

## Apêndice 5

### Coloração por Giemsa e hematologia

#### *Corante de Giemsa*

#### Reagentes

- Solução de corante de Giemsa (por exemplo, BDH/Merck Ltd., Hunter Boulevard, Magna Park, Lutterworth, Leicestershire, R66; Produto 35086).
- A qualidade do corante de Giemsa varia conforme o lote. Antes de ser utilizado, cada novo lote deve ser verificado usando um organismo conhecido.
- Água destilada tamponada com fosfato, pH 7.2.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,7 gr
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,0 gr
água destilada	1,0 litro

- Álcool metílico puro (Analar). Deve ser armazenado em frascos muito bem tampados, para evitar a absorção de água.

#### Método

1. Prepare esfregaço fino como para os exames rotineiros de hematologia. Assegure-se de que o esfregaço tem uma boa área de leitura (*tail*) e que não alcança a borda lateral da lâmina.
2. Deixe o esfregaço secar ao ar e fixe-o com álcool metílico, durante um minuto.
3. Elimine o excesso de álcool metílico e coloque o esfregaço de encontro à lâmina sobre uma bandeja de corar.
4. Usando uma seringa de 20 ml e agulha romba, dilua o corante concentrado de Giemsa 1:10 com água destilada tamponada. Misture bem e extraia o ar.
5. Infiltre cuidadosamente o corante, usando a seringa e agulha, sob a lâmina, assegurando-se de que nenhuma bolha grande de ar ficou presa. Core durante 25–30 minutos.

6. Após corar, enxágüe rapidamente as lâminas na água corrente e deixe escorrer na posição vertical. Os possíveis parasitas devem ser examinados, em maior detalhe, usando lentes de imersão em óleo. As objetivas de imersão em óleo, de 50X ou 63X, são muito úteis no exame preliminar. Pelo menos 1.000 campos devem ser examinados por um microscopista qualificado.

#### *Observações:*

Recomenda-se o método da seringa para a diluição do corante de Giemsa (parágrafo 4, anterior), pois assim que o corante é diluído na água, inicia-se sua precipitação, que é acelerada pela exposição ao ar. Portanto, essa diluição deve ser preparada imediatamente antes de o espécime ser corado; não se deve corar usando corante diluído de estoque. Além disso, quando o espécime é corado nessa posição, na bandeja, se reduz a quantidade de precipitado, e qualquer precipitado que houver desloca-se para longe do esfregaço. Na procura de parasitas intracelulares, é importante que os esfregaços tenham sido corretamente corados.

É **imprescindível** utilizar água tamponada, com pH 7.2, para diluir o corante empregado para parasitas sangüíneos. Só é possível diferenciar o parasita nuclear do material citoplasmático nesse pH alcalino.

#### *Determinação de volume globular (VG) (hematócrito)*

O volume globular (VG) é o percentual do volume sangüíneo ocupado pelos eritrócitos. Um baixo VG é indicativo de anemia. Para determinar o VG, um tubo capilar heparinizado é enchido, diretamente, com sangue capilar (por exemplo, de punção com lanceta no dedo ou orelha) ou com sangue venoso coletado com anticoagulante. Uma extremidade do tubo é selada com Plasticina ou por meio de calor. Use a ação capilar para encher os tubos, deixando 10–15mm vazios na ponta do tubo que será selada. O tubo é centrifugado numa centrífuga de hematócrito (a 12.000g), com a ponta selada do tubo encostada na borda externa de borracha da bandeja de centrifugação. Centrifugue durante 5 minutos e leia o VG no leitor de micro-hematócrito colocando a base da camada de hemácias no zero e o topo da camada de plasma nas linhas 100. A posição da linha prateada é ajustada para tocar na interface entre eritrócitos/leucócito/plaquetas, e o volume globular é lido na escala.

O VG (hematócrito) é a relação hemácias depositadas/volume de sangue.

