



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

POP nº 32/2024

Revisão 01

Página 1/7

Elaborado por:

Revisado por:

Aprovado por

Dr^a Katgeane Neves da Silva
Biomédica

Dr^a Gêssica Tenório Rodrigues
Biomédica

Dr Marcelo Brasil da Silva
Gerente/Bioquímico
DAD/SEMUSA

Dr^a Alessandra Vidal Borges
Biomédica
RT DAD/SEMUSA

POP Nº32/2024

OBJETO: REALIZAÇÃO DE EXAMES DE HEMATOLOGIA

1. APLICAÇÃO

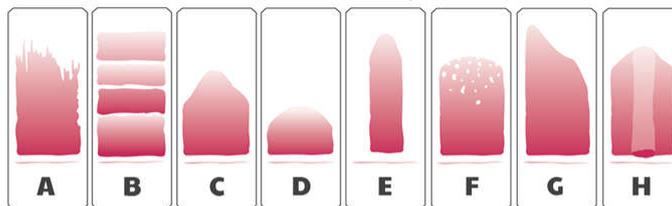
1.1 Padronizar os exames de Hematologia.

2. PROCEDIMENTOS:

2.1 CONFEÇÃO DO ESFREGAÇO

- Homogeneize o tubo da amostra;
- Coloque 5µL de sangue em uma lâmina. O esfregaço deve ficar delgado e bem homogêneo, logo, não há necessidade de grande quantidade de amostra na lâmina;
- Com o auxílio de uma outra lâmina ou extensor, com um ângulo de 45°, distenda o sangue na lâmina. O esfregaço deve ser feito em velocidade constante, adequada a permitir o espalhamento uniforme da amostra;
- Deixe a lâmina secar;
- Com lápis dermatográfico, identifique as lâminas com letra legível e facilmente visível.

Figura 1 - Erros e Acertos na Confeção de Lâminas Hematologia



A - Borda irregular da lâmina extensora;

B - Pausas na hora de mover a lâmina extensora;

C - Movimento muito rápido;

D - Gota de sangue muito pequena;

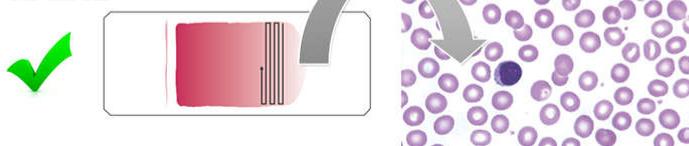
E - Gota de sangue concentrada no centro da lâmina;

F - Sujeira ou gordura na lâmina ou amostra lipêmica;

G - Pressão desigual na lâmina extensora;

H - Demora na confecção do esfregaço/gota seca.

IDEAL



Fonte: Biomedicina Padrão, 2017

2.2 REALIZAÇÃO DO HEMOGRAMA

- Homogeneize o tubo no “homogeneizador de tubos” ou manualmente. Esta homogeneização deve ser lenta para preservação das células sanguíneas na amostra. Leve a amostra ao aparelho automatizado de hematologia. O equipamento liberará o resultado do hemograma, em alguns aparelhos a contagem específica de leucócitos não é liberada. Caso este resultado contenha valores fora da faixa de referência, deve-se repetir o processo deste tópico.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

POP nº 32/2024

Revisão 01

Página 2/7

Elaborado por:

Revisado por:

Aprovado por

Dr^a Katgeane Neves da Silva
Biomédica

Dr^a Géssica Tenório Rodrigues
Biomédica

Dr Marcelo Brasil da Silva
Gerente/Bioquímico
DAD/SEMUSA

Dr^a Alessandra Vidal Borges
Biomédica
RT DAD/SEMUSA

2.3 HEMOGRAMA REALIZADO MANUALMENTE

- Em casos onde o equipamento apresenta problemas, podemos realizar o hemograma manualmente, conforme descrito abaixo.
- Realização do Hematócrito:
 - a) Encha um tubo capilar com sangue do paciente, até cerca de 2/3 do seu comprimento.
 - b) Limpe as paredes do tubo com algodão.
 - c) Vede a extremidade vazia do tubo com massa apropriada ou em chama de lamparina a álcool.
 - d) Coloque o tubo capilar na centrífuga de microhematócrito/ comum. Caso trate-se de uma centrífuga comum, insira o capilar no interior de um tubo e insira-lo na centrífuga, mantendo o equilíbrio com outro tubo.
 - e) Tampe convenientemente a centrífuga e centrifugue por 5 minutos. No caso de centrífuga comum, centrifugar por 20 minutos.
 - f) Realize a leitura no cartão de hematócrito. (Figura 2)
 - g) O menisco inferior (hemácias) deve coincidir com a linha zero e o menisco superior (plasma) deve coincidir com a linha 100. A leitura é feita onde ocorre a separação entre a capa de leucócitos e as hemácias sedimentadas.

