

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS**

MESTRADO PROFISSIONAL EM PESQUISA CLÍNICA

DÉBORA DANIELLE BALDUINO LAUZIN

**AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA E CONFIABILIDADE
DE DOIS ANALISADORES HEMATOLÓGICOS
AUTOMATIZADOS.**

Rio de Janeiro

2017

Avaliação da acurácia e confiabilidade de dois
analisadores hematológicos automatizados.

DÉBORA DANIELLE BALDUINO LAUZIN

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de mestre.

Orientador (es): Carlos Augusto Ferreira de Andrade
Yara Hahr Marques Hökerberg

Rio de Janeiro

2017

Lauzin, Débora Danielle Balduino.

Avaliação da acurácia e confiabilidade de dois analisadores hematológicos automatizados / Débora Danielle Balduino Lauzin. - Rio de Janeiro, 2017.

67 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica, 2017.

Orientador: Carlos Augusto Ferreira de Andrade.

Co-orientadora: Yara Hahr Marques Hökerberg.

Bibliografia: f. 63-66

1. Hemograma. 2. Analisadores hematológicos automatizados. 3. Acurácia. 4. Confiabilidade. I. Título.

DÉBORA DANIELLE BALDUINO LAUZIN

Avaliação da acurácia e confiabilidade de dois
analisadores hematológicos automatizados.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica do Instituto de Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de mestre.

Orientador (es): Carlos Augusto Ferreira de Andrade
Yara Hahr Marques Hökerberg

Aprovada em ___ / ___ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Armando de Oliveira Schubach (Presidente e Revisor)
Doutor em Biologia Parasitária
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Antonio José Leal Costa (Membro)
Doutor em Saúde Pública
Universidade de São Paulo

Dra. Klecia Marília Soares de Melo Casemiro (Membro)
Doutor em Biologia Parasitária
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Alexandre Gomes Vizzoni (Suplente)
Doutor em Pesquisa Clínica e Doenças Infecciosas
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho Eric que enche minha vida de alegria e me dá forças para sempre continuar crescendo profissionalmente.

Ao meu marido Fábio e ao meu pai Inácio por poder contar com a ajuda deles sempre que precisei, mas agradeço principalmente pelo carinho e amor.

Às minhas amigas e companheiras de trabalho Ana Karla, Cristina, Maria Isabel e Suzan, que me ajudaram com seleção e processamento das amostras, leitura de lâminas, compreensão com os meus horários e apoio incondicional.

À Emanuelle, Rita e a todos os profissionais do laboratório que me ajudaram pelo telefone, enquanto eu estava de licença.

Ao meu orientador Carlos e coorientadora Yara pela dedicação, paciência e pelos ensinamentos. A Raquel pela ajuda com os cálculos.

Ao corpo docente do curso de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica de Doenças Infecciosas por compartilharem seus conhecimentos.

Aos meus colegas de turma que tornaram todas as atividades mais prazerosas e divertidas.

A Deus, que permitiu que tudo acontecesse.

Lauzin, Débora Danielle Balduino. Avaliação da acurácia e confiabilidade de dois analisadores hematológicos automatizados. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação [Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

Introdução: A contagem diferencial dos leucócitos dos analisadores hematológicos automatizados é mais precisa do que a microscopia óptica devido à contagem de um número maior de células. Porém, em amostras alteradas, a microscopia é padrão de referência. A análise da distensão sanguínea vem sendo substituída pelos resultados automatizados, restringindo a revisão da lâmina apenas para amostras com alarmes (*flags*) emitidos pelos equipamentos e por critérios estabelecidos pelo laboratório. Com o uso dos analisadores automatizados os laboratórios aumentaram sua capacidade produtiva, uma vez que estes analisadores permitem uma análise mais rápida, precisa, reprodutível e com mais parâmetros do que os métodos manuais. **Objetivo:** Determinar a confiabilidade e a acurácia dos analisadores hematológicos, utilizados no laboratório do Instituto Nacional de Câncer (INCA), *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750* para avaliação quantitativa e qualitativa do hemograma. **Métodos:** A concordância dos parâmetros quantitativos da série vermelha e branca e plaquetas obtidos pelos dois analisadores foi avaliada por meio de gráficos de Bland-Altman e pelo coeficiente de correlação intraclassa (CCI), também utilizado para avaliar a concordância entre os dois microscopistas. A correlação entre os alarmes dos dois analisadores automatizados e a microscopia foi estimada pelo *kappa* simples. Para avaliar a acurácia dos *flags* morfológicos, foram calculadas as sensibilidades, especificidades, eficiências (acurácia total), valores preditivos e razões de verossimilhança. **Resultados:** Os analisadores tiveram alta concordância entre eles de forma geral (CCI >0,90), exceto concentração de hemoglobina corpuscular média (0,72), monócitos (0,89), basófilos (0,03) e eritroblastos (0,65). O analisador *Sysmex XN-3000* apresentou melhor correlação com a microscopia para eritroblastos (0,89) e basófilos (0,32). Em relação aos *flags* os analisadores apresentaram uma baixa concordância entre eles, o *Sysmex XN* apresentou melhores sensibilidades para os alarmes de blastos (81,8), granulócitos imaturos (75,6) e linfócitos atípicos (50,0), e sensibilidade para bastões de 55,2, semelhante ao *Coulter* (60,1). **Conclusões:** Em relação aos parâmetros quantitativos, os analisadores possuem desempenho comparável. O analisador *Sysmex XN-3000* é melhor na geração dos alarmes morfológicos e na correlação com a microscopia para basófilos e eritroblastos. Sugerimos o ajuste da sensibilidade do *flag* de linfócitos atípicos do *Sysmex XN-3000* a fim de reduzir a taxa de falsos positivos, e do *flag* de blastos do *Coulter LH 750* para aumentar os verdadeiros positivos. Propusemos critérios para liberação automática direta dos hemogramas no setor de Laboratório de Patologia Clínica do INCA.

Palavras-chave: Hemograma, *Sysmex XN-3000*, *Coulter LH 750*, acurácia, correlação, alarmes.

Lauzin, Débora Danielle Balduino. **Accuracy and Reliability evaluation of two automated hematological analyzers**. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação [Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

ABSTRACT

Introduction: Differential counting of leukocytes from automated haematological analyzers is more accurate than optical microscopy due to the counting of a larger number of cells. However, in altered samples, microscopy is a reference standard. The analysis of the blood distension has been replaced by the automated results, restricting the revision of the slide only to samples with flags emitted by the equipment and by criteria established by the laboratory. With the use of automated analyzers the laboratories have increased their productive capacity, since these analyzers allow a faster, accurate, reproducible and with more parameters analysis than the manual methods. **Objective:** To determine the reliability and accuracy of hematological analyzers used in the National Cancer Institute (INCA), *Sysmex XN-3000* and *Coulter LH 750* for quantitative and qualitative evaluation of the hemogram. **Methods:** The agreement of the quantitative parameters of the red and white series and platelets obtained by the two analyzers was evaluated by means of Bland-Altman plots and by the intraclass correlation coefficient, also used to evaluate the agreement between the two microscopists. The correlation between the alarms of the two automated analyzers and the microscopy was estimated by the simple kappa. To evaluate the accuracy of the morphological flags, sensitivity, specificities, efficiencies (total accuracy), predictive values and likelihood ratios were calculated. **Results:** The analyzers had good agreement among them in general. The *Sysmex XN-3000* analyzer presented better correlation with microscopy for erythroblasts and basophils. In relation to the flags the analyzers presented a low agreement among them, *the Sysmex XN* presented better sensitivities for the alarms of blasts, immature granulocytes and atypical lymphocytes, and *Coulter*-like sensitivity for bands. **Conclusions:** Regarding the quantitative parameters, the analyzers have comparable performance. The *Sysmex XN-3000* analyzer is better at generating morphological alarms and correlating with microscopy for basophils and erythroblasts. We suggest adjusting the sensitivity of the atypical lymphocyte flag of the *Sysmex XN-3000* in order to reduce the rate of false positives and the blasts flag of the *Coulter LH 750* to increase the true positives. We proposed criteria for direct automatic release of hemograms in the Laboratory of Clinical Pathology sector of INCA.

Key words: Hemogram, *Sysmex XN-3000*, *Coulter LH 750*, accuracy, correlation, flags.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: Informações técnicas e tecnologias empregadas nos analisadores hematológicos <i>Coulter LH 750</i> e <i>Sysmex XN-3000</i>	35
Tabela 1: Graus de intensidade do índice kappa.....	45
Tabela 2: Confiabilidade entre os resultados da leitura das lâminas por microscopia óptica pelos dois farmacêuticos (n=40).....	48
Tabela 3: Frequência e concordância de blastos, granulócitos imaturos, bastões e linfócitos atípicos entre os dois observadores, n=40.....	48
Tabela 4: Distribuição e confiabilidade dos parâmetros hematológicos entre os analisadores automatizados <i>XN 3000</i> e <i>LH 750</i>	49
Tabela 5: Distribuição e confiabilidade da contagem diferencial de leucócitos e eritroblastos entre o analisador automatizado <i>LH 750</i> e a microscopia óptica.....	53
Tabela 6: Distribuição e confiabilidade da contagem diferencial de leucócitos e eritroblastos entre o analisador automatizado <i>XN-3000</i> e a microscopia óptica.....	54
Tabela 7: Parâmetros de acurácia para os alarmes blastos, granulócitos imaturos, bastões e linfócitos atípicos gerados pelos analisadores <i>Sysmex XN-3000</i> e <i>Coulter LH 750</i>	55
Tabela 8: Concordância entre os analisadores <i>Sysmex XN 3000</i> e <i>Coulter LH 750</i> para os alarmes morfológicos, n=459.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Analisador Hematológico automatizado <i>Sysmex XN-3000</i>	28
Figura 2: Representação esquemática da sequência de eventos que ocorrem no canal WNR (a) e WDF (b) do analisador <i>Sysmex XN-3000</i>	31
Figura 3: Analisador hematológico automatizado <i>Coulter LH 750</i>	33
Figura 4: Diagrama de dispersão tridimensional da distribuição dos leucócitos no analisador hematológico automatizado <i>Coulter LH 750</i>	34
Figura 5: Microscópio com duas cabeças binoculares destinado ao ensino.....	41
Figura 6: Fluxograma dos hemogramas do estudo.....	47
Figure 7: Gráficos de Bland-Altman para os resultados dos parâmetros quantitativos dos analisadores hematológicos automatizados <i>Sysmex XN-3000</i> e <i>Coulter LH 750</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCI – Coeficiente de Correlação Intraclasse
CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DP – Desvio Padrão
FN – Falso Negativo
FP- Falso Positivo
FPI - Fração de Plaquetas Imaturas
GI - Granulócitos Imaturos
HCM - Hemoglobina Corpuscular Média
Hgb - Hemoglobina
Htc – Hematócrito
HCI - Hospital do Câncer I
INCA - Instituto Nacional de Câncer
K₃EDTA - Etilenodiaminotetra-acético tri-potássio
LA - Linfócitos Atípicos
LC – Limite de Concordância
Mdif – Média das diferenças
M.O – Microscopia óptica
MPV- Mean Platelet Volum (volume médio plaquetário)
PDW – Platelet Distribution Width (amplitude de distribuição das plaquetas)
PLT – Plaquetas
RBC – Red blood cells (eritrócitos)
RVN – Razão de Verossimilhança Negativa
RVP - Razão de Verossimilhança Positiva
VCM - Volume Corpuscular Médio
VCS – Volum, Conductivity and Scater (volume, condutividade e dispersão da luz)
VPP- Valor preditivo positivo
VPN – Valor preditivo Negativo
VP- Verdadeiro Positivo
VP – Verdadeiro Positivo
VN – Verdadeiro Negativo
WBC – White blood cells (leucócitos)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	HEMOGRAMA.....	17
2.2	AUTOMAÇÃO DO HEMOGRAMA.....	18
2.3	PARÂMETROS AVALIADOS NO HEMOGRAMA: MANUAL X AUTOMAÇÃO.....	20
2.3.1	Eritrograma.....	20
2.3.2	Leucograma.....	24
2.3.3	Plaquetograma.....	26
2.3.4	Alarmes (<i>flags</i>) suspeitos.....	26
2.4	ANALISADOR HEMATOLÓGICO <i>SYSMEX XN-3000</i>	27
2.4.1	Características do analisador <i>XN-3000</i>	27
2.4.2	Tecnologia e métodos de análise.....	28
2.5	ANALISADOR HEMATOLÓGICO <i>COULTER LH 750</i>	32
2.5.1	Características do analisador <i>Coulter LH 750</i>	32
2.5.2	Tecnologias e métodos de análise.....	33
2.6	COMPARAÇÃO ENTRE OS ANALISADORES <i>COULTER LH 750</i> E <i>SYSMEX XN-3000</i>	34
3	JUSTIFICATIVA.....	36
4	OBJETIVOS.....	37
4.1	OBJETIVO GERAL.....	37

4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5	MÉTODOS	38
5.1	DESENHO DE ESTUDO	38
5.2	AMOSTRAS	39
5.3	PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS	39
5.4	CONTROLE DE QUALIDADE	40
5.5	TAMANHO AMOSTRAL PARA O ESTUDO	41
5.6	VARIÁVEIS DO ESTUDO	42
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5.7.1	Controle de qualidade interno: confiabilidade entre os microscopistas	43
5.7.2	Confiabilidade dos parâmetros quantitativos entre os analisadores automatizados <i>Sysmex XN-3000</i> e <i>Coulter LH 750</i>	43
5.7.3	Concordância entre os analisadores automatizados e a Microscopia Óptica	44
5.7.4	Avaliação da acurácia dos alarmes (<i>flags</i>) morfológicos emitidos pelos analisadores automatizados	44
5.7.5	Concordância entre os alarmes morfológicos gerados pelos analisadores <i>Sysmex XN-3000</i> e <i>Coulter LH 750</i>	44
5.7.6	Análise e interpretação dos resultados	44
5.8	ASPECTOS ÉTICOS	45
6	RESULTADOS	45
6.1	Controle de qualidade interno: confiabilidade entre os microscopistas	48
6.2	Confiabilidade dos parâmetros quantitativos das séries branca, vermelha e plaquetas entre os analisadores automatizados <i>Sysmex XN-3000</i> e <i>Coulter LH 750</i>	49

6.3	Confiabilidade da contagem diferencial de leucócitos e eritroblastos entre os analisadores automatizados e a microscopia óptica	53
6.4	Avaliação da acurácia dos alarmes (<i>flags</i>) morfológicos emitidos pelos analisadores automatizados	54
6.5	Concordância entre os alarmes morfológicos gerados pelos analisadores <i>Sysmex XN 3000</i> e <i>Coulter LH 750</i>	56
7	DISCUSSÃO.....	56
8	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
	Anexo I.....	67

1 INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas ocorreu um grande avanço tecnológico na automação do hemograma. Os atuais analisadores hematológicos automatizados (ou contadores eletrônicos) fornecem parâmetros na realização do hemograma de série vermelha, branca e plaquetas, com contagem diferencial de leucócitos em três, cinco ou mais partes. Além disso, os analisadores oferecem parâmetros que não podem ser obtidos manualmente, como o RDW (distribuição das hemácias por volume), um índice que avalia a presença de anisocitose; os índices PDW (amplitude de distribuição das plaquetas) e MPV (volume médio plaquetário) para avaliação plaquetária e, em alguns modelos, o FPI (fração de plaquetas imaturas). Este último parâmetro permite uma avaliação precoce da resposta medular evitando, desta forma, transfusões de plaquetas desnecessárias (MARTINHO, 2012; SILVA et. al., 2015).

