

REVISÃO DA TÉCNICA DA CURVA DE FRAGILIDADE OSMÓTICA NO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

Mirian de Fátima da Silva

RESUMO

A curva de fragilidade osmótica é um dos métodos de se avaliar a resistência dos glóbulos vermelhos quando expostos a concentrações decrescentes de soluções salinas. O objetivo deste trabalho foi validar a técnica empregada no Instituto Naoum, de São José do Rio Preto (INSJRP), no Serviço de Hematologia e Hemoterapia de São José dos Campos (SHHSJC). Para isso, a técnica do INSJRP foi realizada em paralelo com a utilizada no SHHSJC.

INTRODUÇÃO

A esferocitose hereditária é um tipo de anemia hemolítica não imunológica, causada por alterações qualitativas e/ou quantitativas das proteínas constitucionais da membrana dos eritrócitos. Consequentemente, ocorre maior fragilidade osmótica das hemácias comprometidas que são degradadas pelo baço. O resultado morfológico desse processo é o surgimento de glóbulos vermelhos de formato esférico, com maior densidade que as hemácias normais. (BEHRMAN et al, 2005; FAILACE R., 2009; GRANJO et al, 2003).

A esferocitose é uma patologia de caráter genético, herdada de forma autossômica dominante, e pode ser classificada em leve, moderada ou grave, de acordo com sua apresentação clínica. Os indivíduos afetados podem ser assintomáticos, sem anemia e com hemólise compensada ou podem cursar com os sinais e sintomas de uma anemia hemolítica grave (BEHRMAN et al, 2005).

O teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos foi definido como um dos métodos para se avaliar a variação da resistência dos glóbulos vermelhos, quando estas células são expostas a soluções salinas de concentrações decrescentes. (Hermes Pardini 2015)

Estudos evidenciam que há um aumento da resistência globular na anemia ferropriva, assim como na talassemia. Por outro lado, ocorre uma diminuição dessa resistência na esferocitose hereditária e na esferocitose associada a anemias hemolíticas autoimunes (Bain, Barbara J. 2004)

A técnica atualmente empregada no SHHSJC apresenta dificuldades na obtenção das suas diluições, demandando o preparo de vários reagentes.

A técnica utilizada no INSJPR utiliza diluições não fracionadas (com volumes inteiros), o que facilita suas obtenções e diminui a demanda de reagentes

O teste de fragilidade é de difícil padronização e, por esse motivo, pouco realizada nos laboratórios.

OBJETIVO

Revisão e validação da técnica de curva de fragilidade osmótica utilizada no INSJRP no SHHSJC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Técnica realizada no SHHSJC

✓ ***Solução estoque de NaCl a 10% ph 7,4***

-NaCl - 45 g

-Na₂HPO₄ - 6,825 g

- NaH₂PO₄ . H₂O – 1,41 g

-Água deionizada qsp - 500 ml

✓ ***Solução trabalho 0,9 a 0,1%:*** preparara-se 9 soluções em diferentes concentrações de NaCl seguindo a tabela abaixo:

Tubo	Solução estoque NaCl 10%	Água deionizada	Concentração de NaCl
01	9,0 mL	91 mL	0,9%
02	8,0 mL	92 mL	0,8 %
03	7,5 mL	92,5 mL	0,75 %
04	6,5 mL	93,5mL	0,65%
05	6,0 mL	94 mL	0,6%
06	5,5 mL	94,5mL	0,55%
07	5,0 mL	95 mL	0,5%
08	4,5 mL	95,5 mL	0,45%
09	4,0 mL	95 mL	0,5%
10	3,5mL	96,5 mL	0,35%
11	3 mL	97ml	0,3%
12	2 mL	98 mL	0,2%
13	1ml	99ml	0,1%