Figura 2 - Cartão de Leitura do Hematócrito



Fonte: Google Imagens,2024.

2.4 REALIZAÇÃO DA HEMATIMETRIA

- Em um tubo ou frasco pequeno pipetar 4 mL de líquido diluidor (líquido de Gower ou solução salina



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

POP nº 32/2024

Revisão 01

Página 3/7

Elaborado por:

Revisado por:

Aprovado por

Dr^a Katgeane Neves da Silva
Biomédica

Dr^a Gêssica Tenório Rodrigues
Biomédica

Dr Marcelo Brasil da Silva
Gerente/Bioquímico
DAD/SEMUSA

Dr^a Alessandra Vidal Borges
Biomédica
RT DAD/SEMUSA

0,9%).

- Pipetar 0,02 mL de sangue e transferir para o frasco acima.
- Aguardar 5 minutos e homogeneizar
- Com o auxílio de uma pipeta, preencher a câmara de Neubauer, tomando o cuidado de homogeneizar antes da pipetagem, evitando o excesso de líquido e formação de bolhas de ar.
- Levar a câmara de Neubauer ao microscópio para efetuar a contagem. Utilizar o aumento de 400X, utilizando o retículo central da lâmina.
- Ler as quadrículas laterais e central e após, somar as parcelas.
- Multiplicar o resultado por 10000.
- Emitir o resultado em hemácias p/ mm³ de sangue.

• Cálculos:

$$\begin{array}{l} 0,02 \text{ mL Sangue} \text{_____} 4 \text{ mL Líquido diluidor} \\ 01 \text{ mL Sangue} \text{_____} X \text{ Hemácias} \end{array}$$

- Portanto a diluição usada para contagem de hemácias é 1:200.
- **Resultado:** X hemácias p/ mm³ de sangue.

2.5 DOSAGEM DE HEMOGLOBINA

- Em um tubo de ensaio adicionar 5 mL de reagente de cor (cianeto de hemoglobina) e 0,02 mL de sangue total (amostra). Homogeneizar e aguardar 5 minutos.
- Repetir o mesmo passo anterior para o padrão
- Determinar a absorbância do teste em comprimento de onda 540 nm, acertando o zero com o reagente de cor ou com água destilada/deionizada.
- Obter o valor da concentração sanguínea de hemoglobina (em g/dL) utilizando o valor obtido com o padrão de hemoglobina, através de regra de três simples.
- Cálculo:

$$\begin{array}{l} \text{Padrão de hemoglobina} \text{_____} \text{Absorbância determinada} \\ \text{Concentração de hemoglobina na amostra (X)} \text{_____} \text{Absorbância obtida} \end{array}$$

2.6 REALIZAÇÃO DA LEUCOMETRIA GLOBAL

- Em um tubo de hemólise pipetar 0,4 mL do líquido diluidor (líquido de Turk), após homogeneizar o



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

POP nº 32/2024

Revisão 01

Página 4/7

Elaborado por:

Revisado por:

Aprovado por

Dr^a Katgeane Neves da Silva
Biomédica

Dr^a Gêssica Tenório Rodrigues
Biomédica

Dr Marcelo Brasil da Silva
Gerente/Bioquímico
DAD/SEMUSA

Dr^a Alessandra Vidal Borges
Biomédica
RT DAD/SEMUSA

sangue, colhido com EDTA, pipetar 0,02 mL do mesmo, e transferir para o tubo contendo o líquido diluidor.

- Homogeneizar e aguardar 20 minutos para que haja destruição das hemácias. Com o auxílio de uma pipeta, encher o retículo da câmara de Neubauer, evitando o excesso de líquido e bolhas de ar.
- Levar a câmara de Neubauer ao microscópio, focalizando no aumento de 100X ou 400X (caso haja necessidade), usando para contagem os quatro retículos laterais da câmara.
- Realizar a contagem nos quatro quadrantes laterais onde o número de leucócito de cada quadrantes será multiplicado por 50, e os valores encontrados nos quatro quadrantes serão somados encontrando assim o valor de leucócitos.
- ***Resultados:** Expressos em X leucócitos p/ mm³.