Os analisadores automatizados estão substituindo totalmente os métodos manuais na realização do hemograma em laboratórios de médio e grande porte, com exceção da contagem diferencial de leucócitos e, em alguns casos, de contagem de plaquetas. Os laboratórios aumentaram sua capacidade produtiva, uma vez que os analisadores automatizados permitem uma análise mais rápida, precisa, reproduzível e com mais parâmetros do que os métodos manuais (SILVA et. al., 2015).

Diversos estudos mostram que, em amostras normais (sem alterações significativas nas três séries hematológicas), o desempenho analítico da maioria dos analisadores hematológicos é altamente satisfatório com diferenças mínimas entre os diferentes equipamentos (BUTTARELLO, 2008; KANG et. al., 2008).

A contagem diferencial dos leucócitos através dos analisadores hematológicos é mais precisa do que a análise manual através da microscopia óptica, devido à contagem de um número muito maior de células do que por microscopia (MARTINHO, 2012). A realização da contagem diferencial leucocitária através da contagem de 100 células por microscopia óptica apresenta três tipos de

erros: um erro estatístico, um erro produzido pela distribuição desigual das células na distensão sanguínea e um erro na identificação das células relacionado com a subjetividade do observador. O erro mais importante é o erro estatístico, uma vez que a variação estatística ocorre devido à pequena quantidade de células contadas, o que leva à baixa reprodutibilidade nas contagens diferenciais manuais. Entretanto, em amostras alteradas, a microscopia óptica é o método de referência. Somente através da microscopia é possível: escalonar os neutrófilos em segmentados, bastões, metamielócitos, mielócitos e promielócitos; verificar a presença de alterações displásicas nos leucócitos como granações tóxicas, corpos de Döhle, hipo e hipersegmentação dos neutrófilos; descrever os linfócitos atípicos e a morfologia dos blastos (BUTTARELLO, 2008; MARTINHO, 2012).

Os analisadores hematológicos emitem alarmes (*flags*) na presença de células que normalmente não são encontradas no sangue periférico, como blastos, linfócitos atípicos e neutrófilos imaturos, alterações nas séries vermelhas e plaquetas, e, alterações na amostra. A análise da distensão sanguínea vem sendo substituída pelos resultados automatizados, restringindo a revisão da lâmina apenas para amostras com alarmes emitidos pelos equipamentos. Dessa forma, pode-se diminuir os custos com as confecções das lâminas e reduzir o tempo de liberação dos resultados. Porém grande parte dos alarmes gerados são falso-positivos, comprometendo a rotina laboratorial (BRIGGS, 2011; FAILACE, 2009; HAWKER, 2002; PIERRE, 2002).

O Setor de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital do Câncer I (HCI) do Instituto Nacional de Câncer (INCA) conta atualmente com os analisadores hematológicos *Coulter LH 750* (Beckman, Brea, Califórnia) e *Sysmex XN-3000* (*Sysmex Corporation*, Kobe, Japan) que processam em média 110 e 200 hemogramas/ hora respectivamente, utilizando as tecnologias de impedância e citometria de fluxo fluorescente (FERNANDEZ, 2011; SYSMEX, 2015).

O analisador *Coulter LH 750* realiza a contagem dos eritrócitos, dosagem de hemoglobina, determinação dos índices eritrocitários e plaquetários, contagem de plaquetas, contagem total de leucócitos, contagem diferencial de leucócitos, contagem de eritroblastos e reticulócitos e fração de reticulócitos imaturos. A contagem total de leucócitos é corrigida automaticamente na presença de interferentes, tais como eritroblastos, plaquetas gigantes, grumos plaquetários,

eritrócitos não lisados ou seus fragmentos (FERNANDEZ, 2001). Em um estudo comparando os analisadores hematológicos *CELL_DYN Sapphire*, *ADVIA 120*, *Coulter LH 750* e *Sysmex XE-2100*, a sensibilidade para a contagem diferencial do *Coulter LH 750* foi de 94,9% e eficiência de 84,1%. A sensibilidade dos *flags* morfológicos de blastos, granulócitos imaturos e/ou desvio à esquerda, linfócitos atípicos e eritroblastos foram 63,6%, 52,2%, 0% e 75%, respectivamente, e a eficiência desses *flags* foram 95,8%, 88,8%, 94,7% e 95,8% respectivamente (KANG, 2008).

O analisador *Sysmex XN-3000* realiza a contagem de granulócitos imaturos (compreende a soma dos metamielócitos, mielócitos e promielócitos), e fração de plaquetas imaturas (FPI), além das contagens realizadas pelo *Coulter LH 750*. Esse equipamento demonstrou uma sensibilidade de 81% e especificidade de 98% na contagem de eritroblastos; sensibilidade de 97% e especificidade de 54% na detecção de linfócitos atípicos; sensibilidade de 100% e especificidade de 96% na detecção de blastos; e sensibilidade de 88% e especificidade de 84% na detecção de granulócitos imaturos (HOTTON, 2013).

Os analisadores *Coulter LH 750* e *XN-3000* oferecem alarmes com sensibilidades ajustáveis. Baseado na população de pacientes atendidos, qualquer laboratório pode introduzir seus critérios ou usar os critérios já estabelecidos pelo fabricante. Com o estudo da acurácia dos *flags*, pode-se solicitar alteração das configurações dos analisadores, podendo diminuir a necessidade das revisões de lâminas na rotina laboratorial (BRIGGS, 2012; FERNANDEZ, 2001).

Esse estudo visa contribuir com os já existentes sobre a acurácia e confiabilidade dos analisadores *Coulter LH 750* e *Sysmex XN-3000*, propor recomendações para liberação direta do hemograma (sem análise microscópica) e propor alterações das configurações desses analisadores, se necessário.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HEMOGRAMA

O hemograma é um dos exames mais solicitados por todas as especialidades médicas devido à diversidade de informações fornecidas. Este exame consiste em um conjunto de testes que estabelece aspectos quantitativos e qualitativos dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Dessa forma, fornece informações sobre a presença e o tipo de anemia, condição imunológica, presença de infecções, doenças hematológicas e alteração da coagulação. O hemograma constitui um coadjuvante de extrema importância no acompanhamento de quimioterapia e radioterapia, no diagnóstico e controle evolutivo das doenças infecciosas e das emergências médicas. O hemograma é composto pelo eritrograma, leucograma e plaquetograma (FAILACE et al., 2009).

O eritrograma é a seção do hemograma que avalia o perfil hematológico da série vermelha no sangue periférico, ou seja, analisa os eritrócitos (hemácias). É constituído pelos parâmetros quantitativos e pela avaliação da morfologia dos eritrócitos. Os principais parâmetros quantitativos avaliados nessa etapa do hemograma são: contagem de eritrócitos (RBC), dosagem de hemoglobina (HgB), hematócrito (Htc), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Esses três últimos parâmetros (VCM, HCM e CHCM) são denominados índices hematimétricos, e são calculados ou obtidos pela análise dos valores primários (RBC, HgB e Htc). A avaliação morfológica é feita em relação ao tamanho das hemácias (microcitose, normocitose e macrocitose), alterações na forma ou poiquilocitose (hemácias “em alvo”, drepanócitos, esferócitos e outras), conteúdo de hemoglobina (normocromia e hipocromia), inclusões citoplasmáticas (pontilhado basófilo, corpúsculo de Howel Jolly) e distribuição das hemácias nas distensões sanguíneas (aglutinação ou *rouleaux*) (FAILACE et al., 2009; OLIVEIRA 2007, MARTINHO, 2012).

O leucograma avalia a série branca, ou seja, os leucócitos no sangue periférico. É constituído pelas contagens global (total de leucócitos na amostra) e diferencial de leucócitos (quantidade relativa dos diferentes tipos celulares), e pela análise das suas alterações morfológicas (granulações tóxicas, vacuolização citoplasmáticas, hipersegmentação dos neutrófilos, atipia linfocitária, corpúsculo de Döhle) (FAILACE et al., 2009; OLIVEIRA 2007; MARTINHO, 2012).

O plaquetograma engloba a contagem de plaquetas, a avaliação da sua morfologia (macroplaquetas, plaquetas dismórficas e micromegacariócitos), e identificação e diferenciação de plaquetopenias das pseudoplaquetopenias. (FAILACE et al., 2009; OLIVEIRA, 2007; MARTINHO, 2012).

2.2 AUTOMAÇÃO DO HEMOGRAMA

Uma das mais importantes descobertas no desenvolvimento dos analisadores hematológicos automatizados (ou contadores eletrônicos) foi a formulação do princípio da impedância elétrica, patenteada por Wallace Henry Coulter em 1953. O método da impedância, inicialmente usado para contar partículas suspensas em um fluido, foi adaptado para contagem de células sanguíneas especialmente devido ao aumento da demanda por hemogramas. Em 1973, sete anos após a confecção do primeiro analisador hematológico *Coulter*, foi desenvolvido um novo analisador hematológico da *TOA Medical Electronics*, renomeada de *Sysmex Corporation* desde 1998 (COULTER, 1958; FUJIMOTO, 1999; OKADA, 1999; TATSUMI, 1999). Desde 1980, o uso da análise diferencial de leucócitos automatizada vem tornando-se comum em grande número de laboratórios (MATSUNO, 1998). Os diversos contadores eletrônicos disponíveis no mercado baseiam-se em impedância ou princípios ópticos, associados ou não a métodos químicos, citometria de fluxo e imunofluorometria para a contagem dos diferentes tipos celulares (OLIVEIRA, 2007).

Atualmente, a maioria dos laboratórios utiliza analisadores hematológicos automatizados para a realização do hemograma. Os analisadores mais robustos, utilizados em laboratórios de médio e grande porte, substituem totalmente os

métodos manuais na avaliação quantitativa (valores numéricos) do eritrograma e plaquetas, exceto em casos de pseudoplaquetopenia (MARTINHO, 2012).

Em relação ao leucograma, os analisadores automatizados realizam a contagem diferencial de leucócitos em três ou cinco partes. Os analisadores de três partes realizam as contagens absolutas e relativas dos granulócitos (soma dos neutrófilos, basófilos e eosinófilos), monócitos e linfócitos, e são geralmente usados em laboratórios de médio porte. Já os contadores com contagem de cinco partes (completa) fornecem as contagens dos neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, sendo usados em laboratórios de grande porte (MARTINHO, 2012; OLIVEIRA, 2007). Os analisadores hematológicos com contagem diferencial completa são de alta precisão em amostras normais e sem interferentes. Assim, a microscopia óptica é realizada apenas em casos selecionados, de acordo com os critérios estabelecidos pelo laboratório (MARTINHO, 2012; TOLEDO, 2002). Os analisadores da série XN da *Sysmex* fornecem ainda a contagem de granulócitos imaturos (a soma dos metamielócitos, mielócitos, promielócitos), além da contagem dos cinco tipos celulares, sendo denominado, portanto, um analisador com diferencial de seis partes (SYSMEX, 2017; SILVA *et. al*, 2015;).

Os analisadores automatizados possuem várias vantagens em relação aos métodos manuais na realização dos hemogramas, tais como: aumento da segurança (já que todo o processamento do hemograma se dá com o tubo de sangue fechado, eliminando assim o risco de manipulação do sangue pelo operador e diminuição de troca das amostras por erro humano); menor volume de sangue (geralmente abaixo de 150 μL), importante em amostras pediátricas; diminuição no tempo de emissão de laudos, pois os analisadores mais utilizados processam mais de 100 hemogramas por hora; interfaceamento dos resultados liberados pelo equipamento e o sistema, evitando erros de digitação; avaliação de outros parâmetros que não podem ser avaliados de forma manual, como fração de plaquetas imaturas (FPI), amplitude da distribuição das plaquetas (PDW) e volume médio plaquetário (MPV) (FAILACE, 2009; MARTINHO, 2012; SILVA *et. al*, 2015).

2.3 PARÂMETROS AVALIADOS NO HEMOGRAMA: MANUAL X AUTOMAÇÃO

2.3.1 Eritrograma

2.3.1.1 Contagem de eritrócitos (RBC)

A contagem de eritrócitos consiste no número de eritrócitos por mm^3 de sangue. Esse parâmetro não deve ser interpretado isoladamente no eritrograma e nunca deve ser usado como parâmetro de anemia (MARTINHO, 2012). A contagem manual dos eritrócitos é feita na câmara de Neubauer, após diluição da amostra com solução isotônica com a finalidade de evitar a lise dos eritrócitos. Esse tipo de contagem é trabalhosa, imprecisa e necessita de experiência do operador. Além disso, ocorre superestimação da contagem em casos de hiperleucocitose, pois os leucócitos também não são lisados e são contados erroneamente como eritrócitos. A contagem automatizada de eritrócitos nos analisadores hematológicos geralmente utiliza os princípios da impedância e/ou da óptica, sendo essa contagem mais precisa e exata do que a contagem manual (OLIVEIRA, 2007).

2.3.1.2 Dosagem de hemoglobina (Hgb)

A dosagem da hemoglobina é utilizada como parâmetro para diagnóstico de anemia. Quando o resultado obtido for abaixo dos limites de referência significa anemia. Deve-se levar em consideração o sexo e a idade do paciente (MARTINHO, 2012). A dosagem de hemoglobina emprega o método da cianometahemoglobina. Nesse método, o sangue total é diluído em ferricianeto de potássio e cianeto de potássio. O ferricianeto converte o ferro da hemoglobina de íon ferroso (divalente) em ferro sérico (trivalente), com formação de metaemoglobina, que se combina com o cianeto de potássio produzindo cianometahemoglobina, que é medida fotocolorimetricamente em 540 nm ou utilizando filtro verde (CHAPMAN, 2000; OLIVEIRA, 2007).

