

MACKELLY SIMIONATTO

**ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE CONTAGEM DE RETICULÓCITOS  
PARA CONTROLE DE QUALIDADE**

CURITIBA

2009

MACKELLY SIMIONATTO

**ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE CONTAGEM DE RETICULÓCITOS  
PARA CONTROLE DE QUALIDADE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Suely Soares

CURITIBA

2009

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha família.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Marilis Dallarmi Miguel, pelo incentivo e apoio em um momento especial.

Aos meus orientadores, que me acolheram de braços abertos e sempre compreensivos: o prestativo professor Aguinaldo, pela sua atenção, seus conhecimentos fabulosos em estatística e informática e seu espírito bem humorado; a pacienciosa professora Maria Suely, pela sua preocupação, carinho e seus conhecimentos em hematologia.

À toda equipe do Laboratório Pontagrossense de Análises Clínicas.

À Michele Ana Flores Chaves pela grande ajuda, disponibilidade e dedicação.

Às colegas de pós-graduação, Adélia Grzybowski, Débora Regina Daga e Luciane Tucholski, pela amizade e hospitalidade em minhas passagens por Curitiba.

À Regina Montrezol, pelo seu dinamismo.

A todos que cooperaram para a realização do trabalho.

MACKELLY SIMIONATTO

Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, Farmacêutica da Prefeitura Municipal de Carambeí, atuou como Farmacêutica Bioquímica no Laboratório Pontagrossense de Análises Clínicas de 1999 a 2007 e, professora colaboradora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa de 2000 a 2005. Especialista em Microbiologia Clínica pela Universidade Estadual de Ponta Grossa em 1999, Graduada em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Estadual de Ponta Grossa em 1998.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE TABELAS</b>	
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	
<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1	RETICULÓCITOS .....	18
2.2	ERITROPOIESE .....	20
2.3	CONTAGEM DE RETICULÓCITOS.....	22
2.3.1	Aplicações da determinação de reticulócitos para o diagnóstico e monitoração de doenças hematológicas.....	22
2.3.2	Metodologias empregadas para a contagem de reticulócitos.....	24
2.3.2.1	Contagem de reticulócitos através de metodologia manual .....	25
2.3.2.2	Contagem de reticulócitos por métodos eletrônicos.....	29
2.3.3	Formas de apresentação dos resultados das contagens de reticulócitos ... .....	33
2.4	CONTROLE DE QUALIDADE EM LABORATÓRIO CLÍNICO .....	35
2.4.1	Controle de qualidade interno e externo .....	37
2.4.2	O Emprego da estatística no controle de qualidade em hematologia.....	40
2.4.3	Importância do estudo dos erros e do controle de qualidade em contagens de reticulócitos .....	41
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
3.1	OBJETIVO GERAL .....	44
3.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	44
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
4.1	MATERIAL .....	46
4.2	MÉTODOS .....	47
4.2.1	Local de realização dos procedimentos .....	47
4.2.2	Reagentes.....	48
4.2.3	Preparo das soluções corantes .....	48
4.2.4	Coleta de amostras .....	49
4.2.5	Métodos empregados.....	49
4.2.5.1	Eritrograma.....	49
4.2.5.2	Contagem manual de reticulócitos .....	49
4.2.5.2.1	Padronização do corante .....	50
4.2.5.2.2	Padronização da técnica de preparo de extensões em lâmina .....	52
4.2.5.2.3	Padronização da contagem de reticulócitos em microscópio óptico.....	53
4.2.5.3	Metodologia automatizada .....	55
4.2.6	Experimentos .....	56
4.2.6.1	Estudo da variação inter-observadores para a contagem manual de reticulócitos .....	56
4.2.6.2	Estudo comparativo da contagem de reticulócitos pelos métodos manual e automatizado .....	57

4.2.6.3	Estudo comparativo entre contagens de reticulócitos automatizadas com o emprego de reagentes do fabricante do aparelho e de diluentes-corantes preparados no laboratório.....	57
4.3	ANALISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	58
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
5.1	ESTUDO DAS ANÁLISES INTER-OBSERVADORES.....	60
5.2	ESTUDO DE COMPARAÇÃO ENTRE METODOLOGIA MANUAL E AUTOMATIZADA .....	68
5.3	ESTUDO DE COMPARAÇÃO ENTRE CORANTES DA METODOLOGIA AUTOMATIZADA.....	75
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>85</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>92</b>
ANEXO 1.	MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ENTREGUE A PACIENTES PARTICIPANTES DO ESTUDO .....	93
ANEXO 2.	APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DA SAÚDE DA UFPR.....	95
ANEXO 3.	PLANILHA DE ORIENTAÇÃO E TRANSCRIÇÃO DE RESULTADOS APLICADA AOS LABORATÓRIOS DE CLÍNICAS PARTICIPANTES	96
ANEXO 4.	PLANILHA DE AVALIAÇÃO APLICADA AOS LABORATÓRIOS DE ANÁLISES CLÍNICAS PARTICIPANTES DA ANÁLISE INTER-OBSERVADORES PARA A CONTAGEM MANUAL DE RETICULÓCITOS .....	97
ANEXO 5.	DADOS OBTIDOS POR MEIO DE INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO SOBRE A PARTICIPAÇÃO EM PROGRAMAS DE CONTROLE DE QUALIDADE, A CERTIFICAÇÃO, UTILIZAÇÃO DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO E REALIZAÇÃO DE CONTAGEM DE RETICULÓCITOS POR MÉTODO DE AUTOMATIZAÇÃO DE 10 LABORATÓRIOS PARTICIPANTES NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS (PR). .....	98
ANEXO 6.	INFORMAÇÕES QUANTO AOS CRITÉRIOS DE EXECUÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CONTAGENS DE RETICULÓCITOS FORNECIDOS PELOS OBSERVADORES DO TRABALHO E DOS LABORATÓRIOS PARTICIPANTES.....	99
ANEXO 7.	PARECER DE ACEITAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGO.....	100
ANEXO 8.	ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA (pdf) .....	101

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	ESQUEMA DE HEMOPOIESE .....	22
FIGURA 2.	FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS CORANTES AZUL DE METILENO NOVO E AZUL DE CRESIL BRILHANTE .....	50
FIGURA 3.	ASPECTO MORFOLÓGICO DE RETICULÓCITOS PELAS COLORAÇÕES AZUL DE CRESIL BRILHANTE (ACB) E AZUL DE METILENO NOVO (AMN) EM MICROSCOPIA ÓPTICA DE IMERSÃO (x1000) .....	52
FIGURA 4.	CORRELAÇÃO PARA AS CONTAGENS DE RETICULÓCITOS (%) ENTRE OS EXAMINADORES K E L .....	64
FIGURA 5.	PERFIL DA AVALIAÇÃO DAS 25 LÂMINAS PARA A CONTAGEM DE RETICULÓCITOS (%) DOS 12 AVALIADORES PELOS GRÁFICOS DE CONTROLE DE QUALIDADE .....	65
FIGURA 6.	GRÁFICO DE DISPERSÃO PARA OS VALORES DE CONTAGENS DE RETICULÓCITOS (%) DE TODOS EXAMINADORES PARA TODAS AS LÂMINAS. ....	66
FIGURA 7.	GRÁFICO DAS MÉDIAS DAS CONTAGENS DE RETICULÓCITOS (%) ENTRE METODOLOGIA MANUAL E AUTOMATIZADA .....	70
FIGURA 8.	HISTOGRAMA DE FREQUÊNCIA DOS DADOS OBTIDOS PELO MÉTODO MANUAL E AUTOMATIZADO PARA A CONTAGEM DE RETICULÓCITOS(%) .....	71
FIGURA 9.	HISTOGRAMA DE FREQUÊNCIA COM TODOS OS RESULTADOS OBTIDOS PELAS CONTAGENS DE RETICULÓCITOS (%) .....	72
FIGURA 10.	GRÁFICO DE DISPERSÃO DE COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS DA METODOLOGIA MANUAL E AUTOMATIZADA PARA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS (%).....	73
FIGURA 11.	GRÁFICO DA ANÁLISE DE REPETIÇÕES DOS DADOS OBTIDOS PELA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS (%) COM O CORANTE AZUL DE METILENO NOVO 1:10 EM 50 AMOSTRAS.....	77
FIGURA 12.	GRÁFICO DA DISPERSÃO DA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS DE AMOSTRAS DE PACIENTES COM O USO DOS CORANTES COMERCIAL E AZUL DE METILENO NOVO NA DILUIÇÃO 1:10 ...	78

FIGURA 13. GRÁFICO DAS MÉDIAS DA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS DOS PACIENTES COM O USO DO CORANTE COMERCIAL E AZUL DE METILENO NOVO .....79

FIGURA 14. CORRELAÇÃO PARA AS CONTAGENS DE RETICULÓCITOS (%) EM ANÁLISE DE COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS OBTIDOS COM O CORANTE COMERCIAL E O AZUL DE METILENO NOVO 1:10.....80

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CONTAGEM MANUAL DE RETICULÓCITOS: INFLUÊNCIA DA PORCENTAGEM DE ERRO E NÚMERO DE ERITRÓCITOS NA EXATIDÃO DAS CONTAGENS.....	26
TABELA 2. CONTAGEM MANUAL PELO MÉTODO DE MILLER: PORCENTAGEM DE RETICULÓCITOS EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE ERITRÓCITOS CONTADOS.....	27
TABELA 3. VOLUME GLOBULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO DE MATURAÇÃO DOS RETICULÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO.....	35
TABELA 4. COMPARAÇÃO DE RESULTADOS DE CONTAGENS RELATIVAS DE RETICULÓCITOS ENTRE CORANTES DE METODOLOGIA MANUAL.....	51
TABELA 5. CONTAGEM RELATIVA DE RETICULÓCITOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE LEITURA.....	53
TABELA 6. ANÁLISE DE COMPARAÇÃO POR ESTATÍSTICA DE CORRELAÇÃO INTRA-CLASSE ENTRE OS EXAMINADORES “K” E “L” E OS DE MAIS, PARA A CONTAGEM DE RETICULÓCITOS (%).....	63
TABELA 7. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA, MODELO INTEIRAMENTE CASUALISADO) PARA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE A METODOLOGIA MANUAL E AUTOMATIZADA PARA A CONTAGEM DE RETICULÓCITOS.....	69
TABELA 8. CONTAGEM DE RETICULÓCITOS (%) PELOS MÉTODOS MANUAL E AUTOMATIZADO.....	69
TABELA 9. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA, MODELO FATORIAL) PARA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE O USO DO CORANTE COMERCIAL E AZUL DE METILENO NOVO 1:10.....	76

