Hemograma automatizado

www.profbio.com.br
Prof. Archangelo Padreca Fernandes
Profa. Alessandra Barone

Hemograma automatizado

- Técnica mais utilizada em todos os laboratórios clínicos do mundo.
- Mais rápida, reprodutível e confiável do que a técnica manual.
- Amostra de sangue é aspirada pelo equipamento.
- Após tratamento com soluções específicas, ela passa por eletrodos que medem o tamanho da célula e sua complexidade.
- Desta maneira é possível distinguir entre os diversos tipos celulares do sangue.

Hemograma automatizado

- Criado no início na década de 50 por Walace Coulter.
- Utilização da impedância elétrica para contagem de células.
- Os reagentes (diluidores) ficavam localizados na parte externa do aparelho.
- Década de 60: os aparelhos já contavam com canais diferentes para contagem de eritrócitos e plaquetas, contagem de leucócitos e dosagem de hemoglobina por fotometria.
  - Os diluidores na parte interna dos aparelhos.

Modelo primitivo da Coulter

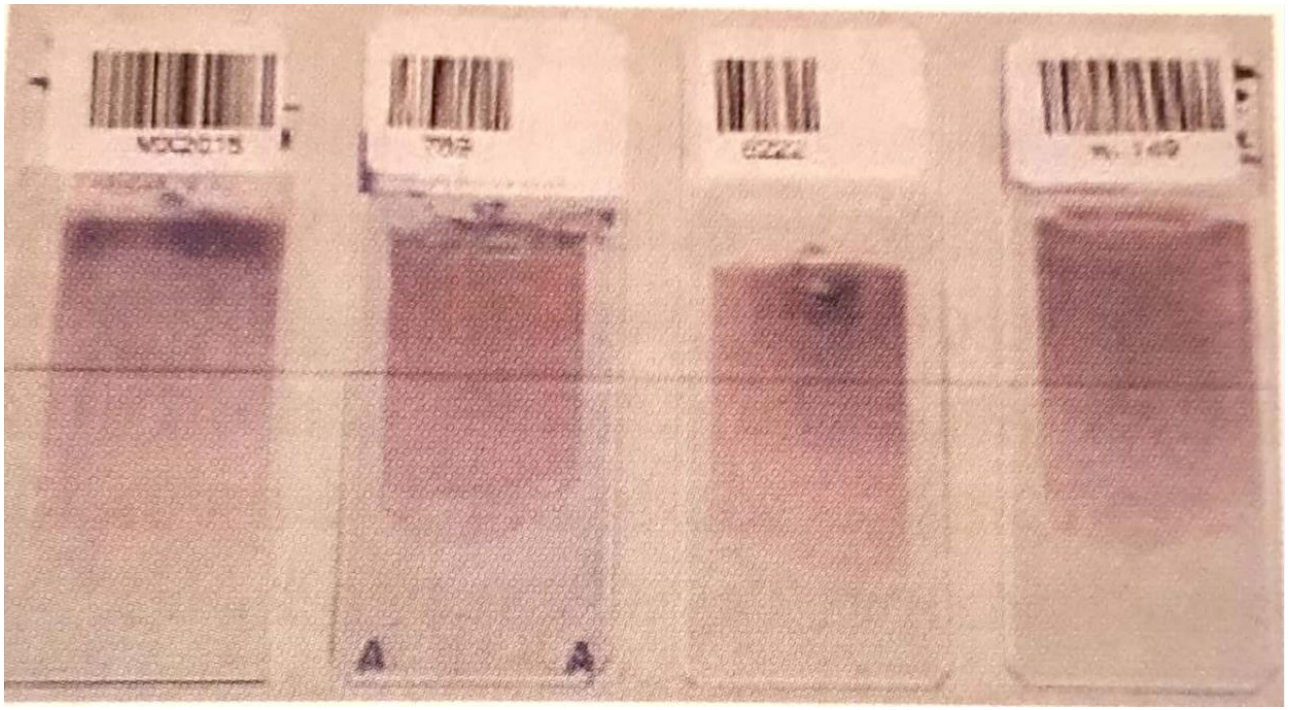
Hemograma automatizado

- Década de 70: a tecnologia de impedância foi acrescida de citometria de fluxo.

- Década de 80: equipamentos apresentavam agulha aspiradora pra perfuração sequencial.

- Década de 90: robotização para realização de extensão sanguínea.

Extensões sanguíneas automatizadas



Hemograma automatizado

- Os fabricantes de aparelhos automatizados contam com diferentes tecnologias para produção de aparelhos de grande e pequeno porte
  - Pequeno porte: impedância elétrica, radiofrequência e fotometria
  - Grande porte: impedância elétrica, radiofrequência, fotometria e citometria de fluxo

Sistema automático de preparação de amostras para esfregaços sanguíneos

Processo estandardizado para a preparação do esfregaço de alta qualidade
Preparação simultânea de 2 esfregaços com ajuste da espessura e tamanho

Exploração automática
Identificação e pre-classificação celular
Verificação rápida dos resultados (validação exigida por profissional)
Modalidade ausente da caminhada - série da exploração das corrediças
Modalidade de carregamento contínua
Distribuidor automático do óleo
Carregador automático da corrediça

https://www.youtube.com/watch?v=TH2dixy-1y4

Sysmex- XE-2100

Sysmex- XE -2100

- Análise individual em tubo fechado

- **Princípios de medição:**
  - **Impedância elétrica** (corrente direta): RBC, PLT, HCT (medido) e diferencial de células imaturas
  - **Citometria de fluxo** fluorescente: WBC, contagem de reticulócitos, eritroblastos, plaquetas imaturas e contagem óptica de plaqueta
  - **Radiofrequência**: diferencial de céls imaturas
  - **Fotometria**: HGB. Reação livre de cianeto

Sysmex- XE -2100

- **Parâmetros analisados:**
- 34 parâmetros:
  - WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW-SD, RDW-CV, PLT, MPV, NEUT%, NEUT#, LYMPH%, LYMPH#, MONO%, MONO#, EOS%, EOS#, BASO%, BASO#, IG%, IG#, RET%, RET#, LFR%, MFR%, HFR%, IRF, RETHe, PLT-O, IPF%, NRBC%, NRBC#

Sysmex- XE -2100

- WBC: leucócitos RBC: eritrócitos HGB: hemoglobina
- HCT : hematócrito MCV: VCM MCH: HCM
- MCHC: CHCM RDW-SD RDW-CV
- PLT: plaquetas MPV: volume médio plaquetáro
- NEUT : neutrófilos LYMPH: linfocitos MONO:monócitos
- EOS: eosinófilos BASO: basófilos IG : granulócitos imaturos RET:reticulóticos
- LFR , MFR e HFR: análise da maturação de reticulócitos pela intensidade de fluorescência em baixa, alta e média fluorescência
- IRF: porcentagem de reticulócitos imaturos
- RETHe: conteúdo de hemoglobina dos reticulócitos
- PLT-O: contagem óptica de plaquetas
- IPF: plaquetas imaturas NRBC: eritroblastos

Sysmex- XE-2100

- Presença de canais diferenciados para análise celular:
  - Canal de hemoglobina
  - Canal de eritrócitos/plaquetas, que mede e conta por impedância em um fluxo com foco hidrodinâmico
  - Canal de diferencial para **neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos** após interação com corante fluorescente

Sysmex- XE-2100

- Canal de leucócitos/**basófilos**, que lisa todas as células menos os basófilos, sendo diferenciados por dispersão de luz frontal e lateral
- Canal de eritroblastos, sendo identificados por intensidade de fluorescência e dispersão frontal da luz. Os eritroblastos apresentam uma quantidade menor de material genético e consequentemente menor fluorescência que os leucócitos.
- Canal de granulócitos imaturos distintos por impedância e corrente de radiofrequência.

