, persiste necessário.

O hemograma é o exame complementar mais requerido nas consultas, fazendo parte de todas as revisões de saúde. Levantamentos feitos pelo autor em seu laboratório em 2004 evidenciaram o hemograma na lista de exames de mais de 45% dos pacientes *ambulatoriais* que coletaram sangue. Levantamento de 2014 no Laboratório Weinmann (Porto Alegre) mostrou-o ainda muito mais expressivo: 62,3% das requisições de exames dentre mais de 200 mil pacientes *ambulatoriais* continham hemograma! Essa preferência universal denota que o hemograma, além de parte integrante da triagem de saúde, é coadjuvante indispensável no diagnóstico e no controle evolutivo das doenças infecciosas, das doenças crônicas em geral, das emergências médicas, cirúrgicas e traumatológicas, e no acompanhamento de quimioterapia e radioterapia, relacionando-se com toda a Patologia.

Além disso, o **Hemograma é a Hematologia**. O autor, que durante mais de cinco décadas manteve consultório de Hematologia Clínica anexo a seu laboratório, sempre fez o hemograma contemporaneamente às consultas; com a tecnologia emergente na década de 1960 e, em poucos anos, transformada no milagre da tecnologia atual, obtém-se o resultado em minutos. Incontáveis vezes fez o diagnóstico pelo hemograma mesmo

antes de questionar e examinar o paciente. Dispondo-se dessa facilidade, uma longa elaboração diagnóstica é abortada por um relance ao monitor do contador eletrônico, complementado ou não por uns minutos de microscopia. A história e o exame físico, direcionados pela hipótese fundamentada, tornam-se rápidos e eficientes. Outros exames, se necessários, são escolhidos dentre os exatamente apropriados ao caso e geralmente feitos com o sangue já coletado; não há perda de tempo nem despesas inúteis. O paciente passa 1 hora no consultório e, já da primeira consulta, tendo gasto apenas com exames específicos para o caso, retorna para casa com diagnóstico e tratamento. Nos casos em que o hemograma mostrar evidências de uma hemopatia séria, a coleta de medula óssea para exame também pode ser feita no ato, com imediata microscopia do material aspirado; se for evidenciada infiltração leucêmica ou linfomatosa, amostras já coletadas à aspiração são enviadas a laboratórios de imunofenotipagem e/ou citogenética; casos em que a clínica e o hemograma sugerirem ser preferida a biópsia, o material é enviado a laboratório de patologia.

Se o paciente tem, confirmado por hemograma e/ou exame de medula óssea, um diagnóstico que exija tratamento por equipe multidisciplinar em hospital (p. ex., leucemia aguda), ele já sai, no ato, com pedido de internação no hospital escolhido. Se as alterações hematológicas causais da consulta se confirmarem decorrentes de doença própria de outra especialidade, o paciente recebe um laudo e é orientado a retornar ao colega que o enviou ou a procurar diretamente os especialistas apropriados.

Essa prática simplista de *hemograma no ato*, tão gratificante e econômica, é difícil de ser igualada em outras especialidades, pois em nenhuma a “biópsia” do tecido/órgão-alvo – no caso o sangue – é tão pouco invasiva e o exame tão rápido e completo.

Os contadores eletrônicos contam, medem, dosam e fornecem uma série de dados diretos e objetivos sobre as células examinadas; desses dados primários, o computador do instrumento deriva por cálculo uma nova série de valores matemáticos, estatísticos e gráficos. Os fabricantes e distribuidores das máquinas adotaram a denominação inapropriada “parâmetros” para designar cada um desses componentes, cujo conjunto é o *hemograma*. A designação consagrou-se pelo uso. O número de parâmetros fornecido é variável, dependendo da qualidade do equipamento.

O resultado completo do hemograma, com todos os dados fornecidos para apreciação pelo técnico responsável, pode ser apreciado na tela (Fig. 1.1) ou impresso (*laboratory worksheet*) pela máquina (Fig. 1.2.).

Quando os contadores eletrônicos duvidam das próprias cifras ou julgam insegura a identificação celular, emitem *flags* (avisos) pertinentes; na presença destes ou de qualquer uma dentre uma série de anormalidades previamente definidas e incluídas em um procedimento operacional padrão (POP), são indicadas revisão e microscopia complementar. A se-

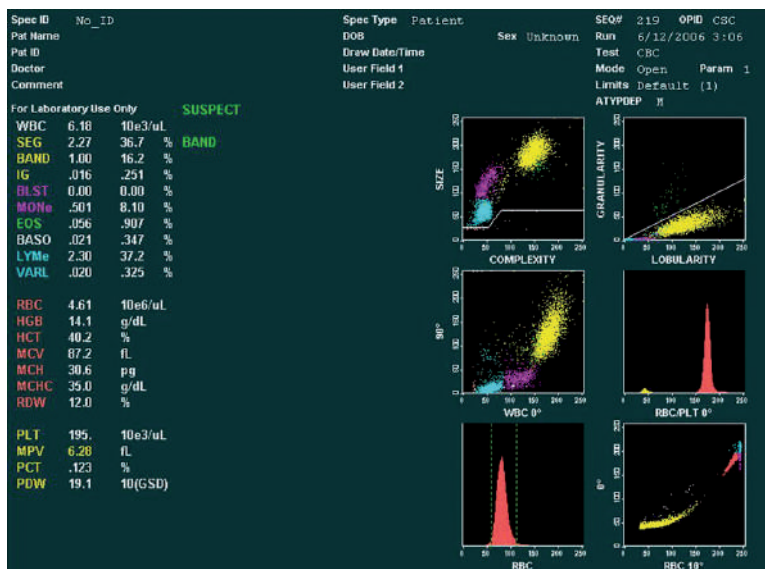


FIGURA 1.1 Resultado de hemograma na tela do Cell Dyn Ruby.

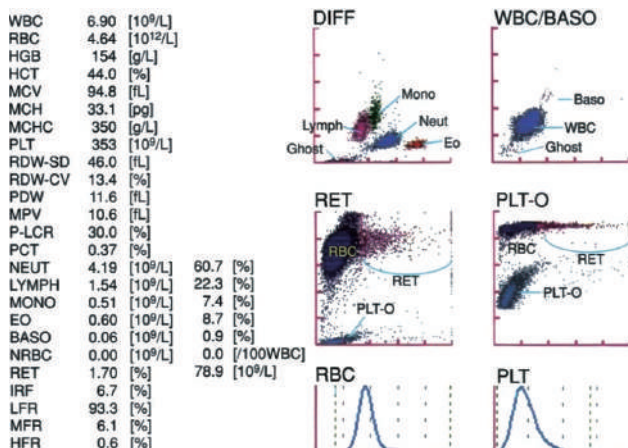


FIGURA 1.2 Resultado impresso de hemograma com reticulócitos (laboratory worksheet) fornecido pelo Sysmex XE.

guir, os resultados da máquina acrescidos das anotações da microscopia são interfaciados com o centro de processamento de dados do laboratório para emissão dos resultados.

Salvo em instituições fechadas, com médicos iniciados na tecnologia do hemograma automatizado, os laboratórios não fornecem aos pacientes e/ou médicos requisitantes os resultados originais das máquinas. As razões são várias, por exemplo:

- As abreviações e siglas, em inglês, os gráficos e *flags* – como vistos nas Figuras 1.1 e 1.2 – são ininteligíveis para os *não iniciados* nessa tecnologia. Mesmo o aprendizado da interpretação dos resultados de um tipo de máquina não implica em compreensão dos resultados de outras; são todas diferentes.
- O interfaciamento entre os contadores e os computadores do laboratório, com um *software* apropriado, permite a transmissão automática apenas dos valores numéricos consagrados pela tradição para um *layout* simples de interpretar, com a terminologia vigente em português.

A transmissão dos histogramas de volume corpuscular (RBC e PLT na Fig. 1.2), embora seja possível e até fácil com os *softwares* atuais, não tem sido assumida pelos laboratórios brasileiros, mesmo os de grande porte e amplos recursos. As valiosas curvas são sonegadas nos resultados. A única exceção conhecida pelo autor está na Figura 1.3. A explicação usual é a de que os *médicos não saberiam interpretá-los, constituindo-se, assim, em despesa inútil*.^{*} Com essa atitude, os laboratórios voluntariamente assumem a responsabilidade de ter de analisar de modo sistemático os histogramas alterados e fornecer a interpretação nos resultados com frases esclarecedoras (p. ex., “dupla população eritroide”, etc.). Lamentavelmente isso não é cumprido pela maioria, que, na verdade, nem ao menos tem técnicos suficientes com competência para fazê-lo. Não se dão con-

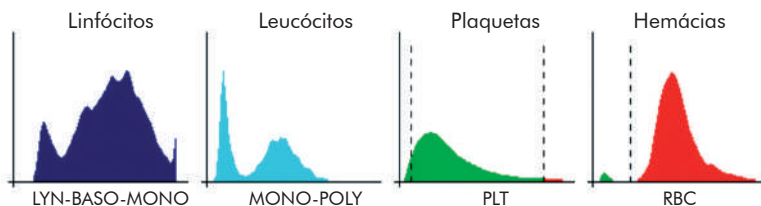


FIGURA 1.3 Histogramas fornecidos pelo Laboratório da Universidade Paranaense (UNIPAR) nos resultados de rotina de hemograma.