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

NCCLS	– <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
CFU-GEMM	– unidade formadora de colônias específica para a formação de granulócitos, eritrócitos, monócitos e macrófagos
CFU-GMM	– unidade formadora de colônias específica para a formação de granulócitos, monócitos e macrófagos
CFU-E	– unidade formadora de colônias específica para a formação de eritrócitos
BFU-E	– unidade formadora de explosão eritróide “Burst”
CSF	– fatores estimulantes de colônia
EPO	– eritropoetina
IL-1	– interleucina 1
IL-3	– interleucina 3
HCG	– gonadotrofina coriônica humana
DNA	– ácido desoxirribonucléico
RNA	– ácido ribonucléico
ICSH	– <i>International Committee for Standards in Haematology</i>
CAP	– <i>College of American Pathologists</i>
IRF	– Índice de reticulócitos imaturos
CRC	– Contagem de reticulócitos corrigida
IR	– Índice de reticulócitos
RPI	– Índice de produção de reticulócitos
VG	– volume globular
RBC	– eritrócitos
VCM	– volume corpuscular médio
HCM	– hemoglobina corpuscular média
CHCM	– concentração de hemoglobina corpuscular média
PS	– procedimento sistêmico
POP	– procedimento operacional padrão
ITR	– instrução de trabalho
EPI	– equipamento de proteção individual
NBR ISO	– Norma brasileira aprovada pela ABNT

ABNT	– Associação Brasileira de Normas e Técnicas
SBAC	– Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
SBPC	– Sociedade Brasileira de Patologia Clínica
PICC	– <i>Programa Interlaboratorios de Control de Calidad</i>
G-EQUAS	– <i>External Quality Assessment Scheme</i>
TEQUAS	– <i>Trace Elements External Quality Assessment Scheme</i>
JCAHO	– <i>Joint Commision on Accreditation of Healthcare Organizations</i>
JCCLS	– <i>Joint Commision for Clinical Laboratory Standards</i>
CLIA'88	– <i>Clinical Laboratory Improvement Amendment of 1988</i>
IFCC	– <i>International Federation of Clinical Chemistry</i>
WHO	– <i>World Health Organization</i>
BPL	– Boas práticas laboratoriais
TCLE	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
LAPAC	– Laboratório Pontagrossense de Análises Clínicas
UEPG	– Universidade Estadual de Ponta Grossa
HUOP	– Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário do Oeste do Paraná
UNIOESTE	– Universidade do Oeste do Paraná
CR	– contagem de reticulócitos

## RESUMO

A contagem dos reticulócitos é usada extensamente na rotina laboratorial para avaliar a atividade eritropoiética da medula óssea, sendo de grande importância para o diagnóstico, prognóstico e terapia de anemias. Em pacientes com quadro de anemia que apresentam reticulocitose, a eritropoiese na medula óssea mostra-se eficaz contra um processo hemolítico ou hemorragia acelerados, ou responde a terapias específicas. Por outro lado, a reticulocitopenia demonstra pouca atividade eritropoiética. A contagem de reticulócitos promove o monitoramento da regeneração da atividade da medula óssea após quimioterapia ou transplante de medula óssea. Os reticulócitos são corados com o azul de metileno novo ou o azul de cresil brilhante, evidenciando o aspecto característico de retículo a fragmentos de RNA, ao microscópio óptico. As metodologias manual e automatizada, para a contagem de reticulócitos em laboratório clínico, seguem o protocolo de normas técnicas H44-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) e ao *International Committee for Standards in Haematology* (ICSH). A metodologia manual é muito utilizada em laboratórios de pequeno e médio porte, devido ao baixo custo em relação ao método automatizado. No entanto, mesmo laboratórios de médio porte que contam com aparelhos eletrônicos para a contagem de reticulócitos, nem sempre os utilizam, devido ao alto custo dos reagentes específicos. As contagens de reticulócitos feitas em contadores eletrônicos, que empregam a metodologia de citometria de fluxo, são mais rápidas e precisas, devido ao maior número de células contadas e da redução das fontes de erros. Alguns equipamentos determinam volume, concentração de hemoglobina e grau de maturidade dos reticulócitos, compondo o reticulocitograma, o qual reflete o tipo de produção eritrocitária da medula óssea. Os objetivos do presente trabalho foram os de avaliar a variação inter-observadores para contagem manual de reticulócitos; comparar metodologias de execução manual e automatizada para contagem de reticulócitos; testar alternativas para a metodologia automatizada; bem como analisar os seus erros estatísticos. Foram selecionadas 446 amostras de sangue total de pacientes, obtidas por punção venosa na rotina laboratorial para hemograma e ou contagem de reticulócitos do Laboratório Pontagrossense de Análises Clínicas, Ponta Grossa – PR, e do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, com idades entre 0 e 89 anos, sendo 102 do sexo masculino, 120 do sexo feminino e 224 recém-natos. A análise de correlação inter-observadores e intra-classes, para valores baixos, médios e altos, segundo Bartko (1974) foi usada para avaliar a concordância entre 12 observadores, que realizaram a contagem manual de reticulócitos em 25 preparações de sangue, com contagens variadas. Os resultados das análises estatísticas indicam que o erro casual ( $1-R^2$ ) variou de 4 a 60% entre os observadores. Apesar da imprecisão detectada, o perfil geral entre os observadores foi similar. Na comparação entre as metodologias manual e automatizada (ABBOTT Cell Dyn 3500 SL), utilizando-se amostras de sangue de 341 pacientes, a análise de variância (ANOVA) dos resultados não demonstrou diferenças entre as médias obtidas com as duas metodologias ( $p = 0,21$ ), sendo que os valores de tendência central e de dispersão foram muito próximos entre ambas. A análise de variância dos valores obtidos com o emprego de azul de metileno novo 1g/dl diluído 1:10 em NaCl 0,85 g/dl como corante-diluyente alternativo, em comparação aos obtidos com o fornecido pelo fabricante do aparelho, para contagem de reticulócitos automatizada, não mostrou diferenças entre as médias obtidas ( $p = 0,9$ ) e entre as repetições ( $p = 0,63$ ). Entretanto, foi detectado um erro sistemático, com valores 0,4% maiores para as determinações com o corante-diluyente alternativo em relação ao comercial, bem como um erro casual ( $1-R^2$ ) de 19%, dentro do erro apresentado pela metodologia. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que: no estudo inter-observadores, o coeficiente de correlação intra-classes indicou resultados clinicamente úteis; a comparação entre as metodologias manual e automatizada indicou precisão entre os dados obtidos; o corante-diluyente alternativo apresentado pode substituir o corante-diluyente comercial, por apresentar resultados estatisticamente idênticos.

## ABSTRACT

Reticulocyte countings is extensively used in laboratorial routine to evaluate the bone marrow erythropoietic activity, being of great importance for the diagnosis, prognostic and therapy of anemia. In patients with signs and symptoms of anemia presenting reticulocytosis, the bone marrow erythropoiesis is quite efficient against increased hemolytic process, or answers to specific therapies, but shows little erythropoietic activity for reticulocytopenia. Reticulocyte counting's monitorate activity of the bone marrow regeneration after chemotherapy or bone marrow transplantation. Reticulocytes are supravitaly stained with new methylene blue or brilliant cresyl blue, which confer the characteristic aspect of the RNA fragments to their organelles, at light microscopy. The manual and automated methodologies for reticulocyte countings follows the protocol, as suggested by the H-44 technique norms of the National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) and of the International Committee for Standardization in Hematology (ICSH). The manual methodology is quite used in laboratories of small and average size, due to the low cost in relation to the automated method. However, even average size laboratories possessing electronic devices, not always use them, due to the high cost of the specific reagents. Reticulocyte counting's in electronic equipments, which use the cytometry flow methodology, are faster and precise due to high number of cells counted and reduction in the sources of errors. Some equipment determines volume, hemoglobin concentration and degree of maturity of the reticulocytes, as reticulocytogram, which reflects the type of erythrocyte production of the bone marrow. The aims of the present work were to evaluate Inter-observer variations for reticulocyte manual countings; to compare manual and automated methodologies for reticulocyte counting; and to test alternatives stains for the automated methodology; and its statistical errors. Samples of venous blood of 446 patients in the laboratorial routine for hemogram and/or reticulocyte countings of the Pontagrossense Laboratory of Clinical Analyses, Ponta Grossa - PR, and of the Laboratory of Clinical Analyses of the University Hospital of Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - PR, with ages between 0 and 89 years, being 102 males, 120 females, and 224 new-borns. The Inter-observers and intra-class correlation analyses, for low, average and high values, according to Bartko (1974) was used to evaluate the agreement between 12 technologists, who had carried through the reticulocyte manual counting in 25 preparations of blood, with varied countings. The results of the statistical analyses indicate that the random error ( $1 - R^2$ ) varied from 4 - 60% among technologists, but the general profile among technologists was quite similar. In the comparison on manual and automated methodologies (ABBOTT Cell Dyn 3500 SL), using samples of blood of 341 patients, the results of the analyses of variance (ANOVA) did not demonstrate differences between the averages of the two methodologies ( $p = 0.21$ ), and the measures of central tendency and variability was quite close. The analyses of variance for the data obtained with the new methylene blue stain 1g/dl diluted 1:10 in 0.85 g/dl NaCl, as alternative stain against the one supplied for automated reticulocyte countings, by the device manufacturer, did not show differences either for averages ( $p = 0,9$ ) or replicates ( $p = 0.63$ ). However, a bias quality control was detected, with values 0.4% graters for the alternative stain, as well as random error ( $1 - R^2$ ) of 19%, as expected for the methodology. From the observed results it can be concluded that: for inter-observer studies, the intra-class correlation coefficient indicated clinically useful results; the comparison on the manual and automated methodologies indicated precision between them; the alternative stain studied can substitute commercial stain, since they present statistically similar results.

