

## PADRONIZAÇÃO DO PREPARO DE LISADOS HEMOGLOBÍNICOS ESTÁVEIS PARA USO EM LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA.\*

Elena Y. GUSHIKEN\*\*  
Marcos A. Gonçalves MUNHOZ\*\*  
Cecília KITAMURA\*\*  
Vânia M. C. ZAMFIROV\*\*  
Luiz I. NIERO\*\*

RIALA6/714

GUSHIKEN E. Y.; MUNHOZ, M. A. G.; KITAMURA, C.; ZAMFIROV, V. M. C.; NIERO, L. I.; Padronização do preparo de lisados hemoglobínicos estáveis para uso em laboratório de saúde pública. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):83-86, 1991.

**RESUMO:** Foram selecionadas amostras de sangue humano, com sorologia negativa para HIV e hepatite B, para se avaliar as condições de preparo e estabilidade de lisados hemoglobínicos, no monitoramento da quantificação da hemoglobina. A metodologia empregada foi um sistema de congelamento e descongelamento que originou um padrão de hemoglobina estável por 6 meses e de baixo custo operacional, que poderá ser utilizado no controle de qualidade intra e interlaboratorial do deseamento de hemoglobina.

**DESCRIPTORIOS:** controle de qualidade, padrão de hemoglobina.

### INTRODUÇÃO

Diante das dificuldades de conservação das amostras controles (recém-colhidas), devido principalmente ao problema de transporte que provoca exposição à variação de temperatura, o PIEEC, "Plan Internacional de la OMS de Evaluacion Externa de Calidad" sugere preparar lisados estéreis para a hemoglobina e sangue estabilizado para as contagens celulares, por fixação com formaldeído ou glutaraldeído<sup>2,4,7</sup>.

Para obtenção de controles de forma simples e eficaz a World Health Organization sugere misturas de várias amostras de sangue, selecionadas pela dosagem de hemoglobina com valores superiores a 13,0 g/dL

O objetivo do presente trabalho é a padronização do preparo de lisados hemoglobínicos a partir de um "pool" de sangue humano composto por amostras encaminhadas pelas unidades básicas de saúde, selecionadas pela dosagem de hemoglobina segundo WHO<sup>5,6,9</sup>, e sua utilização em labora-

tório de Saúde Pública, no controle de qualidade interno e externo.

### MATERIAL E MÉTODOS

Preparamos dois lotes de padrões de hemoglobina com concentração (8,0 g/dL IAL e 15,0 g/dL IAL) e utilizamos um terceiro adquirido externamente (13,7 g/dL Celm).

O "pool" de sangue humano foi selecionado de mistura de cinco amostras (5 mL cada), colhidas com EDTA separando-se o plasma por centrifugação (1500g), com testes negativos para HIV e Hepatite B<sup>3</sup> processados em capela de fluxo laminar, filtrados a vácuo e aliquoteados em frascos estéreis e conservados a 4°C

Hemolisados. O preparo do hemolisado seguiu as seguintes etapas:

- 1) Centrifugou-se o sangue em frasco esterilizado de tamanho adequado, a 1500g e por 20 minutos.
- 2) Adicionou-se o ao sedimento de células ver-

\* Realizado na Seção de Hematologia do Instituto Adolfo Lutz

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

melhas, igual volume de solução fisiológica estéril, misturando-se por inversão, centrifugando-se, descartando-se o sobrenadante e a camada superficial.

3) Repetiu-se a lavagem por três vezes consecutivas, para assegurar a completa remoção do plasma, leucócitos e plaquetas.

4) Os glóbulos vermelhos foram lisados por congelamento (-20°C) e descongelamento para obter-se hemólise total.

5) Adicionou-se igual volume de clorofórmio ao hemolisado, agitando-se vigorosamente com auxílio de um vibrador mecânico e refrigerou-se "overnight" para permitir a separação do estroma.

6) Após 24 horas, centrifugou-se a 1500g por 20 minutos, descartando-se a camada lipídica extraída.

7) Filtrou-se em papel de filtro Whatmann nº 42 adaptado em um funil de Buchner ligado a tampa de sucção.