^{*} O presente manual dedica várias páginas ao esclarecimento e à valorização dos histogramas eritroide e plaquetário.

ta de que, fornecendo os histogramas impressos nos resultados, passam a responsabilidade de interpretação para os médicos requisitantes e ficam, ao menos legal e eticamente, liberados dessa difícil tarefa.

O *layout* mais usado e recomendado pelo autor para o resultado de hemograma está na Figura 1.4, mas ainda há significativa variação interlaboratorial nos resultados, pois o hemograma depende da qualidade do

HEMOGRAMA	
Linha e modelo do contador eletrônico usado (informar aqui ou no fim)	
ERITROGRAMA	
Eritrócitos*	milhões/ μ L
Hemoglobina	g/dL
Hematócrito	%
VCM	fL
HCM	pg
CHCM	% (ou g/dL)
RDW	%
AQUI: observações (se houver) sobre a série vermelha, interpretação do histograma (se alterado), reticulócitos % e / μ L (se foram contados)	
LEUCOGRAMA	
Leucócitos	/ μ L
Neutrófilos	% / μ L
(distinguir bastonados e segmentados, se for notado desvio à microscopia)	
Linfócitos	% / μ L
Monócitos	% / μ L
Eosinófilos	% / μ L
Basófilos	% / μ L
(mielócitos, blastos e outras, se houver)	
Com (ou sem) observação microscópica complementar (anotar a opção havida no caso)	
AQUI: observações sobre a série branca (se pertinentes)	
PLAQUETAS	
VPM	/ μ L
	fL (se o laboratório tiver comprovação da estabilidade do VPM e valores de referência próprios)
AQUI: observações sobre as plaquetas (se pertinentes)	

FIGURA 1.4 Layout recomendado pelo autor para resultado de hemograma.

* Eritrócitos, hemácias e glóbulos vermelhos são sinônimos perfeitos. É racional preferir-se *eritrócitos* pela derivação grega coerente com *leucócitos* e demais nomes de células, e pelo uso consagrado de derivados, *eritrocitose*, *eritrocitopenia*, *eritropoese* e outros, impossíveis de derivar de *hemácias*. *Glóbulo vermelho* é uma tradução popular de *eritrócito*.

equipamento, do grau de especialização do pessoal técnico, da filosofia de trabalho do laboratório e de tradições locais. Pode variar até por decisões político-econômicas, de acordo com a procedência das requisições: em uma instituição fechada (hospital), pode haver um hemograma para o corpo clínico (p. ex., apenas o laudo original da máquina eletrônica) e outro, detalhado, para pacientes e médicos de fora da instituição, com comentários, interpretação e valores de referência.

Começar o hemograma pelos valores numéricos do **eritrograma** é uma praxe generalizada. Posicionar logo a seguir os demais dados pertinentes à série vermelha parece racional ao autor: comentários sobre o histograma eritroide e a microscopia (se pertinentes), e a contagem e os índices reticulocíticos, quando feitos. Fornecer a contagem de reticulócitos em separado, como um exame distinto do hemograma (embora seja assim no Brasil, pois só é feita por pedido específico, com outro código), distancia-a do eritrograma e, às vezes, a faz passar despercebida: melhor colocá-la dentro do hemograma. Quando o histograma de volume eritroide passar a ser fornecido nos resultados, esse seria também o local apropriado; colocá-lo no final do hemograma, como na Figura 1.3, é uma alternativa aceitável.

No **leucograma**, que vem a seguir, a melhor escolha para a sequência de leucócitos na fórmula é a que corresponde à ordem fornecida pelos contadores eletrônicos, idêntica nas quatro linhas de equipamento discutidas neste manual, pois isso facilita a conferência máquina \Rightarrow resultado e evita enganos. Curiosamente, vários respeitados laboratórios brasileiros usam uma ordem própria, diferente. A seguir, devem estar os comentários pertinentes à série branca. Imprimir os histogramas de volume e/ou *scatterplots* usados pelos contadores eletrônicos na identificação dos tipos leucocitários, como se vê na Figura 1.3 (à esquerda), não tem utilidade: ao contrário do histograma eritroide, *não* são dados a serem interpretados, são apenas ferramentas de identificação usadas pelas máquinas e diferentes em cada modelo.

Encerrando vem a contagem de plaquetas, atualmente parte integrante e indissociável do hemograma. O volume plaquetário médio (VPM) e outros dados sobre plaquetas são incluídos por um número restrito de laboratórios, justificando-se nestes o termo **plaquetograma** para o conjunto. O histograma de volume plaquetário tem uma interpretação mais útil para o laboratorista responsável pelo resultado do que para o médico requisitante (isso é discutido no Cap. 18 [p. 310]); fornecê-lo é uma decisão em aberto.

Um notável progresso recentemente introduzido na apresentação de resultados é a anexação de um retrospecto dos últimos exames feitos pelo paciente; já é adotado por muitos laboratórios. O excelente **laudo evolutivo**, em forma de *tabela*, com os seis últimos resultados de he-

mograma, fornecido pelos laboratórios do Grupo Fleury em Porto Alegre, Laboratório Weinmann e Laboratório a+ (ex-Faillace), será várias vezes usado neste manual. A Figura 7.1 (p. 201) mostra um laudo no *layout* original (escaneado); os demais laudos evolutivos apresentados são transcrições idênticas, mas com as fontes gráficas usadas pela Editora. Todos estão com datas fictícias para impossibilitar identificação de pacientes.

O autor instituiu e passou a recomendar, ainda na década de 1970, uma prática que, na última década, tornou-se praticamente universal e regulamentar: cabe ao laboratório avisar por telefone (ou outro método imediato de comunicação) ao médico requisitante sempre que algum dado do hemograma demonstrar que o paciente está sob alto risco de consequências graves e imediatas: hemorragia por trombocitopenia severa, infecção por neutropenia extrema, quernícterus por hiperbilirrubinemia (recém-nascido), anticoagulação excessiva e outras. Cada laboratório atualmente define uma lista de “**Valores Críticos**” que geram gatilho para essa comunicação. Os laboratórios do Grupo Fleury,* em relação a dados relacionados à Hematologia, utilizam a pequena série a seguir:

- Leucócitos/ μL ≤ 1.000 ou ≥ 100.000
- Neutrófilos/ μL ≤ 500
- Plaquetas/ μL ≤ 10.000
- Hemoglobina (g/dL) $\leq 5,0$ ou ≥ 18
- Bilirrubina total (mg/dL) ≥ 18
- Tempo de tromboplastina parcial ativada (s) > 180
- Tempo de protrombina INR ≥ 5

O autor recomenda ainda que toda suspeita de leucemia aguda (presença de blastos, com anemia e/ou trombocitopenia), em paciente sem diagnóstico anterior, seja imediatamente comunicada; considerar a comunicação como *emergência* se a suspeita for de leucemia promielocítica ou se houver alta contagem de blastos (ver Cap. 22, p. 361). O Laboratório da Santa Casa de Porto Alegre considera valor crítico a presença de hematozoários à microscopia.

No evento frequente de o médico não ser encontrado, deve-se contatar o paciente (ou responsável) e solicitar a ele que tente comunicar-se com o médico para transmitir-lhe a necessidade desse imediato contato com o laboratório; anote-se em livro de ocorrências qualquer das duas eventualidades havidas. O autor, durante suas várias décadas de atividade no laboratório, sempre que presente assumiu essa tarefa; nos ra-

* Publicada com autorização.

ros casos considerados de emergência (supracitados) em que o médico não foi encontrado, combinou com o paciente (ou responsável) o encaminhamento a emergência de hospital capacitado a realizar atendimento de onco-hematologia. Esse recurso é inviável em laboratórios sem consultoria médica.

Para se interpretar o hemograma, há necessidade do conhecimento da tecnologia empregada, dos parâmetros fornecidos, da maneira de expressar os resultados e da correlação com a Clínica e a Patologia – *sobre isso versa o presente Manual*.

Todos os contadores atuais fazem um conjunto de determinações básicas, que inclui eritrograma completo e contagens de leucócitos e plaquetas. Os modelos de pequeno porte fazem uma fórmula leucocitária simplificada (de três tipos celulares), que deve ser completada pela microscopia. Os contadores eletrônicos de grande porte, agora de uso generalizado, fazem fórmula leucocitária completa com cinco ou seis tipos celulares e outros, apresentados como *flags*; usando-se esses contadores, convencionou-se restringir a microscopia a hemogramas alterados.

A visão abrangente de um médico hematologista, com vida profissional dividida entre a clínica e o laboratório, adiciona um toque de especialista à numerologia de alta precisão das máquinas eletrônicas: uma sequência de hemogramas transforma-se em uma poderosa lista que suscita hipóteses clínicas e complementações diagnósticas. Médicos com essa ambivalência estão se tornando raros; a pós-graduação em Hematologia não contempla a Patologia Clínica respectiva, dedicando-se quase exclusivamente à onco-hematologia hospitalar. Nos Estados Unidos e Europa, há hemopatologistas que fazem, simultaneamente, anatomia patológica e patologia clínica do sangue e dos órgãos hematopoéticos; essa especialidade até hoje não se desenvolveu no Brasil. Só laboratórios de grande porte ou de hospitais universitários ainda mantêm a consultoria interna permanente de um médico hematologista.