Sysmex- XE-2100

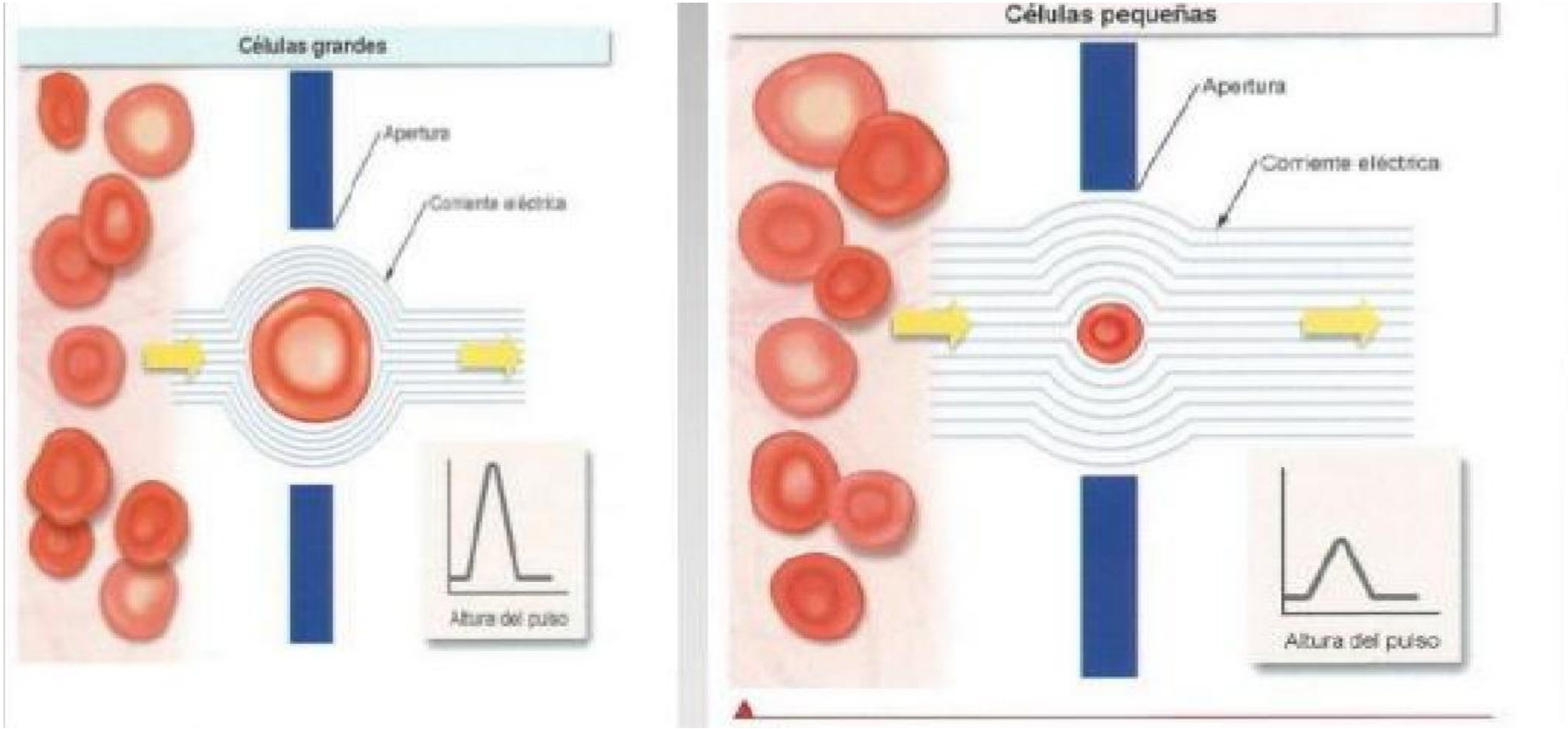
- **Capacidade de processamento**
  - Módulo manual: 60 amostras por hora
  - Módulo automático: 150 amostras por hora

Impedância elétrica

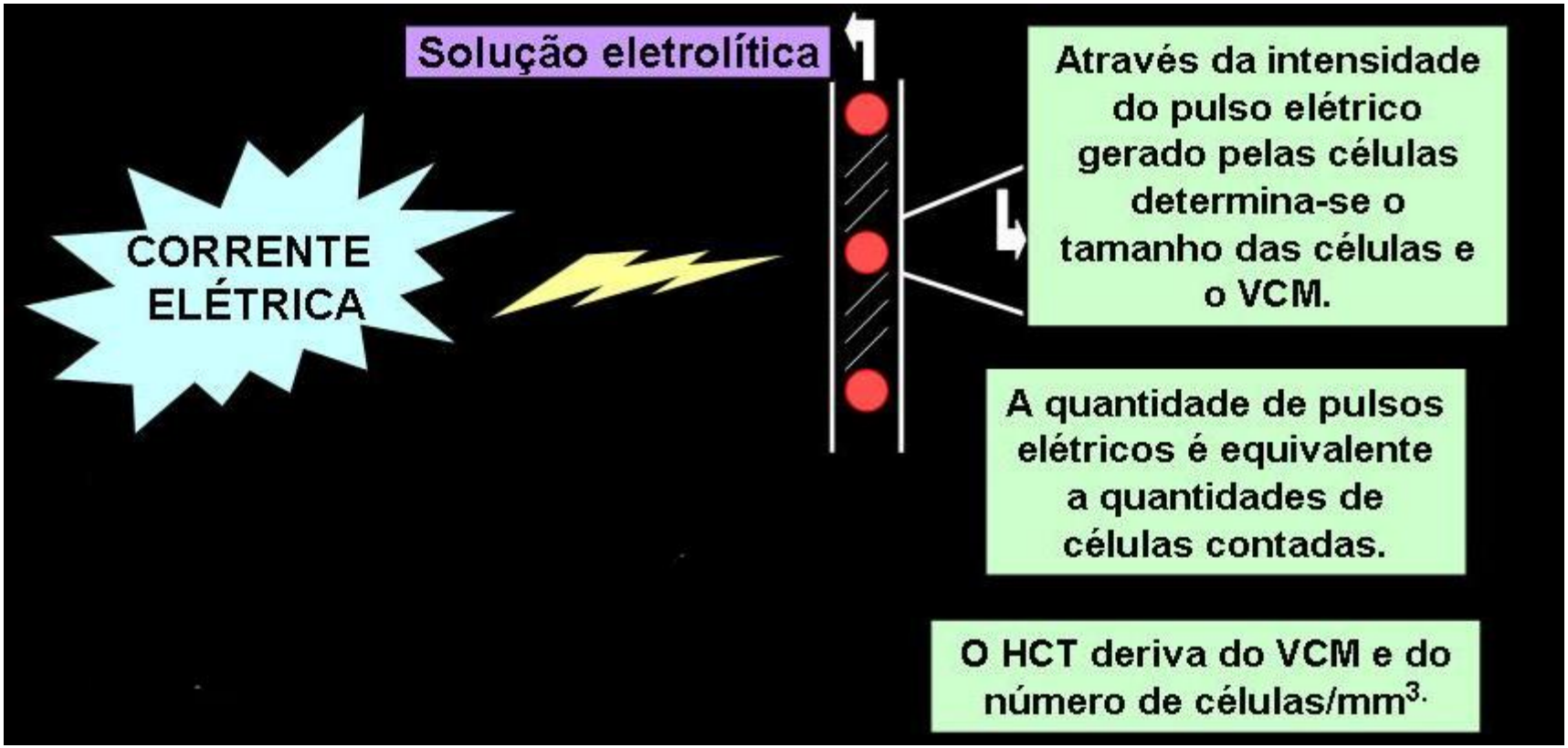
- Origem da automação
- Princípio baseado na característica de má condução elétrica das células, ou seja, são consideradas como partículas não condutoras de eletricidade
- São capazes de diminuir a condução elétrica do meio quando imersas em solução condutora

Impedância elétrica

- As diferentes células sanguíneas são contadas e medidas a partir dos impulsos elétricos que geram quando imersas em um meio condutor (solução eletrolítica).
- As células também são orientadas em um fluxo laminar e interceptadas uma a uma por uma corrente elétrica.
- Importantes para classificação do volume das células, mas incapazes de analisar aspectos internos
- Analisa RBC, PLT e HCT
  - Alguns aparelhos medem o htc a partir do VCM x GV
- Resultados lançados através de histogramas

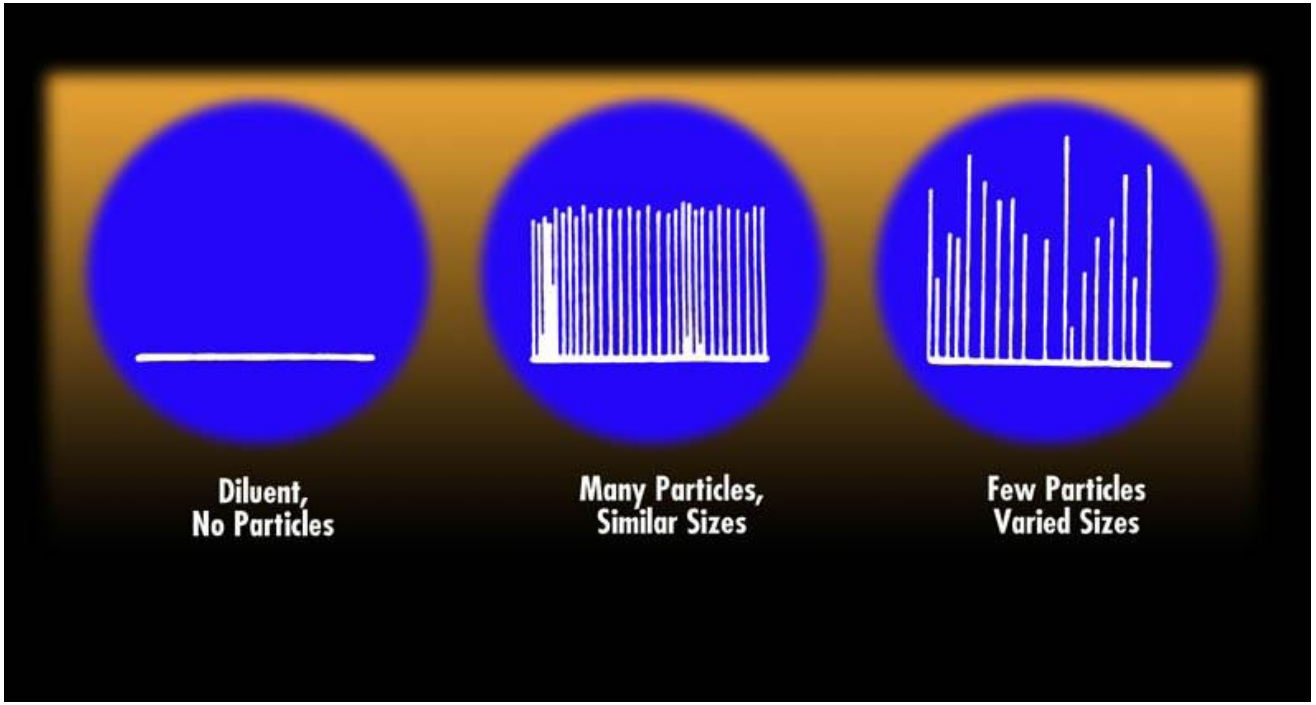


Pulsos elétricos grandes correspondem a células grandes e pulsos elétricos pequenos a células pequenas


Solução eletrolítica
CORRENTE ELÉTRICA
Através da intensidade do pulso elétrico gerado pelas células determina-se o tamanho das células e o VCM.
A quantidade de pulsos elétricos é equivalente a quantidades de células contadas.
O HCT deriva do VCM e do número de células/mm3.