## 1 INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

A contagem de reticulócitos do sangue periférico é realizada para avaliar a integridade funcional da medula óssea. Em pacientes com quadro de anemia que apresentam reticulocitose, ou seja, aumento do número de reticulócitos, a eritropoiese na medula óssea mostra-se eficaz e responde às terapias específicas. Entretanto, em pacientes com quadro de anemia que apresentam um número diminuído de reticulócitos na circulação, ou reticulocitopenia, a eritropoiese é ineficaz e pode estar associada a outros fatores. Além de avaliar a evolução desses pacientes, a contagem de reticulócitos promove o monitoramento da regeneração da atividade da medula óssea após quimioterapia ou transplante de medula óssea (VAN HOVE *et al.*, 2001).

O método manual para contagens de reticulócitos é o mais comumente utilizado em laboratório clínico e está baseado na observação microscópica dos restos de RNA ribossomal, evidenciados por colorações supra-vitais. A metodologia de referência é baseada no protocolo H44-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* – NCCLS (FERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, a metodologia automatizada vem sendo incorporada na rotina laboratorial, como alternativa ao método manual, visando a praticidade e a obtenção de maior precisão. No método automatizado, além de se contar maior número de células, elimina-se muitas fontes de erro, apesar de algumas limitações devidas a alguns interferentes e ao custo elevado (STIENE-MARTIN *et al.*, 1998).

A técnica manual é mais demorada e trabalhosa em relação à automação e seus resultados podem ser pouco confiáveis se não forem seguidos critérios rigorosos para a sua execução e avaliação. Os fatores de erro mais comuns encontrados nos resultados são: baixo número de células contadas, artefatos de coloração, variação na coloração dos reticulócitos devido ao tempo de incubação, discriminação visual entre os reticulócitos e alta variabilidade dos resultados entre observadores (RILEY *et al.*, 2001).

Considerando a relevância da qualidade da contagem de reticulócitos para a detecção de doenças hematológicas e o controle de seu tratamento, esse trabalho propõe avaliar as contagens de reticulócitos através da comparação dos critérios

---

empregados em sua execução e dos resultados obtidos pela técnica manual, além de comparar esses resultados com os obtidos em automação. Além do estudo proposto, será avaliada uma alternativa de adaptação da metodologia automatizada, para possibilitar a laboratórios de pequeno e médio porte, resultados confiáveis com o uso de uma técnica viável, com um custo mais baixo e aplicável na rotina do laboratório clínico.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 RETICULÓCITOS

Os eritrócitos maduros, células responsáveis pelo transporte de oxigênio aos tecidos, são anucleados, apresentam a forma de disco bicôncavo, possuem de 7 a 8  $\mu\text{m}$  e são desprovidos de mitocôndrias e ribossomos. Os reticulócitos são seus precursores imediatos e são também anucleados, porém 20% maiores em volume. Na microscopia eletrônica, os reticulócitos se apresentam como células arredondadas, com a superfície tortuosa e, além dos grânulos de ribossomos, apresentam mitocôndrias e “vacúolos autofágicos” (autofagossomos ou lisossomos secundários), estes últimos representam um mecanismo de descarte da célula (WICKRAMASINGHE *et al.*, 1986; LEE *et al.*, 1999).

A presença do “retículo” levou ao termo reticulócito, porém o retículo plasmático verdadeiro não está mais presente na célula. Os grânulos ou filamentos, que são restos de RNA ribossomal, podem aparecer distribuídos em bandas estreitas ou compactados de maneira densa, simulando um núcleo. Células com grandes quantidades de retículo são consideradas mais jovens ou imaturas e, à medida que o retículo diminui, os reticulócitos são considerados mais velhos ou maduros (LEE *et al.*, 1999). Alguns autores especificam o grau de maturidade do reticulócito em estágios como, por exemplo, Lewis *et al.* (2006) que classifica o reticulócito em 4 grupos; ou ainda, autores como Pierre e Riley *et al.* (2002) que citam em seus estudos a classificação de 1932 de Heilmeyer e Westhaeuser, os quais definiram os estágios em: grupo 0 – célula vermelha nucleada com retículo perinuclear denso; grupo I – após a extrusão do núcleo, o reticulócito muito jovem possui uma massa coesa e densa de RNA ou outras organelas; grupo II – o RNA torna-se menos denso com maturação mais rápida e o sistema reticular aparece nessa região da célula; grupo III – o RNA espalha-se e diminui em quantidade; grupo IV – reticulócito maduro com pouca quantidade de restos de RNA espalhados, que tendem a desaparecer ao tornar-se o eritrócito.

A forma e a densidade do reticulócito também dependem de alguns fatores físicos. Assim, variações de temperatura destroem os retículos gradualmente, ao passo que se formam filamentos ou grânulos. Em uma preparação corada de forma

---

supra-vital, a mudança de pH para um meio mais ácido resulta em uma aparência granular fina do retículo, enquanto em um meio mais alcalino, a forma é pontilhada. A resistência do reticulócito pode variar também frente a soluções hipotônicas. Após centrifugação *in vitro*, os reticulócitos ocupam posição superior aos eritrócitos maduros, por apresentarem menor densidade (LEE *et al.*, 1999). A falta de homogeneização da suspensão amostra-corante nas técnicas de contagem de reticulócitos pode levar ao erro e diminuir a precisão do teste.

Os reticulócitos ativos sintetizam hemoglobina e outras proteínas, como as enzimas metabólicas, além de pentoses-fosfato, podendo liberar energia por via aeróbica mitocondrial através da degradação do piruvato a gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e água (H<sub>2</sub>O), no ciclo do ácido tricarboxílico (WICKRAMASINGHE *et al.*, 1986).

Os grânulos de RNA dos reticulócitos podem ser evidenciados através de colorações supra-vitais com o uso, por exemplo, de azul de cresil brilhante, de azul de metileno novo e de certos marcadores fluorescentes (BANFI, 2008). As colorações supra-vitais, por não necessitarem de fixação prévia, evitam a indução de artefatos. As lâminas preparadas para este tipo de coloração não são permanentes (LEE *et al.*, 1999). Os corantes de Romanowsky, amplamente empregados na rotina laboratorial para a coloração de extensões sanguíneas, evidenciam os reticulócitos apenas através de leve basofilia, não permitindo a sua quantificação de forma precisa (STIENE-MARTIN *et al.*, 1998).

Na microscopia eletrônica, as mitocôndrias são encontradas agrupadas e os ribossomos distribuídos de forma difusa, enquanto vesículas pinocíticas e moléculas de ferritina não são vistas. Na fase de reticulócito, ainda ocorrem 20% restantes da síntese da hemoglobina necessária para o funcionamento dos eritrócitos normais e, à medida que a célula amadurece, várias organelas diminuem em número, levando à redução do volume. Assim, primeiro desaparecem as mitocôndrias e, mais tarde, os ribossomos, sendo que os vacúolos autofágicos, que podem ser encontrados, representam um mecanismo de destruição de componentes desnecessários para a célula. Como propriedade de células mais jovens, a aderência de reticulócitos é maior do que a de eritrócitos, o que faz com que os mesmos circulem mais lentamente no sangue. Em condições nas quais haja uma redução da concentração de hemoglobina ou de eritrócitos, ou seja, quando há anemia, os reticulócitos tendem a ser liberados precocemente da medula óssea. (LEE *et al.*, 1999).

## 2.2 ERITROPOIESE

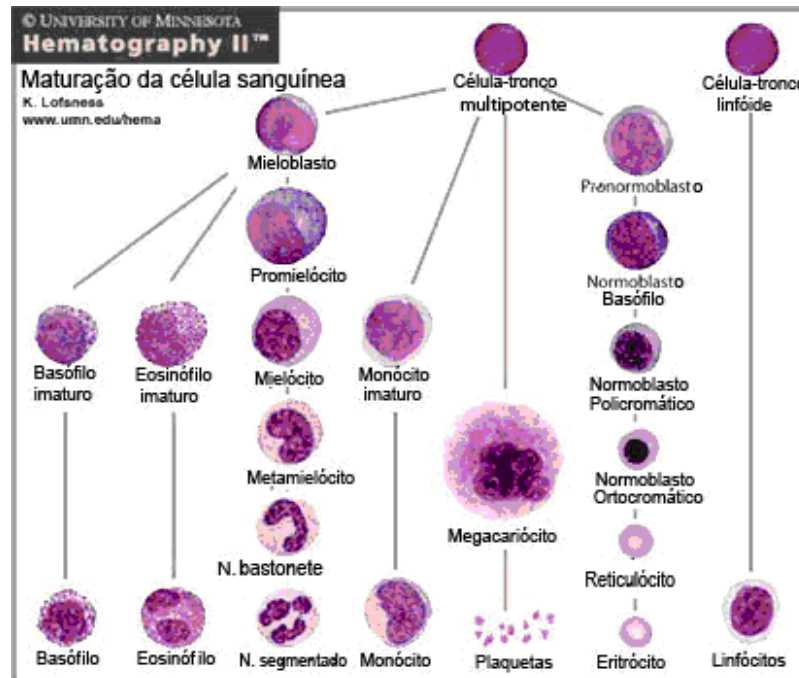
Em estudos datados de 1924, Maximow postulou a existência de uma célula progenitora para as células sanguíneas. Acredita-se que a linhagem eritróide tenha origem de uma célula tronco pluripotente, comum para todas as células sanguíneas, como representado esquematicamente na Figura 1. A partir da 16ª semana de gestação, a medula óssea produz a célula tronco, que origina uma unidade formadora de colônias – granulócito, eritrócito, macrófago, monócito (CFU-GEMM) indiferenciada e multipotente, a qual se diferencia em unidades de colônias específicas para a formação de granulócitos, macrófagos-monócitos (CFU-GMM), bem como unidades formadoras de explosão eritróides “Burst” (BFU-E), as quais são progenitoras das unidades específicas para a formação de eritrócitos (CFU-E). Para o desenvolvimento dessas unidades de colônias, são necessários fatores estimulantes de colônia (CSF), componentes biológicos, como cálcio e glicose, anticorpos, citocinas, interleucinas e eritropoetina (EPO), responsáveis pela regulação da hematopoiese. A eritropoetina é um hormônio glicoprotéico, com peso molecular de 34.000 Da, e que induz o progenitor celular eritróide a se dividir e diferenciar em pronormoblastos ou proeritroblastos. A presença de grandes quantidades de receptores para a EPO, existente nessas células, pode levar a outro efeito, que é a manutenção da vida celular, por retardamento da clivagem do DNA, que ocorre normalmente na CFU-E. Assim, na ausência de eritropoetina, a célula evoluirá para o processo de apoptose ou morte celular (LEE *et al.*, 1999).