No laboratório, a presença desse hematologista-laboratorista em extinção gera uma **filosofia de trabalho**: o fornecimento sistemático de resultados elucidativos, não apenas de listas de números a interpretar. Hemogramas anormais só são fornecidos após elaborada tentativa de esclarecimento ou com sugestões de como esclarecê-los. Para tal fim, esse *workaholic* não se importa de ultrapassar os limites da requisição do médico e dos horários de trabalho. Na falta de dados que permitam interpretação total, telefonemas aos médicos requisitantes, para discussão, são amplamente utilizados. Telefonemas aos pacientes, entretanto, devem ser realizados com muita parcimônia e somente se o médico não for encontrado. Por exigirem diplomacia e autoridade, na opinião do autor, somente devem ser feitos pelo próprio médico hematologista; como regra, geram gratidão e confiança, mas, caso sejam malconduzidos ou en-

volverem pacientes emocionalmente instáveis, podem gerar apreensão e desconfiança.

A otimização dos serviços prestados nos termos dessa filosofia de trabalho não é subjetiva nem teórica; o autor a viu comprovada diariamente em bem mais de meio século de atividade profissional. As horas e os insumos gastos com exames feitos a mais, com repetições para confirmação, com telefonemas e informações, com discussões internas com o pessoal da hematologia não elevam o *preço cobrado* pelos exames, elevam apenas o *custo*. O ganho de qualidade é obtido a expensas da rentabilidade financeira. Gastar-se o mesmo em *marketing* ou no estabelecimento de relações participativas com médicos ou instituições talvez fosse mais lucrativo, mas, na opinião do autor, a prática não se coaduna com uma patologia clínica ética e produtiva: a rentabilidade financeira na prestação de serviços médicos não deve ser visada como um fim, mas como um efeito colateral do inevitável sucesso dessa filosofia.

Do lado do médico requisitante, por sua vez, cria-se o dever da escolha consciente do(s) laboratório(s) que indicará aos pacientes. Sabendo que a referida filosofia, sustentada por uma tecnologia de ponta, é tradicional em um laboratório e que não custa mais, é racional e ético indicá-lo, preterindo outros. Afinal, é seu dever escolher o que há de melhor para os pacientes!

A comunicação frequente, por telefone ou pela internet, gera um bom relacionamento recíproco, com compreensão e receptividade do médico aos resultados do laboratório. Resultados considerados pelo médico requisitante como duvidosos, improváveis ou incompatíveis com os previstos, serão reconferidos após diálogo telefônico com o patologista clínico, fora da presença do paciente. Correções deverão ser aceitas com tolerância pelos médicos requisitantes se decorrerem de má transcrição das cifras originais; em um laboratório, onde transitam milhões de dígitos por dia, inevitavelmente algum terá emissão errônea não notada. Repetições serão combinadas quando se concluir pela improbabilidade de resultados; todas as reconferências deverão ser gratuitas. Ampliações de requisições médicas, com acréscimo de exames não pedidos, mas percebidos necessários pelo patologista clínico, são éticas e recomendáveis, mas só poderão ser cobradas com aquiescência do médico requisitante e do paciente.

REGISTRO E PROCESSAMENTO DE DADOS

A manutenção da *qualidade total* nos laboratórios de patologia clínica exige permanente controle, do cuidado nos registros iniciais e na identificação das amostras até a conferência final e entrega dos resultados. O registro de ingresso dos pacientes deve incluir nome completo e data de nascimento, telefone para contato, médico requisitante (digitado pe-

lo número do Conselho Regional de Medicina), lista dos exames pedidos, observações ou comentários do médico (se houver) e os dados contábeis pertinentes. A identificação por código de barras é indispensável. O computador abre um registro numerado para o paciente, distribui os dados contábeis pelas contas das respectivas instituições requisitantes e mantém a lista dos demais exames pedidos acessível no sistema a todas as seções técnicas. Exames anteriores do paciente, nos últimos 3 ou 5 anos, buscados no computador pelo nome e conferindo-se a data de nascimento para evitar erros de homonímia, também devem ser mantidos acessíveis ao técnico-sênior revisor para permitirem comparações quando pertinentes.

A transferência de resultados do contador eletrônico para o sistema de processamento de dados do laboratório, que emite os laudos finais, no caso de hemogramas sem *flags* e dentro dos limites de referência arbitrados no POP para liberação sem microscopia, deve ser feita por *interfaciamento direto* entre as máquinas, sem interferência humana. Com limites precisos e sensatamente definidos para *hemogramas cujos resultados automatizados dispensem melhor esclarecimento*, esse procedimento zera os erros humanos de transcrição e impede a manipulação perigosa dos dados por pessoal menos qualificado.

No caso de hemogramas com interfaciamento direto rejeitado pela presença de *flags* ou por cifras fora dos limites arbitrados no POP, o autor sugere que o programa faça imprimir uma *laboratory worksheet* (ver Fig. 1.2) para avaliação pelo técnico-sênior responsável; uma alternativa é observá-lo diretamente na tela (ver Fig. 1.1). O técnico-sênior define a necessidade de microscopia e responsabiliza-se por todas as observações e correções complementares que lhe parecerem necessárias até o fornecimento do resultado final. Alguns laboratórios preferem incluir as correções e/ou observações *diretamente no resultado no sistema*, outros, *na cópia impressa*, com digitação para o sistema do novo resultado final. Em qualquer caso, há possibilidade de erro humano. Para minimizá-lo, o autor faz algumas sugestões:

- Quando for necessário o acréscimo de observações aos resultados, fazê-lo, sempre que possível, por meio de *códigos que gerem legendas*. Exemplos: código POLI faz imprimir “policromatose”, GTOX, “granulações tóxicas nos neutrófilos”, etc., com a respectiva semiquantificação em cruces ou adjetivos, descrita adiante neste capítulo. Isso evita erros da digitação de frases longas ou palavras complexas, como *anomalia de Pelger-Huët*. Códigos numéricos são mais fáceis de serem usados, mas também mais fáceis de serem trocados por engano.
- Incluir no programa do computador uma série de “limites aceitáveis” para cada parâmetro do hemograma. Números que extrapolarem esses limites arbitrados serão aceitos no resultado somente quando acompa-

nhados de dígitos de controle preestabelecidos, anotados pelo técnico-sênior responsável. Ou seja, a introdução do dígito de controle comprova que o técnico viu a anormalidade, fez a(s) pesquisa(s) necessária(s) regida(s) pelo POP respectivo para essa anormalidade e liberou-a por julgá-la condizente com o caso; na falta do dígito, o programa rejeita o resultado. Exemplos: um VCM maior do que 110 fL exige que o técnico percorra a lâmina ao microscópio procurando outros dados esclarecedores das anemias macrocíticas (ver p. 201); feito isso, libera o resultado com um dígito de controle significando *macrocitose*; um RDW acima de 16 exige que o técnico analise o histograma de volume eritroide para avaliar a população; a introdução do dígito de controle significando *anisocitose* libera o resultado.

- Delimitar extremos para o possível de cada parâmetro e de suas correlações numéricas. Exemplos: o resultado absurdo causado pela presença de crioaglutininas, como o da Figura 5.4 (p. 146), não será aceito pelo sistema nem que o técnico deseje fornecê-lo. Um $Hct = 24\%$ é incompatível com uma $Hgb = 14,0 \text{ g/dL}$; a rejeição é automática e irreversível. Se Hct, HCM, concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) não corresponderem às respectivas fórmulas de cálculo, incluídas no sistema, igualmente não serão aceitos ou serão automaticamente recalculados pelo sistema.
- Digitação de resultados feita em duplicata é um método de segurança ainda usado por alguns laboratórios. É insatisfatório: erros feitos pelo técnico *no boletim original* serão digitados igualmente nas duas versões. Salvaguardas *incluídas no sistema* são sempre mais fáceis e seguras, portanto preferíveis a controles por tarefa humana.

COLETA DE MATERIAL*

A passagem do repouso noturno, na posição horizontal, à posição vertical e à deambulação diurna causa acúmulo gravitacional e transudação plasmática nos membros inferiores: há um aumento das cifras eritroides do amanhecer ao entardecer da ordem de 2 a 3%, que pode chegar a 5 a 8% em obesos e cardiopatas. O leucograma também varia: há uma elevação circadiana da manhã para a tarde na contagem de leucócitos por aumento de neutrófilos. As diferenças citadas, entretanto, não costumam ser clinicamente relevantes, de modo que a coleta de sangue para hemograma pode ser feita a qualquer hora. Evite-se apenas coletá-lo *após exer-*

* Há um livro com recomendações da SBPC/ML: Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Coleta e preparo da amostra biológica. Barueri: Manole; 2014 [capturado em 23 de jan 2015]. Disponível em: www.sbpc.org.br/upload/conteudo/livro_coleta_biologica2013.pdf.

cício físico, pois causa considerável neutrofilia, e nas 2 horas que sucedem refeição lauta ou rica em gordura. Neutropenia em hemograma coletado de manhã cedo, em condições basais, exige confirmação com coleta no fim da manhã ou na segunda metade da tarde. Poliglobulia em hemograma coletado no fim do dia exige confirmação em coleta de manhã cedo.