Vários analisadores hematológicos empregam uma modificação do método manual da cianometemoglobina. Contudo, muitos fabricantes estão substituindo esse método por outros que não utilizem cianeto, a fim de reduzir os possíveis danos ambientais causados por esses compostos tóxicos. O cianeto pode ser substituído por laurel sulfato de sódio, imidazol, dodecil sulfato de sódio e óxido de dimetil lauril amina (SILVA et. al, 2015).

2.3.1.3 Hematócrito (Hct)

O hematócrito é o volume da massa eritroide de uma amostra de sangue, expresso em porcentagem do volume total de sangue dessa amostra. Possui boa correlação com a viscosidade sanguínea, sendo utilizado para avaliar alterações na volemia. O hematócrito pode ser obtido manualmente através de microcentrifugação do sangue em um capilar de vidro. Na maioria dos analisadores automatizados, o hematócrito é calculado segundo a fórmula $Ht = VCM \times RBC/10$, onde VCM é o volume corpuscular médio das hemácias e RBC é a contagem de hemácias. O analisador *Coulter LH 750* calcula o hematócrito através dessa fórmula. Os analisadores da *Sysmex®* determinam o hematócrito diretamente através dos métodos de foco hidrodinâmico e corrente direta. O hematócrito manual é mais impreciso do que o automatizado, pois ocorre encarceramento de plasma entre as hemácias elevando o valor do hematócrito em até 1,5% (FAILACE, 2007; OLIVEIRA, 2007).

2.3.1.4 Volume Corpuscular Médio (VCM)

O VCM é o índice hematimétrico que permite avaliar o volume das hemácias. Corresponde à média dos volumes de uma população de hemácias expresso em fentolitros (fL), sendo uma das medidas mais importantes no diagnóstico diferencial das anemias, indica microcitose (VCM < 80 fL), normocitose (VCM entre 80 e 100 fL) e macrocitose (VCM > 100fL). O VCM manual é obtido indiretamente segundo a

fórmula: $VCM = Htc \times 10/RBC$, o que torna o VCM manual impreciso, pois depende da contagem de eritrócitos (RBC) manual que possui pouca confiabilidade. Por automação, o VCM é determinado diretamente por impedância elétrica ou dispersão óptica. Os analisadores da Sysmex® calculam o VCM, pois determinam o hematócrito diretamente por automação (OLIVEIRA, 2007).

2.3.1.5 Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

A HCM é a média do conteúdo de hemoglobina de uma população de hemácias, indicando a quantidade de hemoglobina por hemácia. Sua diminuição é um indicativo de distúrbios de hemoglobinizacão, levando à hipocromia. A HCM manual ou por automação é obtida indiretamente pela fórmula: $HCM = Hb \times 10/RBC$. No caso do hemograma manual, é o menos confiável parâmetro obtido por cálculo, pois depende da contagem imprecisa dos eritrócitos em câmara de Neubauer e da dosagem de hemoglobina manual (OLIVEIRA, 2007).

2.3.1.6 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

A CHCM é o índice hematimétrico que indica a concentração de hemoglobina em determinado volume de hemácias. Logo, é o índice que avalia a cor das hemácias. Hemácias hipocrômicas e as policromáticas (os reticulócitos) possuem baixa concentração de hemoglobina, enquanto as hemácias hiperocrômicas (esferócitos, drepanócitos e equinócitos desidratados) possuem alta concentração de hemoglobina. Assim, uma população de hemácias hipocrômicas ou de hemácias policromáticas possuem CHCM baixa, enquanto que hemácias hiperocrômicas têm tendência a elevar a CHCM. A CHCM manual é calculada de acordo com a fórmula $CHCM = Hb \times 100/Ht$ e, por automação, é $CHCM = Hb \times 100 / (VCM \times RBC/10)$. A CHCM automatizada é um índice que depende de todos os outros parâmetros do eritrograma (OLIVEIRA, 2007).

2.3.1.7 Distribuição das Hemácias por Volume (RDW)

O RDW representa a variabilidade do tamanho da população de eritrócitos, ou seja, mede o grau de anisocitose. Pode ser utilizado na detecção precoce de deficiências de ferro, folato e vitamina B12 em pacientes que ainda não são anêmicos, pois é o primeiro parâmetro que se altera nesses casos. Esse parâmetro só pode ser obtido através dos analisadores automatizados. A análise manual da anisocitose é feita através de avaliação morfológica por microscopia óptica (FAILACE, 2007; OLIVEIRA, 2007).

2.3.1.8 Eritroblastos (Nucleated Red Blood Cells - NRBC)

Os eritroblastos são os precursores nucleados dos eritrócitos e são encontrados na medula óssea em condições normais. Podem aparecer no sangue periférico de pacientes com anemias hemolíticas graves, doenças medulares ou com baço hiperproliferativo. No recém-nascido, os eritroblastos circulam no sangue periférico até dez dias depois do nascimento (OLIVEIRA, 2007). A contagem dos eritroblastos manual é feita através da contagem em distensão sanguínea. Os eritroblastos são contados em separado durante a contagem diferencial de leucócitos, resultando no número de eritroblastos em 100 leucócitos. Se o número de eritroblastos for maior do que 10/100 leucócitos, então deve-se descontar do total de leucócitos, pois a contagem elevada de eritroblastos aumenta a contagem de leucócitos. O cálculo deve ser feito da seguinte maneira: leucócitos ajustados = $(\text{leucócitos totais} \times 100) / (100 + \text{número de eritroblastos})$. Vários modelos de analisadores automatizados realizam a contagem de eritroblastos. Os analisadores *Coulter LH 750* e os modelos da *Sysmex* contam eritroblastos através da citometria de fluxo e já fornecem a leucometria ajustada (MARTINHO, 2012; OLIVEIRA, 2007).

2.3.1.9 Reticulócitos

Os reticulócitos são eritrócitos imaturos que perderam o núcleo e mantêm algumas organelas como ribossomos, ácido ribonucleico (RNA) mensageiro e mitocôndrias. São originados na medula óssea após as fases de pró-eritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático e eritroblasto ortocromático. A quantidade de reticulócitos no sangue indica a velocidade e a capacidade de produção de eritrócitos viáveis na medula óssea. Se houver hiperpluralidade da medula óssea com quantidade de reticulócitos normal ou diminuída, é sugestivo de anemias associadas à eritropoese ineficaz como, por exemplo, anemias megaloblásticas. A medula óssea hipocelular com quantidade de reticulócitos diminuída, sugere anemias não associadas à eritropoese ineficaz, como anemia em pacientes com leucemia, aplasias de medula e outros. A contagem manual de reticulócitos é feita em distensões sanguíneas coradas pelos corantes supravitais (como o azul de metileno), que têm a capacidade de corar os precipitados de RNA residual (MARTINHO, 2012; OLIVEIRA, 2007).

2.3.2 **Leucograma**

O leucograma inclui a contagem global e a contagem diferencial de leucócitos. A contagem global é o número total de leucócitos na amostra por mm^3 . Essa contagem determina a produção basal dos leucócitos na medula óssea e dos linfócitos nos órgãos linfoides secundários em um indivíduo normal, seu aumento ou diminuição em estados infecciosos benignos ou nas neoplasias hematológicas. No hemograma manual, a contagem global é realizada em câmara de Neubauer, após diluição de amostra de sangue total com solução lisante de eritrócitos e plaquetas. No hemograma automatizado são utilizadas as tecnologias de impedância pelo analisador *Coulter LH 750* ou citometria de fluxo pelo *Sysmex XN-3000* (MARTINHO, 2012; OLIVEIRA, 2007).

A contagem diferencial é a quantificação de cada tipo de leucócito e é expressa em porcentagem e em valores absolutos. A contagem em valores absolutos é a contagem recomendada pelo ICSH (*International Council for Standardization in Hematology*) e é obtida através da multiplicação do valor percentual pelo valor da contagem global de leucócitos. A contagem diferencial de leucócitos é realizada através da análise da distensão sanguínea por microscopia óptica. Os valores percentuais obtidos são inteiros, pois são determinados com base na contagem de 100 células. Os analisadores hematológicos fornecem as contagens em valores absolutos e em percentuais, e podem fornecer contagens diferenciais em três, cinco ou seis partes. O analisador *Coulter LH 750* realiza a contagem diferencial de cinco partes, ou seja, classifica e quantifica neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. O analisador *Sysmex XN-3000* é um contador de seis partes, ou seja, quantifica neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e granulócitos imaturos, que compreende a soma dos metamielócitos, mielócitos e promielócitos.

Em amostras normais a contagem automatizada é mais precisa e possui maior reprodutibilidade do que a manual, pois os contadores estabelecem os valores relativos em um número maior de células. Entretanto, em amostras alteradas, a contagem manual é o método de referência, pois não há exatidão na contagem automatizada quando estão presentes células imaturas ou anômalas na amostra. Dentre as limitações da contagem diferencial automatizada, podemos citar:

- Não faz o escalonamento dos neutrófilos em segmentados em bastões, metamielócitos, mielócitos e promielócitos;
- Não identifica eosinófilos imaturos;
- Não avalia alterações displásicas nas séries eritróide (eritroblastos normoblásticos dos eritroblastos megaloblásticos) e leucocitária como neutrófilos pseudo-Pelger-Huet, hipogranulação ou hipergranulação neutrofílica e corpos de Dohle.
- Não faz distinção das atipias linfocitárias;
- Não caracteriza adequadamente os blastos.

2.3.3 Plaquetograma

A principal função das plaquetas é a formação do tampão plaquetário em resposta à lesão vascular. Além disso, ela desempenha um papel muito importante na cascata de coagulação, pois sua membrana plasmática contém glicoproteínas que servem de receptores para o Fator von Willebrand, colágeno e fibrinogênio (HOFFBRAND et. al., 2008).

A contagem manual de plaquetas é realizada em hemocitômetros como, por exemplo, a câmara de Neubauer, que utiliza várias soluções diluentes. Este método é considerado padrão de referência para a contagem de plaquetas. O uso desta técnica atualmente está restrito ao controle de qualidade de contagens automatizadas, devido a fatores como: demora na realização, dificuldade de padronização, variação na estabilidade e eficácia dos líquidos diluentes e variabilidade entre os observadores. O método de Fonio é um método indireto de avaliação das plaquetas, sendo utilizado para estimar a quantidade de plaquetas e avaliar sua morfologia e distribuição na distensão sanguínea. O analisador *Coulter LH 750* realiza a contagem de plaquetas utilizando a tecnologia de impedância e o *Sysmex XN-3000* utiliza citometria de fluxo.

2.3.4 Alarmes (*flags*) suspeitos

Os analisadores hematológicos são equipados com um algoritmo interno que gera mensagens (alarmes ou *flags*) suspeitas para os resultados de uma amostra, com base numa distribuição ou população anormal de células. Os alarmes alertam ao usuário sobre a possibilidade de anormalidades morfológicas ou outros tipos de anormalidades na amostra. Na presença de um alarme, os resultados devem ser revistos e pode ser necessária alguma ação corretiva com, por exemplo, a revisão morfológica através da leitura de lâmina (COULTER, 2010; HOUWEN, 2001).

Vários tipos de alarmes são emitidos pelos analisadores automatizados, alertando o usuário sobre alterações no eritrograma (dupla população eritrocitária,

aglutinação dos eritrócitos, presença de eritroblastos), no plaquetograma (plaquetas gigantes, agregados plaquetários), no leucograma (blastos, granulócitos imaturos, bastões, linfócitos atípicos) e na amostra (amostra envelhecida) (FAILACE, 2007; OLIVEIRA, 2007).

No leucograma são emitidos alarmes morfológicos, ou seja, alarmes baseados na presença de células que normalmente estão ausentes no sangue periférico. Esses alarmes alertam para a presença de: blastos (presentes nas leucemias), plasmócitos (mieloma múltiplo, leucemia plasmocitária, reacionais, etc), linfócitos atípicos (em infecções virais), *Hairy cells* (na tricoleucemia) e desvio à esquerda (bastonetes neutrófilos, metamielócitos, mielócitos e promielócitos). Este último pode ocorrer devido a processos infecciosos bacterianos, tratamento com estimuladores de produção dos neutrófilos e leucemia mieloide crônica. Na presença desses alarmes, deve-se confeccionar as distensões sanguíneas e prosseguir com a identificação e quantificação dessas células através da microscopia óptica, pois o equipamento apenas registra, sem identificar sob o ponto de vista qualitativo esses tipos celulares (FAILACE, 2007; HECKNER, 2000, OLIVEIRA, 2007).

2.4 ANALISADOR HEMATOLÓGICO *SYSMEX XN-3000*

2.4.1 Características do analisador *XN-3000*

Os analisadores da série XN são analisadores hematológicos automatizados com multi-parâmetros quantitativos destinados aos diagnósticos *in vitro* no rastreamento de populações de pacientes encontradas em laboratórios de análises clínicas. O analisador hematológico automatizado *Sysmex XN-3000* é composto por dois módulos *XN-1000* e um sistema para confecção e coloração de lâminas hematológicas, o *SP-1000* (figura 1). Cada módulo *XN-1000* processa 100 hemogramas/hora. Possui capacidade de armazenar 100.000 resultados de

amostras, incluindo gráficos de histogramas, dispersogramas e os dados demográficos dos pacientes (SYSMEX, 2014).

Figura 1: Analisador Hematológico automatizado *Sysmex XN-3000*



Fonte: Instituto Nacional de Câncer.

2.4.2 Tecnologia e métodos de análise

2.4.2.1 Método de detecção de corrente direta com foco hidrodinâmico

A contagem dos eritrócitos e plaquetas é feita pelo detector de eritrócitos através dos métodos de foco hidrodinâmico e corrente direta. Nesse método a amostra diluída é rodeada por um reativo envolvente e passa através do centro da abertura. Esse reativo evita a recirculação parcial de células e que estas sejam confundidas com as plaquetas, além de evitar que duas ou mais células passem ao mesmo tempo através da abertura e sejam contadas como uma só célula de maior

tamanho. O método de foco hidrodinâmico melhora a precisão e reprodutibilidade das contagens celulares (SYSMEX, 2015).

2.4.2.2 Análise de hemoglobina

O método da cianometahemoglobina foi recomendado pelo Comitê Internacional para a Padronização em Hematologia em 1966 como um método internacional padrão. Contudo, sua velocidade de conversão de hemoglobina é lenta e ainda usa compostos de cianeto, que são reativos tóxicos. Assim esse método vem sendo substituído por outros mais rápidos e/ou livres de cianeto. O analisador XN3000 utiliza o método de hemoglobina-lauril sulfato de sódio (SLS-HGB) para obter a hemoglobina colorimétrica. Esse método utiliza como reagente um sal de lauril sulfato de sódio, tornando a análise de hemoglobina livre de cianeto (OLIVEIRA, 2007; SYSMEX, 2015).