- ✓ Numera-se 13 tubos de ensaios :
- ✓ No tubo nº1, coloca-se 5ml de solução 0,9%; no tubo nº2, coloca-se 5ml solução 0,8%; no tubo nº 3, coloca-se 5ml de solução 0,75% e assim por diante.
- ✓ Coloca-se, em cada tubo, 50µl de amostra de sangue (heparinizado).
- ✓ Os tubos são homogeneizados suavemente, sem agitar;
- ✓ Os tubos ficam em repouso por 30 minutos, em temperatura ambiente, em seguida, são centrifugados em rotação 1200 a 1500 por 5 minutos;
- ✓ A leitura é feita com (em) espectrofotômetro em 546 nm, utilizando o tubo nº1 como branco, para acertar o zero.
- ✓ O 1.º valor foi dividido por ele mesmo e multiplicado por 100, correspondendo a 100%; o 2.º pelo 1.º x 100; o 3.º pelo 1.º x 100; e assim por diante. A leitura é feita com espectrofotômetro, e o resultado liberado em unidades de absorbância.

MATERIAIS E MÉTODOS INSJPR

✓ **Solução estoque de NaCl a 10%**

-NaCl - 9 g

-Na₂HPO₄ - 1,36 g

- NaH₂PO₄ . H₂O - 0,27 g

-Água deionizada qsp - 100 ml

✓ **Solução trabalho 0,9 a 0,1%:** preparara-se 9 soluções em diferentes concentrações de NaCl seguindo a tabela abaixo:

Tubo	Solução estoque NaCl 10%	Água deionizada	Concentração de NaCl
01	9,0 mL	91 MI	0,9%
02	8,0 mL	92 MI	0,8 %
03	7,0 mL	93 MI	0,7 %
04	6,0 mL	94 MI	0,6%
05	5,0 mL	95 MI	0,5%
06	4,0 mL	96 MI	0,4%
07	3,0 mL	97MI	0,3%
08	2,0 mL	98 MI	0,2%
09	1,0 ml	99 MI	0,1%

- ✓ Numera-se 9 tubos de ensaios :
- ✓ No tubo nº1, coloca-se 5ml de solução 0,9%; no tubo nº2, coloca-se 5ml solução 0,8%; no tubo nº 3, coloca-se 5ml de solução 0,7% e assim por diante.
- ✓ Coloca-se, em cada tubo, 50µl de amostra de sangue (heparinizado).
- ✓ Os tubos são homogeneizados suavemente, sem agitar;
- ✓ Os tubos ficam em repouso por 15 minutos, em temperatura ambiente, em seguida, são centrifugados em rotação 1500 a 2000, por 5 minutos;
- ✓ A leitura é feita com (em) espectrofotômetro em 546 nm, utilizando o tubo 1 como branco, para acertar o zero.
- ✓ O 1.º valor foi dividido por ele mesmo e multiplicado por 100, correspondendo a 100%; o 2.º pelo 1.º x 100; o 3.º pelo 1.º x 100; e assim por diante. A leitura é feita com espectrofotômetro, e o resultado liberado em unidades de absorbância.

RESULTADOS

A validação da técnica do INSJRP foi realizada em paralelo com a técnica já utilizada no SHHSJC.