Para hemograma, usa-se sangue coletado de veia superficial da dobra do cotovelo, com agulha de calibre compatível com o volume a coletar. A indústria nacional anota o calibre (\emptyset) e o comprimento em milímetros (mm). Como há material importado, também se costuma anotá-los em unidades anglo-americanas: calibre em unidade fracionária historicamente usada na medida de fios (*gauge* = g) e comprimento em polegadas; há ainda, um código de cor. O autor recomenda a seguinte escolha de calibres:

- $\emptyset = 0,6$ mm (23 g), cor azul-clara, para coletas de até 2 mL (berçário e veias afetadas por quimioterapia). Geralmente é substituída por escalpe* de calibre similar. Escalpes de pequeno calibre, mais delicados do que agulhas, têm sido preferidos sistematicamente para coletas de veias muito finas, principalmente em berçário.
- $\emptyset = 0,7$ mm (22 g), cor preta, para coletas de até 5 mL (dorso da mão e pulso, pediatria).
- $\emptyset = 0,8$ mm (21 g), cor verde, é o usual para coletas de até 20 mL. Para 20 mL completos ou pouco mais, melhor usar $\emptyset = 0,9$ mm (20 g).

A jugular externa é segura e útil para lactentes (Fig. 1.5 [a]) e pacientes com veias difíceis ou esclerosadas. Causa má impressão nos pais, circundantes e/ou no próprio paciente: o autor usou-a amplamente por



a)



b)

FIGURA 1.5 Coleta da jugular externa em lactente (a). Pressão adequada, com o polegar, após punção venosa (b).

* Neologismo quanto ao significado, ainda fora dos dicionários, que está substituindo o termo importado *butterfly*.

ter “autoridade” para sugeri-la, mas reconhece a dificuldade de aceitação. O risco de punção arterial ou de veia profunda é dificilmente justificável para exames rotineiros de patologia clínica. Só se faz hemograma de sangue capilar em unidades de oncopediatria, com coletadores e tecnologia especializados.

A dor da picada da agulha diminui com o aumento do ângulo de penetração, mas o risco de ultrapassar a veia aumenta na mesma proporção. Reação vasovagal à coleta de sangue é infrequente, mas ocorre. O coletador deve estar atento; se notar palidez ou o paciente queixar-se de tontura, deve imediatamente fazer com que se deite. A reação é fugaz e inócua; o risco é a queda. Contenção do paciente só se faz com autorização do responsável, sendo, assim, só aplicável a crianças ou pessoas mentalmente inválidas; pacientes anestesiados ou comatosos fazem exceção óbvia.

Como o coletador trabalha só e tem as mãos ocupadas, cabe ao próprio paciente ou a um acompanhante comprimir o local da punção para o estancamento após a coleta. A melhor maneira é segurando o braço e pressionando o local com o polegar; nas salas de coleta do laboratório do autor havia um pôster, reproduzido na Figura 1.5 (b), mostrando a maneira correta de pressionar. Mesmo instados com insistência, geralmente não o fazem com a pressão e o tempo adequados. A consequência é um hematoma local, pois o adesivo sem firme compressão prévia por 3 a 4 minutos é ineficaz para evitá-lo.

O sangue é recebido em tubos industrializados contendo 1 a 2 mg de EDTA sódico ou potássico liofilizado por mL de sangue a coletar; apesar de muito discutida, o autor considera irrelevante a escolha do cátion. O volume de sangue recomendado para o tubo deve ser respeitado; se a desproporção sangue/EDTA for muito grande, causará erro pré-analítico no VCM e parâmetros derivados. Se houver preferência – não recomendada – por tubo contendo EDTA em solução, a gota deve ser insignificante para não diluir significativamente o sangue coletado (ver erros pré-analíticos, p. 60). Material insuficiente exige nova coleta. Como há tubos pediátricos para hemograma, com minidose de EDTA liofilizado compatível com a coleta de 1 mL de sangue, convém tê-los à mão para uma eventual coleta escassa. Coleta lenta e difícil, por falta de fluxo na veia puncionada, favorece a agregação plaquetária e a coagulação: nunca aceitá-la! É necessário trocar o material e puncionar outro local. A heparina não se presta como anticoagulante para leucograma e contagem de plaquetas – destrói os leucócitos e causa uma coloração de fundo violeta nas lâminas –, mas é tolerável para o eritrograma, desde que em mínima quantidade para evitar diluição. A diferença entre o hemograma do sangue de veias e de artérias periféricas é insignificante; o eritrograma pode ser feito com o sangue coletado para gasometria arterial nas seringas industrializadas próprias com heparina liofilizada.

A coleta de sangue de cateteres profundos é necessária em muitos pacientes, especialmente nos que estão recebendo quimioterapia. Necessária, mas tecnicamente indesejável. É preciso aspirar inicialmente um volume significativo de sangue e despezá-lo, porque estava em estase e com heparina no cateter. Com esse cuidado, o sangue obtido é satisfatório para eritrograma e leucograma; a contagem de plaquetas, entretanto, sempre será insegura pela perda inevitável no trajeto. Em pacientes internados, é recomendável que a coleta seja feita por pessoal próprio da unidade, e o material, entregue no laboratório. A coleta no recém-nascido é discutida no Capítulo 19.

A coleta com seringas e agulhas descartáveis é mais fácil para o coletador e causa menos hematomas nos pacientes do que a coleta com tubos a vácuo e agulhas bipolares, mas implica maior risco de ferimento accidental com a agulha; atualmente as agulhas de boa qualidade têm um protetor plástico que, baixado ao fim da coleta, diminui esse risco. O uso de agulhas bipolares e aspiração direta nos tubos a vácuo aceleram a mistura do sangue com o anticoagulante, o que é vantajoso. O uso de luvas de borracha e a troca a cada paciente são exigências atuais, mas é certo que o prejuízo ao tato interfere no trabalho, a troca contínua irrita a pele e pode causar dermatite alérgica nos coletadores e – o principal – não os protege contra o risco de ferimento, pois não resistem à ponta da agulha. O autor considera a norma um exagero, e a troca a cada paciente é um espantoso e inútil desperdício; crê, até, que foi estabelecida por pressão da respectiva indústria. O uso de luvas é regulamentar e obrigatório para todo o pessoal que manipula materiais biológicos nas seções técnicas do laboratório.

Mesmo com pessoal de coleta capacitado e experiente, a coagulação incipiente ou total de uma amostra de sangue a cada 800 a 1.000 costuma ocorrer nos laboratórios, tornando-se necessária nova coleta.

A distensão* de lâminas com gotas de *sangue nativo*, da ponta da agulha, era recomendada por alguns patologistas clínicos para que as células sempre fossem vistas ao microscópio sem alterações causadas pelo anticoagulante. O risco de trocas, o atraso na sequência da coleta, o desvio da atenção dos coletadores do paciente para esse trabalho, o aumento do risco de acidentes e a lenta secagem das lâminas pela dificuldade de se usar um secador na sala de coleta fazem preferir-se, hoje, a distensão de lâminas a partir do sangue já anticoagulado. Deve ser feita, sempre que possível, antes de 4 horas da coleta, no máximo em 6; se o transporte do

* “Distensão” é o termo apropriado para lâminas de sangue feitas com a técnica usual; reserve-se “esfregaço” para lâminas de Bacteriologia e outras, feitas com alça de platina ou *swab*.

ponto de coleta para um laboratório central demandar maior prazo, torna-se necessário distendê-las na origem.

Amostras de sangue enviadas devem ser transportadas a $\cong 5^{\circ}\text{C}$ e com um mínimo de agitação. Lâminas já distendidas não devem ficar no ambiente refrigerado junto com as amostras, pois podem hemolisar pela umidade. Deve-se embrulhá-las separadamente e transportá-las, evitando exposição a temperaturas $> 36^{\circ}\text{C}$. O sangue transportado deve ter recepção preferencial no laboratório de destino de modo a passar imediatamente à seção técnica para processamento; esta importante recomendação não costuma ser respeitada.

CONTADORES ELETRÔNICOS

A contagem eletrônica começou com a patente, por Wallace Coulter, na década de 1950, de um dispositivo capaz de contar e medir os pulsos de condutividade (*impedância*) causados pela passagem de partículas suspensas em líquido através de um orifício pelo qual flui uma corrente elétrica. O método mostrou-se adequado à finalidade a que se propunha: contagem, ulteriormente medida, dos glóbulos sanguíneos. O contador primitivo (Fig. 1.6 [a]) tinha uma haste oca, com o interior comunicando-se com o exterior por um orifício de pequeno diâmetro, com um eletrodo metálico interno e outro externo, e uma fonte geradora de corrente contínua. Uma bomba pneumática aspirava o sangue, apropriadamente diluído em solução eletrolítica, de fora para dentro pelo estreito orifício, até um volume exato predeterminado. Ao cruzarem individualmente o orifício, os glóbulos, pela menor condutividade, desencadeavam pulsos de impedância, sentidos pelo galvanômetro do instrumento. Os pulsos eram contados, posteriormente passaram também a ser medidos, e a calculadora, levando em conta a diluição e o volume aspirado, convertia o resultado em número de glóbulos por μL de sangue, depois o volume individual das partículas e a média deste.



a)



b)

FIGURA 1.6 Modelo primitivo da Coulter (a) e Coulter T890 (b); ambos usados no passado no laboratório do autor.