O mecanismo de reação do método hemoglobina-SLS funciona da seguinte forma:

- Etapa 1 - reação de hemólise entre o SLS e a membrana dos eritrócitos levando à liberação da hemoglobina;
- Etapa 2- a hemoglobina livre sofre uma modificação em sua estrutura tridimensional devido à ligação entre o grupo hidrofóbico do SLS e a globina;
- Etapa 3 - oxidação do grupo heme do ferro pelo oxigênio (ferro divalente para ferro trivalente);
- Etapa 4 - os grupos hidrofílicos do SLS se unem ao grupo heme do ferro trivalente para formar a união estável de SLS-hemoglobina.

A união SLS-hemoglobina mostra uma curva de absorção com um pico máximo a 535 nm de comprimento de onda e uma reativação aos 560 nm. O analisador irradia uma luz de 555 nm de comprimento de onda e mede a absorção (SYSMEX, 2015).

2.4.2.3 Hematócrito

O hematócrito é medido eletronicamente, através do método de detecção de altura dos pulsos. É expressado como porcentagem, sendo determinado comparando o volume total ou acumulado de hemácias com o volume de sangue total na diluição (SYSMEX, 2015).

2.4.2.4 Método de citometria de fluxo fluorescente

A citometria de fluxo é destinada a contagem de leucócitos, diferencial de leucócitos incluindo contagem de granulócitos imaturos, reticulócitos, fração de reticulócitos imaturos, hemoglobina reticulocitária, plaquetas fluorescentes como segundo método de análise e fração de plaquetas imaturas (FPI). Nesse método as células são analisadas à medida que estas passam através de uma célula de fluxo. A amostra de sangue é aspirada, medida e diluída, depois corada com um reativo fluorescente. A amostra posteriormente passa pela célula de fluxo onde as células passam em fila através da abertura. Um laser semiconductor emite uma luz que incide sobre as células no momento de sua passagem pela abertura. A dispersão da luz emitida é avaliada através de três sinais que variam entre as células de acordo com a morfologia e grau de maturação. A luz dispersa frontalmente é recebida pelo fotodiodo. A luz dispersa lateralmente e a luz fluorescente lateral são recebidas pelo tubo fotomultiplicador do sistema óptico. Esses sinais de luz são convertidos em pulsos elétricos, tornando possível obter informação sobre o tamanho, a complexidade e o estado de amadurecimento das células (SYSMEX, 2015).

O analisador XN3000 possui quatro canais onde são realizadas as identificações dos diferentes tipos celulares: canal WNR, canal WDF, canal de reticulócitos e canal de plaquetas fluorescentes. No canal WNR é realizada a contagem global de leucócitos e a diferencial de basófilos e eritroblastos. Este canal diferencia os basófilos de outros leucócitos e os detecta através de suas diferenças morfológicas baseados nas modificações da luz dispersa frontal (figura 2a). No

canal WDF é realizada a contagem dos neutrófilos, linfócitos monócitos e eosinófilos, assim como a detecção de células anormais tais como neutrófilos imaturos e linfócitos atípicos (figura 2b). Primeiro ocorre hemólise e dissolução dos eritrócitos e plaquetas, e permeabilização da membrana celular dos leucócitos. Um corante fluorescente penetra na célula e cora os ácidos nucleicos e as organelas celulares. Depois ocorre distinção de cada tipo de leucócito pelas diferenças em suas morfologias através da incidência da luz dispersa lateral. É possível diferenciar alarmes de anormalidade e contar várias células através da análise das diferenças de luz dispersa e fluorescência (SYSMEX, 2015).

Figura 2: Representação esquemática da sequência de eventos que ocorrem no canal WNR (a) e WDF (b) do analisador *Sysmex XN-3000*

(a)	Hemólise		Fluorescência		Fluorescência lateral (FSL)	Luz dispersa frontal (FSC)
	Antes	Depois	Antes	Depois		
Basófilos					Forte	Forte
Linfócitos					Media	Media
Monócitos						
Granulócitos (neutrófilos e eosinófilos)						
Eritroblastos					Fraca	Fraca
Hemácias					Muito fraca	Muito fraca

Figura 2 - Continuação

(b)

	Hemólise		Dissolução		Fluorescência lateral (FSL)	Luz dispersa frontal (FSC)	
Linfócitos		→		→		Média	Fraca
Monócitos		→		→		Média	Fraca
Neutrófilos		→		→		Fraca	Média
Eosinófilos		→		→		Fraca	Forte
Linfócitos atípicos		→		→		Média - Forte	Fraca
Granulócitos imaturos		→		→			Média

Fonte: Adaptado do guia preparatório para treinamento *Sysmex XN1000*.

2.5 ANALISADOR HEMATOLÓGICO *COULTER LH 750*

2.5.1 Características do analisador *Coulter LH 750*

O Analisador *Coulter LH 750* (figura 3) é um analisador hematológico quantitativo e automatizado destinado à utilização para diagnóstico *in vitro* em laboratórios clínicos. Possui velocidade de processamento de 110 amostras/hora, capacidade para armazenar até 50.000 hemogramas, histograma com apresentação tridimensional para os parâmetros leucócitos e reticulócitos e histogramas para visualização das populações de hemácias, plaquetas com curva corretora eliminando interferências.

Figura 3: Analisador hematológico automatizado *Coulter LH 750*



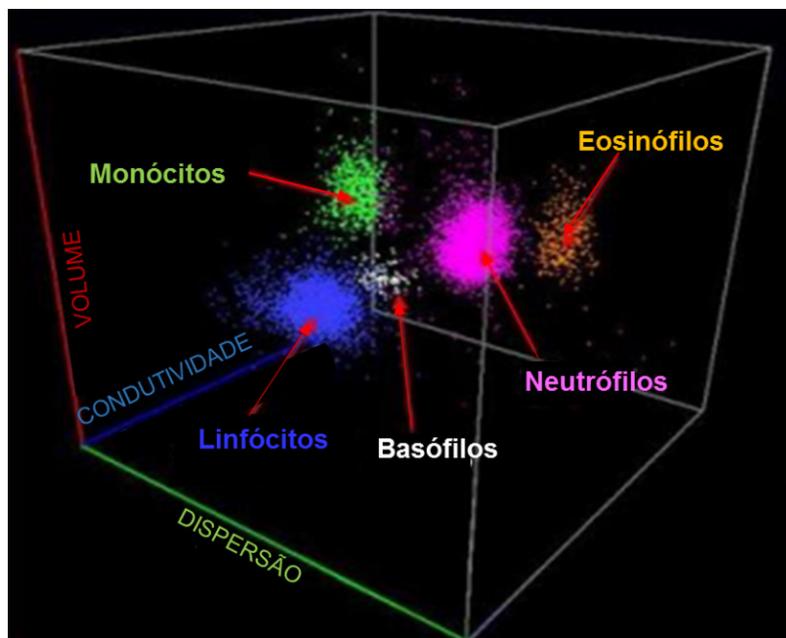
Fonte: Instituto Nacional de Câncer.

2.5.2 Tecnologias e métodos de análise

As contagens globais de leucócitos, eritrócitos e plaquetas realizadas no analisador *Coulter LH 750* são realizadas baseadas no princípio da impedância elétrica. De acordo com esse princípio, quando uma célula passa por uma pequena abertura entre dois eletrodos (um positivo e outro negativo), por ser má condutora de corrente, promove o impedimento da passagem de corrente elétrica (impedância elétrica), de magnitude proporcional ao seu volume (OLIVEIRA, 2007).

A contagem diferencial de leucócitos e a contagem de reticulócitos são baseadas no princípio VCS (*volume, conductivity e scatter*) – volume, condutividade e dispersão da luz. O canal VCS utiliza o foco hidrodinâmico célula a célula, que passam por um fluxo celular contínuo. Os sinais elétricos de baixa frequência que são emitidos pelas células definem o volume celular. Os sinais de alta frequência (radiofrequência) definem a condutividade interna (composição interna). A dispersão (*scatter*) da luz emitida pela célula define sua granularidade e formato. Esta tecnologia permite a diferenciação e contagem de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e reticulócitos (figura 4).

Figura 4: Diagrama de dispersão tridimensional da distribuição dos leucócitos no analisador hematológico automatizado *Coulter LH 750*.



Fonte: Adaptado da tela do sistema do analisador *Coulter LH 750*

2.6 COMPARAÇÃO ENTRE OS ANALISADORES *COULTER LH 750* E *SYSMEX XN-3000*

As principais informações técnicas e tecnologias utilizadas nos analisadores hematológicos *Coulter LH 750* e *Sysmex XN-3000* estão listadas no quadro 1.

Quadro 1: Informações técnicas e tecnologias empregadas nos analisadores hematológicos *Coulter LH 750* e *Sysmex XN-3000*.

	Beckman Coulter®	Sysmex®
Analisador Hematológico	<i>Coulter LH 750</i>	<i>Sysmex XN-3000</i>
Capacidade de processamento	110 (testes/hora)	200 (testes/hora)
Diferenciação dos leucócitos	5 partes (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos)	6 partes (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e granulócitos imaturos)
Leucócitos	Impedância	Citometria de fluxo
Eritrócitos	Impedância	Impedância
Hemoglobina (Hg)	Ciano-meta-hemoglobina modificado	Lauril sulfato de sódio (livre de cianeto)
Hematócrito (Htc)	$Ht = VCM \times RBC/10$	Foco hidrodinâmico e corrente direta
Volume Corpuscular Médio (VCM)	Média do volume dos eritrócitos	$VCM = Htc \times 10/RBC$
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	$Hb \times 10/RBC$	$Hb \times 10/RBC$
Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)	$Hb \times 100 / (VCM \times RBC/10)$	$Hb \times 100 / (VCM \times RBC/10)$
Reticulócitos	Coloração supravital com azul de metileno e detecção através da tecnologia VCS	Coloração supravital com corante de RNA e detecção óptica da fluorescência
Eritroblastos	Método óptico	Método óptico
Leucócitos	Tecnologia VCS	Método óptico e coloração fluorescente
Plaquetas	Impedância	Impedância e método óptico

VCS: *volume, conductivity, scatter* (volume, condutividade e dispersão da luz)

3 JUSTIFICATIVA

Os hospitais do Instituto Nacional de Câncer (INCA) integram o Sistema Único de Saúde (SUS) e oferecem tratamento gratuito e integral às pessoas com câncer. O INCA é referência nacional no tratamento do câncer, reconhecido pela qualidade do atendimento e serviço prestados por seus profissionais (INCA, 2015). O Laboratório de Patologia Clínica desta instituição possui um importante papel no acompanhamento dos tratamentos e auxílio no diagnóstico dessas malignidades e infecções decorrentes do tratamento das mesmas. O Setor de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital do Câncer I (HCI) do INCA conta atualmente com os analisadores hematológicos *Sysmex XN-3000* (*Sysmex Corporation*, Kobe, Japan) e *Coulter LH 750* (Beckman, Brea, Califórnia). O estudo da performance desses analisadores é importante para o Setor de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do INCA – HCI por diversas razões, como elucidadas a seguir.

Durante a rotina laboratorial os hemogramas são distribuídos entre os analisadores *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750*. Como esses dois equipamentos empregam metodologias distintas, pode ocorrer uma variabilidade analítica entre os resultados, porém essas diferenças precisam ser de uma magnitude aceitável. Assim, devemos fazer uma análise da concordância entre os seus resultados, para continuarmos utilizando-os indistintamente no acompanhamento dos pacientes.

Os resultados emitidos pelos analisadores hematológicos que estiverem dentro dos limites dos parâmetros numéricos e sem alarmes morfológicos, são liberados sem intervenção dos funcionários do setor através do interfaceamento dos resultados dos equipamentos com o sistema (salvo em solicitações médicas específicas). O estudo da acurácia dos alarmes torna-se importante na liberação direta, para podermos liberar os hemogramas automaticamente com segurança, com o mínimo possível de resultados falsos negativos.

Após uma análise realizada no mês de maio de 2016 no Setor de Hematologia, verificamos que cerca de 40% dos hemogramas apresentaram alarmes morfológicos emitidos pelos analisadores. Esse alto índice deve-se aos

pacientes com doenças hematológicas ou aos tratamentos como quimioterapia, radioterapia, transplante de medula óssea e medicamentos que estimulam a produção de neutrófilos. Nestes casos, são necessárias tanto a confecção das distensões sanguíneas, bem como sua avaliação por microscopia óptica. A revisão dessas lâminas acarreta demora na liberação dos resultados dos hemogramas, consequentemente atrasando os tratamentos e transfusões sanguíneas. A análise da acurácia dos alarmes permitirá verificar se essa quantidade de alarmes está superestimada devido aos falsos positivos.

Os analisadores *Coulter LH 750* e *Sysmex XN-3000* oferecem *flags* morfológicos ajustáveis, através da sensibilidade. Baseado na população de pacientes atendidos, o laboratório pode introduzir seus critérios ou usar os critérios já estabelecidos pelo fabricante. Porém as alterações só poderão ser feitas pelas equipes técnicas das empresas responsáveis pelos analisadores e mediante estudos que comprovem a real necessidade de ajuste. Com o estudo da acurácia dos alarmes, poderemos verificar se há necessidade de alterar as configurações dos equipamentos, podendo diminuir as revisões de lâminas na rotina laboratorial (BRIGGS, 2012; FERNANDEZ, 2001).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a confiabilidade e a acurácia dos analisadores hematológicos *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750* para avaliação quantitativa e qualitativa do hemograma.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a concordância entre os analisadores hematológicos *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750* para os parâmetros quantitativos hemoglobina, hematócrito, hemácias, leucócitos total, VCM, HCM, CHCM, RDW, eritroblastos, diferencial de leucócitos e plaquetas.
- Verificar a concordância entre os analisadores hematológicos *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750* com a microscopia óptica para a contagem diferencial de leucócitos e para contagem de eritroblastos;
- Avaliar a acurácia dos flags morfológicos dos analisadores hematológicos *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750* utilizando a microscopia óptica como padrão de referência;
- Propor critérios para liberação direta dos hemogramas (sem revisão das lâminas) no setor de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do INCA.

5 MÉTODOS

5.1 DESENHO DE ESTUDO

Estudo seccional de validação diagnóstica para avaliar a acurácia de dois analisadores hematológicos automatizados, seguindo as recomendações contidas na diretriz STARD 2015 (KOREVAAR et al., 2016). As análises foram realizadas no laboratório de patologia clínica do HCl do INCA, hospital que atende pacientes oncológicos em diversas áreas, exceto ginecologia oncológica (Hospital do Câncer II), câncer de mama (Hospital do Câncer III) e cuidados paliativos (Hospital do Câncer IV).

5.2 AMOSTRAS

Foram estudadas 476 amostras de sangue periférico provenientes dos pacientes atendidos no HCl do INCA para os quais foi solicitado hemograma no período de abril a maio de 2016. As amostras foram selecionadas consecutivamente, por ordem de chegada no setor, pela manhã e à tarde, em diferentes dias da semana, a fim de mimetizar a rotina laboratorial.