Segundo McKenzie (1996) e Lee *et al.* (1999), os vários estágios de maturação dos eritroblastos em ordem crescente são: pronormoblasto, normoblasto basófilo, normoblasto policromatófilo e normoblasto ortocromático; células precursoras que evoluem para reticulócito e, finalmente, para eritrócito. A maturação nuclear evolui até o desaparecimento dos nucléolos e a condensação da cromatina quando, através da cariopicnose, cessa a atividade nuclear. A maturação e a proliferação celular acontecem simultaneamente, sendo que as células são incapazes de promover automanutenção. O processo de maturação dura em torno de 12 a 15 dias, até as células do estágio de unidade formadora de explosão eritróide “burst” (BFU-E) chegarem a eritroblastos. Em 6 a 8 dias, a BFU-E prolifera e se diferencia em unidade formadora de colônia eritróide (CFU-E), cujas células

proliferam em 5 a 7 dias, para formar o pronormoblasto. Ocorrem de 3 a 5 divisões celulares da CFU-E até formar o eritroblasto basófilo. Portanto, cada pronormoblasto origina de 8 a 32 eritrócitos e a divisão cessa no estágio de eritroblasto policromatófilo. Os eritroblastos ortocromáticos não podem mais sintetizar DNA ou RNA. A anucleação, após a degradação nuclear, é um processo semelhante ao da citocinese. Quando a maturação adicional e a composição da membrana lipídica são alteradas, os reticulócitos são lançados à corrente sanguínea pela medula óssea e seqüestrados pelo baço por 1 ou 2 dias ou, em sua ausência, pelo fígado. As frações de RNA ribossomal aparecem pela ação das ribonucleases ou RNAases. Os oligonucleotídeos resultantes serão mais tarde degradados pelas fosfodiesterases e fosfatases, sendo que a pirimidina-5' nucleotidase específica encontrada nos reticulócitos desfosforila os nucleotídeos e libera as bases pirimídicas para o exterior da célula. A síntese de hemoglobina inicia nos pronormoblastos, ocorrendo em um nível baixo nos reticulócitos e, não mais ocorre no eritrócito maduro. A hemoglobina acumulada é evidenciada pelos corantes de Romanowsky, conferindo a característica acidófila do citoplasma.

Na circulação, os reticulócitos maduros evoluem para eritrócitos em um período de 1 ou 2 dias, onde há uma degradação progressiva dos ribossomos e mitocôndrias até adquirir a forma bicôncava, forma esta que otimiza a transferência de gases (WICKRAMASINGHE *et al.*, 1986).

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA HEMOPOIESE



(Fonte: <http://www.umn.edu/hema>)

## 2.3 CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

### 2.3.1 Aplicações da determinação de reticulócitos para o diagnóstico e monitoração de doenças hematológicas

Por muitos anos, a contagem de reticulócitos tem sido considerada a prova executada em laboratório clínico mais sensível para avaliar a atividade eritropoética (FERNÁNDEZ *et al.*, 2007). A utilidade da contagem dos reticulócitos é de avaliar a eritropoiese ou a diminuição da formação de eritrócitos. São considerados como valores de referência em seres humanos para a contagem de reticulócitos: homens e crianças – 0,5 a 2,5%, mulheres – 0,5 a 4,0%, recém-natos – 2,0 a 5,0%, para contagens relativas (LEE *et al.*, 1999). Para Lewis *et al.* (2006), os valores relativos são de 0,5 a 2,5% e em números absolutos, os valores ficam entre 50 e 100 x 10<sup>9</sup>/l.

Sua elevação indica produção eficaz de eritrócitos frente ao estímulo e é um dado importante nas respostas terapêuticas. Os índices estarão aumentados após perda de sangue aguda ou aumento da destruição dos eritrócitos, como resposta

---

normal ou aumento de 3 a 6 vezes; após terapia com ferro para anemia ferropriva; após terapia com folato ou vitamina B<sub>12</sub> para anemias megaloblásticas e, possivelmente, em condições de policitemia, carcinoma metastático na medula óssea, doença de Di Guglielmo, etc. Em casos extremos de estímulo, a eritropoiese poderá estar aumentada em até 10 vezes. Na anemia falciforme, em geral os reticulócitos estão aumentados, com valores de 5 a 30%. Os índices estarão diminuídos na eritropoiese ineficiente ou na formação diminuída de eritrócitos como em doença hemolítica do tipo auto-imune grave, crises não regenerativas, alterações megaloblásticas e ainda, alcoolismo e mixedema (WALLACH, 1999). Frequentemente, a contagem de reticulócitos estará normal ou diminuída em anemia de doença crônica, doenças mieloproliferativas, doenças linfoproliferativas e carcinoma metastático para pacientes sem tratamento (SIMMONS, 1997). A contagem de reticulócitos serve de parâmetro na anemia associada ao câncer (FELICIANO *et al.*, 2003) bem como, auxilia a monitorização da EPO para esses pacientes (CANÇADO, 2007). Uma possível confirmação de uma contagem elevada de reticulócitos é a sua correlação com a presença de eritrócitos policromatófilos na lâmina do sangue periférico (WALLACH, 1999).

De acordo com Pasquini (2000), a diminuição de reticulócitos está associada às anemias aplásicas, com valores que não excedem a 1%. Davis (1996) definiu a fração de reticulócitos imaturos como um parâmetro capaz de avaliar a regeneração medular por transplante de medula óssea e quimioterapia em situações de intensa reticulocitopenia. Noronha e Grotto (2002) afirmam que o reticulócito jovem é o indicador precoce da recuperação medular.

A utilização de automação por metodologia de citometria de fluxo para a contagem de reticulócitos vem sendo estudada como uma análise rápida, específica e reprodutiva para avaliar a atividade da EPO, como em estudos relatados de Barbone *et al.* (1994), que empregou eritrócitos de camundongo. Os autores observaram com a contagem automatizada e manual de reticulócitos, uma resposta rápida ao tratamento com a EPO recombinante humana e também com outros agentes, como Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 3 (IL-3), dexametasona e Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG).

Recentemente, em estudos como o de Molina *et al.* (2007), utilizou-se a contagem de reticulócitos para avaliar a reposição das células hematológicas após transplantes de células tronco com enxertos alogênicos em uma série de pacientes

---

com quadros clínicos variados de alterações hematológicas, como leucemia aguda, leucemia mielóide crônica, mieloma múltiplo, aplasia de medula óssea e linfoma Não-Hodgkin. Geralmente, esses pacientes apresentavam em seus tratamentos usuais anteriores ao enxerto, decréscimo do número de reticulócitos. Após o enxerto, 92,6% dos 136 pacientes estudados apresentaram o aumento do número destas células, das porcentagens das frações imaturas e de outros parâmetros em um período de 14 dias em média, uma vez que o enxerto neutrofílico padrão leva em média 18 dias para ser detectado e era considerado o marcador mais importante anteriormente avaliado. Portanto, a análise conjunta dos parâmetros reticulocitários pode ser utilizada para determinar precocemente o sucesso ou a rejeição do transplante.

Em outro estudo, como o de Weimann *et al.* (2007) buscou-se assimilar a contagem da fração imatura de reticulócitos e a determinação da concentração de EPO como auxiliares na detecção precoce de episódios de rejeição aguda em pacientes transplantados renais, devido ao fato de serem marcadores de eritropoiese. Era esperado que as contagens fossem reduzidas no quadro da rejeição, mas o estudo em 25 pacientes demonstrou que tais valores não se alteraram, dificultando o emprego prático de tal relação.

Alguns estudos em camundongos e coelhos, como os de Rapoport *et al.* (1985) e Minich *et al.* (1989), utilizaram métodos de biologia molecular para evidenciar a diferença na produção da fração jovem e madura dos reticulócitos pela síntese da enzima de RNA mensageiro, 15-lipoxigenase, promovendo a lise da membrana mitocondrial e inibição da cadeia respiratória. No último estudo, ocorreu indução de anemia pela administração de fenil-hidrazina para promover o estresse reticulocitário e observou-se a recorrência posterior da produção dos reticulócitos. A perda de receptores de insulina na membrana do reticulócito durante a sua maturação também pode ser observada (THOMOPOULOS *et al.*, 1978).

### 2.3.2 Metodologias empregadas para a contagem de reticulócitos

Atualmente, existem metodologias manual e automatizada para a contagem de reticulócitos em laboratório clínico. Ambas as técnicas seguem o protocolo de normas técnicas H44-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) e às recomendações do *International Committee for Standards in*

---

*Haematology* (ICSH), sendo a metodologia manual muito utilizada em laboratórios de pequeno e médio porte, devido à falta de equipamento apropriado e ao baixo custo em relação ao método automatizado (BAIN, 1997). No entanto, mesmo em laboratórios de médio porte que contam com um aparelho eletrônico para a contagem de reticulócitos, nem sempre o utilizam devido ao custo de reagentes específicos do equipamento, fornecidos pelo fabricante.

A identificação dos reticulócitos, tanto através da metodologia manual, quanto da automatizada, deve ser feita de acordo com a padronização do *College of American Pathologists* (CAP) que em 1986 definiu o reticulócito como “qualquer célula vermelha anucleada que após fixada por corante supra-vital, contenha um mínimo de duas partículas de material corado, correspondendo à precipitação de ácidos nucléicos” (PIERRE, 2002; NASCIMENTO, 2004).

#### 2.3.2.1 Contagem de reticulócitos através de metodologia manual

A contagem manual de reticulócitos através do microscópio de luz foi desenvolvida em 1940 e continua a ser a metodologia mais empregada para a determinação de tais células (BUTARELLO *et al.*, 2001; PIERRE, 2002; RILEY *et al.*, 2002).

A técnica se fundamenta na propriedade em que o corante supra-vital precipita restos de RNA ribossomal. Uma gota de corante é misturada com um volume equivalente de sangue periférico coletado com anticoagulante e posteriormente, incubada geralmente a quente, por alguns minutos. Lâminas de microscopia são preparadas com essa suspensão e secas à temperatura ambiente (RILEY *et al.*, 2002).