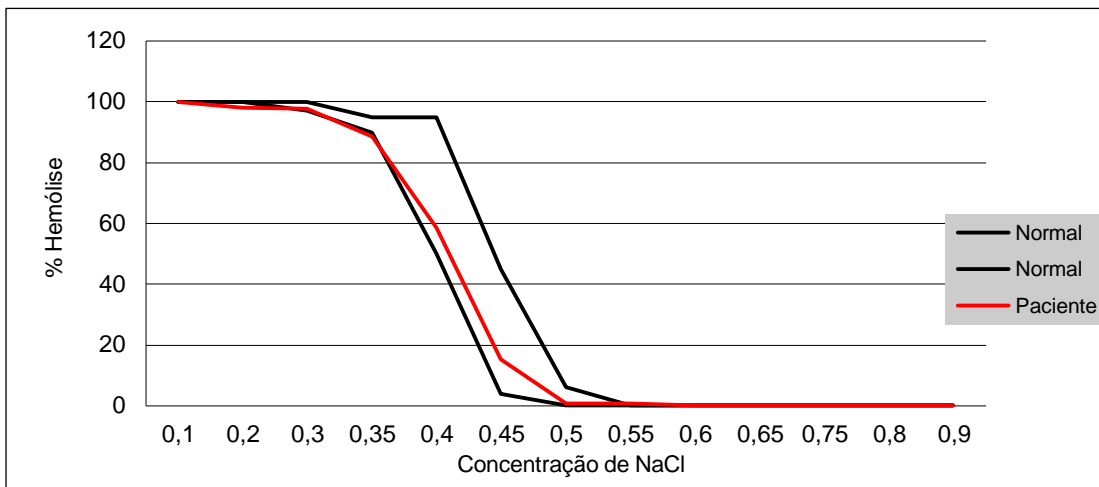


Figura 1- Controle Normal

Fonte: Técnica SHHSJC

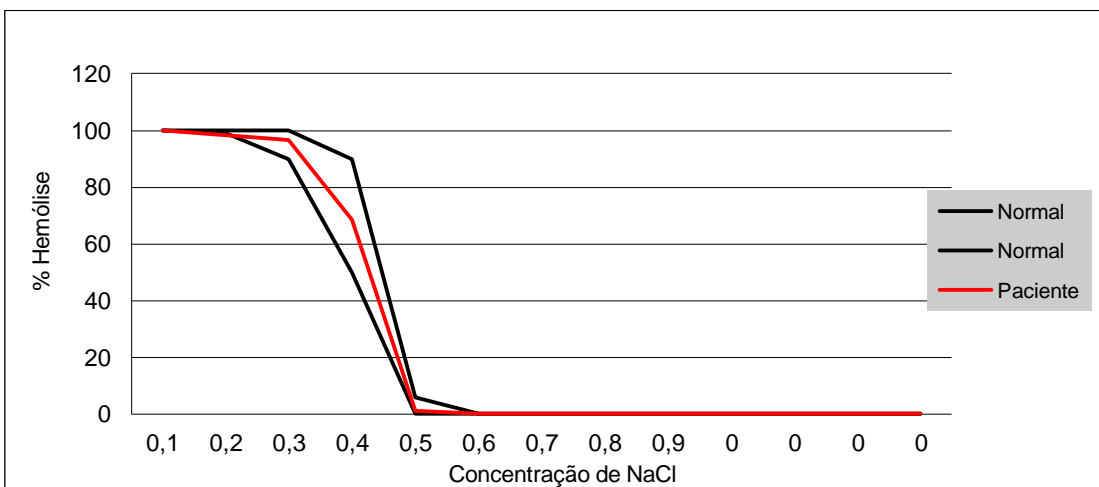


Figura 2- Controle Normal

Fonte: Técnica INSJRP

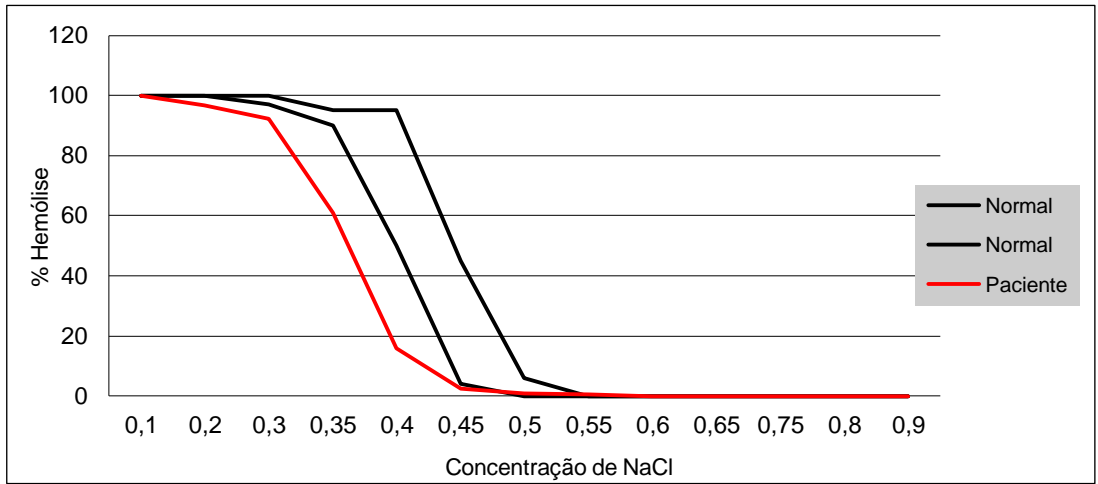


Figura 3- Anemia Falciforme

Fonte: Técnica SHHSJC

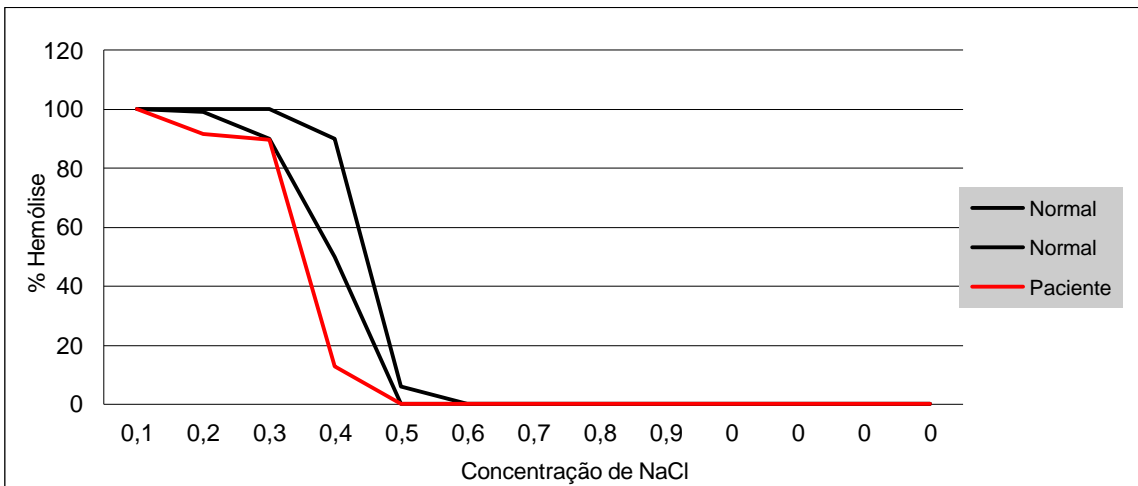


Figura 4- Anemia Falciforme

Fonte: Técnica INSJRP

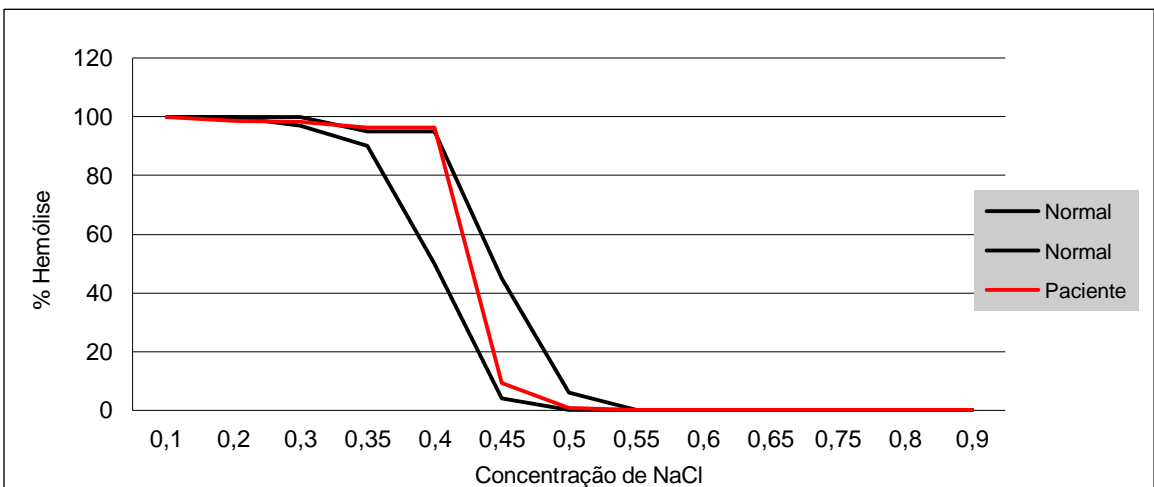