Foram incluídas as amostras de sangue colhidas em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetra-acético tri-potássio (K_3EDTA) que foram encaminhadas ao Setor de Hematologia para realização de hemogramas. Foram excluídas as amostras consecutivas de um mesmo paciente colhidas no mesmo dia e aquelas com contagem total de células menor que $500/\mu l$, devido à dificuldade de contar 100 células por microscopia óptica em uma lâmina proveniente de uma amostra com leucometria abaixo de $500/\mu l$.

As amostras foram obtidas por profissionais responsáveis pela coleta de sangue do Laboratório de Patologia Clínica do INCA. Foram utilizadas agulhas descartáveis 25 x 7 mm ou *scalp* a vácuo em casos de difícil acesso, garrotes, equipamentos de proteção individual e álcool 70% para assepsia do local. Foi realizada a punção venosa periférica na fossa antecubital nas veias antecubital média, cefálica e basílica, em tubos à vácuo de 2 ou 3 ml, contendo K_3EDTA . Os tubos foram identificados com etiquetas contendo códigos de barras e encaminhadas ao Setor de Hematologia para a realização dos hemogramas. A utilização dessas etiquetas permite a identificação das amostras pelos equipamentos, e o interfaceamento entre os resultados liberados pelos analisadores hematológicos e o sistema MATRIX adotado pelo laboratório.

5.3 PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS

No Setor de Hematologia, os tubos foram primeiramente inseridos no analisador hematológico *Coulter LH 750* para processamento. Após a liberação dos

tubos pelo analisador, estes foram processados pelo analisador hematológico *Sysmex XN-3000* e, em seguida, transportados automaticamente para o sistema de confecção e coloração de distensões sanguíneas *Sysmex SP-1000*, que realizou as distensões sanguíneas em lâminas de vidro, identificação e coloração destas para análise microscópica. O corante utilizado por esse equipamento é o May-Grünwald-Giemsa. Após a coloração, todas as lâminas foram avaliadas pela microscopia óptica por um de dois farmacêuticos treinados e com experiência nesta atividade, mascarados para o resultado dos analisadores hematológicos automatizados. Foram utilizados microscópios Nikon com objetivas de 40x e 100x (imersão). Os resultados da leitura manual de 100 leucócitos, classificados na contagem diferencial foram expressos em porcentagens. Os eritroblastos também foram contados na lâmina, em paralelo a contagem diferencial de leucócitos. Os resultados das contagens das lâminas por microscopia foram digitados no programa Epi Info™ versão 7.

As amostras foram descartadas após sete dias de armazenamento em geladeira, assim como as demais amostras de hemogramas do setor. Após a leitura à microscopia óptica, as lâminas foram armazenadas rotineiramente por quinze dias para sanar eventuais dúvidas dos médicos.

5.4 CONTROLE DE QUALIDADE

Na rotina do laboratório, são realizadas manutenções diárias, quinzenais e mensais em todos os analisadores hematológicos conforme as instruções dos fabricantes. O controle de qualidade interno desses equipamentos é feito diariamente através de amostras de sangue controle fornecidas pelos fabricantes. Além disso, diariamente selecionamos amostras de sangue dos 20 primeiros pacientes e processamos nos dois analisadores automatizados, para uma análise bruta da concordância entre eles, onde ações corretivas são tomadas quando observamos variações entre os resultados emitidos por eles.

O controle de qualidade externo é fornecido mensalmente pela Controllab,

uma empresa de controle de qualidade para laboratórios. Esse controle externo é constituído por sangue controle para verificação dos equipamentos, e lâminas de hemograma digitalizadas para analisar as leituras feitas pelos microscopistas.

Para esse estudo, realizamos também um controle de qualidade interno para a microscopia, a fim de observarmos a concordância entre os microscopistas na análise microscópica da lâmina do hemograma. Para isso confeccionamos lâminas em duplicata no esquema “duplo-cego” para que os dois farmacêuticos participantes do estudo realizassem a leitura das lâminas por microscopia óptica. Estes farmacêuticos foram treinados e possuem experiência em leitura de lâminas, atuando há mais de 5 anos no setor de hematologia do laboratório.

Figura 5: Microscópio com duas cabeças binoculares destinado ao ensino.



Fonte: Instituto Nacional de Câncer

5.5 TAMANHO AMOSTRAL PARA O ESTUDO

Para o controle de qualidade interno, seria necessário um tamanho de 80 observações (40 lâminas para cada avaliador), considerando um coeficiente de correlação intraclassa (CCI) de 0,8, nível de significância de 5% e poder de 80%. Para a avaliação de acurácia dos analisadores, seriam necessárias 369 amostras sanguíneas, considerando o nível de confiança de 95%, uma diferença aceitável de

0,05 e assumindo uma proporção de 0,4, pois aproximadamente 40% dos resultados apresentam *flags* na rotina do setor.

Estes cálculos foram realizados no programa WinPepi versão 11.63.

5.6 VARIÁVEIS DO ESTUDO

- **Parâmetros quantitativos de série vermelha:** hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), hemoglobina (g/dL); hematócrito (%), volume corpuscular médio - VCM (fL); hemoglobina corpuscular média - HCM(pg); hemoglobina corpuscular média - MCHC (g/dL); grau de anisocitose - RDW (%) e eritroblastos (%).
- **Parâmetros quantitativos de série branca:** total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), neutrófilos (%), linfócitos (%), monócitos (%), eosinófilos (%), basófilos (%) e granulócitos imaturos % (somente para o *Sysmex XN-3000*)
- **Parâmetro quantitativo do plaquetograma:** plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$).
- **Parâmetros qualitativos (alarmes ou *flags*):** blastos, granulócitos imaturos (GI), neutrófilos bastonetes (bastões) e linfócitos atípicos (LA).

As amostras analisadas por microscopia óptica foram consideradas positivas quando obedeciam aos seguintes critérios:

- Presença de blastos - amostra positiva para blastos;
- $\geq 1\%$ de metamielócitos, mielócitos ou promielócitos - amostra positiva para granulócitos imaturos
- $\geq 5\%$ de neutrófilos bastonetes - amostra positiva para bastões
- $\geq 5\%$ de linfócitos atípicos – amostra positiva para linfócitos atípicos

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.7.1 Controle de qualidade interno: confiabilidade entre os microscopistas

O coeficiente de correlação intraclasse e seu respectivo intervalo de 95% de confiança foi utilizado para avaliar a confiabilidade de cada parâmetro quantitativo de série branca observado. O coeficiente *Kappa* foi calculado para os parâmetros qualitativos (*flags*).

5.7.2 Confiabilidade dos parâmetros quantitativos entre os analisadores automatizados *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750*.

A concordância dos valores obtidos entre cada analisador foi avaliada por meio do gráfico de Bland-Altman, que descreve a dispersão entre as médias individuais das duas medidas e as diferenças individuais entre as medidas. Utilizou-se um limite de concordância (LC) de 95% pela seguinte equação: $LC = (1.96 \times DP) \pm Mdif$; onde DP = desvio padrão e Mdif = média das diferenças. No eixo y estão projetados os valores das diferenças entre os parâmetros quantitativos dos dois analisadores, no eixo x estão os valores das médias dos resultados obtidos entre eles. Foram traçados os limites de concordância, ou seja, os valores da média das diferenças +1.96 DP (linha superior) e a média das diferenças -1.96 DP (linha inferior). Além disso foi traçada a linha correspondente ao viés (linha do meio), ou seja, a média entre a diferença entre os analisadores (BLAND e ALTMAN, 1986; HIRAKATA e CAMEY, 2009).

Foi utilizado o CCI para avaliar a concordância entre os analisadores hematológicos para todos os parâmetros quantitativos.

5.7.3 Concordância entre os analisadores automatizados e a Microscopia Óptica

Para esta análise, foi calculado o coeficiente de correlação intra-classe e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para as variáveis de série branca e eritroblastos.

5.7.4 Avaliação da acurácia dos alarmes (*flags*) morfológicos emitidos pelos analisadores automatizados

Para avaliar a acurácia dos analisadores automatizados para detectar os quatro alarmes morfológicos, foram calculados os seguintes parâmetros: sensibilidade, especificidade, eficiência (acurácia total), valores preditivos positivo e negativo, e razões de verossimilhança, considerando a microscopia óptica o método de referência.

5.7.5 Concordância entre os alarmes morfológicos gerados pelos analisadores *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750*

Para avaliar a concordância entre os *flags* morfológicos emitidos pelos dois analisadores foi calculado o coeficiente *Kappa* (k) e seus respectivos intervalos de confiança, para cada parâmetro qualitativo.

5.7.6 Análise e interpretação dos resultados

O coeficiente de correlação intraclass e os gráficos foram realizados no programa SPSS versão 16. A interpretação dos valores foi de acordo com *Portney* e *Watkins*:

CCI > 0,90 - alta confiabilidade

0,89 > CCI > 0,75 - boa confiabilidade

CCI < 0,75 - baixa confiabilidade

Os cálculos do índice *Kappa*, concordâncias positivas e negativas foram feitos no programa R Gui versão 3.4.1. Os valores de Kappa foram interpretados de acordo com a proposição de *Landis e Koch*, tabela 1.

Tabela 1: Graus de intensidade do índice Kappa. Fonte: Adaptado de LANDIS e KOCH, 1977

K	Interpretação
< 0	pobre
0.00 – < 0,20	discreta
0.20 – < 0.40	regular
0.40 – < 0.60	moderada
0.60 – < 0.80	substancial
0.8 – < 1.00	quase perfeita
1.00	perfeita

5.8 ASPECTOS ÉTICOS

As amostras biológicas deste estudo foram obtidas na rotina do laboratório e não caracterizam qualquer acréscimo de condutas, tratamentos ou questionamentos junto aos pacientes. O projeto desta dissertação foi encaminhado aos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) do INI e INCA, que emitiram parecer de dispensa de apreciação ética por se tratar de análise de desempenho de equipamentos (ANEXO I).

6 RESULTADOS

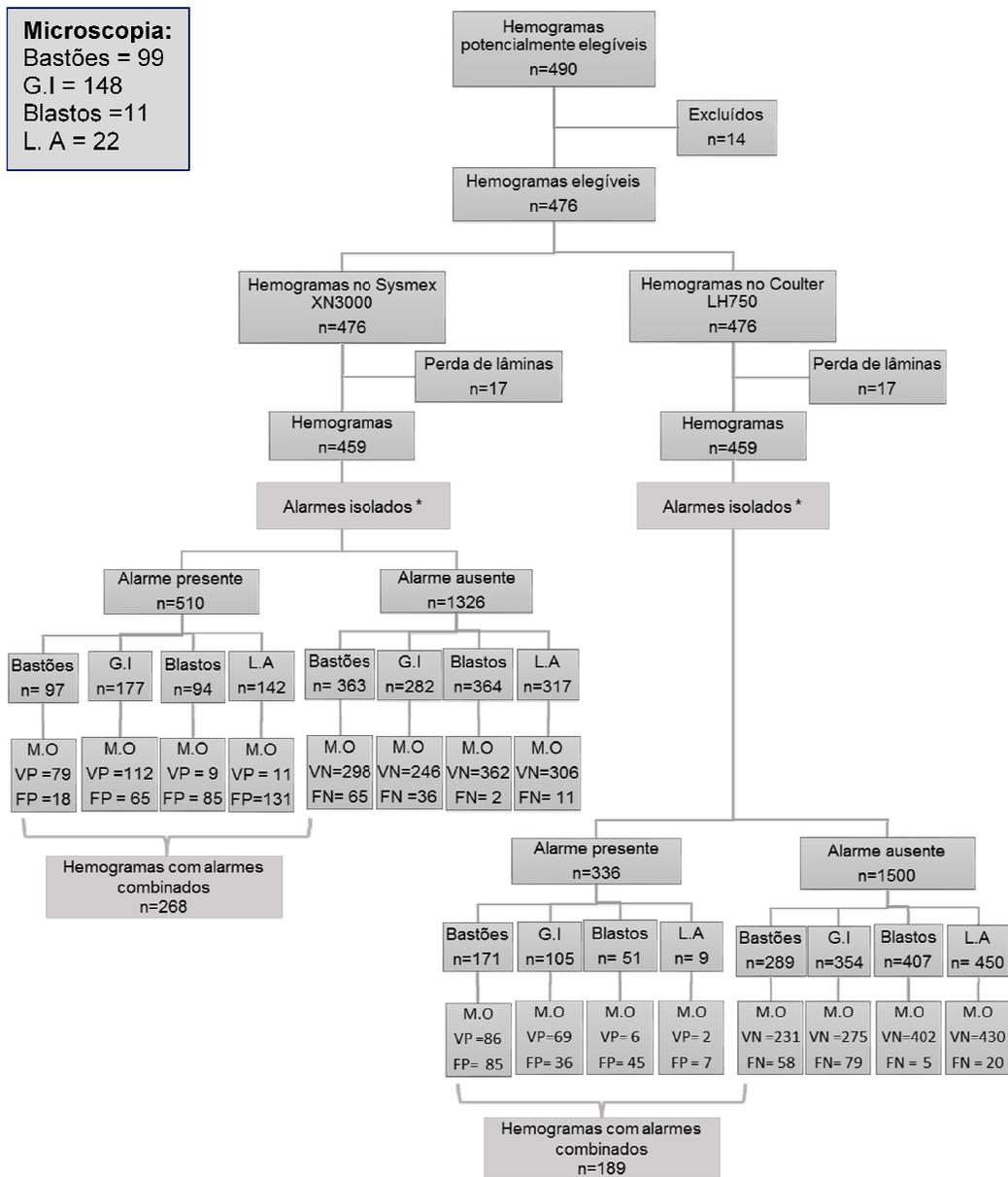
O fluxo dos hemogramas, desde a seleção, está representado pela figura 6, conforme o *guideline* STARD 2015 para estudos de métodos diagnósticos (KOREVAAR *et al*, 2016). Dos 490 hemogramas selecionados, 14 hemogramas foram excluídos por apresentarem resultado da contagem global de leucócitos menor que 500/ μ l. As análises quantitativas foram então realizadas nas 476 amostras restantes, processadas nos analisadores *Sysmex XN-3000* e *Couler*

LH750. Para a análise dos alarmes gerados pelos equipamentos, foram confeccionadas lâminas das distensões sanguíneas para análise microscópica. Houve perda de 17 lâminas devido a quebras (oito) e não confecção pelo equipamento (nove). O fluxograma ilustra a quantidade de alarmes gerados pelos analisadores e sua correlação com a microscopia óptica (padrão ouro). O mesmo hemograma pode conter alarmes combinados, ou seja, um hemograma pode possuir até quatro alarmes (bastões, granulócitos imaturos, blastos e linfócitos atípicos) ao mesmo tempo. Por isso a soma dos alarmes isolados é maior do que o total de alarmes. Nesse estudo foram utilizados 459 hemogramas para análise do desempenho analítico dos alarmes gerados pelos analisadores, esse número de hemogramas pode gerar até 1836 alarmes isolados (459 hemogramas x 4 possíveis alarmes).