HT= VCM x GV

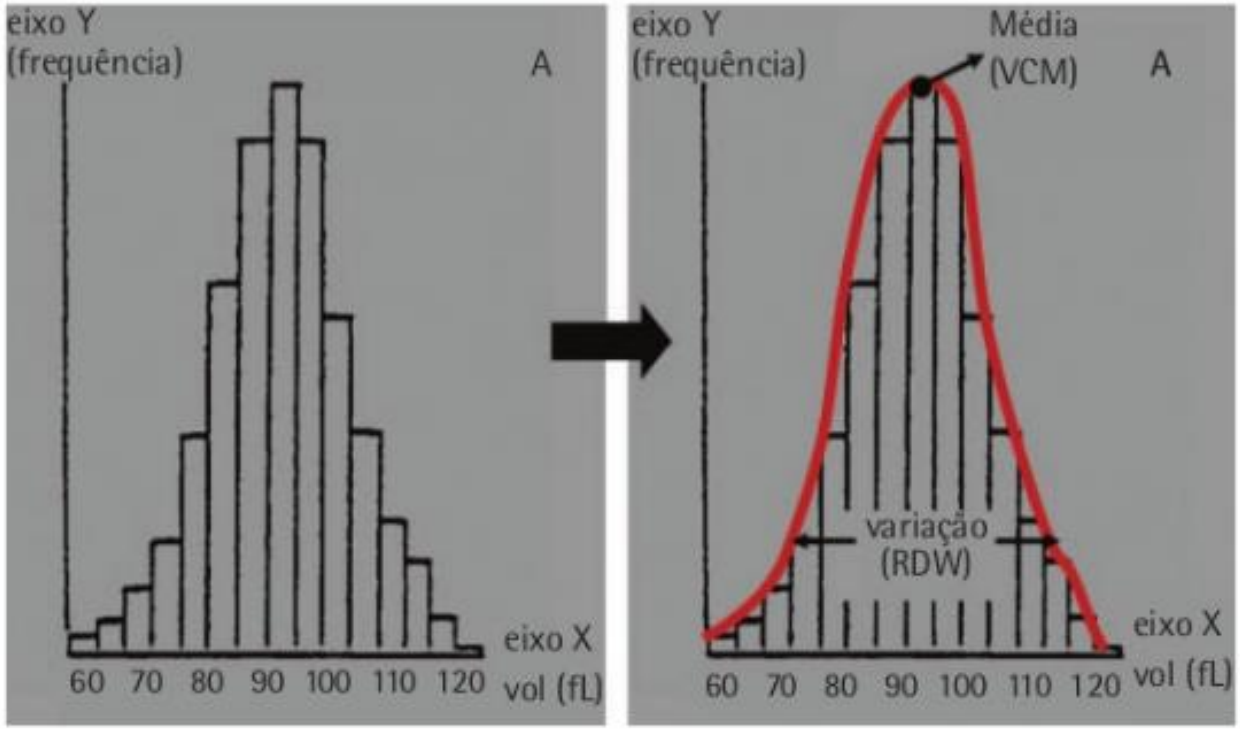
Impedância



Lei de Ohm : V=IR
A voltagem gerada (corrente constante) é proporcional ao tamanho da partícula (obstrução)

A somatória dos impulsos elétricos produzem os histogramas, importantes para analise da variabilidade das populações celulares

Histograma para volume: curva de distribuição dos volumes dos eritrócitos



Radiofrequência

- Princípio que utiliza corrente eletromagnética de alta voltagem
- Útil para determinação do volume e a complexidade do núcleo das células
- Determina os tipos celulares
  - Depende da estrutura interna celular, inclusive relação núcleo citoplasma, densidade nuclear e granularidade.

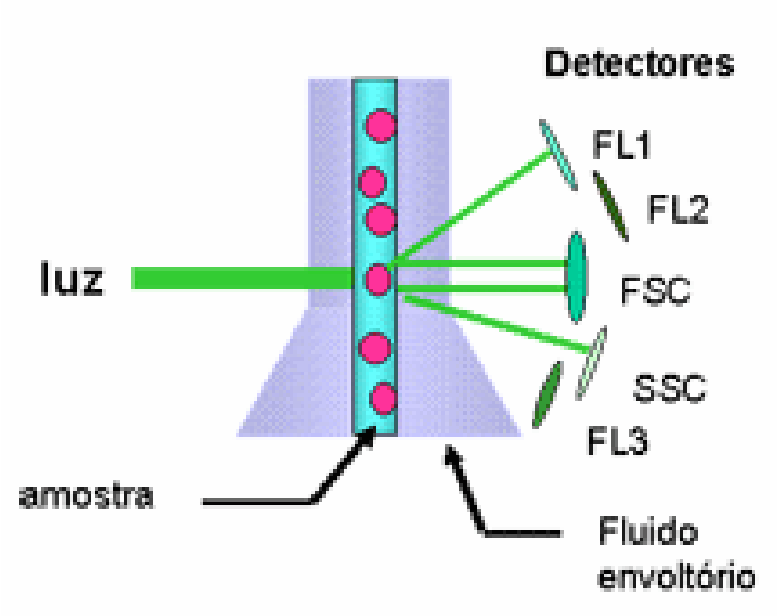
Método de dispersão a laser

- É uma técnica de medição das propriedades de células em suspensão, orientadas em um fluxo laminar e interceptadas uma a uma por um feixe de luz (LASER).
- Baseada na incidência de laser sobre a célula e na dispersão da luz quando incide na mesma
  - Utilizados com fluorescência ou sem fluorescência.
    - Dependem do fabricante
- Avalia tamanho e complexidade interna

Método de dispersão a laser

- **Componentes**
  - Câmara de fluxo
  - Conjunto óptico luminoso (LASER);
  - Amplificador e processador dos sinais luminosos (SENSORES);
  - Sistema computacional integrado para processar as informações oriundas dos sensores.
    - O feixe de laser incidirá sobre cada célula (de forma individual)
    - A radiação incidente sofrerá desvios que serão reconhecidos pelos fotossensores

Dispersão a laser



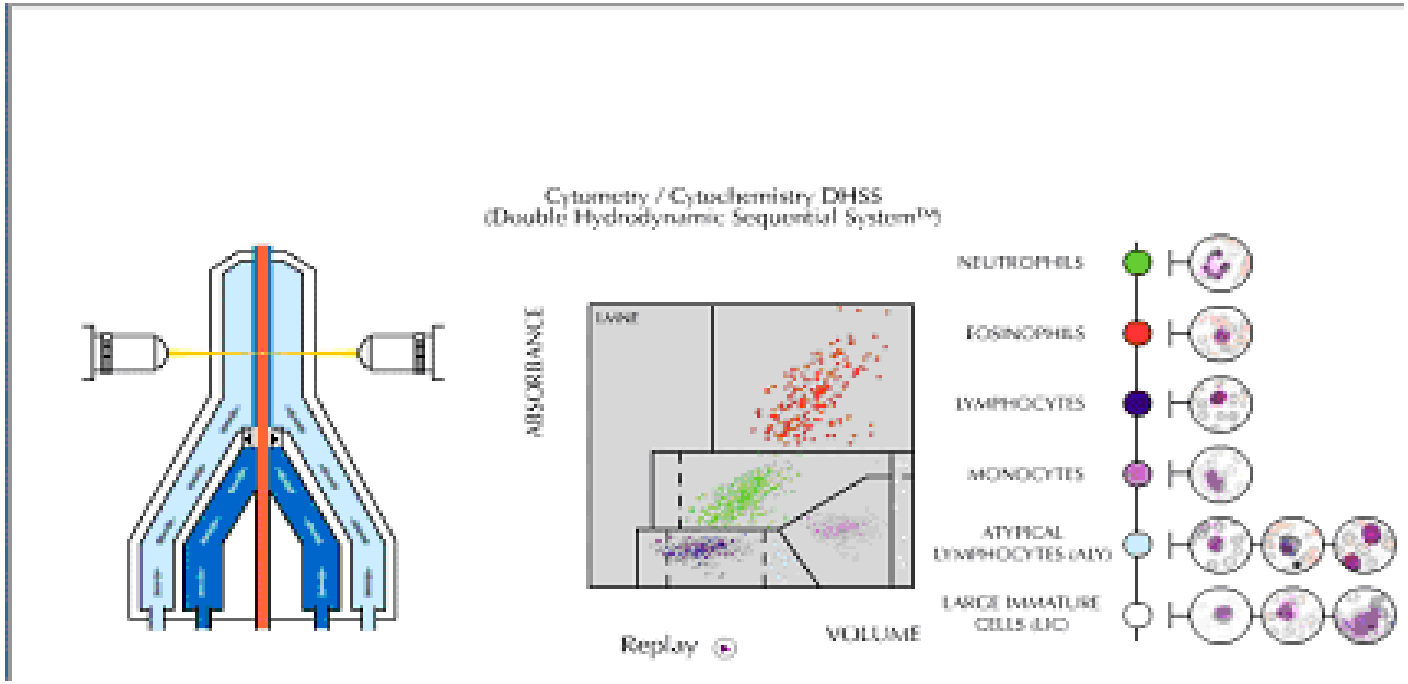
SSC- avalia a granulosidade intracelular através da luz dispersada

FSC – avalia o tamanho da célula pela difração e refração da luz

FL: Sensores especializados em medir intensidade da fluorescência: avalia características e tamanho do núcleo