### *Contagem de leucócitos*

Fluido para diluição dos leucócitos:

Ácido acético glacial	2 ml
Azul de metileno a 1 %	1 - 2 gotas
Água destilada	até 98 ml

Após a lise dos eritrócitos, corar os leucócitos. Para a lise, adicionar 20 µl de sangue a 0,38 ml de fluidos de diluição de leucócitos (1 em 20): misturar cuidadosamente. Encher a câmara de contagem do hemacitômetro e deixar descansar em câmara úmida, durante dois minutos. Contar todos os leucócitos numa área de 4 mm<sup>2</sup>.

### Contagem de leucócitos

$$= \frac{\text{n}^\circ \text{ de células contadas} \times \text{diluição} \times 10^6}{\text{volume contado (0,4)}} = \text{número contado} \times 50 \times 10^6/\text{l}$$

Exemplos de contagens normais de leucócitos, em diferentes grupos etários:

<b>Grupo Etário</b>	<b>Contagem normal de leucócitos</b>
Crianças < 1 ano	6-18 x 10 <sup>9</sup> /l
Crianças de 1 a 10 anos	5-14 x 10 <sup>9</sup> /l
Adultos	4-11 x 10 <sup>9</sup> /l

### *Determinação de hemoglobina (método de cianometahemoglobina)*

Solução para diluição do sangue (solução de Drabkin, pH 7.0 - 7.4)

Cianeto férrico de potássio	200 mg
Cianeto de potássio	50 mg
Di-hidro-ortofosfato de potássio	140 mg
Nonidet P40	1 ml
Água destilada	até 1 litro

Armazenar a temperatura ambiente, em câmara escura (não congelar). *Essa solução é muito tóxica.*

A solução pode ser preparada dissolvendo comprimidos concentrados dos componentes ou diluindo uma ampola do concentrado comercializado.

Adicionar 20µl de sangue coletado com anticoagulante a 4 ml de reagente, misturar bem e deixar descansar a temperatura ambiente, durante três minutos. A densidade ótica é lida no colorímetro, em 540 nm, contra a solução do reagente. Além disso, mede-se separadamente a densidade ótica de um padrão de referência da cianometaemoglobina contra o reagente puro.

A concentração de hemoglobina (gr/l) é calculada da seguinte maneira:

$$\frac{\text{Densidade ótica do espécime do teste} \times \text{concentração do padrão} \times \text{fator de diluição}}{\text{Densidade ótica do padrão}} = 100$$

Variações normais:

<b>Grupo Etário</b>	<b>Concentração de hemoglobina</b>
Crianças de 1 a 6 anos	110 – 140 gr/l
Homens adultos	130 – 180 gr/l
Mulheres adultas	115 – 165 gr/l

*Proteína sérica total*

Reagente de Biureto:

Sulfato de cobre (5 H <sub>2</sub> O)	3 gr
Tartarato sódico de potássio	9 gr
Iodeto de potássio	5 gr
NaOH	24 gr
Água destilada	até 1 litro

Reagente de tartarato alcalino:

Tartarato sódico de potássio	9 gr
Iodeto de potássio	5 gr
NaOH	24 gr
Água destilada	até 1 litro

Adicionar 0,1 ml de soro a 5 ml de reagente Biureto.

Adicionar 0,1 ml de soro a 5 ml de solução de tartarato alcalino.

Deixar descansar os tubos de ensaio a temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Calibrar o espectrômetro com um filtro de comprimento de onda de 540 nm, usando 5 ml de reagente de Biureto, e subtrair o valor da densidade ótica da solução de tartarato alcalino.

A proteína total do espécime do paciente pode ser lida a partir da curva de calibração preparada com cinco diluições da solução protéica concentrada ou um soro de controle contendo uma quantidade conhecida de proteína. Existem soluções concentradas liofilizadas, contendo quantidades conhecidas de proteína total, disponíveis comercialmente.