O analisador *Sysmex XN 3000* gerou 510 alarmes isolados em 268 hemogramas, enquanto que o *Coulter LH 750* apresentou 336 alarmes isolados em 189 hemogramas.

A análise microscópica das 459 lâminas apresentou 99 bastões, 148 granulócitos imaturos, 11 blastos e 22 linfócitos atípicos.

Figure 6: Fluxograma dos hemogramas do estudo



GI: granulócitos imaturos, LA: linfócitos atípicos; MO: microscopia óptica; VP: verdadeiro positivo; FP: falso positivo; VN: verdadeiro negativo; FN: falso negativo.

* cada hemograma pode conter até quatro alarmes isolados (total de 1836 possíveis alarmes)

6.1 Controle de qualidade interno: confiabilidade entre os microscopistas

A confiabilidade entre os resultados das leituras das lâminas pelos dois observadores foi alta para neutrófilos, linfócitos e eosinófilos; boa correlação para monócitos e eritroblastos, e baixa correlação para basófilos (tabela 2). A concordância dos resultados dos parâmetros qualitativos entre os dois observadores perfeita para blastos, substancial para bastões e linfócitos atípicos, e moderada para granulócitos imaturos (tabela 3).

Tabela 2: Confiabilidade entre os resultados da leitura das lâminas por microscopia óptica pelos dois farmacêuticos e seus respectivos intervalos de confiança (IC), n=40.

Variável	Coefficiente de correlação intraclassa (IC 95%)
Neutrófilos (%)	0,950 (0,907 – 0,973)
Linfócitos (%)	0,952 (0,911 – 0,974)
Monócitos (%)	0,854 (0,741 – 0,920)
Eosinófilos (%)	0,952 (0,911 – 0,974)
Basófilos (%)	0,535 (0,272 – 0,724)
Eritroblastos	0,756 (0,584 – 0,863)

Tabela 3: Frequência e concordância de blastos, granulócitos imaturos, bastões e linfócitos atípicos entre os dois observadores, n=40.

Parâmetros	Concordância positiva n (%)	Concordância Negativa n (%)	Kappa (IC 95%)	Interpretação
Blastos	1 (2,5)	39 (97,5)	1,00 (0,69-1,31)	Perfeita
Granulócitos imaturos	6 (15,0)	28 (70,0)	0,57 (0,26-0,88)	Moderada
Bastões	5 (12,5)	31 (77,5)	0,66 (0,37-0,95)	Substancial
Linfócitos atípicos	3 (7,5)	35 (87,5)	0,72 (0,42-1,02)	Substancial

6.2 Confiabilidade dos parâmetros quantitativos das séries branca, vermelha e plaquetas entre os analisadores automatizados *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750*.

A tabela 4 apresenta os coeficientes de correlação intraclasse (CCI) obtidos para cada analisador automatizado, bem como seus limites superiores e inferiores, a média e o desvio padrão (DP). Verificamos que, de acordo com os critérios estabelecidos, os dois analisadores possuem alta confiabilidade (CCI>0,90) para a maioria dos parâmetros quantitativos, à exceção do percentual de monócitos que apresentou boa concordância, e baixa concordância para MCHC, eritroblastos e basófilos.

Tabela 4: Distribuição e confiabilidade dos parâmetros hematológicos entre os analisadores automáticos XN 3000 e LH 750

Parâmetros	Amostras (n)	XN 3000 Média (DP)	LH 750 Média (DP)	CCI (IC 95%)
Hemácias($\times 10^6/\mu\text{L}$)	476	3,648 (0,041)	3,700 (0,041)	0,995 (0,993 – 0,995)
Hemoglobina(g/dL)	474	10,529 (0,116)	10,630 (0,115)	0,995 (0,994 – 0,996)
Hematócrito (%)	476	31,635(0,336)	33,170 (0,353)	0,988 (0,986 – 0,990)
VCM (fL)	476	87,326 (0,360)	90,216 (0,375)	0,949 (0,939 -0,957)
HCM (pg)	474	29,060 (0,137)	28,939 (0,134)	0,978 (0,974 – 0,982)
MCHC (g/dL)	474	33,259 (0,071)	32,048 (0,047)	0,726 (0,681 – 0,766)
RDW (%)	475	15,868 (0,156)	17,074 (0,180)	0,940 (0,929 – 0,950)
Plaquetas($\times 10^3/\mu\text{L}$)	476	202,38 (5,810)	203,70 (6,022)	0,975 (0,970 - 0,979)
Leucócitos($\times 10^3/\mu\text{L}$)	470	10,359 (1,084)	10,354 (1,058)	0,998 (0,998 – 0,999)
Neutrófilos (%)	476	58,673 (0,979)	60,543 (0,982)	0,961 (0,954 – 0,968)
Linfócitos (%)	476	27,900 (0,859)	27,124 (0,838)	0,971 (0,965 – 0,976)
Monócitos (%)	476	10,282 (0,339)	9,283 (0,337)	0,889 (0,869 – 0,907)
Eosinófilos (%)	476	2,308 (0,155)	2,307 (0,159)	0,956 (0,947 – 0,963)
Basófilos (%)	476	0,461 (0,018)	0,744 (0,053)	0,026 (-0,065 – 0,116)
Eritroblastos (%)	476	0,305 (0,075)	0,417 (0,107)	0,655 (0,599– 0,704)

VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: grau de anisocitose

Figura 7: Gráficos de Bland-Altman para os resultados dos parâmetros quantitativos dos analisadores hematológicos automatizados *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750*.

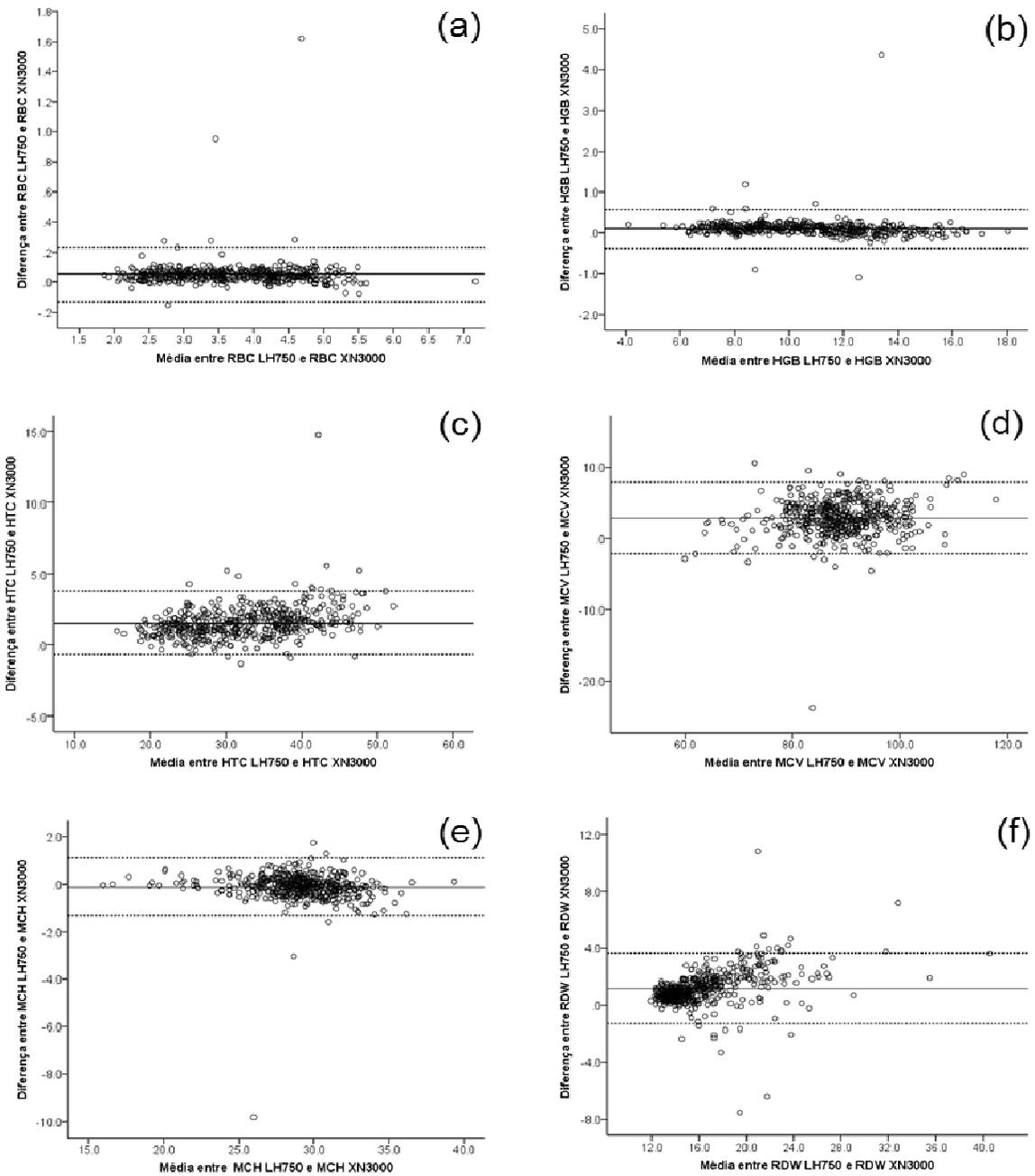


Figura 7 - Continuação

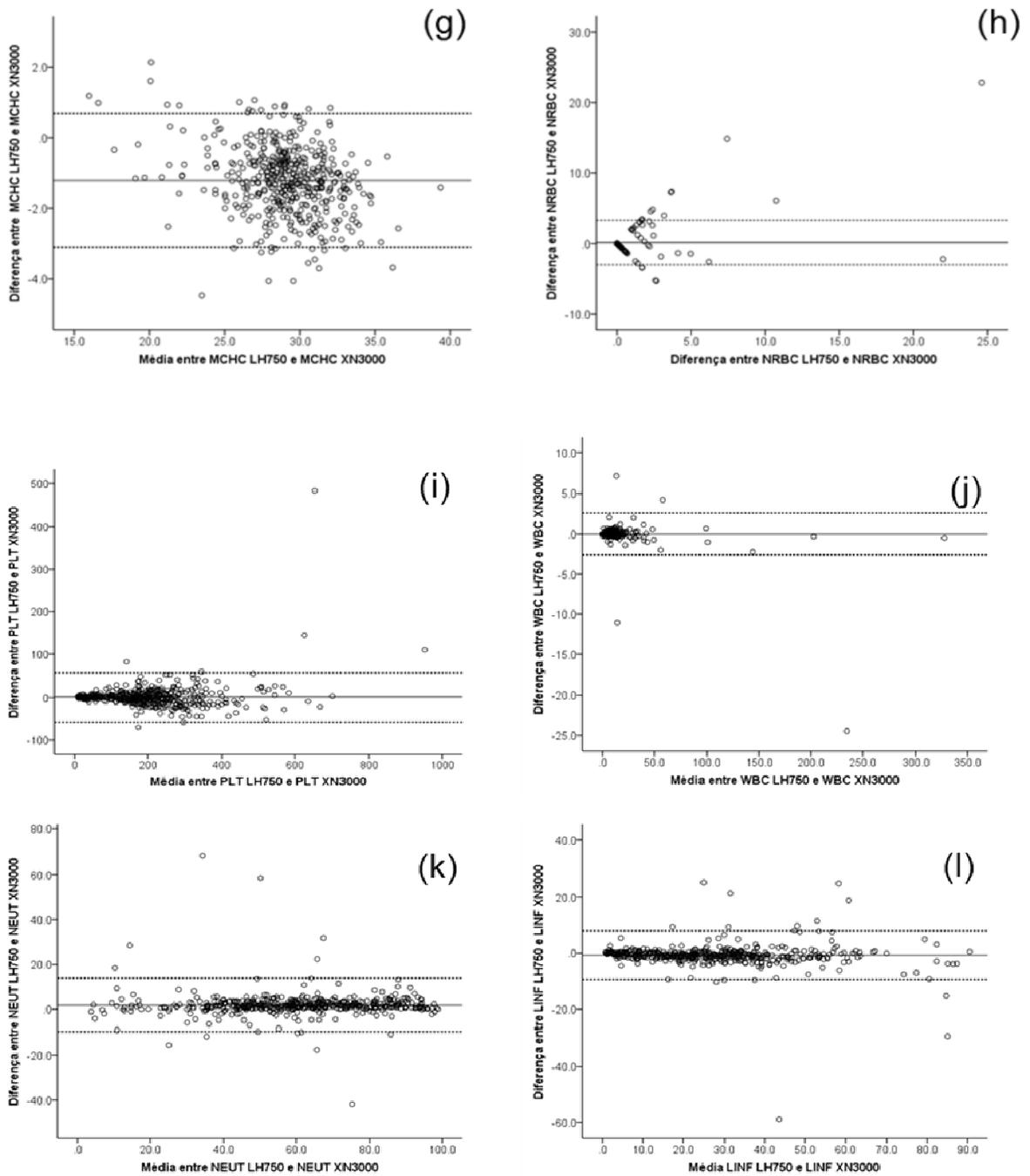
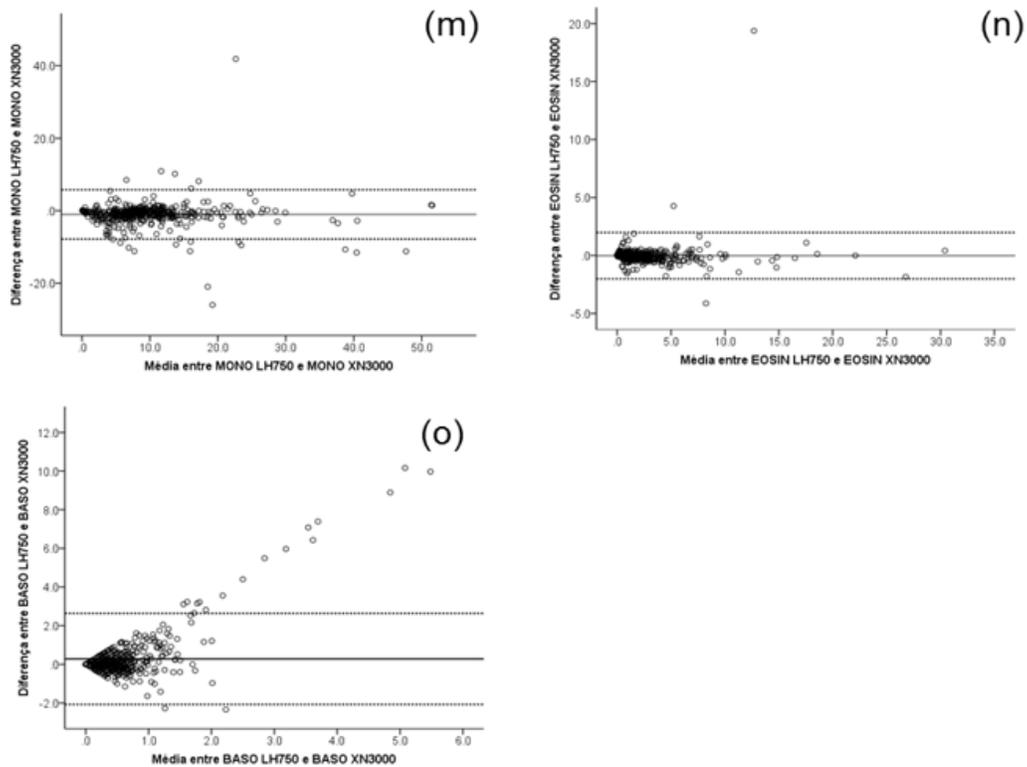


Figura 7 - Continuação



RBC hemácias, HGB hemoglobina; HTC hematócrito; VCM volume corpuscular médio; MCH hemoglobina corpuscular média; CHCM concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW grau de anisocitose; PLT plaquetas; WBC total de leucócitos; NRBC eritroblastos; NEUT neutrófilos; LINF linfócitos; MONO monócitos; EOSIN eosinófilos e BASO basófilos.

