AZUL DE CRESIL BRILHANTE

Finalidade:
Corante para contagem de reticulócitos.

Registro ANVISA:
10097010105

Apresentação:
620477 - AZUL CRESIL BRILHANTE RETICULOC FR100mL

LB 172061
Rev. 09 – 01/2025

1. INTRODUÇÃO

Os reticulócitos compreendem eritrócitos imaturos no estágio final de diferenciação celular. O termo reticulócito deriva das características microscópicas das células depois de tratadas com corantes supravitais, como o azul de metileno novo ou o azul de cresil brilhante, que conferem aos fragmentos de ácido ribonucléico (restos de RNA ribossomal) a aparência de uma fina rede reticular ou grânulos dispersos.

A proliferação e a diferenciação eritróide ocorrem em compartimentos do microambiente medular conhecidos como "ilhas eritroblásticas". Estas ilhas consistem em um macrófago central com projeções citoplasmáticas circundado por eritroblastos em diferentes estágios de desenvolvimento. A eritropoiese é impulsionada pelo equilíbrio entre mecanismos de *feedback* positivo e negativo que operam nestas ilhas.

A extrusão do núcleo pelo eritroblasto ortocromático no final da diferenciação eritróide dá origem ao reticulócito, que se caracteriza por ser uma célula anucleada, cerca de 20% maior que os eritrócitos maduros e que na microscopia eletrônica se apresenta como uma célula multilobular, que ainda conserva no citoplasma alguns resquícios de organelas como retículo endoplasmático, ribossomos e mitocôndrias. O reticulócito ainda possui a capacidade de produção de hemoglobina, apesar da ausência do núcleo, devido à presença de RNA mensageiro no citoplasma. Por apresentar mitocôndrias também tem certa capacidade de respiração aeróbica.

O tempo médio de maturação dos reticulócitos é cerca de 4 dias, sendo que os três primeiros dias ocorrem na medula óssea e nas últimas 24 horas são liberados para a circulação sanguínea. No processo final de maturação, os reticulócitos perdem todas as organelas, têm o volume ligeiramente reduzido e adquirem o formato bicôncavo e a coloração citoplasmática própria dos eritrócitos maduros. Neste ponto, cessa a síntese proteica e perdem também qualquer capacidade de metabolismo aeróbico, restringindo-se a metabolização da glicose pela via de Embden-Meyerhoff (geração de ácido lático) e pelo *shunt* das pentoses.

A produção de células vermelhas é estritamente regulada, a fim de manter um hematócrito de 40 a 45%, concentração em que a oferta de oxigênio aos tecidos é ótima. Aproximadamente 2 milhões de reticulócitos são produzidos a cada segundo, porém a produção pode ser aumentada em cerca de 20 vezes em caso de anemia severa.

A contagem de reticulócitos no sangue periférico fornece informações sobre a integridade funcional da medula óssea. Em pacientes com quadro de anemia que apresentam reticulocitose, a eritropoiese na medula óssea mostra-se eficaz e responde às terapias específicas. Entretanto, em pacientes com quadro de anemia que apresentam um número diminuído de reticulócitos na circulação, ou reticulocitopenia, a eritropoiese é ineficaz e pode estar associada a outros fatores. Além de avaliar a evolução desses pacientes, a contagem de reticulócitos promove o monitoramento da regeneração da atividade medular após quimioterapia ou transplante de medula óssea.

A maioria das técnicas laboratoriais para contagem de reticulócitos são baseadas na detecção de RNA (reticulina) no citoplasma dos reticulócitos. Desde o final dos anos 1940 até o início dos anos 1980, a enumeração de reticulócitos foi realizada através da análise microscópica de extensões sanguíneas coradas pela coloração supravital. O desenvolvimento de corantes fluorescentes específicos para RNA na década de 1980 possibilitou a utilização de citômetros de fluxo para contagem de reticulócitos com elevada exatidão e precisão. O desenvolvimento de citômetros de fluxo dedicados à enumeração de reticulócitos revelou-se como uma alternativa à microscopia ótica para laboratórios com alto volume de contagens de reticulócitos. A análise por citometria de fluxo proporcionou informações clínicas valiosas que não eram disponíveis pela microscopia de luz. Com a recente incorporação da citometria de fluxo nos analisadores hematológicos, a contagem de reticulócitos assim como parâmetros derivados tornaram-se parte da rotina laboratorial. Análise de reticulócitos com fluorocromo marcados com anticorpos monoclonais contra receptores de superfície de reticulócitos já estão disponíveis para estudos de investigação dos reticulócitos e doenças do Erythron.