Os instrumentos primitivos, que exigiam um diluidor manual externo para as amostras de sangue a examinar e um espectrofotômetro para a hemoglobina, evoluíram nos anos 1960 e começo dos anos 1970 para instrumentos capazes de aspirar o sangue, distribuí-lo em alíquotas apropriadamente diluídas para canais separados, um para contar e medir plaquetas e eritrócitos, outro para contar e medir leucócitos e dosar hemoglobina por espectrofotometria, após hemólise pelo líquido diluidor. Aperfeiçoados na mecânica, na eletrônica e, principalmente, no *software* do computador de apoio, os *contadores eletrônicos por impedância*, isto é, com tecnologia baseada no *princípio Coulter*, tornaram-se reprodutíveis e seguros, fornecendo cifras hematimétricas fidedignas. O Coulter T890 (Fig. 1.6 [b]) foi um marco na evolução técnica – e na Hematologia –, e há modelos funcionando até hoje. Evoluiu para modelos mais compactos, ainda fabricados e utilizados, com a designação usual de *contadores eletrônicos de pequeno porte*.

No fim dos anos 1970, a tecnologia de impedância foi acrescida de *citometria em fluxo*, maravilha tecnológica com inúmeras perspectivas e variantes para identificação celular, dando origem aos atuais *contadores eletrônicos de grande porte*. As novas máquinas são capazes de fornecer a multiplicidade de parâmetros do hemograma atual e são utilizadas na generalidade dos grandes laboratórios. A mecânica dos instrumentos, nos anos 1980, foi automatizada pela técnica de perfuração sequencial, com uma agulha aspiradora (*probe*), da tampa dos frascos de sangue, dispostos em raques móveis e identificados por código de barras. Essa automação elimina o risco da manipulação do sangue pelos operadores e diminui a perspectiva de troca de material por erro humano. No fim dos anos 1990, foram criados *sistemas robotizados*, com a anexação aos modelos *top of line* de algumas linhas de equipamento automático capaz de distender e corar lâminas eletivamente, sob comando de critérios incluídos no *software* de uma *central inteligente*. Essa melhoria torna o equipamento bem mais caro, mesmo deduzindo-se a economia de mão de obra; ainda está restrita a laboratórios de grande porte, mas o uso está se generalizando. A robotização acrescenta rapidez e certo aumento de segurança contra erro humano ao procedimento, mas não interfere na *qualidade* do produto final: o resultado do hemograma. O hemograma feito em contadores de pequeno porte será brevemente discutido a seguir, mas é o *hemograma feito em contadores de grande porte* que terá resultados transcritos, debatidos e interpretados neste livro.

Hemograma em contadores eletrônicos de pequeno porte

Vários fabricantes fornecem aparelhos de pequeno porte e de baixo custo de aquisição, manutenção e insumos, com tecnologia restrita à contagem e medida de pulsos de impedância (*princípio Coulter*). Fazem as conta-

gens de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, dosam hemoglobina e calculam os parâmetros derivados; fornecem uma fórmula leucocitária por volumetria, distinguindo três tipos celulares: pequenas (linfócitos), médias (monócitos) e grandes (granulócitos).

No Brasil, ainda são usados em laboratórios com até 50 hemogramas por dia. São muito apropriados para a triagem de doadores em serviços de hemoterapia. Nos Estados Unidos e Europa, são usados em emergências de pequenos hospitais, policlínicas, ambulatorios e até em consultórios médicos. Como não performam automaticamente uma fórmula leucocitária com todos os elementos, se o laboratório tiver que fornecer um resultado completo de hemograma, precisa completá-lo com uma fórmula feita ao microscópio (fórmula visual, ou “manual”).

Nesses contadores, o resultado fornecido é uno e indivisível. Pedidos parcelados de leucograma, hematócrito ou contagem de leucócitos pertencem a uma tecnologia extinta. Há uma exceção aceitável. Havendo interesse só na série vermelha – como na seleção de doadores em banco de sangue, em exames periódicos da gravidez ou de pacientes renais crônicos em diálise – e sabendo-se que o laboratório do serviço (ou contratado) trabalha com um desses modelos de pequeno porte, isto é, *sem fórmula leucocitária automatizada*, justifica-se o pedido isolado de *eritrograma*. Nessa eventualidade, o laboratorista economiza o trabalho de distender lâmina e fazer a tediosa fórmula ao microscópio, fornecendo só o eritrograma desejado e as demais contagens, com economia de custo ou preço. Também não tem sentido o pedido isolado de contagem de plaquetas, pois a máquina não se presta a fazê-la sem as demais contagens; a contagem de plaquetas é sempre parte do conjunto.

A simplicidade e o baixo preço do equipamento não desvirtuam a qualidade; os dados hematimétricos dos modelos mostrados na Figura 1.7 são confiáveis. Faz exceção a contagem de plaquetas em casos de trombocitopenia acentuada e/ou de plaquetas de dimensões fora do normal, pois falta aos instrumentos uma contagem alternativa por canal óptico.

Os parâmetros fornecidos são em menor número, mas essencialmente idênticos aos das grandes máquinas.

FIGURA 1.7 Contadores de pequeno porte: Cell Dyn Emerald (a) e Sysmex XP 300 (b).



Hemograma em contadores eletrônicos de grande porte

Os contadores eletrônicos de grande porte atuais, capazes de fazer todas as determinações do hemograma, são variados, de múltiplas procedências e com extensa gama tecnológica. O autor teve ampla experiência em seu laboratório com instrumentos Coulter (modelos antigos), Cell Dyn (Abbott) e Sysmex (Roche); atualmente tem acesso a instrumentos Advia (Siemens) e Sysmex no Laboratório da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. São as quatro linhas de instrumentos de maior expressão internacional; as empresas fabricantes e/ou distribuidoras locais oferecem contratos de *leasing* e comodato, que incluem o fornecimento de insumos e assistência técnica, com *pagamento por exame*, com um número mínimo preestabelecido e preços variando favoravelmente de acordo com o número mensal combinado.

Segue uma lista simplificada, mas abrangente, da tecnologia dessas quatro linhas de instrumentos:

1. Medida e contagem dos pulsos de impedância, causados pelos glóbulos, ao cruzarem um orifício pelo qual flui uma corrente contínua (princípio Coulter): contagem e medida do volume de eritrócitos e plaquetas em todos os instrumentos, contagem de leucócitos na maioria deles.
2. Medida da condutividade elétrica dos glóbulos, em radiofrequência, no orifício de impedância: sensível à estrutura interna das células, usada para diferenciação dos tipos de leucócitos na fórmula das linhas Beckman Coulter e Sysmex.
3. Análise, em vários ângulos, da dispersão e difração da luz (foco luminoso de tungstênio ou *laser*) focalizada nos glóbulos em citometria em fluxo: identificação (em alguns, contagem) dos tipos celulares em todas as linhas de instrumentos.
4. Dispersão e absorvância da luz (*laser*) após reação da mieloperoxidase: identificação dos granulócitos (peroxidase +) na linha Advia.
5. Idem, após efeito lítico preferencial do solvente sobre o citoplasma dos leucócitos: identificação dos basófilos, resistentes à lise, em várias linhas de instrumentos; identificação de células imaturas (resistentes por falta de lipídeos na membrana) na linha Sysmex.
6. Idem, após coloração supravital do ácido ribonucleico (RNA): identificação dos reticulócitos na linha Beckman Coulter.
7. Dispersão de luz polarizada: identificação dos eosinófilos pelo efeito despolarizante, em várias linhas de instrumentos.
8. Avaliação da fluorescência após marcação do RNA citoplasmático com derivados da fluoresceína: identificação dos reticulócitos nas linhas Cell Dyn, Sysmex e Advia.

9. Avaliação da fluorescência do DNA nuclear após marcação com iodeto de propídio: identificação de leucócitos inviáveis (membrana permeável ao marcador) e eritroblastos na linha Cell Dyn.
10. Avaliação da fluorescência em leucócitos após permeabilização da membrana por solvente e marcação com um corante fluorescente de polimetina: identificação dos leucócitos e de plaquetas reticuladas na linha Sysmex.
11. Avaliação da fluorescência após marcação das células com anticorpos monoclonais fluorescentes (imunofenotipagem limitada), feita com *software* especial por alguns modelos *top of line*: contagem de plaquetas (com anti-CD61) e de linfócitos CD3, CD4 e CD8 na linha Cell Dyn. Outras aplicações ainda em estágio experimental.
12. Espectrofotometria: é usada de modo universal para a dosagem de hemoglobina; as diversas linhas de instrumentos diferem quanto à conversão da Hgb antes da colorimetria: cianometemoglobina (Beckman Coulter), hemoglobina-laurilsulfato de sódio (Advia e Sysmex), metemoglobina-imidazol (Cell Dyn).