Após a coloração, são os filamentos de RNA que se coram, portanto, é essencial que, na preparação, os reticulócitos estejam bem corados e que, as contagens sejam feitas em áreas nem muito espessas ou nem muito finas da extensão. Outros fatores importantes para as contagens são, o discernimento visual do observador, a contagem do número suficiente de células e o poder de resolução do microscópio. As contagens dos reticulócitos devem ser feitas em aumento de 1.000 vezes ao microscópio óptico. A contagem ideal, para se obter um grau aceitável de reprodutibilidade, ocorre quando a maior quantidade de campos com eritrócitos for observada e os reticulócitos, contados. Pode-se considerar que o

método se torna mais preciso na medida em que aumenta o número de células contadas. Para tanto, devem ser contados campos consecutivos e não ao acaso. Deve-se ainda, prosseguir a contagem quando os reticulócitos estiverem em número diminuído e, observados mais cuidadosamente, quando apresentarem poucos grânulos. Um método alternativo para a contagem manual é o emprego do chamado disco de Miller calibrado, adaptado na ocular na forma de dois quadrados, um dentro do outro, sendo que o menor ocupa aproximadamente um nono da área do quadrado maior. Os reticulócitos devem ser contados no quadrado maior e os eritrócitos, no quadrado menor. A contagem relativa de reticulócitos será a razão do total do número de reticulócitos pelo total do número de eritrócitos contados ou observados, multiplicada por 100. Com o uso do disco de Miller, o número de eritrócitos deverá ser multiplicado por 9. Os resultados obtidos poderão ser corrigidos ou ainda, a partir deles, se calcular o índice de produção de reticulócitos (LEWIS *et al.*, 2006).

A Tabela 1 indica o número de eritrócitos a serem contados em relação a diferentes porcentagens de reticulócitos obtidas. Pode-se observar índices de erro de acordo com números de eritrócitos contados e % de reticulócitos obtidas, até 20%, coeficiente de variação máximo para um grau de exatidão aceitável (DACIE e LEWIS, 1965).

TABELA 1. CONTAGEM MANUAL DE RETICULÓCITOS: INFLUÊNCIA DA PORCENTAGEM DE ERRO E NÚMERO DE ERITRÓCITOS NA EXATIDÃO DAS CONTAGENS

Grau de exatidão desejado Erro (%)	Reticulócitos (%)					
	1	2	5	10	25	50
20%	2.525	1.225	475	225	100	25
10%	10.100	4.900	1.900	900	400	100
5%	40.400	19.600	7.600	3.000	1.600	400

Os dados referem-se ao número de células a serem contadas.  
Fonte: DACIE e LEWIS (1965).

Segundo Bain (1997), como se observa na Tabela 2, do mesmo modo, pode-se relacionar o número de células contadas com a contagem relativa de reticulócitos

encontrados, para se obter um grau de reprodutibilidade aceitável, de acordo com as especificações do ICSH.

TABELA 2. CONTAGEM MANUAL PELO MÉTODO DE MILLER: PORCENTAGEM DE RETICULÓCITOS EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE ERITRÓCITOS CONTADOS

Contagem de reticulócitos (%)	Número aproximado de eritrócitos a contar nos quadrados pequenos para um erro de 10%	Equivalente à contagem total de células
1 – 2	1.000	9.000
2 – 5	500	4.500
6 – 10	200	1.800
20 - 25	100	900

Fonte: BAIN (1997).

Em outras palavras, o erro padrão de contagem de reticulócitos pode ser avaliado através da porcentagem de reticulócitos encontrada, assim como, do total de células observadas no quadrado menor de contagem no método de Miller. O coeficiente de variação para o número de células contadas entre resultados aceitáveis deve ser menor do que 20%. Quando a contagem de reticulócitos exceder a 10%, uma contagem relativamente menor de células resulta em um desvio padrão de 10% (LEWIS *et al.*, 2006).

A contagem relativa de reticulócitos pode induzir ao erro se o grau de anemia ou a estimulação intensa eritropoética não forem considerados. Assim, o volume de amostra de sangue a ser empregado depende do resultado do volume globular sanguíneo do paciente, para garantir que a intensidade de coloração seja adequada. Resultados de contagens de reticulócitos discrepantes são de extrema importância para o Controle de Qualidade e, podem ocorrer devido à variação inter-observadores nas técnicas manuais. Como causas de erros, devem ser considerados os critérios morfológicos para o reconhecimento do reticulócito, inclusive a sua diferenciação com o eritrócito maduro e com grânulos de corpúsculos de Pappenheimer, Howell-Jolly ou mesmo, corpos de Heinz; o número de células avaliadas; o preparo da lâmina para as contagens; a padronização da área de contagem; o emprego de corantes de Romanowsky como contra-corantes; a preparação da suspensão da

---

amostra e do corante; a diferença de gradiente de densidade entre reticulócitos e eritrócitos durante a incubação; a inibição da coloração em hiperglicemia (STIENE-MARTIN *et al.*, 1998).

Muitas diferentes inclusões podem ser vistas nos eritrócitos em várias alterações patológicas em hematologia, que poderiam ser confundidas com reticulócitos em uma preparação supra-vital: (McKENZIE, 1996; STIENE-MARTIN *et al.*, 1998; LEWIS *et al.*, 2006).

i) Corpos de Pappenheimer - aparecem, em geral, como um único grânulo corado em azul escuro, como os filamentos ou grânulos dos reticulócitos. Trata-se de lisossomos secundários, variáveis em sua composição de ferro e proteínas, ou mitocôndrias com micelas de ferro, que aparecem como depósitos basofílicos irregulares na periferia da célula. A matriz protéica do grânulo é corada por Romanowsky, enquanto a porção de ferro se cora pela coloração de Perls, pelo azul da Prússia.

ii) Corpos de Heinz - podem ser vistos em coloração supra-vital, em azul claro, como inclusões discretas em contraste com o material filamentoso reticular do reticulócito. Eles são compostos de agregados de hemoglobina desnaturada e aparecem como massas ligadas à superfície interna da membrana celular. Quando únicos, os corpos de Heinz são grandes, mas quando diversos estão presentes em uma célula, são pequenos.

iii) Corpos de Howell-Jolly - são grânulos presentes no eritrócito, púrpura ou violeta escuros, esféricos, usualmente únicos e raramente mais que dois por célula, constituídos por fragmentos de DNA.

iv) Ponteados basófilos – são grânulos azul-negros distribuídos no interior do eritrócito, compostos de agregados de RNA ribossomal, algumas vezes associados com mitocôndrias e siderossomos.

v) Inclusões de protozoários como os agentes da malária e da babesiose – aparecem como anéis azuis com “pedra” vermelha e outras formas dos vários estágios de evolução dos protozoários, sendo que os eritrócitos parasitados podem ser confundidos com os reticulócitos.

A contagem de reticulócitos por microscopia de fluorescência foi descrita por Kozenow e Mai antes de 1950, que utilizou um fluorocromo RNA e DNA específico. A técnica ofereceu poucas vantagens em relação à contagem de reticulócitos ao microscópio de luz e nunca foi amplamente utilizada (RILEY *et al.*, 2002).

### 2.3.2.2. Contagem de reticulócitos por métodos eletrônicos

O emprego de contadores eletrônicos para a contagem de reticulócitos em laboratório permite determinações mais rápidas e precisas, devido ao maior número de células contadas e por eliminarem grande parte das fontes de erros. Os contadores eletrônicos utilizam a metodologia de citometria de fluxo, com sistema de *softwares* adequado para classificar discrepâncias de diferentes sistemas pré-analíticos (BANFI, 2008). Alguns equipamentos oferecem uma variedade de informações relacionadas aos reticulócitos, como volume, concentração de hemoglobina e maturidade, os quais não são avaliados ao microscópio de luz (ZANDECKI *et al.*, 2006). O conjunto dos exames reticulocitários efetuados nestes aparelhos denomina-se reticulocitograma e a análise dos mesmos reflete o tipo de produção eritrocitária da medula, informando as modificações da atividade eritropoiética (NASCIMENTO, 2004).

O RNA ribossomal dos reticulócitos pode ser evidenciado através de coloração supra-vital, utilizando-se corantes com características básicas que simultaneamente coram o retículo (ácido), ou formam complexos enzimáticos, através de enzimas específicas, com um marcador fluorescente (STIENE-MARTIN *et al.*, 1998). Portanto, os reagentes mais empregados em automação são: os corantes supra-vitais, como o azul de metileno novo usado em equipamentos comerciais das marcas ABBOTT e BECKMAN COULTER; e a oxazina, em equipamentos da BAYER e ainda; os marcadores fluorescentes, como: *thiazole orange* para o equipamento HORIBA ABX; auramina O, em equipamentos da SYSMEX; ou corifosfina O, para o BECKMAN COULTER (ZANDECKI *et al.*, 2007).

A metodologia é compreendida como semi-automatizada quando a preparação da amostra é realizada manualmente por meio da diluição da alíquota de sangue total diretamente no tubo de reagente específico do equipamento, após a reação completa que ocorre em determinado período de tempo, a amostra é então processada no equipamento. Em equipamentos automáticos onde a amostra de sangue é diretamente inserida sem a necessidade de preparo prévio, o aumento da eficiência do analisador é maior por eliminar erros pré-analíticos de diluição, coloração e incubação. Essa metodologia é chamada de automatizada (PIERRE, 2002).

---

Segundo Bain (1997) e Van Hove *et al.* (2001), muitos equipamentos de automação em hematologia utilizam quatro medidas independentes para a obtenção dos parâmetros hematológicos: a) Contagem do número total de leucócitos, eritrócitos e plaquetas em canais de impedância elétricos. O método se fundamenta na medida de corrente elétrica que é produzida por uma partícula suspensa em um líquido condutor e que, pela passagem através de um orifício, gera pulsos que indicam o número de células que atravessaram a abertura, sendo que, a amplitude de cada pulso é proporcional ao volume da célula que o produziu; b) Determinação da concentração de hemoglobina em um canal espectrofotométrico através do método modificado da cianometahemoglobina; c) Contagem do número total e diferencial de leucócitos medida em um canal de fluxo óptico ou citômetro de fluxo. Neste processo, as células individuais diluídas em um fluido passam através de um ou mais sensores a *laser*, os quais medem suas características químicas ou físicas. Essa medida está fundamentada no espalhamento, absorção ou emissão da luz pelas células, que a espalham ou emitem em diferentes ângulos e intensidades, gerando informações sobre seu próprio tamanho, estrutura interna, granularidade e morfologia superficial. Em geral, o espalhamento da luz é analisado em quatro ângulos: ângulo  $0^\circ$ , usado para a determinação da medida do tamanho das células; ângulo de  $10^\circ$ , para a medida da complexidade das células;  $90^\circ$ , para avaliar a superfície e a estrutura interna ou lobularidade das células; e  $90^\circ$  D de luz despolarizada, para determinar certos tipos de granularidade.