Contagem total e diferencial de leucócitos

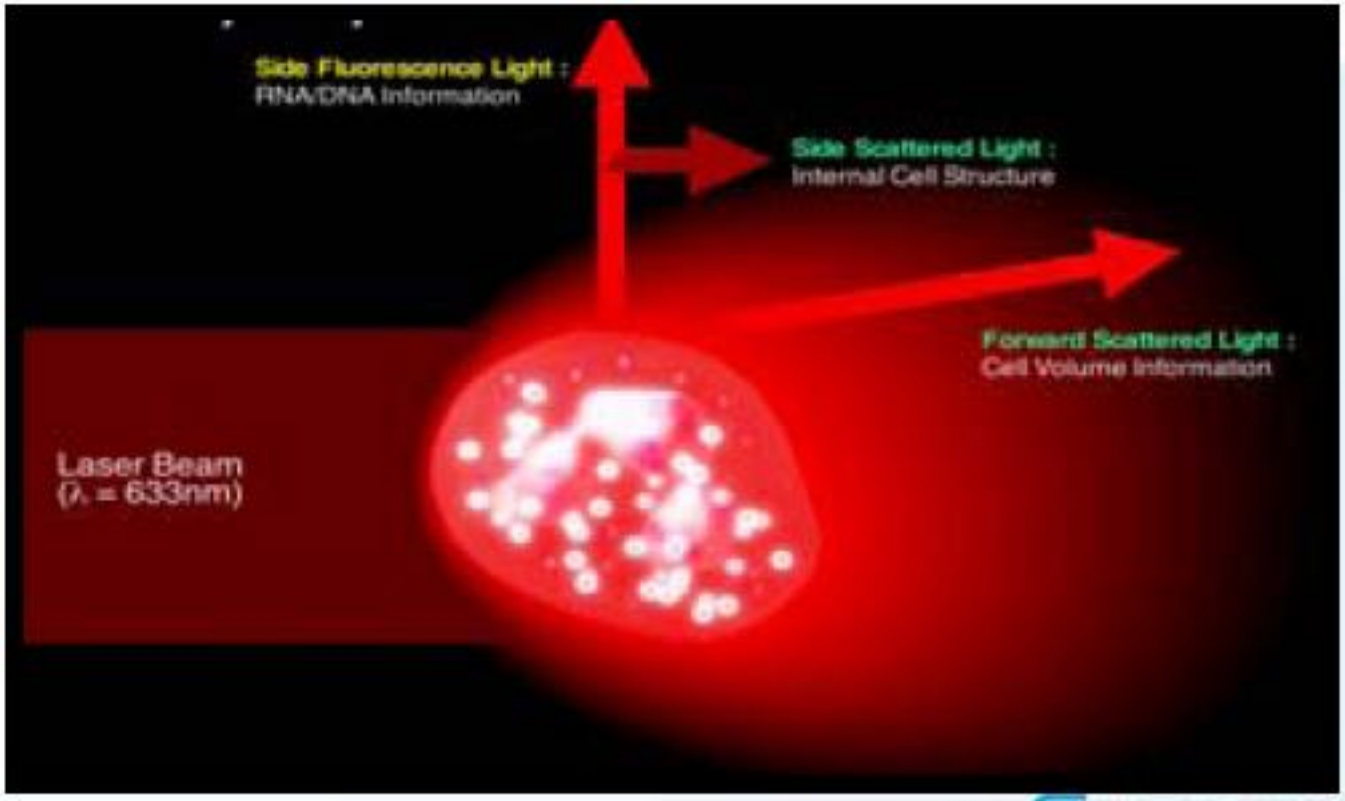
Método de dispersão a laser



As informações provenientes dos diferentes sensores, são agrupadas, formando as características de cada célula que são expressas em um citograma.

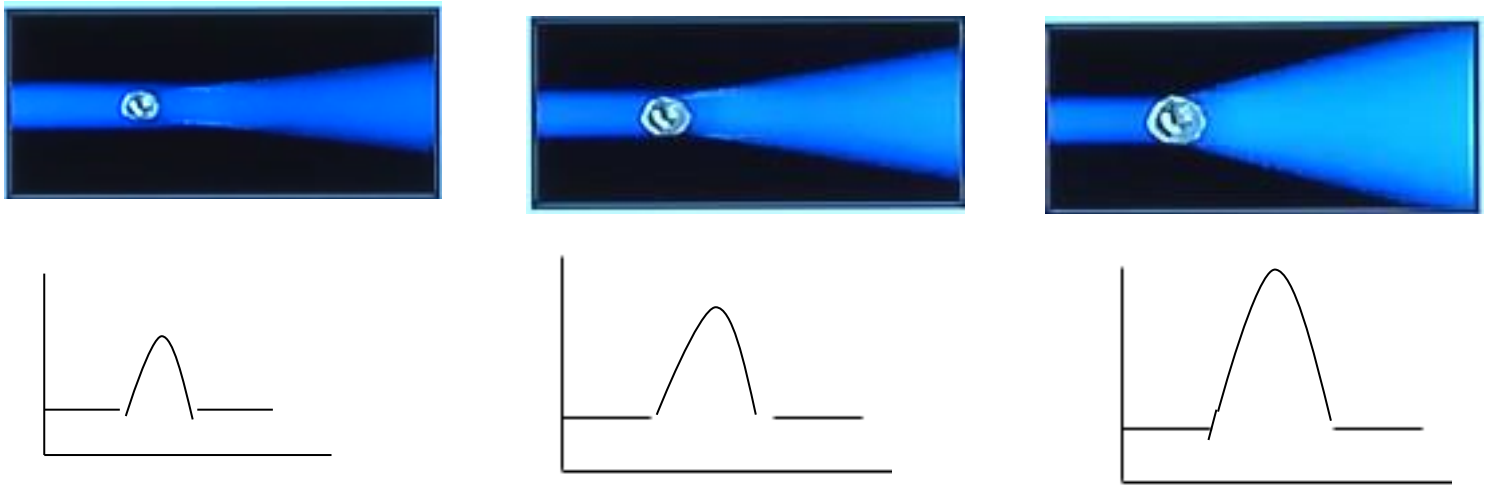
Citometria de Fluxo Fluorescente

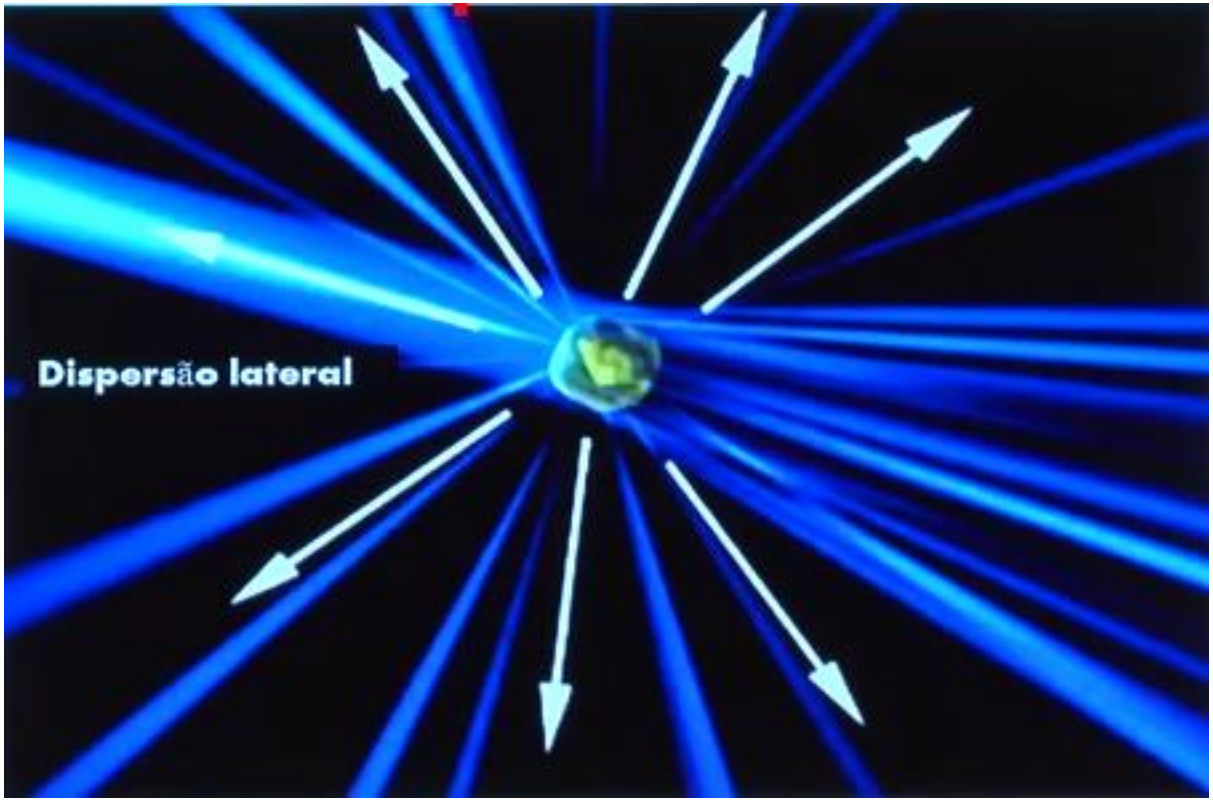
Análise celular



Sysmex

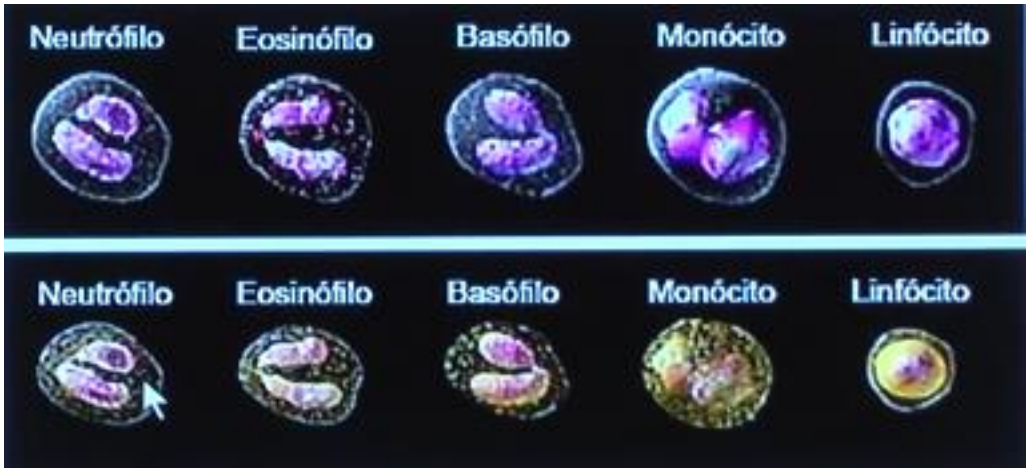
A intensidade da dispersão de luz frontal é convertida em pulso de voltagem