Todos as linhas de contadores utilizam-se do princípio Coulter (item 1, anterior) como método básico das contagens; eritrócitos e plaquetas, distinguidos por limiares de volume, geralmente compartilham um mesmo canal de impedância. Da mesma forma, o hemolisado destinado à dosagem espectrofotométrica da hemoglobina (item 12, anterior) também é usado para a contagem de leucócitos. As linhas Coulter e Sysmex usam o trajeto de impedância para a medida de condutividade dos leucócitos (item 2, anterior).

Os demais princípios para identificação celular (itens 3 a 11, anterior) dependem da técnica de citometria em fluxo (*flow cytometry*); os glóbulos são direcionados para uma tubuladura delgada onde fluem um atrás do outro, envoltos em uma bainha de solvente e focados por técnica hidrodinâmica. Ao entrarem nos múltiplos canais do sistema, alíquotas são diluídas, e os glóbulos são suspensos em uma variedade de fluidos, com características específicas de tonicidade, de atividade como solvente, com ou sem corantes, sejam de impregnação, enzimáticos ou imunológicos, alguns fluorescentes. Finalmente passam por um ponto do trajeto (*flow cell*) onde são contados e submetidos aos diversos processos de identificação.

Na *flow cell*, os glóbulos em coluna são alvejados individualmente por raios luminosos em diversos ângulos para analisar a difração da luz e por *lasers* para excitar fluorescência nos que tomaram os corantes marcados com fluoresceínas. Múltiplos fotodetectores recebem a luz difrata-

da, outros identificam e medem a fluorescência em um ou vários comprimentos de onda (cores). A energia é convertida em pulsos elétricos que são digitalizados e enviados ao computador. O *software* recebe as informações dessas dezenas de milhares de células que passam pelo trajeto em segundos e distribui a imensa quantidade de dados em *clusters* de identificação predeterminados, permitindo uma avaliação qualitativa e quantitativa integral das populações em teste. O termo “fantástico” é extrapolado por essa tecnologia.

Os instrumentos das quatro linhas discutidas fornecem, de modo idêntico, embora por tecnologia variada, contagens e volumetria de eritrócitos e plaquetas, contagem e fórmula diferencial de leucócitos, dosagem de hemoglobina, índices hematimétricos, histogramas do volume corpuscular (eritroide e plaquetário), *scatterplots* leucocitários usados para a diferenciação celular, *flags* e comentários codificados ou escritos sobre anormalidades.

A tecnologia empregada é descrita no texto correspondente a cada linha de instrumentos, junto com inovações, características e parâmetros especiais que oferece.

Para uma discussão técnica detalhada, o leitor deve consultar na internet os *sites* das empresas fabricantes; manuais de instrução de cada instrumento podem ser obtidos com os distribuidores locais.

Linha Beckman Coulter (Coulter® LH750)

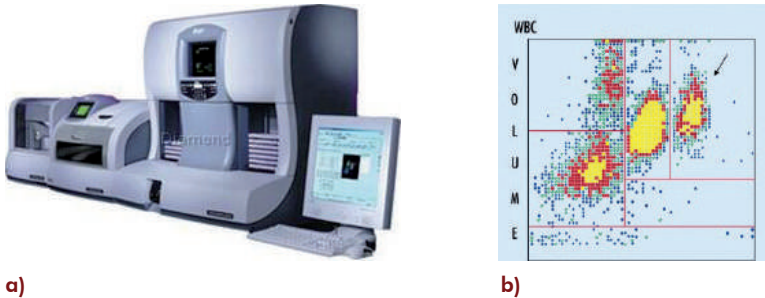
O mais avançado e recente modelo (*top of line*) da série, o Coulter® LH750, visto na Figura 1.8 (a), pode ser fornecido anexado a equipamento capaz de distender e corar lâminas (*slide maker*) em obediência a critérios inseridos no banco de dados.

No eritrograma, por impedância, destaca-se a alta qualidade do histograma, alongado na abscissa, baixo na ordenada e com traçado firme, porque o *software* edita pulsos aberrantes; além disso, anota na abscissa o valor em 50 e 100 fL. Na opinião do autor é mais fácil de se interpretar do que os histogramas das demais linhas e, por isso, é várias vezes mostrado neste manual.

O leucograma é feito com a tecnologia que a Coulter denomina “VCS”:

- Volume (medido por impedância);
- Condutividade (em frequência de ondas de rádio);
- *Laser Scatter*.

A figura plana do *scatterplot* do leucograma na Figura 1.8 (b) é o plano frontal de uma imagem tridimensional, um cubo, elaborada pe-



a) **FIGURA 1.8** Coulter® LH750 com slide maker **(a)**. Scatterplot de leucócitos com tecnologia VCS **(b)**.

lo computador do aparelho, com as medidas VCS distribuídas pelas três arestas que partem da origem. Os resultados obtidos para cada célula são plotados e geram conglomerados espaciais, que a máquina separa por planos móveis, vistos em frontal como linhas. Há um conglomerado de linfócitos (LY), de neutrófilos (NE), de monócitos (MO) e de eosinófilos (EO); os basófilos (BA), atrás dos linfócitos, só são vistos em outra incidência. No *display* do instrumento, o *scatterplot* é colorido com um código de cores correspondente ao número de eventos em cada ponto. São listadas as porcentagens de cada tipo celular (fórmula relativa), bem como sua conversão em números por μL (fórmula absoluta).

Há *flags* na série leucocitária para desvio à esquerda e granulócitos imaturos, linfócitos atípicos e blastos, e um mais amplo *slide review*; na plaquetária, há *flags* para excesso de pulsos junto aos extremos do intervalo volumétrico e presença de agregados. A máquina fornece uma interpretação de fábrica, que imprime *macrocitose* ou *microcitose*, *hipo* ou *hipercromia*, etc., de acordo com os limites de referência que atribui às cifras; identifica e aponta até *população eritrocitária dimórfica* (que o autor neste Manual denomina *dupla população*) pela análise do histograma.

A contagem de de reticulócitos e os índices reticulocíticos podem ser obtidos opcionalmente em canal próprio, pela coloração com novo-azul-de-metileno.

Nos últimos anos, a linha Beckman-Coulter perdeu sua posição de liderança no Brasil; o autor crê que há, ou houve, desinteresse pela ampliação ou mesmo manutenção do mercado local.

Linha Abbott (Cell Dyn Ruby e Cell Dyn Sapphire)

A linha, cujos principais modelos estão na Figura 1.9, tem as seguintes características, algumas inovadoras:



FIGURA 1.9 Cell Dyn Ruby (a), Cell Dyn Sapphire (b) e slide maker SMS (c).

- Óptica com *laser* de argônio, com potência capaz de excitar fluorescência nas células marcadas com iodeto de propídio para o DNA e com uma fluoresceína própria (CD4K530®) para o RNA, o que permite identificar a fração de leucócitos inviáveis, os eritroblastos, e fazer a contagem de reticulócitos.
- Leitura simultânea de todos os dados na *flow cell*, com *laser scatter* em quatro ângulos e fluorescência. Impedância aperfeiçoada por fluxo forçado. A esferação dos eritrócitos e a leitura em múltiplos ângulos no canal de reticulócitos do modelo Sapphire permite (desde 2010) uma medida da concentração hemoglobínica dos eritrócitos e reticulócitos e o fornecimento de índices estatísticos similares aos do volume corpuscular.
- Contagem de leucócitos reprodutível até 250.000/ μL .
- Contagem de plaquetas por dupla tecnologia, automaticamente estendida em casos com trombocitopenia; mantém satisfatória precisão entre 5.000 e 2 milhões/ μL . Há, ainda, uma contagem imunofenotípica opcional no Sapphire, com marcação fluorescente do CD61, considerada como método de referência para contagem de plaquetas.
- A mesma coloração imunofluorescente permite, no modelo Sapphire, de modo opcional, a contagem de linfócitos CD3, CD4 e CD8.

O modelo Ruby é o mais aceito no Brasil; o modelo Sapphire, embora de grande qualidade, é pouco difundido pelo preço elevado.

Linha Advia Siemens

Desde os primeiros modelos nos anos 1970, essa linha de contadores eletrônicos, originalmente japonesa, utiliza duas técnicas únicas na época:

- Coloração citoquímica de mieloperoxidase para identificação de granulócitos no leucograma; o canal de peroxidase é eficaz na diferenciação e permite o diagnóstico imediato da deficiência genética, não rara, de mieloperoxidase.

- A contagem e a medida de eritrócitos (após esferação isovolumétrica) e de plaquetas é feita por *laser scatter* em dois ângulos; o índice de refração correlaciona-se com a densidade celular e permite a determinação da concentração *hemoglobínica individual* dos eritrócitos. A máquina fornece rotineiramente no hemograma a média (*CHCM = cell hemoglobin concentration mean*) e uma curva de frequência dos valores individuais, quantificando hipocromia e hiperocromia com números estatísticos, em tudo semelhante ao que é feito com o volume corpuscular. A atual Advia Siemens, cujo modelo mais recente está na Figura 1.10, foi pioneira nessa tecnologia que recebeu liberação para uso clínico pela *Food and Drug Administration (FDA)* em 1997. A técnica é extensiva ao canal de reticulócitos; a coloração é feita com oxazina 750.