A contagem de reticulócitos, entretanto, pode ser determinada de duas maneiras dependendo do tipo de equipamento: pela dispersão de luz através de canal de raios *laser*, que utiliza corante supra-vital e; pela emissão de fluorescência em canal espectrofotométrico que utiliza fluorocromos (VAN HOVE *et al.*, 2001).

Para os reticulócitos, a análise no grau 0 é suficiente para diferenciá-los da maioria das plaquetas, enquanto os dados do histograma (gráficos de dispersão) são utilizados para diferenciar reticulócitos de eritrócitos, aglomerados plaquetários e células nucleadas. Os reticulócitos apresentam uma dispersão de luz em  $10^\circ$ , semelhante à ocasionada pelos eritrócitos, mas diferem muito em relação à sua dispersão em  $90^\circ$ . Os reticulócitos imaturos são separados dos reticulócitos mais maduros na linha discriminatória de dispersão de luz entre 0 e  $10^\circ$  e dependem de intervalos de referência preliminares em função de desvios padrões que, em geral, para equipamentos que utilizam corantes supra-vitais, são maiores em relação

---

àqueles que utilizam fluorescência. Isto ocorre devido à baixa sensibilidade de identificação e discriminação de reticulócitos pelos corantes supra-vitais. A emissão de fluorescência requer filtros de espectro ultravioleta com comprimentos de onda maiores que 457 nm e 500 nm, para a excitação e emissão de luz, respectivamente. A intensidade de fluorescência emitida pelo alto ou baixo conteúdo de RNA do reticulócito o identifica, enumera e fornece dados ao seu respeito (RILEY *et al.*, 2002). Portanto, o emprego de corante fluorescente define melhor o nível de maturidade do reticulócito (BUTTARELLO *et al.*, 2002).

Equipamentos que utilizam, principalmente, marcadores fluorescentes separam os reticulócitos pela quantidade de granulações, em três grupos, relacionados ao grau de maturidade: alta maturidade, que possuem a menor quantidade de granulações; baixa maturidade, com a maior quantidade de granulações; média maturidade, com quantidade intermediária de granulações. Considera-se ainda que, reticulócitos com baixa e média maturidade compõem a fração de reticulócitos imaturos (IRF). Estes aparelhos fornecem também o volume reticulocitário médio, que representa o tamanho dos reticulócitos circulantes, dado importante em casos de anemias microcítica e macrocítica (NASCIMENTO, 2004). Portanto, equipamentos que combinam citometria de fluxo com técnicas de emissão de fluorescência aumentam a possibilidade de uma maior precisão nos resultados dos índices de produção dos eritrócitos, por utilizar critérios de reconhecimento padrão, assegurando a avaliação do grau de maturação da população de reticulócitos. Tais informações podem auxiliar na detecção precoce da rejeição após transplante de medula óssea (BRUGNARA *et al.*, 1997) e em quimioterapia (D'ONOFRIO *et al.*, 1995). A concentração de hemoglobina nos reticulócitos pode ser determinada a partir das concentrações conhecidas de hemoglobina total no eritrócito e seu uso pode ser útil para identificar a deficiência de ferro e monitorar a terapia em pacientes que fazem uso de ferro intravenoso, EPO humana recombinante ou hidroxiuréia (BRUGNARA *et al.*, 1997). Em estudos recentes como os de XU e CHAUDHURI (2005); e de CROMER *et al.* (2006), utilizou-se as técnicas de coloração fluorescente para a contagem de reticulócitos, na tentativa de relacionar o aumento do parasitismo por agentes causadores da malária e a diminuição da produção de reticulócitos, devido ao tropismo acentuado para estas células, pela presença de receptores de membrana específicos e, conseqüentemente, a ocorrência de hemólise. Técnicas de citometria de fluxo para

---

reticulócitos estão sendo empregadas para quantificar os receptores de transferrina na superfície do reticulócito, com o objetivo de avaliar o nível de ferro das células, segundo Ervasti *et al.* (2000).

Contagens relativas de reticulócitos obtidas por metodologia manual e automatizada se correlacionam bem. Entretanto, valores absolutos da concentração de reticulócitos podem diferir entre si ao se considerar as duas metodologias, porque dependem das condições de incubação e dos métodos de calibração dos equipamentos empregados, o que pode contribuir para a inexatidão dos aparelhos automatizados em algumas situações (LEWIS *et al.*, 2006).

Entre os potenciais interferentes que diminuem a precisão da metodologia automatizada para contagem de reticulócitos, e que exigem cuidados, estão as possíveis combinações do RNA de plaquetas e leucócitos ou mesmo do DNA de células nucleadas com corantes ou marcadores dos aparelhos. Assim, o equipamento pode englobar na contagem, plaquetas gigantes ou agrupadas, leucócitos anormais ou fragmentados. Precusores eritrocitários normalmente não são contados pelos analisadores eletrônicos, mas poderiam hipoteticamente duplicar o aumento da fração de reticulócitos imaturos levando a uma contagem de reticulócitos anormal. Inclusões eritrocitárias como corpúsculos de Howell-Jolly, corpos de Pappenheimer, corpos de Heinz ou ponteados basófilos, podem ser confundidas com as granulações dos reticulócitos, como ocorre na metodologia manual. Eventualmente, também esferócitos e eritrócitos com hemoglobina H podem ser contados como se fossem reticulócitos. Entretanto, esse tipo de interferência pode variar de acordo com o equipamento utilizado. Com equipamentos que utilizam marcadores fluorescentes, outros interferentes podem também ser relatados na contagem de reticulócitos, tais como: inclusão de parasitas como *Babesia sp* e *Plasmodium spp*, podendo ocorrer um aumento de até 6 vezes em relação à contagem manual para pacientes com cerca 70% dos eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum*. Diferenças na intensidade de fluorescência dos reticulócitos observadas entre os analisadores eletrônicos, tal qual o brilho de reticulócitos mais imaturos, levam aos índices típicos da fração imatura. Entretanto, foram reportados erros nos índices dos reticulócitos maduros, devido à confusão com leucócitos intensamente corados ou aos poucos grânulos corados vistos em alguns reticulócitos maduros de recém-natos. Este fato ocorre em consequência da baixa concentração do marcador usado em alguns equipamentos. De acordo com as

---

instruções da maior parte dos fabricantes, a estabilidade da suspensão de células constituída por amostra de sangue e corante empregada para a determinação da contagem de reticulócitos, é de 72 horas a 4°C e de 24 a 48 horas a temperatura ambiente. Porém, alguns estudiosos observaram estabilidade somente durante 8 horas a 4°C e 6 horas a temperatura ambiente para a fração de reticulócitos imatura. Outras situações ainda são mencionadas podendo ocasionalmente, serem causa de interferência na contagem automatizada de reticulócitos, como a presença de aglutininas frias, paraproteínas e hemólise na amostra (ZANDECKI *et al.*, 2007). Algumas contagens poderão estar falsamente aumentadas quando houver autofluorescência ou quando a fluorescência for produzida pela ligação com RNA ou DNA de outras células (BAIN, 1997). Mesmo assim, a automatização pode auxiliar na eliminação dos elementos subjetivos de reconhecimento visual dos reticulócitos (LEWIS *et al.*, 2006). É fundamental a análise do esfregaço sanguíneo por hematologista experimentado nas determinações automáticas.

O processamento de imagens na área de microscopia óptica vem sendo cada vez mais utilizado para o reconhecimento e contagens automatizados de células e visa permitir a aferição, melhorar a precisão eliminando o erro na identificação de artefatos e reduzir custos. Entretanto, a detecção automática de reticulócitos, em geral, ainda é insatisfatória e a falta de disponibilidade de equipamentos dificulta o seu emprego (PIERRE, 2002). Recentemente, estudos realizados com técnica modificada por um sistema de decisão de lógica difusa resultou em 100% de detecção de reticulócitos presentes nas amostras utilizadas para teste, apresentando apenas dois falsos positivos em 1280 células avaliadas (FIGUEIRÓ *et al.*, 2006).

Estudos de comparação entre corantes, equipamentos e técnicas realizados para determinar a melhor metodologia para contagem de reticulócitos são de grande importância em controle de qualidade.

### 2.3.3 Formas de apresentação dos resultados das contagens de reticulócitos

Sabe-se que a concentração de reticulócitos no sangue periférico reflete a atividade eritropoiética, uma vez que os mesmos são liberados normalmente da medula óssea ou ficam circulantes por um período de tempo. No entanto, não é regra que o aumento da eritropoiese leve à retirada prematura dos reticulócitos da circulação. O tempo de duração desse estímulo, também chamado de estresse,

---

pode durar 3 dias. Sendo assim, pode-se deduzir que o tempo de maturação e a contagem de reticulócitos corrigida podem ser utilizados para avaliar também, a circulação de ferro no sangue. Essa informação é relatada pela contagem de reticulócitos relativa ou em porcentagem e ainda, expressa em valores absolutos representada pelo número de reticulócitos em um litro de sangue (STIENE-MARTIN *et al.*, 1998; RILEY *et al.*, 2002).

Segundo Stiene-Martin *et al.* (1998), a contagem de reticulócitos corrigida (CRC) pode ser referida como um índice de reticulócitos (IR), por uma correção através do volume globular (VG) ou hematócrito. A CRC corrige a contagem dos reticulócitos observados, considerando-se um volume globular normal de 45%, com a finalidade de corrigir o grau de anemia em que o indivíduo se encontra. Isto é feito porque as porcentagens de reticulócitos podem parecer aumentadas quando os reticulócitos são retirados precocemente da circulação ou quando aumenta o número de eritrócitos na mesma. Assim, os valores esperados para o CRC dependem do grau de anemia. A CRC pode ser calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{CRC} = \frac{\% \text{ de Reticulócitos} \times \% \text{ de VG}}{45\%}$$

Em pacientes que apresentam valores de VG nos limites normais ou próximos, o número de reticulócitos condiz com a realidade e tende a ser aproximadamente 1%. Entretanto, à medida que o VG diminui, a medula óssea normalmente responde ao estímulo com uma maior produção de eritrócitos, através do aumento do número de reticulócitos. Portanto, o cálculo da CRC permite encontrar um valor real para o número de reticulócitos e através da RPI, avaliar a eficácia da eritropoiese. Para os pacientes que apresentarem um volume globular de 35%, espera-se um valor de CRC de 2 a 3%. Para aqueles pacientes cujo volume globular for menor ou igual a 25%, espera-se que a contagem corrigida de reticulócitos seja maior que 3%.