Quanto maior o pulso de voltagem, maior é a complexidade interna da célula

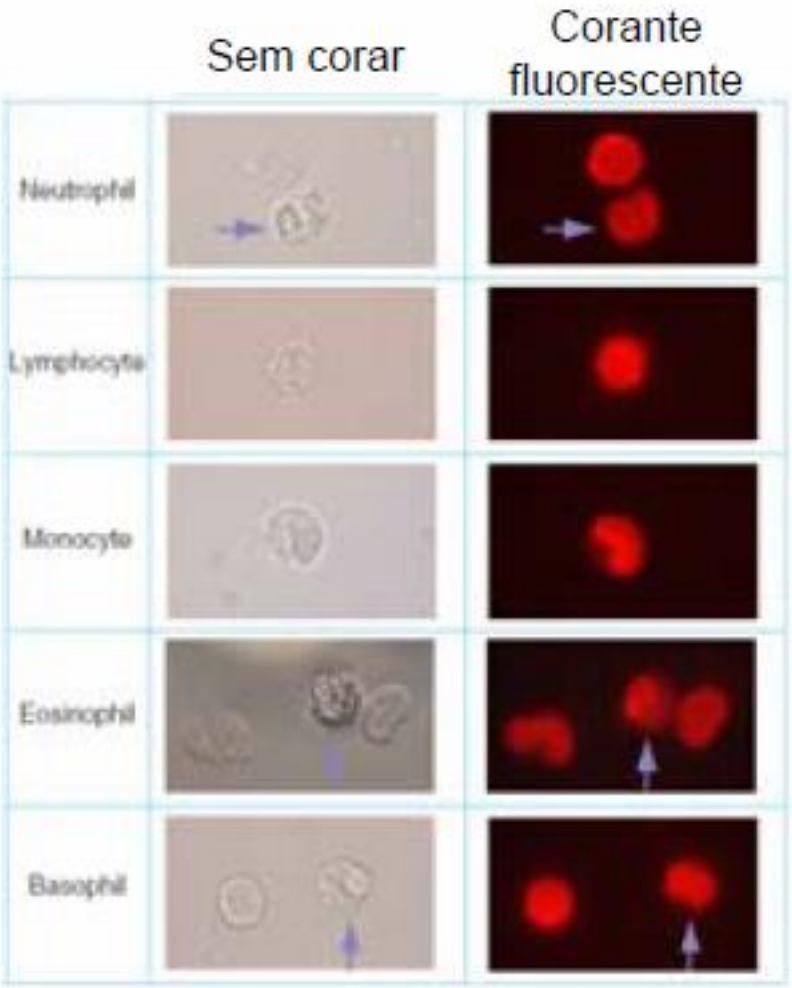
Utilização de corantes fluorescentes que se ligam ao RNA dos ribossomos nas organelas e ao DNA



O laser incide na substância fluorecente e a fluorescência emitida é captada por sensores