A figura 7 representa os gráficos de Bland-Altman de concordância entre os dois analisadores automatizados para todos os parâmetros quantitativos. Houve boa concordância entre os analisadores para todos os resultados, pois a maioria dos pontos encontram-se dentro do limite esperado de concordância. Exceto para basófilos (figura 7o) que apresentou muitos pontos fora dos limites de confiança, o que pode ser confirmado pelo baixo CCI (tabela 4).

6.3 Confiabilidade da contagem diferencial de leucócitos e eritroblastos entre os analisadores automatizados e a microscopia óptica

Os parâmetros neutrófilos, linfócitos e eosinófilos apresentaram boa confiabilidade entre os analisadores e a microscopia (tabelas 5 e 6). A contagem de eritroblastos apresentou boa confiabilidade entre o analisador XN3000 e a microscopia, e baixa confiabilidade entre o analisador LH750 e a microscopia. O percentual de basófilos apresentou baixa confiabilidade nos dois analisadores comparados com a microscopia. O alarme granulócitos imaturos do *Sysmex XN-3000* apresentou boa correlação com a microscopia.

Tabela 5: Distribuição e confiabilidade da contagem diferencial de leucócitos e eritroblastos entre o analisador automático LH 750 e a microscopia óptica.

Parâmetros	Amostras (n)	LH750 Média (DP)	Microscopia Média (DP)	CCI (IC 95%)
Neutrófilos (%)	451	60,543 (0,982)	62,469 (0,963)	0,882 (0,860 – 0,901)
Linfócitos (%)	452	27,124 (0,838)	26,196 (0,873)	0,888 (0,867 – 0,906)
Monócitos (%)	452	9,283 (0,337)	8,621 (0,309)	0,725 (0,678 – 0,766)
Eosinófilos (%)	452	2,307 (0,159)	2,303 (0,157)	0,848 (0,820 – 0,872)
Basófilos (%)	452	0,744 (0,053)	0,357 (0,035)	0,043 (-0,049 – 0,135)
Eritroblastos(%)	449	0,417 (0,107)	0,323 (0,0842)	0,650 (0,593 – 0,700)

Tabela 6: Distribuição e confiabilidade da contagem diferencial de leucócitos e eritroblastos entre o analisador automático XN3000 e a microscopia óptica.

Parâmetros	Amostras (Nº)	XN3000 Média (DP)	Microscopia Média (DP)	CCI (IC 95%)
Neutrófilos (%)	458	58,673 (0,979)	62,469 (0,963)	0,878 (0,855 – 0,897)
Linfócitos (%)	458	27,900 (0,859)	26,196 (0,873)	0,890 (0,870 – 0,908)
Monócitos (%)	458	10,282 (0,339)	8,621 (0,309)	0,706 (0,657 – 0,749)
Eosinófilos (%)	458	2,308 (0,155)	2,303 (0,157)	0,882 (0,860 – 0,901)
Basófilos (%)	458	0,461 (0,018)	0,357 (0,035)	0,323 (0,239 – 0,403)
Eritroblastos(%)	458	0,305 (0,075)	0,323 (0,0842)	0,890 (0,869 – 0,907)
Granulócitos imaturos (%)	458	2,574 (0,238)	1,379 (0,187)	0,769 (0,728 – 0,804)

6.4 Avaliação da acurácia dos alarmes (*flags*) morfológicos emitidos pelos analisadores automatizados

A tabela 7 mostra o desempenho analítico dos alarmes para blastos, granulócitos imaturos, bastões e linfócitos atípicos. Mais de 1% de blastos foram contados em 11 (2,4%) de 459 amostras por microscopia óptica. Para este alarme, o analisador *Sysmex XN-3000* apresentou maior sensibilidade (81,8%) enquanto que o *Coulter LH 750* apresentou maior especificidade (89,9%) e acurácia (89,1%). O equipamento *Sysmex XN-3000* apresentou maior RVP (8,09) e menor RVN (0,22).

Foram contados mais de 1% de granulócitos imaturos (metamielócitos, mielócitos e promielócitos) em 148 (32,2%) de 459 amostras. A sensibilidade foi maior para o analisador *Sysmex XN-3000*, apresentando 76,4% enquanto que a especificidade foi maior para o *Coulter LH 750* (88,4%). O *Sysmex XN-3000* apresentou menor RVN.

De 459 amostras, 99 (21,5%) continham mais do que 5% de bastões. O analisador *Sysmex XN 3000* apresentou maior especificidade (94,3%), acurácia (82,1%) e RVP (9,6) que o *Coulter LH 750* para o alarme de bastões.

Tabela 7: Parâmetros de acurácia para os alarmes blastos, granulócitos imaturos, bastões e linfócitos atípicos gerados pelos analisadores *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750*, com respectivos intervalos de confiança (IC) de 95% (n=459).

	<i>Coulter LH 750</i> (95% IC)	<i>Sysmex XN 3000</i> (95% IC)
Blastos (≥ 1% M.O)		
Sensibilidade (%)	54,5 (28,0 - 78,7)	81,8 (52,3 – 94,9)
Especificidade (%)	89,9 (86,8 – 92,4)	80,9 (77,1 – 84,3)
Eficiência (%)	89,1	81,0
VPP (%)	11,8 (6,8 – 19,7)	9,6 (6,9 – 13,2)
VPN (%)	98,8 (97,7 – 99,4)	99,5 (98,3 – 99,8)
RVP	5,4 (2,9 – 9,9)	4,3 (3,1 – 6,0)
RVN	0,5 (0,3 – 0,9)	0,2 (0,1 – 0,8)
Granulócitos Imaturos (≥ 1% M.O)		
Sensibilidade (%)	46,6 (38,7 – 54,6)	75,6 (68,3 – 82,1)
Especificidade (%)	88,4 (84,4 – 91,5)	79,1 (74,2 – 83,4)
Eficiência (%)	74,9	78,0
VPP (%)	65,7 (57,4 – 73,1)	63,3 (57,7 - 68,5)
VPN (%)	77,7 (74,9 – 80,3)	87,2 (83,7 – 90,1)
RVP	4,0 (2,8 – 5,7)	3,6 (2,9 – 4,6)
RVN	0,6 (0,5 – 0,7)	0,3 (0,2 – 0,4)
Bastões (≥ 5% M.O)		
Sensibilidade (%)	60,1 (51,9 – 67,8)	55,2 (47,1 – 63,2)
Especificidade (%)	73,1 (67,9 – 77,7)	94,3 (91,2 – 96,4)
Eficiência (%)	69,1	82,1
VPP (%)	50,3 (44,7 – 55,9)	81,4 (73,3 – 87,5)
VPN (%)	80,2 (76,6 – 83,4)	82,3 (79,5 – 84,8)
RVP	2,2 (1,8 – 2,8)	9,7 (6,0 – 15,5)
RVN	0,5 (0,4 – 0,7)	0,5 (0,4 – 0,6)
Linfócitos Atípicos (≥ 5% M.O)		
Sensibilidade (%)	9,1 (2,5 – 27,8)	50,0 (30,7 – 69,7)
Especificidade (%)	98,4 (96,7 – 99,2)	70,0 (65,7 – 74,1)
Eficiência (%)	94,3	69,1
VPP (%)	22,2 (6,6 – 53,5)	7,7 (5,1 – 11,5)
VPN (%)	95,5 (94,9 – 96,1)	96,5 (94,8 – 97,7)
RVP	5,7 (1,2 – 25,7)	1,7 (1,1 – 2,6)
RVN	0,9 (0,8 – 1,1)	0,7 (0,5 – 1,1)

VPP - valor preditivo positivo; VPN – Valor preditivo negativo; RVP - razão de verossimilhança positiva; RVN - razão de verossimilhança negativa

Vinte e uma (4,6%) de 459 amostras apresentaram mais de 5% de linfócitos atípicos. O analisador *Coulter LH 750* apresentou maior sensibilidade que o *Sysmex XN-3000*, enquanto que este mostrou maior especificidade.

6.5 Concordância entre os alarmes morfológicos gerados pelos analisadores *Sysmex XN 3000* e *Coulter LH 750*

Os analisadores *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750* apresentaram concordância moderada para o alarme de granulócitos imaturos (0,51), concordância considerável para os alarmes de blastos e bastões (0,26 e 0,39), e discreta concordância para linfócitos atípicos (0,04) (tabela 8).

Tabela 8: Concordância entre os analisadores *Sysmex XN 3000* e *Coulter LH 750* para os alarmes morfológicos, n=459.

Parâmetros	Kappa (IC 95%)	Interpretação
Blastos	0,26 (0,18 – 0,35)	Discreta
Granulócitos Imaturos	0,50 (0,42 – 0,58)	Regular
Bastões	0,39 (0,31 – 0,47)	Regular
Linfócitos Atípicos	0,04 (0,01 – 0,08)	Discreta

7 DISCUSSÃO

Nesse estudo avaliamos o desempenho analítico dos analisadores hematológicos automatizados *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750* do Laboratório de Hematologia do HCl do Instituto Nacional de Câncer, hospital público de referência no tratamento de câncer no Brasil. Na primeira parte desse estudo avaliamos a concordância dos parâmetros quantitativos das séries branca e vermelha, e plaquetas entre os dois analisadores automatizados, a fim de verificar se os

resultados liberados por esses dois equipamentos são equivalentes, podendo ser usados indistintamente no acompanhamento dos pacientes. Também verificamos a concordância dos parâmetros quantitativos da série branca entre os analisadores automatizados e a microscopia óptica. Na segunda parte do estudo avaliamos a acurácia dos alarmes morfológicos gerados pelos analisadores automatizados: blastos, granulócitos imaturos, bastões e linfócitos atípicos, utilizando a microscopia óptica como padrão de referência. A concordância entre os alarmes dos dois aparelhos também foi verificada.

A análise estatística dos parâmetros quantitativos entre os analisadores *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750* mostra CCI >95%, ou seja, uma alta correlação entre eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, plaquetas e leucócitos. Ainda nesta faixa de avaliação também verificamos uma alta correlação nos diferenciais de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos entre os dois analisadores, esses resultados estão de acordo com outros da literatura (OSTA *et al.*, 2014; MEINTKER *et al.*, 2013; SEO *et al.*, 2014).. A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) apresentou um baixo índice de correlação. A CHCM é um parâmetro que depende da dosagem de hemoglobina e do hematócrito. Como a dosagem de hemoglobina realizada pelos dois analisadores automatizados emprega metodologias semelhantes, então essa correlação moderada pode estar vinculada ao hematócrito, que é dosado no *Sysmex XN-3000* e calculado no *Coulter LH 750*. Alguns estudos comparativos utilizando outros modelos de analisadores dessas mesmas marcas (*Sysmex* e *Beckman Coulter*) também mostraram CHCM com índice de correlação inferior aos demais parâmetros hematimétricos (FERNÁNDEZ, 2002; LÉPEZ, *et al.*, PENG *et al.*, 2001).

Os parâmetros quantitativos da série branca (diferencial de leucócitos) e eritroblastos dos dois analisadores foram comparados com a microscopia óptica. As contagens relativas de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos foram semelhantes entre os analisadores e a microscopia (boa confiabilidade). A contagem de monócitos apresentou baixa confiabilidade entre os analisadores e a microscopia, o que corrobora com dados já descritos na literatura, que sugerem como motivo a má distribuição dos monócitos nas distensões sanguíneas (FAILACE, 2003; GROTTO

et al., 1995; SPADA *et al.*, 1998). Foi observada uma baixa correlação entre os analisadores hematológicos, esse fato já foi mostrado na literatura e pode ser devido a presença de blastos ou linfócitos atípicos interferindo na contagem (BORGES; SIQUEIRA, 2009; KANG *et al.*, 2008; MEINTKER *et al.*, 2013; SEO *et al.*, 2014). O analisador *Sysmex XN-3000* apresentou uma correlação de basófilos melhor do que o do analisador *Coulter LH 750*, porém ambos apresentaram baixa correlação com a microscopia. Essa baixa correlação também foi observada em outros estudos, com diferentes analisadores (BORGES; SIQUEIRA, 2009; MEINTKER *et al.*, 2013). Essa baixa correlação pode ser explicada pela pequena quantidade desse tipo de célula no sangue, o que dificulta a contagem manual que avalia apenas 100 células, enquanto que os analisadores automatizados de uma forma geral podem avaliar mais de dez mil células, o que aumenta a contagem de células raras.

Na avaliação dos alarmes emitidos pelos analisadores automatizados foram observados apenas aqueles *flags* relativos a morfologia celular dos leucócitos, que alerta para a presença de blastos, granulócitos imaturos, bastões e linfócitos atípicos.