Quando a CRC é conhecida, o índice de produção de reticulócitos (RPI) pode ser calculado. O tempo de vida do reticulócito na circulação corresponde ao grau de anemia. Normalmente, o tempo de maturação dos normoblastos na medula é de 3-5 dias e a meia vida no reticulócito no sangue periférico é de 1 dia, entretanto, em

anemias, o tempo de maturação na medula é relativamente curto e os reticulócitos permanecem por um período maior no sangue periférico.(LEE *et al.*, 1999; RILEY *et al.*, 2002). Assim, o RPI será corrigido quando o VG e o tempo de maturação do reticulócito no sangue periférico forem considerados. O RPI pode ser calculado através da fórmula abaixo:

$$\text{RPI} = \frac{\text{CRC}}{\text{Tempo de maturação de reticulócitos no sangue periférico}}$$

O tempo de maturação no sangue periférico varia com o volume globular. Aproximadamente, os valores da Tabela 3 são utilizados no cálculo do RPI:

TABELA 3. VOLUME GLOBULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO DE MATURAÇÃO DOS RETICULÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO

VG (%)	Tempo (dias)
40 – 45	1
35 – 39	1,5
29 – 34	2
15 – 24	2,5
<15	3

VG – volume globular

Fonte: STIEN avaliar a variação interobservadores e analisar o erro estatístico da contagem manual dos reticulócitos E-MARTIN *et al.* (1998).

A interpretação do RPI pelos comitês de padronização em hematologia geralmente sugere que resultados maiores que 3 indicam resposta adequada da medula óssea a um quadro de anemia. Entretanto, índices menores que 2 representam uma resposta insuficiente (STIENE-MARTIN *et al.*, 1998).

## 2.4 CONTROLE DE QUALIDADE EM LABORATÓRIO CLÍNICO

O Controle de Qualidade em Laboratórios de Análises Clínicas visa estudar o erro para, desta forma, tentar minimizá-lo e aumentar a probabilidade de se obter resultados adequados para o diagnóstico e a terapêutica; ou seja, resultados válidos, que possam ser usados com confiabilidade. O emprego de amostras

---

controle, de calibração de equipamentos, de padronização de técnicas, assim como, de outras medidas de controle de qualidade interno e externo, são importantes para tal avaliação. Esses fatores contribuem sobremaneira para um diagnóstico mais preciso e eficiente, bem como para uma melhoria na qualidade dos produtos oferecidos pelos laboratórios clínicos, que acarreta, conseqüentemente, uma melhoria no atendimento e um retorno mais eficiente à população (HAUSER, 2003).

Nesse sentido, é importante haver um treinamento adequado dos observadores que irão efetuar a contagem de reticulócitos, conhecer a variação inter-observadores, estabelecer critérios morfológicos adequadamente e estudar a variabilidade, tanto do método manual quanto do automatizado (STIENE-MARTIN *et al.*, 1998). Em termos gerais, o analista de um laboratório deve entender o porquê da mudança de uma técnica, antes que essa técnica seja implantada. A familiaridade do analista com detalhes de dados dos cálculos estatísticos, construção de gráficos e regras para interpretação dos resultados, ajuda o profissional no entendimento dos mecanismos para utilização de um novo procedimento para controle de qualidade em laboratórios (WESTGARD, 1984).

De acordo com HOXTER (1986) “para a otimização do diagnóstico, a qualidade do resultado liberado pelo profissional no laboratório depende da pureza dos reagentes, da exatidão dos padrões, da precisão da aparelhagem, da limpeza do material, da calibração dos aparelhos, da perícia técnica e do estado emocional dos técnicos”; portanto “a qualidade precisa ser atingida, antes que possa ser controlada”.

A calibração, cuja definição é qualquer ajustamento feito em um instrumento para corrigir os resultados obtidos de modo a torná-los “verdadeiros”. O padrão primário é definido como aquele preparado a partir de substância química pura, não higroscópica, que possa ser pesada e mantida em solução estável; e padrão secundário é aquele preparado a partir de um padrão primário e é usado para calibrar instrumentos (STIENE-MARTIN *et al.*, 1998). No caso de contagem de células, não é possível preparar padrões primários ou secundários, mas pode-se empregar amostras controle e calibradores, cujos valores foram obtidos através de exaustivas contagens manuais e determinações repetidas em aparelhos de laboratórios de referência.

---

#### 2.4.1 Controle de qualidade interno e externo

Como exigências de Controle de Qualidade Interno, antes que um laboratório seja certificado, precisa ter todas as suas técnicas documentadas e registradas. Esses documentos são mais freqüentemente chamados de procedimento sistêmico (PS), procedimento operacional padrão (POP) e instrução de trabalho (ITR). O PS é o procedimento que define de forma geral o fluxograma do setor, desde o recebimento do material até a entrega do laudo. O POP é o documento que define detalhadamente a técnica empregada para cada análise realizada no setor. A ITR é o documento que define o preparo dos reagentes e o manuseio correto dos equipamentos para que o POP possa ser executado, bem como a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) como luvas, jalecos e outros, e é de fundamental importância, sendo que os cuidados a serem tomados para se evitar acidentes com sangue e com objetos perfuro-cortantes, bem como a atenção ao se utilizar substâncias tóxicas no laboratório, são requisitos para garantir a segurança dos profissionais desta área.

As informações contidas nesses documentos devem estar vinculadas umas às outras, de forma que qualquer alteração deve ser informada para que os documentos sejam atualizados.

A certificação de produtos ou serviços e de sistemas de gestão e de pessoal é, por definição, realizada por uma organização independente e credenciada para executar a modalidade de Avaliação da Conformidade. A certificação dos Sistemas de Gestão atesta a conformidade do modelo de gestão de fabricantes e prestadores de serviço em relação a requisitos normativos. Os sistemas clássicos na certificação de gestão são os de gestão de qualidade, baseado nas normas NBR ISO 9000 e os sistemas de gestão ambiental, conforme as normas NBR ISO 14000 (INMETRO, 2008).

O Manual da Qualidade é o documento que descreve todos os passos inerentes à obtenção de um programa para garantir a qualidade em laboratórios e inclui os seguintes itens: organograma do laboratório, responsabilidades, descrição do laboratório, política da qualidade, instalação do laboratório, recursos humanos, auditorias internas e treinamentos (DICQ e PALC, 2008). Os programas de controle de qualidade interno podem ser estabelecidos em cada laboratório, que deve definir critérios para sua implantação (HOWANITZ, 1997).

As avaliações obtidas pelos programas de controle de qualidade externo são importantes para se implementar o sistema de controle interno de forma mais adequada. Mesmo quando todas as precauções possíveis são tomadas para assegurar a exatidão e a precisão nos laboratórios, certos erros são detectados apenas através de uma avaliação externa (LEWIS *et al.*, 2006).

A característica mais importante desses programas é de que a mesma amostra é enviada de uma entidade regional ou nacional para um grande número de laboratórios. Todos os laboratórios enviam seus dados de volta para a entidade, cujos resultados serão comparados a um valor considerado correto (LEWIS *et al.*, 2006). Os programas brasileiros de controle de qualidade externo são implementados pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) e pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC). Os programas internacionais mais conhecidos são: o americano, *College of American Pathologists (CAP)*; o espanhol, *Programa Interlaboratorios de Control de Calidad (PICC)*; o alemão, *German – External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS)*; os ingleses, *Trace Elements External Quality Assessment Scheme (TEQAS)* e *St George’s Hospital Medical School*. Esses programas apresentam características próprias, que visam a avaliação de cada laboratório participante. Anualmente são fornecidos certificados de participação e de adequação para os laboratórios que atingirem níveis de excelência.

Segundo ENGLAND *et al.* (1998), a garantia da qualidade inclui todos os passos, sob a orientação do responsável pelo laboratório, para assegurar a confiabilidade dos resultados, mantendo a acurácia e a reprodutibilidade, bem como a comparabilidade entre vários laboratórios.

Dentre os métodos usados incluídos em um “Programa de Garantia da Qualidade” para assegurar a obtenção de resultados reais, estão as boas práticas laboratoriais (BPL), a padronização de técnicas, os sistemas de controle de qualidade interno e externo, as análises estatísticas e os demais aspectos que garantam a qualidade dos resultados levados aos clínicos, ou seja, é a soma de todos os sistemas designados para assegurar a qualidade do resultado final. As normas das BPL cobrem todas as técnicas envolvidas no processo, transporte e armazenamento de material, treinamento de pessoal, espaço e equipamento adequados. O controle de qualidade assegura as normas das BPL através de

---

inspeções, auditorias e análises estatísticas (STIENE-MARTIN *et al.*; 1998; WAGSTAFF, 1998).

Um programa completo para garantia da qualidade em laboratório de análises clínicas deve envolver as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase pré-analítica inclui a coleta adequada da amostra, a identificação correta do paciente e do material, bem como a conservação e transporte adequados do material, além de outros passos que antecedem a fase analítica, que é a própria análise da amostra. A fase pós-analítica inclui todos os passos após a execução da técnica, como transcrição e digitação dos resultados, o estabelecimento de correlações com os dados clínicos e a liberação do laudo por um profissional responsável, após a sua verificação final (ZARBO, 2000; LEWIS *et al.*, 2006).

O método analítico é um conjunto de instruções que define material e equipamentos necessários, bem como ações para a obtenção dos resultados. Através do chamado controle de qualidade analítico, seleciona-se os métodos e os instrumentos considerados confiáveis. Para tanto, antes da implantação de um método ou equipamento, são analisadas suas confiabilidade e viabilidade. A viabilidade está relacionada com a rapidez e o custo para desenvolver a metodologia, com a infra-estrutura e a segurança no trabalho. A confiabilidade depende da variabilidade introduzida pelos erros randômicos e erros sistemáticos (STIENE-MARTIN *et al.*; 1998).