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

A presença de reticulócitos no sangue periférico é um sinal inequívoco de produção de células vermelhas. Assim a contagem de reticulócitos é usada para se avaliar a capacidade da medula óssea em produzir novas células vermelhas, em casos de anemias hemolíticas e hemorragias.

A contagem de reticulócitos já é amplamente estabelecida e utilizada para monitorar a eritropoiese. Constitui um fator importante no diagnóstico, classificação e monitorização do tratamento das anemias, na confirmação da regeneração da medula óssea após quimioterapia ou transplante, e na monitorização da terapêutica com eritropoetina humana recombinante.

A contagem de reticulócitos é o método mais simples para estudo da função eritropoética.

- CAUSAS DE RETICULOCITOSES
1. Esferocitose
2. Drepanocitose
3. Eritroblastose Fetal
4. Anemia aguda pós-hemorrágica
5. Anemia hemolítica autoimune adquirida
6. Hemoglobinúria Paroxística noturna
7. Resposta terapêutica satisfatória nas anemias carenciais

- CAUSAS DE RETICULOPENIAS
1. Anemia Aplástica
2. Crise aplástica de anemia hemolítica
3. Anemias Megaloblásticas

A Reticulocitose é um bom índice da resposta terapêutica das anemias por carência de fatores hematopoéticos.

Uma anemia ferropriva responde à administração de ferro com reticulocitose até a sua inteira correção.

Reticulocitose na ausência de perdas sanguíneas ou tratamento de estados carenciais com ferro, folatos ou vitamina B12 é bastante indicativo de hemólise.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação	g/L
Azul Cresil Brilhante	10g
Citrato de sódio	4g
Água Deionizada	1000mL

A fórmula pode ser ajustada e/ou suplementada, conforme necessário, para cumprir os critérios de desempenho.

3. AMOSTRAS

a- Tipos de amostras

- A amostra utilizada consiste em sangue total coletado com EDTA ou com citrato de sódio, isento de hemólise.

b- Armazenamento e estabilidade da amostra
A amostra deve ser processada o mais rapidamente possível após coletada, do contrário, manter em geladeira (2 a 8 °C) por até 24h.

c- Critérios de rejeição
Rejeitar amostras que se apresentem hemolisadas ou coaguladas (mesmo com micro-coágulos).

4. INFORMAÇÕES GERAIS DO PRODUTO
a- Princípio
O sangue total é diluído em azul de cresil brilhante, e a diluição é usada para fazer esfregaços hematológicos onde serão contados os reticulócitos.
O azul de cresil brilhante cora os restos de RNA associados aos ribossomos que aparecem como filamentos ou ramos azuis, os quais correspondem a eritrócitos que acabaram de perder o número ou mais jovens, uma vez que cerca de 30% da hemoglobina é sintetizada no eritrócito sem o núcleo.

b- Armazenamento e estabilidade
Para fins de transporte, o produto pode permanecer por 72h em temperatura ambiente. No laboratório, o produto deve ser armazenado em temperatura entre 9 e 25°C, condições em que se mantém estável até a data de vencimento expressa em rótulo, desde que isento de contaminação de qualquer natureza. Recomenda-se manter o produto protegido de incidência direta de luz (natural ou artificial) e evitar grandes variações de temperatura até a utilização.

c- Precauções e cuidados especiais
- O produto é destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;
- Uso restrito por profissionais;
- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;
- Não inalar ou ingerir;
- Não utilizar placas com sinais de contaminação, ressecamento ou com alterações de cor ou espessura;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para "Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A" para o manuseio seguro;
- Para acondicionamento e descarte do material usado, autoclavar a 121ºC por 20 minutos. Recomendamos o uso dos sacos Detrilab;
- Os procedimentos de manuseio referentes ao processamento e manuseio para o descarte deverá estar de acordo com a RDC 222, de 28 DE MARÇO DE 2018 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

5. MATERIAIS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)
- Lâminas de vidro
- Lâminas distensoras
- Tubos de ensaio
- Banho-maria 37°C
- Microscópio óptico
- Óleo de imersão

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO
a- Realizar o preparo da diluição, baseado no hematócrito do paciente para:
- Hematócrito até 30%: 12 gotas de sangue para 3 gotas de corante;
- Hematócrito entre 30-45%: 9 gotas de sangue para 3 gotas de corante;
- Hematócrito superior a 45%: 6 gotas de sangue para 3 gotas de corante;
b- Agitar e colocar em banho-maria a 37°C por 20 minutos.
c- Agitar e retirar uma gota para fazer os esfregaços.
d- Aguardar a secagem.
e- É possível contra corar ou não com corante de Wright.
f- Levar ao microscópio ótico na objetiva de imersão.
g- Contar vários campos até que obtenha 1.000 eritrócitos e anotar o número de reticulócitos encontrados nestes campos. A escolha do campo deve ser aleatória com maior preocupação na distribuição de eritrócitos.