2.7 CONTAGEM DE PLAQUETAS

- Pode ser realizada através de duas metodologias (método direto e indireto).

2.7.1 Métodos Indiretos (método de Fônio):

- Colher o sangue total com EDTA e realizar extensão e coloração do mesmo modo utilizadas para contagem diferencial de leucócitos.
- Contar as plaquetas existentes em 10 campos e fazer uma média do somatório das plaquetas encontradas nestes campos. Verificar campos que contenham aproximadamente 200 eritrócitos / campo para que a qualidade da contagem seja garantida.
- Multiplicar o resultado por 10000 obtendo assim o número de plaquetas/mm³ de sangue. Observar o cálculo alternativo embaixo. Por exemplo: em 10 campos de aproximadamente 200 eritrócitos (portando em 2.000 eritrócitos) contaram-se 75 plaquetas. O número de eritrócitos do paciente era de 5.000.000/mm³, assim o número de plaquetas/mm³ será:

$$\frac{75 \text{ plaquetas} \times 2000 \text{ eritrócitos}}{X \times 5.000.000 / \text{mm}^3 \text{ (eritrócitos)}}$$

$$x = 375.000 \text{ plaquetas/mm}^3$$

2.7.2 Método Direto:

A amostra a ser examinada é diluída e a contagem realizada em câmara de Neubauer (método Rees-Ecker). Utilizar a amostra colhida em EDTA, deixando-a em repouso no tubo, sedimentando os elementos figurados.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

POP nº 32/2024

Revisão 01

Página 5/7

Elaborado por:

Revisado por:

Aprovado por

Dr^a Katgeane Neves da Silva
Biomédica

Dr^a Gêssica Tenório Rodrigues
Biomédica

Dr Marcelo Brasil da Silva
Gerente/Bioquímico
DAD/SEMUSA

Dr^a Alessandra Vidal Borges
Biomédica
RT DAD/SEMUSA

- Adicionar 20 µL de plasma em um tubo já contendo 1mL de solução salina. Homogeneizar e inserir no retículo da câmara de Neubauer quantidade suficiente, da diluição preparada, necessária para enchê-la. Deixar em repouso por 30 minutos.
- Levar a câmara ao microscópio e efetuar a contagem das plaquetas no retículo central (nos 25 quadrados: área total de contagem= 1 mm²). Nesta técnica, as plaquetas apresentam-se coradas em azul e refringente.
- Calcular número de plaquetas através da equação de Rees-Ecker.
- **Coloração e contagem específica de leucócitos:** Colocar a lâmina com o esfregaço sanguíneo sobre um suporte especial para coloração. Cobrir a lâmina com o corante May-Grunwald e aguardar 3 minutos. Desprezar este corante lavando com água corrente. Cobrir a lâmina com o corante Giemsa e aguardar 12 minutos. Desprezar o corante, lavando com água corrente.
- Deixar secar e realizar a contagem específica com objetiva de imersão (100X).
- Esta coloração pode ser feita através dos corantes rápidos (panótico). Neste caso, aguardam-se aproximadamente 10 segundos a cada etapa. Primeiramente inserir a lâmina em frasco com álcool (fixador), após inserir a lâmina nas duas soluções corantes. Primeiramente na solução “laranja” (corante acidofílico) e posteriormente no corante “roxo” (corante basofílico). Ao final, lavar a lâmina em água corrente e deixar secar.
- Realizar a contagem diferencial de leucócitos. As porções médias e finais do esfregaço são os locais adequados para o estudo morfológico e para a contagem das células.

2.8 Contagem diferencial de leucócitos:

2.8.1 Focalizar o local do esfregaço para iniciar a contagem.

- Com a objetiva de imersão contar 100 células (leucócitos), fazendo a diferenciação entre os diferentes tipos.
- Anotar os diferentes tipos de leucócitos e os valores encontrados na contagem em %, utilizando o contador eletrônico. Ao completar as 100 células, o equipamento emitirá um som, não havendo necessidade de contagem manual.
- Baseando-se na contagem global de leucócitos e nos valores percentuais na contagem diferencial, os valores absolutos para cada tipo de leucócito são calculados. O resultado deverá ser expresso em números relativos e absolutos. Nosso programa de emissão de laudos já realiza esta atividade automaticamente.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