O preço e a dificuldade de manutenção da linha Advia no Brasil tornam-na atualmente menos competitiva do que a Sysmex.

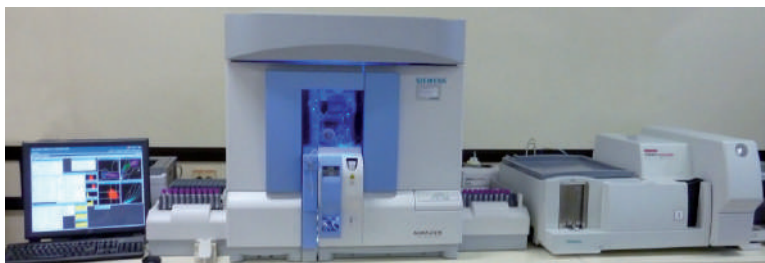


FIGURA 1.10 Contador Advia Siemens 2021i acoplado a *slide maker*. (Cortesia do Laboratório da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.)

Linha Sysmex Roche (Sysmex XE 5000 e XN 3000)

A tecnologia de impedância com corrente elétrica de dupla frequência assemelha-se à da linha Coulter. O sistema é alinhado em foco hidrodinâmico, com bainha de solvente, impedindo falsos pulsos. Os leucócitos são contados no sistema de impedância e, novamente, na citometria em fluxo (Fig. 1.12 [a]). A identificação é feita por *light scatter* frontal (mede o tamanho) e lateral (avalia a complexidade interna, principalmente as características nucleares). A fluorescência para o conteúdo de RNA/DNA é avaliada em fotodetector lateral.

O canal de reticulócitos, corados com polimetina, tem um *software* que permite uma avaliação do volume e conteúdo hemoglobínico des-

te, em contraposição ao dos eritrócitos em conjunto. Pode fornecer, também, uma contagem de *plaquetas reticuladas* (ver Cap. 18, p. 310). O *slide maker* SP 1000 distende lâminas de excelente qualidade, apropriadas para o Cella Vision (Fig. 1.11 [b]).

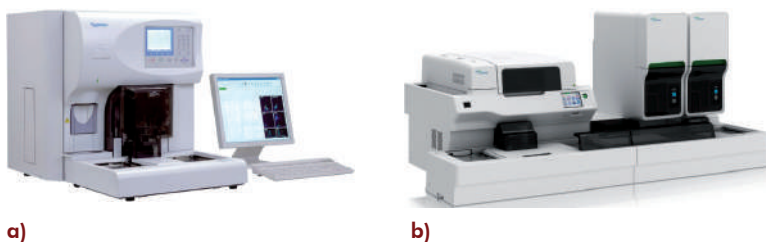


FIGURA 1.11 Sysmex XE 5000 (a); Sysmex XN 3000: duas unidades 1000 acopladas a *slide maker* SP 1000 (b).

Vantagem na competição pelo quociente qualidade/preço torna a linha de contadores Sysmex a mais difundida no Brasil.

MICROSCOPIA

Apesar do notável progresso em simplicidade e qualidade aportado pelos contadores eletrônicos à Hematologia, a observação ao microscópio persiste insubstituível em casos particulares. Até nesta, entretanto, a mecânica, a óptica e a informática associaram-se para facilitar e qualificar a tecnologia: veja-se o Sysmex Cella Vision na Figura 1.12 (b).

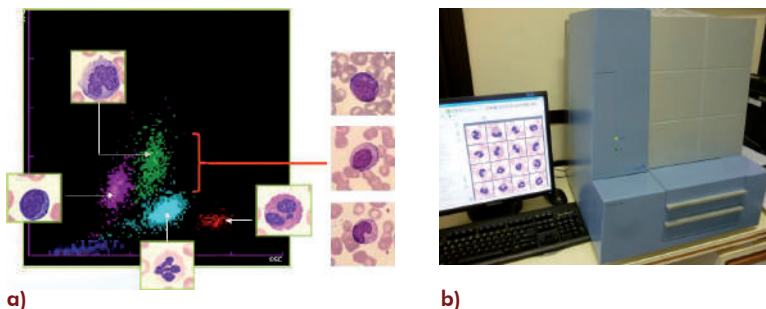


FIGURA 1.12 Scatterplot de identificação dos leucócitos com código de cor (imagem didática, cortesia Sysmex) (a); Sysmex Cella Vision (b).

Sysmex Cella Vision

É um sistema composto por um microscópio de alta qualidade, com movimentação mecânica, acoplado a um computador, com a finalidade de substituir a microscopia convencional na execução da fórmula leucocitária. O instrumento busca os leucócitos um a um na distensão sanguínea, digitaliza e transporta as imagens microscópicas ao sistema, que os identifica pela comparação com um banco de dados e fornece uma fórmula leucocitária “visual automatizada”. Todos os leucócitos examinados podem ser vistos na tela pelo técnico responsável, que pode até estar numa central técnica a distância (pela internet); o técnico modifica as identificações a seu critério, com a vantagem de observar com notável amplificação e clareza as imagens na tela. A presente edição deste manual foi profusamente ilustrada com imagens do Cella Vision.* Uma vez revisada, a fórmula é liberada por interfaciamento direto com o sistema de processamento de dados do laboratório. A leitura do código de barras das lâminas permite ao computador do Cella Vision acesso aos resultados do contador eletrônico onde originalmente foram examinadas as amostras, de modo que o instrumento, com a contagem de leucócitos de cada caso, fornece fórmula percentual e absoluta e insere-as no resultado; se houver modificações decididas pelo técnico, estas são inseridas no sistema e o instrumento recalcula a fórmula apropriadamente.

Note-se que, havendo uma fórmula feita *no contador eletrônico* com exame por citometria em fluxo de vários milhares de leucócitos, os números desta serão muito mais fidedignos do que os da fórmula do Cella Vision; este faz uma microscopia de luxo, mas de apenas uma centena de células – como a da microscopia convencional –, com sua enorme e indesejável variabilidade estatística. Se o contador eletrônico negar a fórmula pela presença de células não identificadas, use-se a da microscopia; se o contador fornecer uma fórmula com todos os números, mas com *flags*, use-se a microscopia (Cella Vision ou convencional) para a identificação celular precisa, mas prefiram-se sempre os dados numéricos da fórmula do contador eletrônico.

A observação da série vermelha no Cella Vision é insatisfatória; a microscopia convencional é superior. A contagem visual de plaquetas por campo, em comparação com o número de eritrócitos automaticamente fornecido pela máquina é uma versão atualizada e muito melhorada do método de Fônio, usado no século XX antes da automação. É excelente para confirmação visual de contagens eletrônicas que suscitem dúvidas.

* Cortesia Sysmex/Laborsys, Laboratório da Santa Casa de Misericórdia (Porto Alegre) e Laboratório Fleury (São Paulo).

O Cella Vision, apesar de dispendioso, tem tido progressiva aceitação e difusão no Brasil.

CRITÉRIOS PARA INDICAÇÃO DE MICROSCOPIA

Mesmo com a sofisticação do Cella Vision, é impossível em um laboratório grande a manutenção de um número de técnicos experientes capazes de examinar centenas ou milhares de lâminas por dia. A “microscopia universal” tornou-se inviável: em todos os laboratórios que usam contadores com fórmula leucocitária completa o exame ao microscópio só é feito em casos selecionados. Em locais onde essa política geral ainda compete com laboratórios que fazem hemograma à moda antiga, com contadores de pequeno porte e fórmula visual (manual), o autor recomenda que *essa orientação seja anotada no resultado de uns e de outros*, mas nenhum laboratório costuma fazê-lo. É desnecessária em hemogramas de laboratórios de instituições fechadas (como hospitais universitários), em que o corpo clínico está formalmente informado da tecnologia usada; em algumas dessas instituições cabe ao médico requisitante solicitar exame microscópico complementar quando julgar necessário.

Em muitos hospitais do exterior, os médicos recebem o resultado diretamente do contador, *on-line* com o sistema de informática da entidade. O requisitante sabe o que vai receber ao solicitar um *hemograma*. Mas, em laboratórios abertos ao público e aos médicos em geral, tem sido difícil difundir o conhecimento de que receberão um hemograma incredivelmente exato quanto aos números, mas limitado à visão das máquinas na identificação celular. Apesar da maravilhosa tecnologia eletrônica, as máquinas não veem tudo, e o que não veem pode ser clinicamente significativo ou, ao menos, biologicamente relevante.

Não há consenso entre os laboratórios brasileiros quanto aos critérios de indicação de microscopia; todos balançam a necessidade de reduzir o número de lâminas enviadas à microscopia com as indicações vindas da experiência clínico/laboratorial dos especialistas. Todos admitem, entretanto, que hemogramas oriundos de clínica onco-hematológica, de pós-transplantados ou sob quimioterapia, e de pacientes graves de UTI, devem ter indicação de microscopia ao menos no primeiro exame. E todos aceitam a presença de *flags* das máquinas e resultados fora de limites de referência pré-fixados como indicativos dessa necessidade; o que varia muito é a amplitude dos extremos definidos.