Observação: As lâminas coradas são estáveis por 30 dias sem contato com o óleo de imersão e por 1 semana quando armazenada com óleo de imersão.

7. RESULTADOS
7.1 Cálculos
- Percentual:

$$\% \text{ de reticulócitos} = \frac{100 \times \text{N de reticulócitos contados}}{1.000}$$

Legenda:
N= número

Contagem de reticulócitos corrigida:
Um paciente com um determinado grau de anemia deve ter a sua contagem de reticulócitos corrigida para que se determine o número de reticulócitos de acordo com o grau de anemia, o que muitas vezes mostra que uma contagem de reticulócitos normais pode estar tendo uma representatividade baixa para o paciente.

Veja a técnica e um exemplo:

- Contagem de reticulócitos corrigido:

$$\% \text{ de reticulócitos corrigido} = \frac{\%\text{Reticulócitos X HCT paciente}}{\text{HCT normal (45\%)}}$$

Legenda:
HCT= hematócrito
Sabendo que um hematócrito considerado normal tem valor igual a 45% que representa a porcentagem da parte sólida do sangue e supondo que na contagem convencional a porcentagem de reticulócitos deste paciente tenha dado 1,2% e seu hematócrito 29:

$$\text{Índice de reticulócitos} = 1{,}2 \times 29 = 0{,}7745$$

O que parecia uma contagem normal igual a 1,2% de reticulócitos passou a ser uma contagem abaixo do normal.

7.2 Resultado
- Expressar os resultados em percentual ou em reticulócitos por µL.

Aspectos microscópicos:

	Resultado esperado
Hemácias contendo reticulócitos	Células esféricas apresentando precipitado de grânulos reticulares.
Fundo da lâmina	Ausência de sujidades e depósitos no fundo das lâminas coradas.

7.3 Valores de referência

Pacientes	**%**	**mm³**
Adultos	0,5 a 1,5	25.000 a 85.000
Recém-nascidos	2,0 a 6,0	100.000 a 300.000

8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO
(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 830/2023)
Os resultados falsamente positivos ou negativos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:
- Após abertos, os componentes tornam-se suscetíveis a contaminações químicas ou microbianas que podem inviabilizar sua utilização;
- Ao substituir os frascos originais, opte por frascos de vidro âmbar, os reagentes apresentam sensibilidade a luz;
- Manter os frascos dos padrões sempre fechados de maneira a evitar alterações em concentrações;
- Os reagentes se destinam ao uso diagnóstico *in vitro*, não devendo ser ingeridos ou entrar em contato com a pele e mucosas;
- Utilização de material vencido, contaminado ou em condições inadequadas;
- Erro na conservação dos reagentes;

- Deve-se evitar o uso de materiais que possam contaminar os reagentes, tais como ponteiras plásticas de micropipetador reaproveitadas ou tubos para a reação;
- Interpretação equivocada de resultados;
- Tempo excessivo ou insuficiente de coloração;
- Armazenamento ou transporte de amostra inadequado;
- Não utilizar a proporção amostra reagente sugerida na técnica;
- Todas as amostras devem ser manipuladas com extrema cautela, pois podem veicular diversas doenças infectocontagiosas (hepatite, SIDA etc.);
- Sempre usar sangue fresco, com anticoagulante (EDTA ou fluoreto de potássio + EDTA ou heparina são recomendados). O excesso de EDTA causa dificuldade na impregnação da coloração pelo Azul de Cresil Brilhante e consequentemente leva à possibilidade de resultados falsos negativos;
- Nos esfregaços que possuam tonalidade voltadas para o vermelho, o corante agiu por pouco tempo podendo gerar resultados falso negativos, pois os reticulócitos podem não ter sido devidamente impregnados;
- Nos esfregaços que apresentarem coloração de tonalidade próxima ao cinza, o corante agiu durante um período prolongado;
- Sempre respeitar o prazo de validade, pois, após o vencimento, o pH do corante sofre alterações que acabam comprometendo a fixação de cor e consequentemente a visualização dos reticulócitos;
- Normalmente há interferências fisiológicas em pacientes submetidos a grandes transfusões;
- A dificuldade em se visualizar os reticulócitos pode ser contornada realizando-se uma coloração de fundo (panótico, Giemsa etc.). Uma causa de erro comum é não se obedecer aos critérios de diluição pelo hematócrito da amostra;
- Baixas temperaturas podem provocar precipitação de corantes;
- A gota de sangue não deve ser muito grande. Quanto maior a gota, mais espesso será o esfregaço;
- Os esfregaços muito espessos só serão aproveitáveis em certas partes das bordas. Os excessivamente delgados tornam-se pálidos;
- O esfregaço satisfatório deve ser fino e homogêneo de margens livres, pois só os que reúnem estas condições apresentam os leucócitos e eritrócitos sem deformação e convenientemente distribuídos;
- A acidez ou a basicidade do esfregaço estão relacionadas muitas vezes, à qualidade da água;
- A limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e a obtenção de resultados corretos. Não usar detergentes a base de fosfato;
- A água utilizada na limpeza do material e preparo dos reagentes deve ser de boa qualidade;
- Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, aminas e agentes oxidantes, o que provoca o deterioramento dos reagentes.