O aparelho converte esses sinais em pulsos identificando o tipo celular

Fluorescência: corante Polimetina

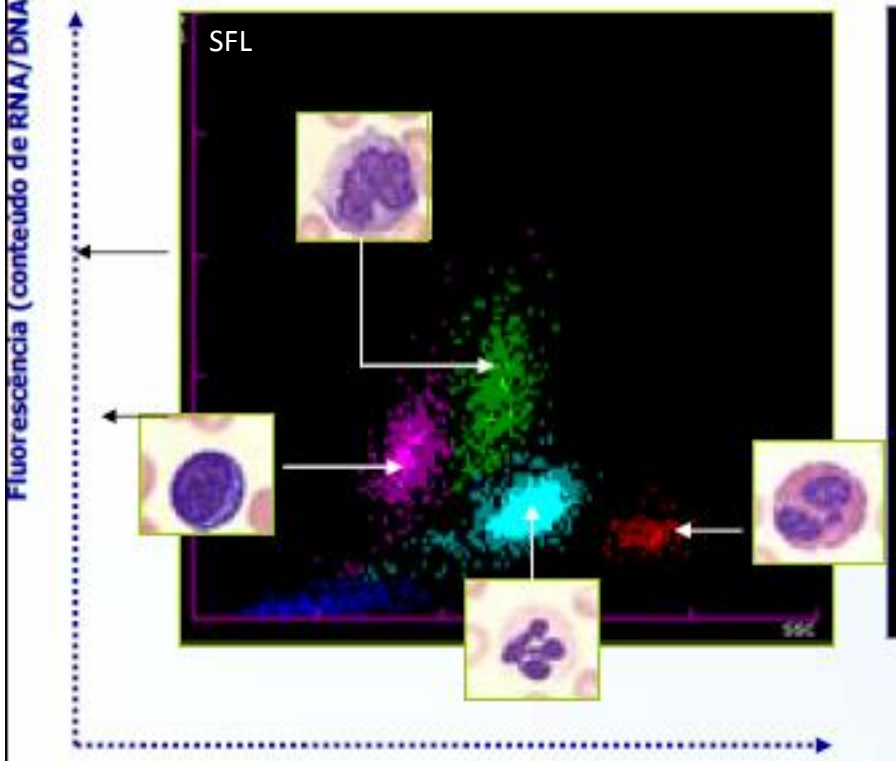


Sysmex

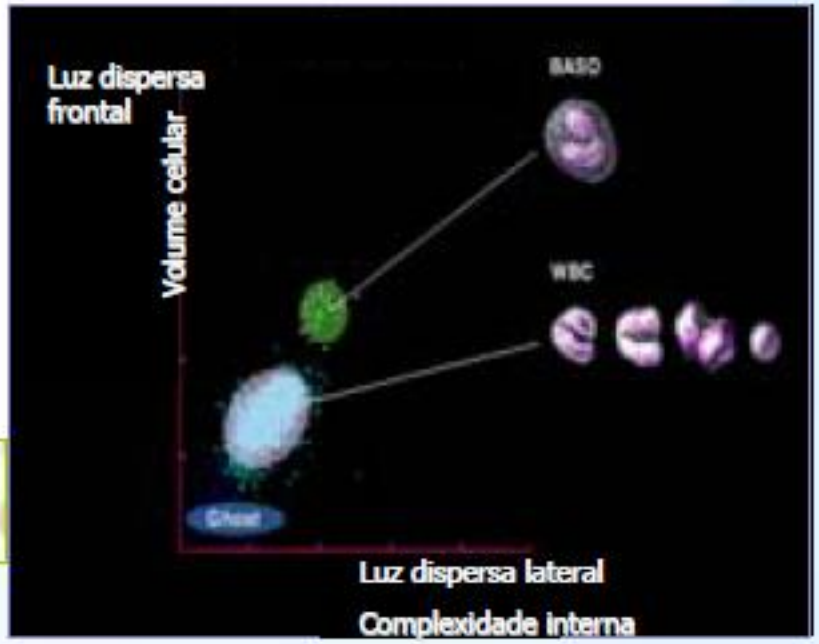
Citometria de Fluxo Fluorescente

XE-2100 Plus/D e XT-1800/2000

Canal DIFF



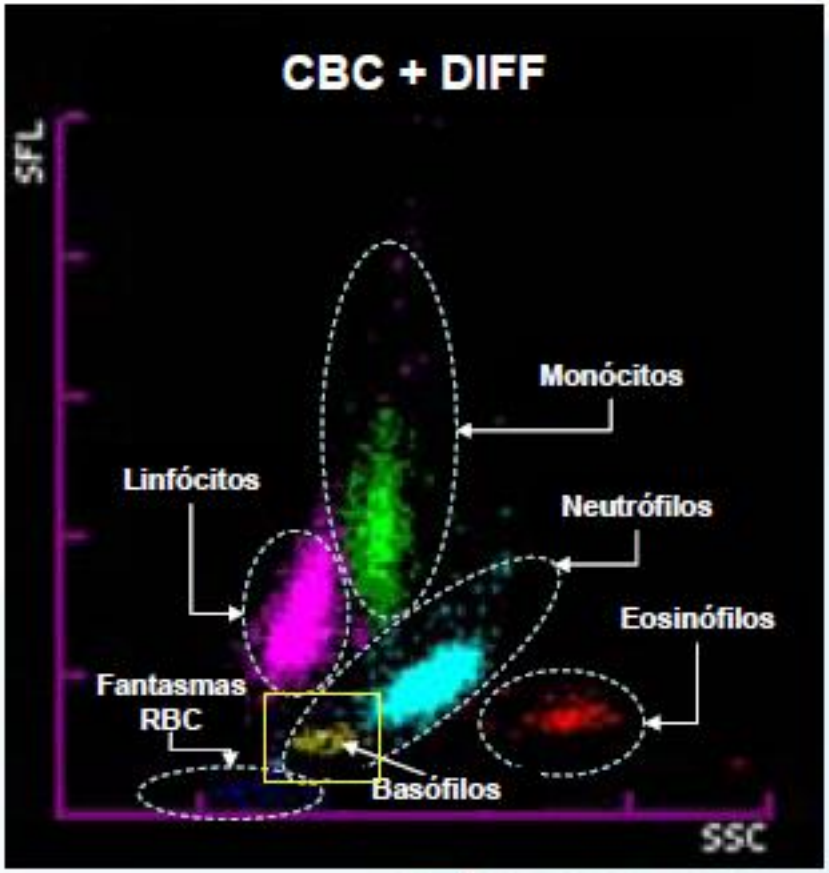
Canal WBC/Baso



Sysmex

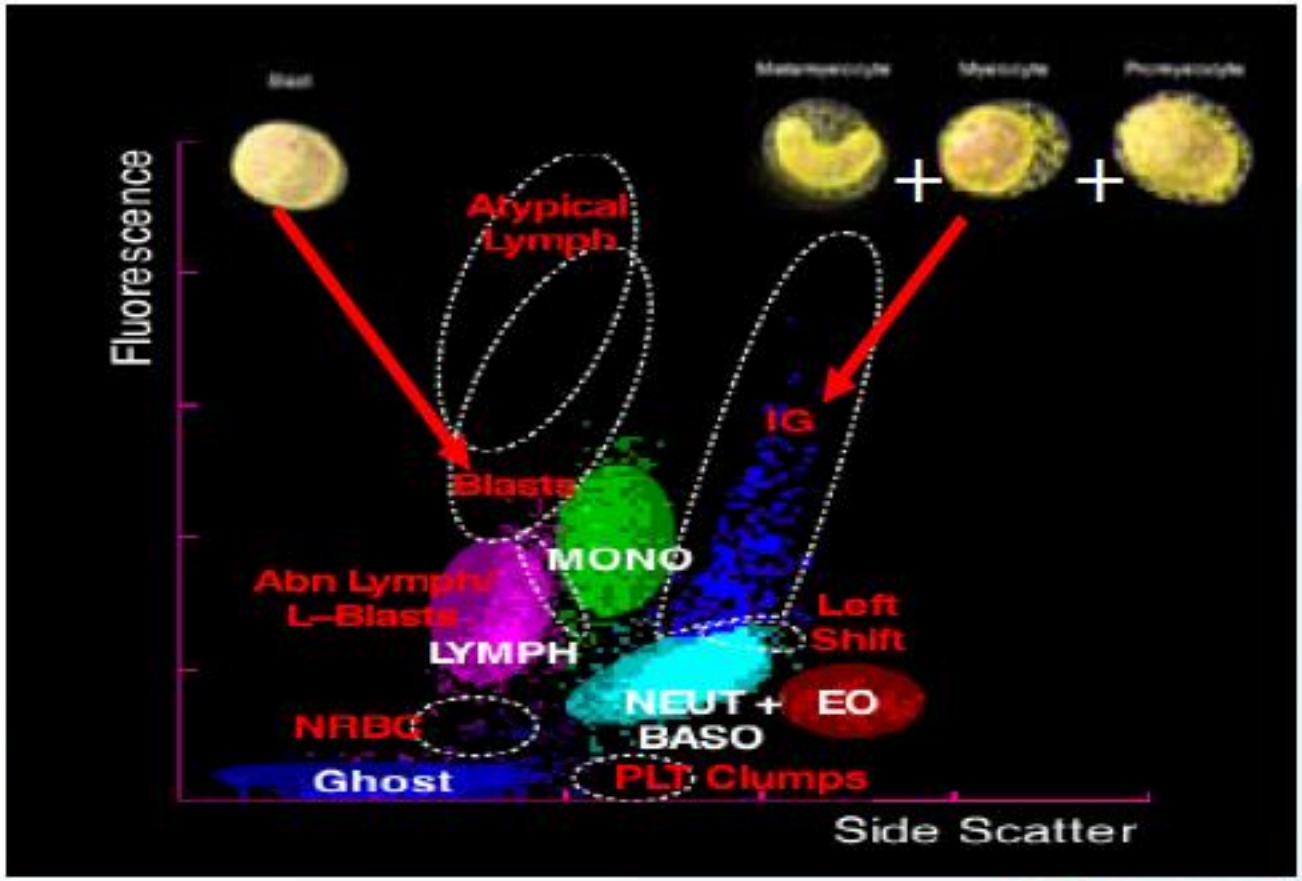
Canal WBC – DIFF
XS-1000*i*

- Citometria de fluxo fluorescente
- Gráfico de dispersão do Canal WBC – DIFF
- Posicionamento celular para uma população normal



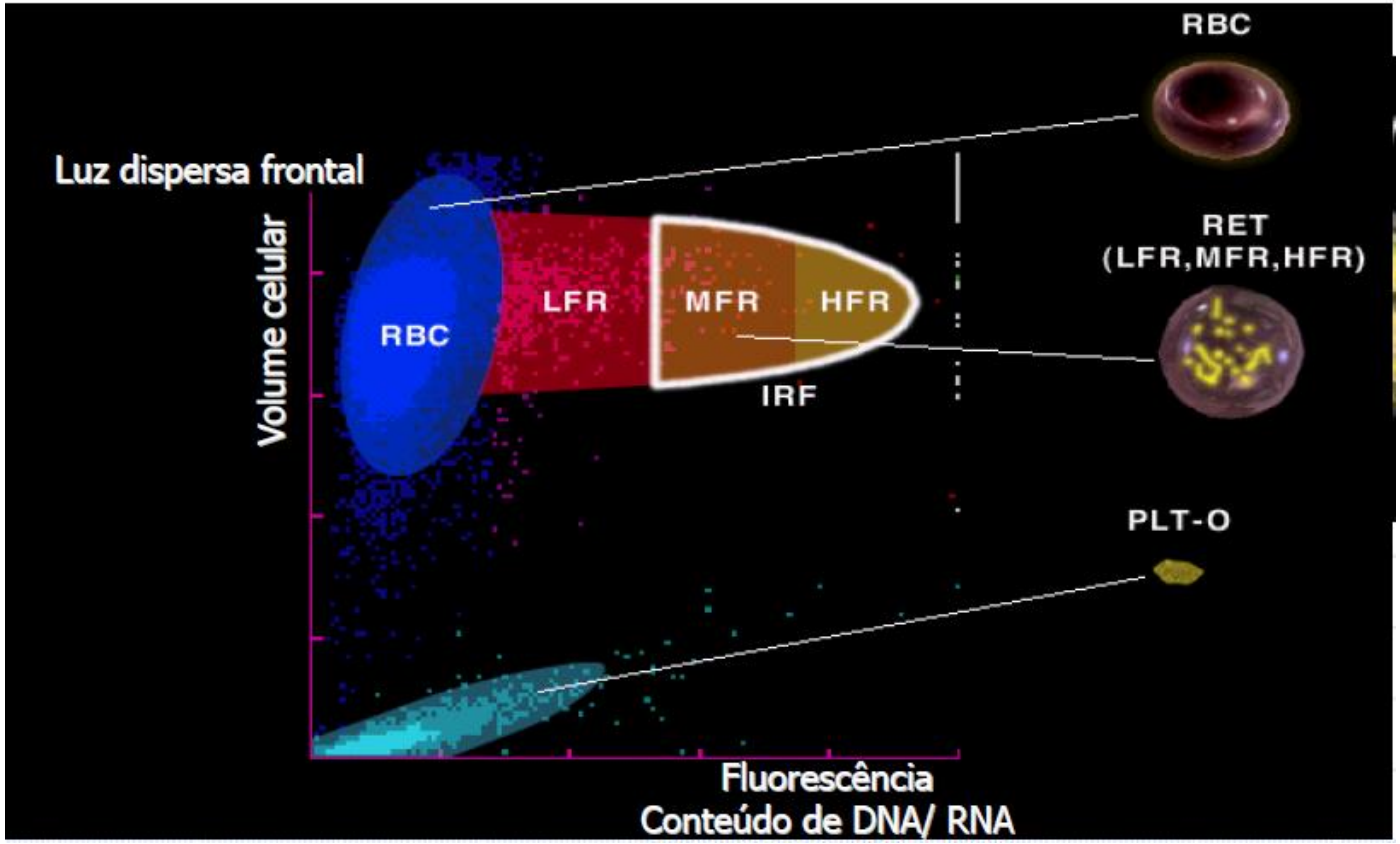
Sysmex

Populações anormais



Sysmex

Canal de reticulócitos e contagem óptica de plaquetas – XE 5000



A contagem dos reticulócitos conta com a coloração dos RNA citoplasmático com fluorescente polimetina