Em 2002, a Beckman Coulter Inc. patrocinou uma reunião multinacional de 20 especialistas em hematologia laboratorial com o objetivo de sugerir diretrizes sólidas para esses critérios. Após extensa reunião, esse *International Consensus Group for Hematologic Criteria for Action following Automated CBC and WBC Differential Analyses* desenvolveu e sugeriu 83 re-

gras. Para testá-las, no ano seguinte, 15 laboratórios de membros do grupo examinaram cerca de 13.300 hemogramas, consolidaram 41 dentre as regras e publicaram as conclusões em 2005;^{*} foram aceitas, assumidas e recomendadas pela International Society of Laboratory Hematology (ISLH).

As diretrizes aprovadas incluem critérios oriundos de *delta check* (comparação automática com resultados anteriores do paciente), de inegável valor, mas lamentavelmente inviável na quase totalidade dos laboratórios brasileiros. A presença de qualquer dos *flags* dos instrumentos foi aceita como indicação. Os extremos numéricos recomendados, localmente aplicáveis, embora o autor discorde de alguns deles, estão na Tabela 1.1.

O autor de uma monografia das dimensões da presente é certamente tendenciado à perfeição (ou seria ao preciosismo?) e preocupa-se menos do que deveria com os problemas logísticos e financeiros de uma indicação demasiado ampla. Tenha-se essa restrição em mente ao julgar os critérios que recomenda a seguir.

TABELA 1.1

Limites definidos pelo Grupo de Consenso Internacional para indicação de microscopia^{*}

Hemoglobina	< 7	> 18,5	g/dL
VCM	< 75	> 105	fL
CHCM	< 30	> 36,5	%
RDW		> 22	%
Leucócitos	< 4.000	> 30.000	/μL
Neutrófilos	< 1.000	> 20.000	/μL
Linfócitos		> 5.000 (adultos) > 7.000 (< 12 anos)	/μL
Monócitos		> 1.500 (adultos) > 3.000 (< 12 anos)	/μL
Eosinófilos		> 2.000	/μL
Basófilos		> 500	/μl
Plaquetas	< 100.000	> 1 milhão	/μL
VPM	< 5,0	> 12,5	fL
Reticulócitos		> 100.000	/μL

^{*} Barnes PW, et al. The International Consensus Group for hematological review: suggested criteria for action following CBC and WBC differential analyses. Lab Hematol. 2005;11(2):83-90.

1. **Idade < 2 anos.** Motivo: a frequência de desvio à esquerda e linfócitos atípicos, ambos de identificação insegura nas máquinas, por diarreia ou viroses, e a dificuldade de definir valores de referência nesse grupo etário. No recém-nascido, a microscopia é indispensável e universalmente indicada.
2. Na edição anterior, o autor anotou > 75 anos como indicação de lâmina e microscopia. Nesta, reconsidera: com a longevidade saudável atual, o número de hemogramas normais nessa idade justifica **excluir** o grupo etário da indicação geral. O grande dado perdido seria o *rouleaux* de componentes monoclonais; em contrapartida corretiva, o autor recomenda, no Capítulo 20 (“Hemograma em idosos”), a inclusão do proteinograma nos exames da revisão clínica anual.
3. Nos raros laboratórios de hospital ou clínica em que a informática permita **delta check**: fazê-lo, limitando-o a 72 horas e dispensando da microscopia os hemogramas com variação inferior a $\pm 10\%$ nos resultados numéricos.
4. **Pedidos médicos** específicos que exigem microscopia: pesquisa de linfócitos atípicos, de esferócitos, outros; ou a observação explícita cada vez mais frequente, escrita pelo médico: * “olhar a lâmina” ou “fazer microscopia”.
5. **Pedidos de exames** correlacionados com alterações do hemograma (p. ex.: monoteste, resistência globular, imunofenotipagem de linfócitos, etc.) ou resultados alterados de outros (p. ex.: VSG > 80 mm, proteinograma com hipergamaglobulinemia, vitamina B₁₂ ou ácido fólico abaixo da referência).
6. **Flags** emitidos pelo aparelho: não costumam diferir muito entre os diversos contadores eletrônicos; os usuais estão listados a seguir.

No leucograma:*Immature granulocytes?**Left shift ou Bands?**Variant ou Atypical lymphocytes?**Abnormal lymphocytes/blasts?***No eritrograma:***Fragments?**Dimorphic population?**RBC lyse resistance?**Nucleated RBC?***No plaquetograma:***Platelet clumps***Geral:***Turbidity/Hemoglobin interference?**Review slide (em alguns contadores)*

* O júbilo (vaidade?) do autor ao considerar que as cinco edições prévias deste Manual possam ter estimulado esse procedimento médico não se baseia em dados estatísticos fidedignos.

Nem todos os *flags* exigem microscopia. *Turbidity* exige só revisão da amostra para pesquisar lipemia. Havendo *Dimorphic population* (ou RDW elevado) a observação do histograma eritroide pode ser confirmadora e suficiente sem microscopia. O *flag Left shift* (ou *bands*) em casos sem neutrofilia mostrou-se tantas vezes falso-negativo e quase sempre positivo (verdadeiro ou falso) em casos com neutrofilia, que o autor abandonou-o como critério; em compensação baixou o limite do número de referência de neutrófilos para $8.000/\mu\text{L}$. Contrariamente, *Platelet clumps*, além de microscopia para ver se há agregação, exige revisão da amostra em busca de coágulos.

- 7. Limites de referência dos parâmetros numéricos:** variam muito entre os laboratórios brasileiros consultados. Os critérios numéricos do Grupo Internacional da Tabela 1.1, com as modificações necessárias pela impossibilidade técnica de emprego do *delta check*, foram submetidos a cuidadosa avaliação crítica no Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da Universidade do Paraná.* Apesar dos critérios terem exigido exame em 46% dos hemogramas testados, valor muito acima dos 30% recomendados pelo American College of Pathologists, houve 10,5% falso-positivos (hemogramas em que os critérios exigiram observação de lâmina, mas a microscopia foi negativa) e 15,5% falso-negativos (hemogramas sem indicação pelos critérios, mas com microscopia positiva). Como a recomendação da ISLH é de que esses valores não ultrapassem 5%, os autores do trabalho concluíram que no laboratório/hospital onde foram testados, os critérios (adaptados) não se mostraram adequados nem seguros e sugeriram a elaboração de critérios próprios elaborados por cada laboratório/instituição.

O autor não concorda com vários dentre os valores preconizados pelo Grupo Internacional; os novos números propostos na Tabela 1.2 são discutidos um a um a seguir, com justificativas principalmente oriundas de correlação à clínica.

Hemoglobina: aqui a grande divergência. A maioria das anemias severas ($\text{Hgb} < 7,0 \text{ g/dL}$) tem diagnóstico óbvio pelos índices hematimétricos, e esses mesmos geram indicação de microscopia (geralmente tão *positiva* quanto inútil: para que microscopia numa anemia ferropênica?). Se as anemias forem originadas de hemopatias, as alterações concomitantes

* Comar SR, et al. Are the review criteria for automated complete blood counts of the International Society for Laboratory Hematology suitable for all hematology laboratories? *Rev Bras Hematol e Hemoter*, 2014;36(3):219-225.

TABELA 1.2

Limites sugeridos pelo autor para indicação de microscopia

Hemoglobina	< 11	> 17	g/dL
VCM	< 78	> 105	fL
CHCM	< 30	> 36,5	%
RDW		> 18,0	%
Neutrófilos	< 1.500	> 8.000	/ μ L
Linfócitos	< 1.000	> 4.500 (adultos) > 7.000 (< 7 anos)	/ μ L
Monócitos		> 1.500	/ μ L
Eosinófilos		> 2.000	/ μ L
Basófilos		> 3	%
Plaquetas	< 120.000	> 500.000 (adultos)	/ μ L
VPM	< 6,0	> 12,5	fL
Reticulócitos	< 10.000	> 100.000	/ μ L

de leucócitos e/ou plaquetas vão gerar a indicação de microscopia. É nas anemias leves e moderadas, com índices hematimétricos e demais séries normais ou quase normais, que a microscopia é útil para pesquisar **poli-cromatocitose** e caracterizá-las como hiper-regenerativas (pós-hemorragicas?).

RDW: é fundamental examinar o histograma em casos com RDW aumentado, mesmo quando o aumento for moderado. Microscopia pode ser dispensada se a interpretação for óbvia apenas pelo histograma. Indispensável será o comentário escrito sobre o achado.

Leucócitos: a sugestão é **retirar** dos critérios a contagem global por ser redundante. Não há leucopenia significativa se não houver *neutropenia*, *linfopenia* ou ambas. O mesmo raciocínio, em sentido inverso, serve para leucocitose. Se a leucocitose for devida a blastos leucêmicos aparecerá o *flag* respectivo ou a máquina negará a fórmula leucocitária, indicação óbvia de microscopia.

Neutrófilos: números mais restritivos são necessários; a neutropenia de viroses acompanha-se de desvio à esquerda; a presença de desvio confirma como *neutrofilia* casos com duvidosos 8.000-10.000 neutrófilos/ μ L.

Linfócitos: o *flag Variant* (ou *Atypical*) *lymphocytes* não é confiável, nem quanto à presença nem quanto à ausência. Linfocitose em crianças de mais de 7 anos (não mais de 12 anos, como nos critérios publicados) de-