9. CONTROLE DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para o consumo todos os reagentes Laborclin são testados pelo Laboratório de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de seu vencimento, descrito na embalagem, desde que armazenados e transportados em condições adequadas. A aplicação do controle de qualidade interno fica à critério do usuário, conforme seus procedimentos.

- Materiais necessários

Utilizar, preferencialmente, amostras clínicas coletadas, transportadas e armazenadas em acordo com as normas vigentes;
Recomenda-se a análise comparativa da lâmina corada com o corante do novo lote, contra lâmina corada por corantes de lotes anteriores.

- Controle de qualidade dos reagentes:

	Aspecto do produto
Corante não utilizado	Solução azul escuro, livre de partículas visíveis.

- Periodicidade

Testar a cada novo lote recebido ou em periodicidade estabelecida pelo próprio laboratório.

- Análise dos resultados

O Azul Cresil Brilhante testado deve expressar os resultados esperados. Caso se constate algum problema, os resultados não devem ser liberados até que as causas tenham sido apuradas devidamente e os problemas constatados sanados.

10. GARANTIA DA QUALIDADE

A Laborclin obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário que:
- O usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;
- Os materiais estejam sendo armazenados em condições adequadas;
- Os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.

Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos junto ao site www.laborclin.com.br. Em caso de dúvidas ou outras informações, contatar o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail sac@laborclin.com.br. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHASIS, J. A.; Mohandas, N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. Blood, v. 112, n. 3, 2008.
2. FORBES, Sahm and Weissfeld. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis, Mo, 2007.
3. HOLT, Krieg, Sneath, Staley and Williams (ed.). Bergey's Manual™ of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.
4. KONEMAN, A.; Sommers, J.R. Diagnóstico microbiológico. 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1989.
5. LEE, G. R. *et al*. Wintrobe's Clinical Hematology. 10. ed. Baltimore: Lippincott William's & Wilkins, 1999.
6. MOURA, Roberto A. *et al*: Técnicas de laboratório, 3ª edição.S. Paulo, Livraria Atheneu, 1992.
7. MURRAY, P. R. *et al.* Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington, DC: ASM Press, 2007.
8. NCCLS. Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guideline—Second Edition. NCCLS document H44-A2 (ISBN 1-56238-527-5). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.
9. OLIVEIRA Lima, Antonio *et al.:* Métodos de laboratório aplicados à clínica, 6ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1985.
10. OLIVEIRA, R.A.G. Hemograma: como fazer e interpretar. Editora: Red publicações, 2ª edição, 2015.
11. SAENGER SL. Anemia e deficiência de ferro: os melhores parâmetros diagnósticos. In: Manual de Exames Laboratoriais em Geriatria. In: Vencio S, Fontes R, Scharf M. Editora Gen, São Paulo, 1ª Ed. 2013.

Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda
CNPJ 76.619.113/0001-31
Insc. Estadual 1370012926
Rua Casimiro de Abreu, 521
Pinhais/PR CEP 83.321-210
Telefone 041 36619000
www.laborclin.com.br
Responsável Técnico:
Maire Wakamori – CRF/PR-20176
Serviço de Assessoria ao Cliente
SAC 0800-0410027
sac@laborclin.com.br

ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico *in vitro.*
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Européia
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
	Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento		Esterilização utilizando óxido de etileno
	Esterilização utilizando irradiação		Esterilizado utilizando vapor ou calor seco.
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso.
	Controle		Controle Negativo
	Controle Positivo		Manter seco
	Manter afastado da luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho
	Não utilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Terceira edição (24.08.2022)