POP nº 32/2024

Revisão 01

Página 6/7

Elaborado por:

Revisado por:

Aprovado por

Dr^a Katgeane Neves da Silva
Biomédica

Dr^a Gêssica Tenório Rodrigues
Biomédica

Dr Marcelo Brasil da Silva
Gerente/Bioquímico
DAD/SEMUSA

Dr^a Alessandra Vidal Borges
Biomédica
RT DAD/SEMUSA

Exemplo:

Contagem global de leucócitos	10000 p/mm ³	
Contagem diferencial de leucócitos	Valor Relativo	Valor Absoluto
Neutrófilos Bastonetes	2%	200 p/mm ³
Neutrófilos Segmentados	60%	6000 p/mm ³
Eosinófilos	4%	400 p/mm ³
Monócitos	5%	500 p/mm ³
Linfócitos	28%	2800 p/mm ³
Total	100%	10000 p/mm ³

100 Leucócitos _____ 2 Neutrófilos Bastonetes
10000 Leucócitos _____ X Bastonetes

X = 200 Neutrófilos Bastonetes p/mm³ de sangue

3. Padronização interna para liberação das alterações dos índices hematimétricos em hemogramas:

3.1 RDW:

- 15,0 – 15,9%: Anisocitose discreta;
- 16,0 – 19,0%: Anisocitose moderada;
- Acima de 19,0%: Anisocitose intensa.

3.2 MICROCITOSE:

- 75-80 fL: Microcitose discreta;
 - 68- 74 fL: Microcitose moderada;
- *Abaixo de 68 fL: Microcitose intensa.

3.3 MACROCITOSE:

- *99 - 102 fL: Macrocitose discreta
- *103-110 fL: Macrocitose moderada
- *Acima de 110 fL: Macrocitose intensa.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

POP nº 32/2024

Revisão 01

Página 7/7

Elaborado por:

Revisado por:

Aprovado por

Dr^a Katgeane Neves da Silva
Biomédica

Dr^a Gêssica Tenório Rodrigues
Biomédica

Dr Marcelo Brasil da Silva
Gerente/Bioquímico
DAD/SEMUSA

Dr^a Alessandra Vidal Borges
Biomédica
RT DAD/SEMUSA

3.4 POIQUILOCITOSE:

- Discreta: Poucas hemácias alteradas em alguns campos;
- Moderada: Todos os campos possuem hemácias alteradas, em pequena quantidade;
- Intensa: Todos os campos possuem hemácias alteradas, em grande quantidade.

3.5 Contagem de reticulócitos (hemácias jovens):

- Colocar 0,5 mL de sangue colhido em EDTA em tubo de ensaio;
- Adicionar 0,5 mL de azul de cresil brilhante.
- Colocar em banho-maria a 37° C por 15 minutos.
- Homogeneizar, fazer esfregaço fino e focalizar com objetiva de imersão.
- Contar, no mínimo 500 hemácias, anotando os reticulócitos encontrados nestes campos. Prefira campos com células isoladas para facilitar a contagem.
- Dividir o resultado por cinco e expressá-lo em %.

Se for solicitado o quantitativo numérico por unidade de volume, realizar o cálculo por regra de três empregando a hematimetria obtida do equipamento.

3.6 Realização do teste de afoçamento:

- Colocar uma gota de sangue (colhido em EDTA) numa lâmina. Colocar uma lamínula e vedar com parafina ou esmalte. TOMAR CUIDADO PARA QUE NÃO HAJA BOLHAS. Após 24 horas, observar em microscópio, com luz reduzida e aumento de 40X, verificando se as hemácias ficaram alteradas, em forma de “foice”.

4. REFERÊNCIAS:

BAIOCCHI, O.C.C.G. Guia de bolso de hematologia. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2019.

HENRY, J. B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 20^a ed. São Paulo: Manole, 2008.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Tratado de hematologia. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2013.



Assinado por **Alessandra Vidal Borges** - BIOMEDICA - RESPONSÁVEL TECNICA - Em: 14/11/2024, 17:02:04



Assinado por **Géssica Tenório Rodrigues** - Biomédica - Em: 13/11/2024, 07:19:20



Assinado por **Marcelo Brasil Da Silva** - Gerente de Laboratório - Em: 12/11/2024, 12:36:46



Assinado por **Katgeane Neves Da Silva** - BIOMEDICA - Em: 12/11/2024, 11:25:14