8) Para cada 70 ml do lisado, adicionou-se 30 ml de glicerol puro e para cada 500 ml do glicerol-lisado, adicionou-se uma dose de penicilina-estreptomicina (1000 UI/5000 UI)<sup>3</sup>. Para obter-se uma concentração mais baixa, adicionou-se 30% (v/v) de glicerol em 9g/L de solução fisiológica ao concentrado lisado. Estocou-se a 4°C.

9) O material preparado foi distribuído em frascos esterelizados tipo penicilina. O produto mantém-se estável por dois anos quando conservados fechados e lacrados segundo o ICSH. Os dosamentos sequenciais foram realizados em hemoglobímetro semi automatizado da Celm, CC 110 e Hb 520, e a concentração de Hb da amostra foi

determinada em espectrofotômetro digital Microanal B 34211, aplicando-se a fórmula indicada pelo ICSH<sup>6,10</sup>. Foram realizados paralelamente aos dosamentos semanais, controles de contaminação por microorganismos (bactérias e fungos) durante 6 meses.

O tratamento estatístico foi efetuado correlacionando-se os resultados obtidos com os padrões IAL 8,0 g/dL e 15,0 g/dL e Celm 13,7 g/dL.

Método de Determinação da Concentração Hemoglobínica<sup>1,2,8,9</sup>.

$$\text{Conc. de Hb (g/dL)} = \frac{A(540) \times 64500 \times 201}{44 \times d \times 1000 \times 10}$$

onde:

- A (540) = absorvância da solução de cianometahemoglobina (HiCN) em 540 nm
- 201 = fator de diluição (20 uL / 4 mL)
- 44 = coeficiente de extinção milimolar (11)
- d = espessura da cubeta em cm (d = 1 cm)
- 1000 = fator de conversão de mg para g
- 10 = fator de conversão de g/L para g/dL
- 64500 = peso molecular de Hb (aproximado a partir do dado base de 64458)<sup>3</sup>.

As determinações de hemoglobina foram efetuadas em 3 grupos de 82 amostras cada. A concentração hemoglobínica dos lisados foram comparados com padrão 13,7 g/dL Celm.

## RESULTADOS

Os resultados estatísticos obtidos estão apresentados de forma resumida na Tabela 1

TABELA 1

	CONCENTRAÇÕES DE PADRÕES DE Hb (g/dL)		
	8,0 IAL	15,0 IAL	13,7 CELM
Nº determinações	82	82	82
Média ± d. p.	7,961 ± 0,103	15,010 ± 0,127	13,656 ± 0,129

Quando comparados entre si (p<0,05) encontramos os seguintes resultados: o coeficiente de correlação entre os padrões IAL 8 e 15 g/dL foi de 0,9835 para um r crítico de 0,22, o que nos mostra a significância destes resultados. Entre os padrões IAL 8 g/dL e Celm 13,7 g/dL o r = 0,9918, entre os padrões IAL 15 g/dL e Celm 13,7 g/dL o r = 0,9896, portanto com significância similar à comparação anterior.

Apresentamos na figura 1 as retas de regressão linear obtidas comparando-se as determinações dos padrões 8 IAL, 15 IAL e 13,7 Celm. Os coeficientes angulares foram: 0,5237 para a reta A e 0,5808 para a reta B o que equivale a dizer que o compor-

tamento dos padrões foi semelhante.

A metodologia empregada segue as normas do Comitê Internacional de Hematologia, porém adaptada a nossa realidade.

Nossa contribuição foi a introdução de um sistema de congelamento e descongelamento de amostras que facilita o manuseio, garantindo maior quantidade de lisados hemoglobínicos em comparação ao método preconizado pelo ICSH.

Os testes realizados em nosso laboratório, utilizando dosagens semanais, mostraram boa reprodutibilidade e conservação, semelhantes ao padrão comercial nacional (Celm-globin) (Tabela 1). Não observamos nenhuma contaminação do material durante

o período de 6 meses nos frascos em uso, entretanto, não foi objetivo deste trabalho controlar a contaminação de frascos lacrados por 2 anos.