A detecção de blastos no sangue periférico possui uma importante relevância clínica, pois essas células estão presentes em pacientes com leucemias e síndromes mielodisplásicas. O acompanhamento do tratamento, remissão e recaída desses pacientes é feito primeiramente pelo hemograma, um exame rápido, barato e minimamente invasivo. A presença ou ausência de blastos é determinante nessas análises, por esse motivo é mais importante privilegiar a sensibilidade do que a especificidade do alarme de blastos gerados pelos analisadores hematológicos. Nesse contexto o analisador *Sysmex XN-3000* foi melhor, pois apresentou sensibilidade de 81,8% enquanto o analisador *Coulter LH 750* apresentou apenas 54,5%. Esse resultado foi consistente com outros da literatura, que mostraram uma alta sensibilidade para o *Sysmex* da série XN e sensibilidade pior para o *Coulter LH 750* (DEPOORTER *et al.*, 2015; HOTTON *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2008; SEO *et al.*, 2014). Em relação aos resultados falsos negativos, o analisador *Sysmex XN-3000* apresentou dois falsos e o *Coulter LH 750* apresentou cinco. O ideal seria a

ausência de falso negativo para esse alarme, porém o analisador *Coulter LH 750* não detectou 45% dos blastos presentes.

Das 459 amostras, onze apresentaram blastos confirmados pela microscopia. O analisador *Sysmex XN-3000* gerou 94 alarmes de blastos, onde nove foram confirmados por microscopia, enquanto que o analisador *Coulter LH 750* gerou 51 e confirmaram-se seis. Se alterássemos as configurações do XN3000 para diminuir o número de resultados falso positivos e, conseqüentemente, diminuir a revisão das lâminas, poderia resultar no aumento de resultados falso negativo, assim como o *Coulter LH 750*. Uma alternativa para solucionar o problema do excesso de falso positivos, nesse caso, seria aliar os alarmes de blastos a uma análise dos parâmetros quantitativos que normalmente estão alterados nas leucemias e mielodisplasias, como leucometria, plaquetas, hemoglobina e hematócrito.

O *flag* de linfócito atípico também está superestimado no XN3000, que gerou 142 alarmes em apenas vinte e dois hemogramas confirmados de linfócitos atípicos. O analisador *Coulter LH 750* apresentou sensibilidade muito baixa (9,5%) na detecção de linfócitos atípicos, gerando apenas nove alarmes destas células.

Os linfócitos atípicos podem ter apenas caráter reacional frente a alguma infecção, ou podem ser linfócitos característicos de doença onco-hematológica, como os linfócitos encontrados na tricoleucemia, síndrome de Sézary e leucemia linfóide crônica (LLC). Nenhum dos dois analisadores gerou alarme de linfócitos atípicos isolado para linfócitos relativos a doenças onco-hematológicas, mas geraram alarmes de “blastos” associados ou não aos alarmes de linfócitos atípicos. Esse fato pode ser explicado pelo maior tamanho e complexidade da cromatina desses linfócitos levando a serem “confundidos” com os blastos pelos analisadores. Por essa razão não é necessário que o analisador tenha alta sensibilidade para linfócitos atípicos, pois os linfócitos patológicos provavelmente vão gerar *flags* de blastos.

Em relação ao *flag* de bastões, os dois analisadores mostraram sensibilidades semelhantes. O *Sysmex XN-3000* mostrou uma especificidade maior que o *Coulter*. Existem controvérsias em relação à utilidade da contagem de neutrófilos bastonetes

(bastões). Enquanto alguns autores consideram que é clinicamente útil para o diagnóstico de infecções, especialmente na sepse neonatal, outros não recomendam seu uso devido à alta variabilidade inter-observadores no reconhecimento dessas células (MEER et al., 2006; NIGRO et al., 2005; SCHELONKA et al., 1995). Outros neutrófilos mais imaturos como os metamielócitos, mielócitos e promielócitos, denominados de granulócitos imaturos, possuem morfologia melhor definida diminuindo a variabilidade entre os observadores. Estudos têm mostrado que seu aumento é útil para o diagnóstico da sepse neonatal, se mostrando uma ferramenta alternativa à contagem de bastões (BUTTARELLO, 2008). Também foi observada uma alta especificidade para a detecção de infecções, reportando uma associação entre o aumento de granulócitos imaturos e a presença de hemoculturas positivas (ANSARI-LARI et al., 2003). Outros estudos sugerem seu uso como marcador da síndrome de resposta inflamatória sistêmica – SIRS (NIERHAUS et al., 2013; MARE et al., 2015). Em relação ao *flag* de granulócitos imaturos, os analisador *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750* apresentaram 112 e 69 verdadeiros positivos, respectivamente. O analisador *Sysmex XN-3000* também quantifica os granulócitos imaturos, e sua contagem possui boa correlação com a microscopia, uma vantagem para esse analisador. Com o avanço das pesquisas sobre a importância dos granulócitos imaturos e a utilidade questionável dos bastões, a tendência é que no futuro ocorra a liberação automática dos granulócitos imaturos pelo analisador XN3000.

8 CONCLUSÕES

Os analisadores *Sysmex XN-3000* e *Coulter LH 750* apresentam boa concordância para os parâmetros quantitativos em geral, exceto para basófilos. O analisador *Sysmex XN 3000* apresenta melhor correlação com a microscopia óptica para basófilos e eritroblastos. No entanto, não possuem apresentam boa concordância para os alarmes morfológicos, sendo o *Sysmex XN-3000* melhor na geração dos alarmes de forma geral. Além disso, esse analisador realiza a contagem dos granulócitos imaturos, que compreende a soma dos metamielócitos,

mielócitos e promielócitos, e essa contagem apresenta boa correlação com a microscopia.

O analisador *Sysmex XN-3000* apresenta boa sensibilidade para blastos, granulócitos imaturos e linfócitos atípicos, isso fornece maior segurança na liberação dos resultados devido a menor taxa de falsos negativos. Assim, deve-se priorizar o processamento dos hemogramas dos pacientes com doenças onco-hematológicas (Hematologia e Centro de Transplante de Medula Óssea) nesse analisador.

O *Sysmex XN-3000* gera elevada taxa de falsos positivos para o alarme de linfócitos atípicos. Sugerimos que o fabricante aumente o ponto de corte da sensibilidade do analisador para esse alarme para diminuir os falsos positivos e evitar revisões desnecessárias das lâminas.

O analisador *Coulter LH 750* possui baixa sensibilidade para blastos, alarme de maior relevância clínica. Assim, sugerimos a diminuição do ponto de corte da sensibilidade para esse alarme a fim de diminuir a taxa de falso negativo.

Cada laboratório deve considerar as características da população de pacientes atendidos para estabelecer critérios para revisão das lâminas. Baseados nos resultados desse estudo, propomos algumas recomendações para a revisão das lâminas no setor de hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do INCA:

- 1) Hemogramas sem alterações nos parâmetros quantitativos e sem *flags* podem ser liberados diretamente (sem revisão da lâmina);
- 2) Hemogramas dos pacientes pertencentes às clínicas de hematologia e do Centro de Transplante de Medula Óssea devem ser revistos sempre na presença de alarmes ou no caso de alterações na leucometria, plaquetas e diferencial de leucócitos;
- 3) No caso de alarme isolado para blastos, deve-se observar se há alterações em pelo menos um dos seguintes parâmetros quantitativos: leucometria, hemoglobina, hematócrito, plaquetas e monócitos. Em caso de alterações, proceder com a leitura da lâmina;

- 4) No caso de alarme isolado para linfócitos atípicos pelo *Sysmex XN-3000*, associado a hemograma sem alterações nos linfócitos, plaquetas ou leucometria, pode-se proceder com a liberação direta do resultado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ansari-Iari MA; Kickler, T.; Borowitz MJ. Immature granulocyte measurement using the *Sysmex* XE-2100: relationship to infection and sepsis. **American journal of clinical pathology**. 2003. v. 120, n. 5, p. 795-799.

Beckman Coulter. Instruções de utilização do Sistema LH 750 da Coulter. NP 177358BC, 2010.

Bland JN; Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **The lancet**. 1986, v. 327, n. 8476, p. 307-310.

Borges LF, Siqueira LO. Validação de tecnologia 5diff do analisador hematológico *Sysmex* XS-1000i para laboratório de pequeno/médio porte. **Lateral**. 2009, v. 10, n. 14, p. 16.

Briggs CJ, Linssen J, Longair I, Machin SJ. Improved Flagging Rates on the *Sysmex* XE-5000 Compared With the XE-2100 Reduce the Number of Manual Film Reviews and Increase Laboratory Productivity. **Am J Clin Pathol**. 2011; 136:309-316

Briggs C, et al. Performance evaluation of the *Sysmex* haematology XN modular system. **J Clin Pathol**. 2012; 65:1024-1030.

Buttarelo M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. **Am J Clin Pathol** 2008; 130 (1): 104-16.

Coulter WH. Means for counting particles suspended in a fluid. USP 2656508, 1958.

Depoorter M, et al. Optimal flagging combinations for best performance of five blood cell analyzers. **International journal of laboratory hematology**. 2015, v. 37, n. 1, p. 63-70.

Failace R, Fernandes FB. Hemograma: Manual de interpretação. São Paulo: Artmed Editora S.A. 2009.

Fernandez T, Domack LB, Montes D, Pineiro R, Landrun E, Vital E. Performance Evaluation of the *Coulter LH 750* Hematology Analyzer. **Laboratory Hematology**. 2001; 7:217-228

Fernández LE, et al. Evaluación del diferencial leucocitario realizado por el *Coulter* STKS y el *Coulter* MAXM. **Rev. Fac. Med. (Caracas)**. 2002, v. 25, n. 2, p. 189-201.

Fujimoto K. Principles of measurement in hematology analyzers manufactured by *Sysmex* Corporation. **Sysmex J Int**. 1999, 9:31-44.

Grimaldi E; Scopacasa F. Evaluation of the Abbott CELL-DYN 4000 hematology analyzer. **Am J Clin Pathol**. 2000,113:497-505.

Hawker CD, et al. Automated transport and sorting system in a large reference laboratory: part 2. Implementation of the system and performance measures over three years. **Clin Chem**. 2002; 48:1761-1767.

Heckner F, Freund M. Hematologia: microscopia pratica. São Paulo: Editora Santos. 2000.

Hirakata, VN; Camey, SA. Análise de concordância entre métodos de Bland-Altman. **Revista HCPA**. Porto Alegre. 2009, Vol. 29, no. 3 (2009), p. 261-268..

Hotton J, Broothaers J, Swaelen C, Cantinieux B. Performance and Abnormal Cell Flagging Comparisons of Three Automated Blood Cell Counters. **Am J Clin Pathol**. 2013; 140:845-852.

Houwen, B. The differential cell count. **Laboratory hematology**. 2001; 7:89- 100.

INCA.gov.br [homepage na Internet]. INCA, 2015 [acesso em 16/06/2015]. Disponível em <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento/atendimento>>.

Kang SH, Kim KH, Ham KC, Lee DS, Cho HI. Comparison of four hematology analyzers, CELL-DYN Sapphire, ADVIA 120, *Coulter LH 750* , and *Sysmex* XE-2100, in terms of clinical usefulness. **Int. Jnl. Lab. Hem**. 2008; 30, 480–486.

Korevaar, DA, et al. Updating standards for reporting diagnostic accuracy: the development of STARD 2015. **Research Integrity and Peer Review**. 2016, v. 1, n. 1, p. 7.

Landis, JR.; Koch, GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977, v.33, n.1, p.159-174.

Lépez R, et al. Evaluacion del autoanalizador *Coulter* MAX-M®: recuento diferencial leucocitario y alarmas morfológicas en pacientes onco-hematológicos. **Revista Chilena de Tecnología Médica**. 2004, v. 24, n. 2.

Mare T.A, et al. The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. **Critical Care**. 2015,v. 19, n. 1, p. 57.

Martinho M. Hematologia em laboratório Clínico. São Paulo: Sarvier, 2012.

Matsuno K, Ishizuka S. New technology of automated blood cell differential counting. **Rinsho Byori**. 1998;46:361-6.

Meer W, et al. Does the band cell survive the 21st century?. **European journal of haematology**. 2006, v. 76, n. 3, p. 251-254, 2006.

Meintker L, et al. Comparison of automated differential blood cell counts from Abbott Sapphire, Siemens Advia 120, Beckman *Coulter* DxH 800, and *Sysmex* XE-2100 in normal and pathologic samples. **American journal of clinical pathology**. 2013, v. 139, n. 5, p. 641-650.

Nierhaus A, et al. Revisiting the white blood cell count: immature granulocytes count as a diagnostic marker to discriminate between SIRS and sepsis-a prospective, observational study. **BMC immunology**, 2013 v. 14, n. 1, p. 8.

Nigro KG, et al. Performance of an automated immature granulocyte count as a predictor of neonatal sepsis. **American journal of clinical pathology**. 2005, v. 123, n. 4, p. 618-624.

Oliveira RAG. Hemograma: Como fazer e interpretar. São Paulo: Livraria Medica Paulista Editora. 2007

Okada T. Development and problem of automated hematology analyzer. **Sysmex J Int.** 1999; 9:52-57.

Peng L, et al. Laboratory evaluation of the Sysmex SE-9500 automated haematology analyser. **International Journal of Laboratory Hematology.** 2001, v. 23, n. 4, p. 237-242.

Pierre RV. Peripheral blood film review. The demise of the eyecount leukocyte differential. **Clin Lab Med.** 2002; 22: 279-297.

Portney LG; Watkins MP. Foundations of clinical research: applications to practice. **Prentice Hall**, 2000.

Schelonka RL, et al. Differentiation of segmented and band neutrophils during the early newborn period. **The Journal of pediatrics.** 1995, v. 127, n. 2, p. 298-300.

Silva PH, et al. Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos. Artmed Editora, 2015.

Sysmex. Guia preparatório para treinamento analisador hematológico automatizado Sysmex® XN-1000. Documento nº 0011-GPT-SLAC, Rev1 Abril 2015

Sysmex XN-3000, a integração perfeita. *Sysmex America Latina e Caribe*, 2012 [acesso em 01/08/2017]. Disponível em <<https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-Especificações-Português.pdf>>

Tatsumi N, et al. Principle of blood cell counter – Development of electrical impedance method. **Sysmex J Int.** 1999; 9:8-20.

ANEXO I



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



Rio de Janeiro, 21 de janeiro de 2016.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa do INI
Para: Dr. Carlos Augusto Ferreira de Andrade

Prezado Dr. Carlos Augusto,

Em relação ao projeto "**Avaliação da Acurácia de Dois Analisadores Hematológicos Automáticos**", dissertação de mestrado da aluna Débora Danielle Balduino Lauzin, encaminhado a este Comitê em 19/01/2016, informamos que, pela natureza do estudo e após análise desta Coordenação, evidenciou-se que não há necessidade de sua apreciação por um Comitê de Ética em Pesquisa; poderá ser submetido à publicação e divulgação dos resultados, com esta comunicação do CEP.

Atenciosamente,

Dr^a Léa Ferreira Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa,
Mat. SIAPE 003709620
IPEC / FIOCRUZ

V.L.