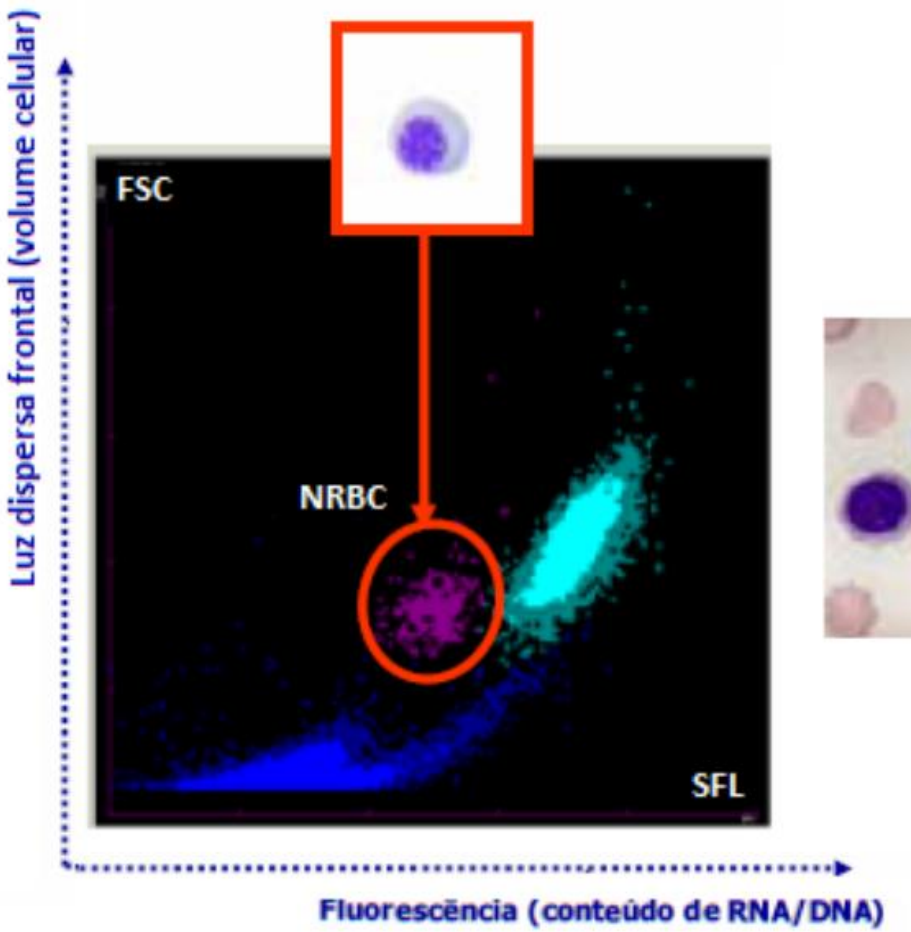
Canal de reticulócitos e contagem óptica de plaquetas – XE 5000

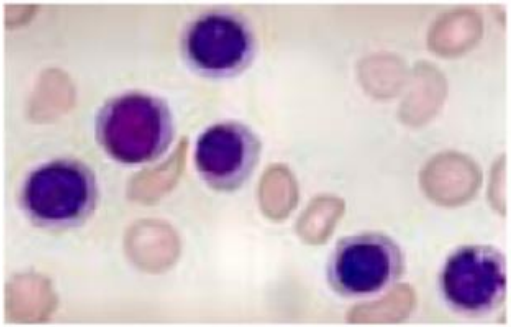
- Relacionados a contagem:
  - Contagem de reticulócitos (%)
  - Correção de reticulócitos
  - Maturação de reticulócitos:
    - RETL %
    - RETM%
    - RETH %
    - IRF (imaturidade de reticulócitos)

Dados clínicos de paciente portador de anemia
Reticulocitograma

	SEM TRATAMENTO	TRATAMENTO 5 DIAS	TRATAMENTO 6 DIAS	TRATAMENTO 7 DIAS	TRATAMENTO 14 DIAS
Eritrócitos $10^6/\mu L$	1,58	2,74	2,50	2,62	2,48
Hemoglobina (g/dL)	4,7	8,4	8,0	8,4	8,7
Hematócrito	13,1	23,4	22,7	24,6	24,7
Plaquetas	71.000	60.000	53.000	91.000	346.000
RET %	1,72	6,26	13,1	12,5	5,8
LFR – RETL%	77,8	28,3	63,8	78,1	80,4
MFR – RETM%	17,6	25,6	23,9	14,0	12,9
HFR – RETH%	4,6	46,1	12,3	7,9	6,7

Canal de eritroblastos





Main | Graph | WBC/NRBC | RBC/PLT | Cumulative | Q-Flags | Service | HPC | Research(W) | Research(R)

Items

Item	Data		Unit
WBC &	24.09	+	10^3/uL
RBC	4.00		10^6/uL
HGB	19.2	+	g/dL
HCT	59.1	+	%
MCV	120.1	+	fL
MCH	39.0	+	pg
MCHC	32.5		g/dL
PLT	148	*	10^3/uL
RDW-SD	77.6	+	fL
RDW-CV	17.7	+	%
PDW	12.3	*	fL
MPV	10.8	*	fL
P-LCR	31.6	*	%
PCT	0.16	*	%
RET%	2.27		%
RET#	0.1117		10^6/uL
IRF	30.5		%
LFR	69.5		%
MFR	22.0		%
HFR	8.5		%
NRBC#	3.01		10^3/uL
NRBC%	12.5		/100WBC

WBC Differential

Item	Data		Unit
IG#	0.01		10^3/uL
NEUT#	11.05		10^3/uL
LYMP#	11.64		10^3/uL
MONO#	0.05	*	10^3/uL
EO#	0.25	*	10^3/uL
BASO#	0.19	*	10^3/uL
OTHER#	0.00		10^3/uL

Item	Data		Unit
IG%	0.0		%
NEUT%	46.0		%
LYMP%	48.3		%
MONO%	3.0	*	%
EO%	1.0	*	%
BASO%	0.8	*	%
OTHER%	0.0		%

Flag(s)

WBC

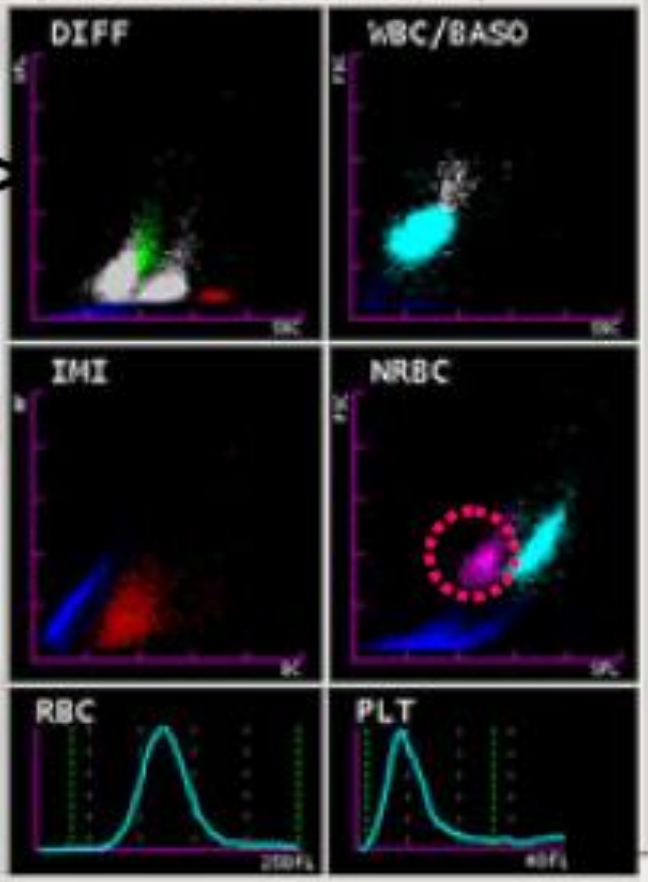
Blasts?
Imm Gran?
WBC Abn Scg
NRBC Present

RBC/RET

Aniso
Macro

PLT

PLT Abn Scg
Thrombo-



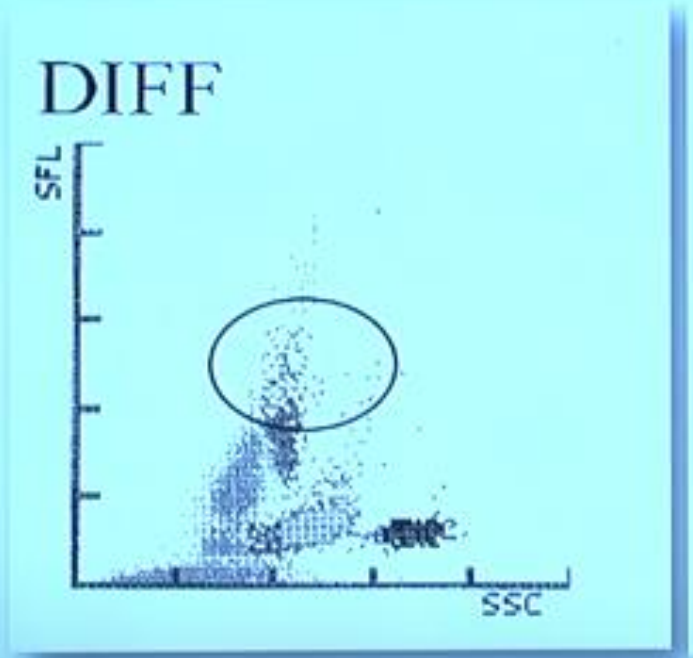
Sysmex

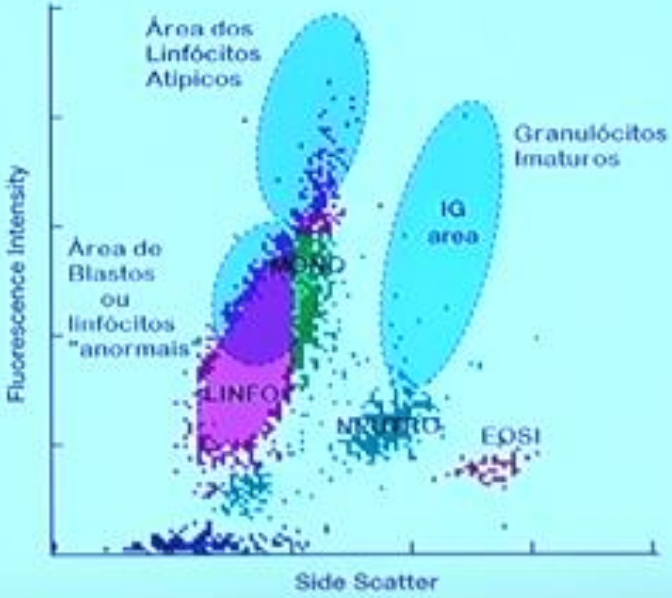
Flags

- Flags comuns em aparelhos que utilizam dispersão a laser
  - Blastos
  - Granulócitos imaturos
  - Linfócitos atípicos
  - Células progenitoras hematopoéticas
  - Eritroblastos