### CONCLUSÕES

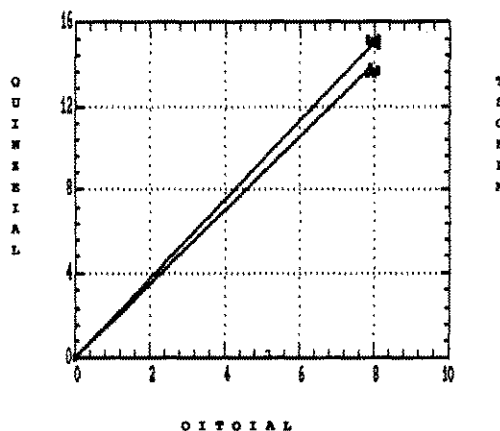
— A preparação preconizada pelo ICSH modificada em nossos laboratórios tem um comportamento comparável aos produtos comercializados acrescentando as vantagens:

a) menor custo operacional e independência de fontes fornecedoras externas.

b) A obtenção de um material estável poderá viabilizar um intercâmbio entre os laboratórios que compõem a rede SUDS-SP e outros, permitindo a implantação de um sistema de controle de qualidade intra e extralaboratorial.

c) Pode ser usado para monitoramento das reações de quantificação das hemoglobinas devido a sua simplicidade e grande reprodutibilidade.

FIGURA 1  
Comparação entre as curvas obtidas com os padrões hemoglobínicos



Reta A: Comparação entre padrões 8,0 g/dL IAL e 13,7g/dL Celm.

Reta B: Comparação entre padrões 15,0 g/dL IAL e 13,7g/dL Celm.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Dra. Heidi Pinto Martins, da Seção de Análises Clínicas Auxiliares, e as Seções de Sorologia, Virologia e Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz, central, pela colaboração neste trabalho.

RIALA6/714

GUSHIKEN E. Y.; MUNHOZ, M. A. G.; KITAMURA, C.; ZAMFIROV, V. M. C.; NIERO, L. I.; Standardization of the stable lysates prepare for the use at the public health laboratory. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):83-86, 1991.

ABSTRACT: Hepatitis B and HIV negative human blood samples were selected in order to evaluate the conditions of stable lysates in the monitoring of hemoglobin quantification. For this purpose, we employed a freezing-defrosting system which generated an inexpensive hemoglobin standard, stable for 6 months. This methodology could be successfully used in the quality control of all laboratories involved with hemoglobin quantification.

DESCRIPTORs: quality control, hemoglobin standard.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUER, J.D. — *Clinical laboratory methods*. 9th. ed. St. Louis, C.V. Mosby, 1982. p. 46-7.
2. DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. — *Practical haematology*. 5th. ed. London, Churchill Livingstone, 1975. p. 31-7, 60.
3. LEHNINGER, A.L. — *Princípios de bioquímica*. 5ª ed. São Paulo, Sarvier, 1989. p. 136.
4. LEWIS, S.M. — El plan internacional de la OMS de evaluación externa de la calidad en hematología. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 106 (5): 407-19, 1989.

GUSHIKEN E. Y.; MUNHOZ, M. A. G.; KITAMURA, C.; ZAMFIROV, V. M. C.; NIERO, L. I.; Padronização do preparo de lisados hemoglobínicos estáveis para uso em laboratório de saúde pública. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 51 (1/2):83-86, 1991.

---

5. LEWIS, S.M. — *The principles and methods of quality assurance in haematology*. Geneva, WHO, 1984. (WHO/LAB/84.3).
6. LEWIS, S.M. — *Quality assurance in haematology: a training course manual practical work-book*. Geneva, WHO, 1984. (WHO/LAB/84.6).
7. LEWIS, S.M. & BURGUESS, B.J. — Quality control in haematology: report of interlaboratory trials in Britain. *Brit. med. J.* 4: 253-6, 1969.
8. SABRAFEN, J.S. — *Hematologia clínica*. 3ª ed. Barcelona, 1982. p. 5, 27-9, 189-90.
9. VAN ASSENDELFT, O.W.; HOLTZ, A.H. & LEWIS, S.M. — *Recommended method for the determination of the haemoglobin concentration of blood*. Geneva, WHO, 1984. (WHO/LAB/84.10).
10. VAN KAMPEN, E.J. & ZIJLSTRA, W.G. — Standardization of hemoglobinometry II. The hemiglobincyanide method. *Clin. chim. Acta.* 6: 538-44, 1961.
11. ZIJLSTRA, W.G. & VAN KAMPEN, E.J. — Standardization of hemoglobinometry I. The extinction coefficient of hemiglobincyanide. *Clin. chim. Acta.* 5: 719-26, 1960.

*Recebido para publicação em 15 de março de 1991.*