Figura 5- Paciente normal

Fonte: Técnica SHHSJC

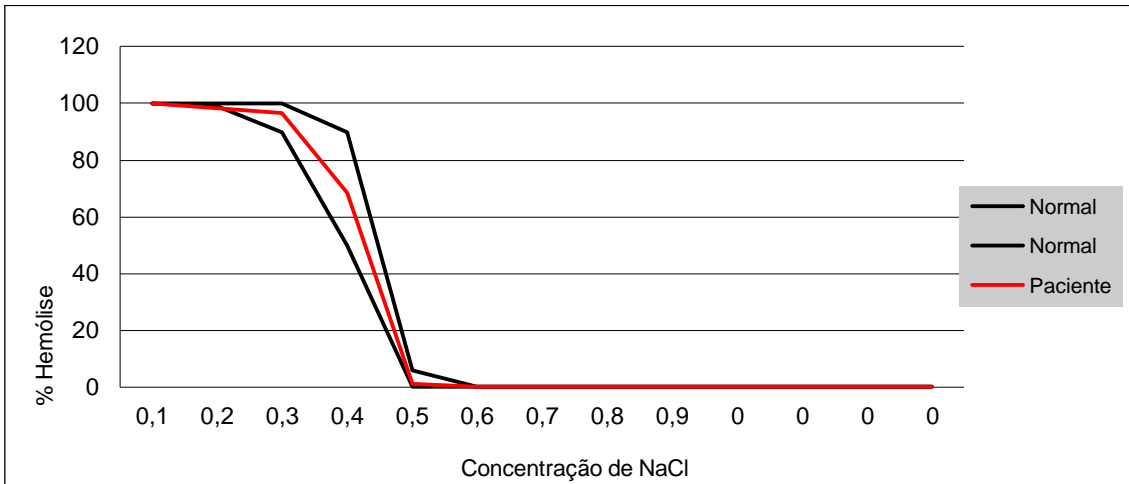


Figura 6 - Paciente normal

Fonte: Técnica INSJRP

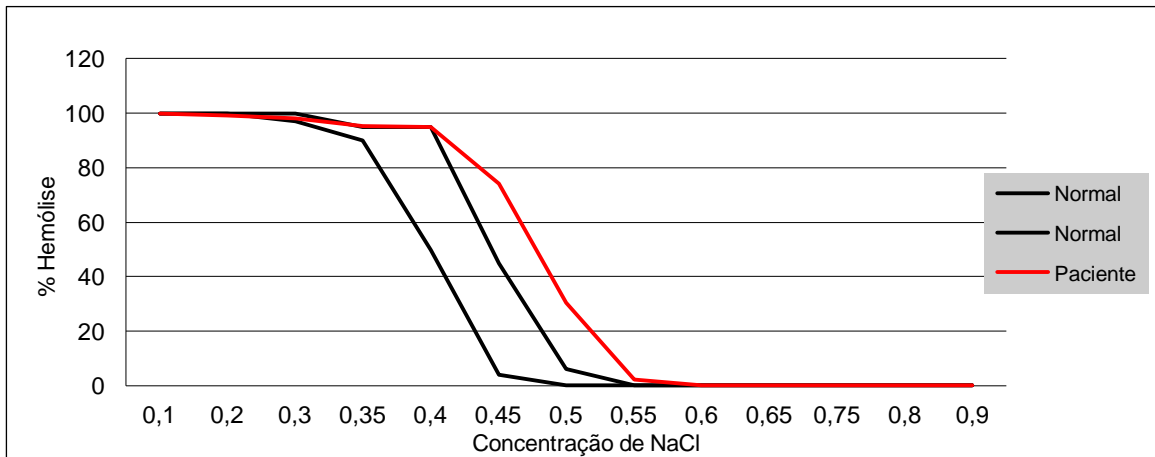


Figura 7 - Esferocitose

Fonte: Técnica SHHSJC

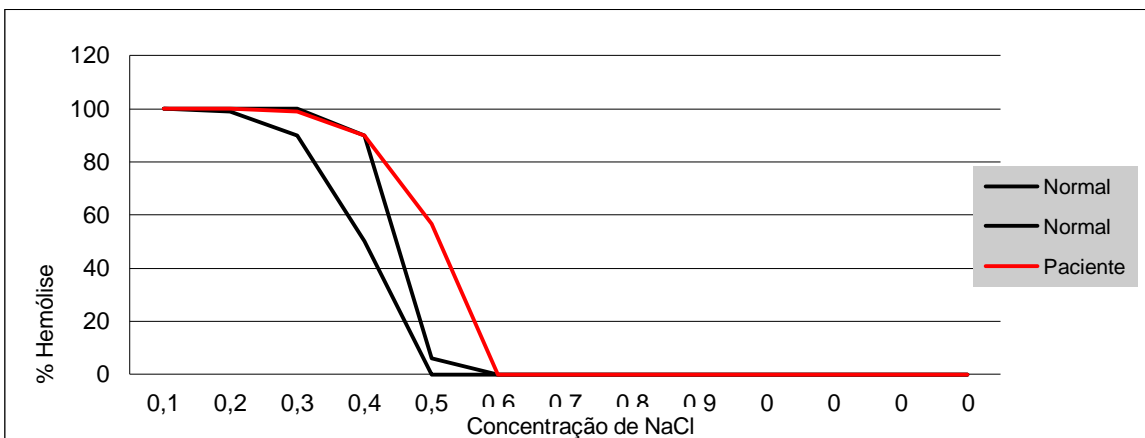


Figura 8 - Esferocitose

Fonte: Técnica INSJRP

CONCLUSÃO

Na presente validação, as curvas das duas técnicas se apresentarem semelhantes e, a partir destes resultados, passamos a realizar a técnica empregada no INSJRP que é de melhor execução. Desta forma, reduzimos o tempo de execução do teste, diminuindo a demanda de preparo de reagentes, e alcançamos maior precisão nas diluições utilizadas pelo método.

REFERÊNCIAS

- Bain,B.J. Células Sanguíneas: um guia prático. 3ª ed.Porto Alegre: Artmed, 2004;
- Naoum,P.C.Eletroforese:Hemoglobinopatias,Proteínas Séricas, Lipoproteínas, DNA. São Paulo: Santos, 2012;
- Rapport, Samuel I. Introdução a Hematologia. 1ª Ed. São Paulo: Rocca, 1987
- Revista Uniara, v.15, n.2, dezembro 2012;
- Todd Sandorf. Diagnóstico clínico e conduta terapêutica por exames laboratoriais,1989
- Almeida, T. V. et al. Técnica de Laboratório. 3ªed. Atheneu.
- ZAGO, M. A. *et al.* Hematologia: Fundamentos e Prática. São Paulo: Atheneu, 2001.
- Pardini, H. Manual de exames.1ª ed. 2015-2016.