Exemplos do uso dos histogramas

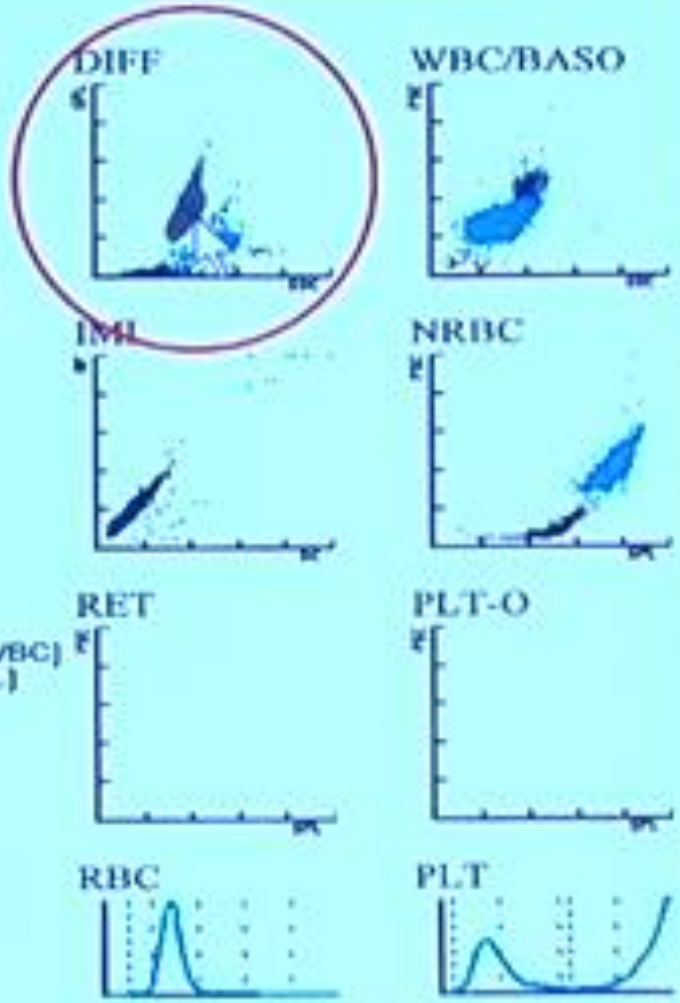
Sysmex





Positive
Morph.

WBC	27.32	[10^9/L]			
RBC	4.42	[10^12/L]			
HGB	6.6	[mmol/L]			
HCT	0.314	[Ratio]			
MCV	71.0	[fL]			
MCH	1.493	[fmol]			
MCHC	21.0	[mmol/L]			
PLT	267	[10^9/L]			
RDW-SD	37.9	[fL]			
RDW-CV	14.5	[%]			
PDW	9.7	[fL]			
MPV	9.2	[fL]			
P-LCR	17.8	[%]			
PCT	0.25	[%]			
NEUT	—	[10^9/L]	—	[%]	
LYMPH	—	[10^9/L]	—	[%]	
MONO	—	[10^9/L]	—	[%]	
EO	0.03	[10^9/L]	0.1	[%]	
BASO	0.90	[10^9/L]	3.3	[%]	*
IG	—	[10^9/L]	—	[%]	
NRBC#	0.00	[10^9/L]	0.0	[/100WBC]	
RET		[%%]		[10^9/L]	
IRF		[%]			
LFR		[%]			
MFR		[%]			
HFR		[%]			
RET-He		[fmol]			



WBC IP Message(s)
WBC Abn Scattergram

Atypical Lympho?
Abn Lympho/L_Blasts?

RBC/RET IP Message(s)

PLT IP Message(s)

Confirmação através da leitura da lâmina!!!

Table 24–6. NINETY-FIVE PER CENT CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS PERCENTAGES OF BLOOD CELLS OF A GIVEN TYPE AS DETERMINED BY DIFFERENTIAL COUNTS

a	n = 100	n = 200	n = 500	n = 1000	n = 10,000
0	0.0– 3.6	0.0– 1.8	0.0– 0.7	0.0– 0.4	0.0– 0.1
1	0.0– 5.4	0.1– 3.6	0.3– 2.3	0.5– 1.8	0.8– 1.3
2	0.2– 7.0	0.6– 5.0	1.0– 3.6	1.2– 3.1	1.7– 2.3
3	0.6– 8.5	1.1– 6.4	1.7– 4.9	2.0– 4.3	2.6– 3.4
4	1.1– 9.9	1.7– 7.7	2.5– 6.1	2.9– 5.4	3.6– 4.5
5	1.6– 11.3	2.4– 9.0	3.3– 7.3	3.7– 6.5	4.5– 5.5
6	2.2– 12.6	3.1– 10.2	4.1– 8.5	4.6– 7.7	5.5– 6.5
7	2.9– 13.9	3.9– 11.5	4.9– 9.6	5.5– 8.8	6.5– 7.6
8	3.5– 15.2	4.6– 12.7	5.8– 10.7	6.4– 9.9	7.4– 8.6
9	4.2– 16.4	5.4– 13.9	6.6– 11.9	7.3– 10.9	8.4– 9.6
10	4.9– 17.6	6.2– 15.0	7.5– 13.0	8.2– 12.0	9.4– 10.7
15	8.6– 23.5	10.4– 20.7	12.0– 18.4	12.8– 17.4	14.3– 15.8
20	12.7– 29.2	14.7– 26.2	16.6– 23.8	17.6– 22.6	19.2– 20.8
25	16.9– 34.7	19.2– 31.6	21.3– 29.0	22.3– 27.8	24.1– 25.9
30	21.2– 40.0	23.7– 36.9	26.0– 34.2	27.2– 32.9	29.1– 31.0
35	25.7– 45.2	28.4– 42.0	30.8– 39.4	32.0– 38.0	34.0– 36.0
40	30.3– 50.3	33.2– 47.1	35.7– 44.4	36.9– 43.1	39.0– 41.0
45	35.0– 55.3	38.0– 52.2	40.6– 49.5	41.9– 48.1	44.0– 46.0
50	39.8– 60.2	42.9– 57.1	45.5– 54.5	46.9– 53.1	49.0– 51.0
55	44.7– 65.0	47.8– 62.0	50.5– 59.4	51.9– 58.1	54.0– 56.0
60	49.7– 69.7	52.9– 66.8	55.6– 64.3	56.9– 63.1	59.0– 61.0
65	54.8– 74.3	58.0– 71.6	60.6– 69.2	62.0– 68.0	64.0– 66.0
70	60.0– 78.8	63.1– 76.3	65.8– 74.0	67.1– 72.8	69.0– 70.9
75	65.3– 83.1	68.4– 80.8	71.0– 78.7	72.2– 77.7	74.1– 75.9
80	70.8– 87.3	73.8– 85.3	76.2– 83.4	77.4– 82.4	79.2– 80.8
85	76.5– 91.4	79.3– 89.6	81.6– 88.0	82.6– 87.2	84.2– 85.7
90	82.4– 95.1	85.0– 93.8	87.0– 92.5	88.0– 91.8	89.3– 90.6
91	83.6– 95.8	86.1– 94.6	88.1– 93.4	89.1– 92.7	90.4– 91.6
92	84.8– 96.5	87.3– 95.4	89.3– 94.2	90.1– 93.6	91.4– 92.6
93	86.1– 97.1	88.5– 96.1	90.4– 95.1	91.2– 94.5	92.4– 93.5
94	87.4– 97.8	89.8– 96.9	91.5– 95.9	92.3– 95.4	93.5– 94.5
95	88.7– 98.4	91.0– 97.6	92.7– 96.7	93.5– 96.3	94.5– 95.5
96	90.1– 98.9	92.3– 98.3	93.9– 97.5	94.6– 97.1	95.5– 96.4
97	91.5– 99.4	93.6– 98.9	95.1– 98.3	95.7– 98.0	96.6– 97.4
98	93.0– 99.8	95.0– 99.4	96.4– 99.0	96.9– 98.8	97.7– 98.3
99	94.6– 99.9	96.4– 99.9	97.7– 99.7	98.2– 99.5	98.7– 99.2
100	96.4–100.0	98.2–100.0	99.3–100.0	99.6–100.0	99.9–100.0

- https://www.youtube.com/watch?v=EQXPJ7eeesQ

Tudo isso é matéria de prova?

Sim!!!!!!

Correção de leucócitos

O cálculo se dá da seguinte forma:
1) Soma-se o total de eritroblastos encontrados aos 100 leucócitos contados diferencialmente.
2) cálculo: Contagem global x 100 / Soma de eritroblatos e leucócitos contados diferencialmente.

Exemplo: 12.000 leucócitos (contagem global)
14 eritroblastos encontrados no diferencial
100 células contadas no diferencial
Conta: 12.000 x 100 / 114
Resultado: 10526 (contagem global corrigida - leucócitos /mm3)