Existem organizações responsáveis pela segurança da qualidade em laboratórios, como: *College of American Pathologists (CAP)*, *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*, *International Committee for Standards in Haematology (ICSH)*, *Joint Commition on Accreditation of Healthcare Organizations (JCAHO)*, *Joint Commition for Clinical Laboratory Standards (JCCLS)*, *Clinical Laboratory Improvement Amendment of 1988 (CLIA'88)*, *International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)* e *World Health Organization (WHO)* (STIENE-MARTIN *et al.*, 1998; LEWIS *et al.*, 2006).

#### 2.4.2 O Emprego da estatística no controle de qualidade em hematologia

O emprego de cálculos estatísticos é de fundamental importância para o estudo dos erros e o estabelecimento de sistemas de controle de qualidade. Quando a variabilidade resulta de uma soma de fatores não-controlados, é chamada variável aleatória porque é influenciada pelo acaso, variando mesmo se determinada no mesmo dia, mesma hora e pelo mesmo equipamento. Atribuiu-se variação aleatória às causas acidentais e indetermináveis, e variação intermitente às causas determináveis. Enquanto as causas determináveis podem ser descobertas e eliminadas com um controle de qualidade eficiente, as causas aleatórias não podem ser removidas sem que se façam mudanças básicas no sistema (SHAININ e SHAININ, 1993; VIEIRA, 1998).

Dentre os métodos estatísticos aplicados à qualidade, estão os gráficos de controle para medir e analisar a variação nos processos, visando aprimorar a qualidade dos processos analíticos. Os chamados gráficos de controle são utilizados para avaliar o controle de qualidade. Esses gráficos apresentam uma linha central esboçada como a média geral, e os limites de confiança superior e inferior, em geral estabelecidos como 3 desvios-padrão em torno da média (BICK, 1993; SHAININ e SHAININ, 1993).

Ao se estudar os erros em laboratório, cada resultado deve ser considerado, de acordo com a fase pré-analítica, levando-se em conta a coleta adequada, as variações fisiológicas, como sexo, idade, gravidez, efeitos hormonais, repouso ou exercício físico, etc; bem como a diferenciação entre normal e patológico. Deve-se considerar que pode ocorrer superposição entre valores de referência e valores obtidos durante determinada condição patológica (NARAYANAN, 2000).

No que se refere ao erro analítico, pode-se afirmar que o erro representa a variabilidade das medidas e que depende de fatores diversos, previsíveis ou não. O resultado obtido com um determinado método não pode ser comparado com o obtido com outro método, cuja especificidade seja diferente. Assim, dentro dos Laboratórios de Análises Clínicas, o estudo dos erros deve ser feito exclusivamente para comparar os resultados obtidos com o mesmo método analítico, ou com métodos equivalentes (HENRY, 1980).

Deve-se realizar análises periódicas dos dados obtidos nas diversas áreas que constituem um Laboratório de Análises Clínicas, aplicando ações preventivas ou corretivas quando necessário. Estes procedimentos são fundamentais para se reconhecer e minimizar os erros. Portanto, a obtenção de coeficientes de variação entre as metodologias empregadas constitui um estudo estatístico para estabelecer a comparação entre as mesmas e é recomendada para a contagem de reticulócitos pela NCCLS (1997).

#### 2.4.3 Importância do estudo dos erros e do controle de qualidade em contagens de reticulócitos

A contagem de reticulócitos, como qualquer determinação em laboratório clínico, está sujeita a erros, que devem ser conhecidos para a implantação de sistemas de controle de qualidade. A contagem manual de reticulócitos está sujeita a uma série de variáveis, como a falta de homogeneização ou cuidados com o tempo e a temperatura de incubação da suspensão de amostra-corante, bem como, as inclusões em eritrócitos quando confundidas com o reticulócito, as quais podem acabar conduzindo a elevados coeficientes de variação, com perda da exatidão e da precisão.

Obtem-se índices de erro, de acordo com números de eritrócitos contados e % de reticulócitos obtidas, até 20% de coeficiente de variação máximo para um grau de exatidão aceitável, conforme descrito na Tabela 1. O erro padrão de contagem de reticulócitos pode ser avaliado através da porcentagem de reticulócitos encontrada e do número de células observadas com o emprego do método de Miller.

A metodologia de citometria de fluxo empregada nos contadores eletrônicos para a contagem de reticulócitos em laboratório permite determinações mais rápidas e precisas, devido ao maior número de células contadas e por eliminarem grande parte das fontes de erros. Entre as vantagens estão uma variedade de informações do reticulocitograma. Entretanto, dependem das condições de incubação e dos métodos de calibração dos equipamentos empregados, o que pode contribuir para a inexatidão dos aparelhos automatizados em algumas situações como as possíveis combinações do RNA de plaquetas e leucócitos ou mesmo do DNA de células nucleadas com corantes ou marcadores dos aparelhos, englobar na contagem, plaquetas gigantes ou agrupadas, leucócitos anormais ou fragmentados, e outras

inclusões que podem ser confundidas com as granulações dos reticulócitos, como ocorre na metodologia manual.

Tendo em vista a importância da contagem de reticulócitos para a detecção de doenças hematológicas e o controle de seu tratamento, esse trabalho propõe uma série de estudos em controle de qualidade através da comparação inter-observadores, dos critérios empregados em sua execução e dos resultados obtidos pela técnica manual e em automação.

### **3. OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

### **OBJETIVO GERAL**

- Estudar comparativamente métodos de contagem de reticulócitos.

### **OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- Avaliar a variação inter-observadores na contagem manual dos reticulócitos.
- Comparar metodologias de execução manual e automatizada para contagem de reticulócitos.
- Testar alternativas para a metodologia automatizada de contagem de reticulócitos.
- Testar a aplicabilidade e a confiabilidade das metodologias estudadas.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

Foram selecionadas amostras de sangue total de pacientes obtidas por punção venosa na rotina laboratorial para exames hematológicos. O critério para a seleção das amostras foi a solicitação clínica para a realização do hemograma e ou da contagem de reticulócitos. Não houve restrições quanto a sexo, idade ou história clínica de cada paciente atendido. A seleção das amostras dependeu também da assinatura, dos mesmos ou de seus responsáveis, de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), obtido por ocasião da coleta e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Saúde da UFPR (CAAE 0026.0.091.000-08-HC, UFPR), conforme o Anexo 1.

Para a realização de uma avaliação inter-observadores de acordo com a metodologia manual, a seleção dos grupos de amostras ocorreu de forma que, entre as mesmas, de acordo com os resultados do eritrograma, se pudesse contemplar tanto aquelas dentro da normalidade quanto da anormalidade para a contagem de reticulócitos, independente de haver ou não solicitação médica para esta contagem. Foram selecionados 25 pacientes de diferentes idades, entre 0 e 87 anos, sendo 13 do sexo masculino e 12 do sexo feminino. As amostras foram classificadas em três grupos, de acordo com a contagem de reticulócitos obtida pelos autores: Grupo B para valores relativos abaixo de 0,5%; Grupo M para valores de 0,5 a 2,5%; e Grupo A para valores acima de 2,5%, valores estes considerados baixos, médios e altos, respectivamente, para efeito de estudo de variabilidade, sem levar em conta sexo ou idade.

Para um estudo de comparação entre as metodologias manual e automatizada, selecionou-se 341 amostras de pacientes, sendo 51 do sexo masculino, 66 do sexo feminino, e apresentavam idades entre 0 e 89 anos, e 224 recém-natos.

Para o estudo de um corante alternativo ao corante comercial na contagem automatizada de reticulócitos, utilizou-se 80 amostras, sendo 30 para os testes

---

preliminares de seleção do melhor corante, concentração através da diluição e reprodutibilidade e outras 50, para determinações de testes de comparação entre o corante comercial e o preparado para a automação. Estas 80 amostras eram de 42 pacientes do sexo feminino e 38 do sexo masculino, com idades entre 0 e 75 anos.

## 4.2 MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em 3 etapas:

- a) Estudo inter-observadores para a contagem manual de reticulócitos;
- b) Estudo comparativo da contagem de reticulócitos pelos métodos manual e automatizado;
- c) Estudo comparativo entre contagens de reticulócitos automatizadas realizadas com o emprego de diluente-corante fornecido pelo fabricante do aparelho e de um diluente-corante alternativo, preparado no laboratório.

### 4.2.1 Local de realização dos procedimentos

Os procedimentos técnicos de preparo de reagentes e execução das determinações foram realizados no Laboratório Pontagrossense de Análises Clínicas (LAPAC), no Laboratório de Produtos Farmacêuticos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), no Laboratório de Citologia e Hematologia Clínica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP) da Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e em outros laboratórios, cujos responsáveis técnicos foram convidados a participar do estudo inter-observadores para a contagem manual de reticulócitos.

#### 4.2.2 Reagentes

Corantes: azul de cresil brilhante (SIGMA); azul de metileno novo (INC BIOMEDICALS INC.); corante comercial pronto para uso para contagem de reticulócitos (LABORCLIN).

Soluções: tampão fosfato de sódio iso-osmótico 150 mmoles/l, pH 6,48; tampão citrato-NaCl, (citrato de sódio 3 g/dl + cloreto de sódio 0,85 g/dl) de pH 7,04.

Os reagentes necessários para o funcionamento do equipamento Cell-Dyn 3500 SL (*Abbott Diagnostics*) e realização das contagens de reticulócitos: diluente; detergente; solução leucoprotetora; lisante; kit para reticulócitos com solução corante constituída de: azul de metileno novo (<0,2%), oxalato de potássio (<3,0%), fosfato de sódio dibásico (0,3%), fosfato de potássio monobásico (0,05%), EDTA dissódico (0,03%), cloreto de sódio (0,1%), tensoativo (0,001%) e conservante (0,05%) em 3,7 ml de solução; e controles comerciais para a metodologia automatizada: Retic Plus Control I e II (*Abbott Diagnostics*), com valores conhecidos de 1,2% (desvio padrão de  $\pm 0,8$ ) e 3,4% (desvio padrão de  $\pm 1,2$ ) respectivamente, para a contagem de reticulócitos.

#### 4.2.3 Preparo das soluções corantes

Foram preparados os corantes supra-vitais: azul de cresil brilhante e azul de metileno novo, de acordo com a metodologia preconizada por Willians *et al.* (1976) e por LEWIS *et al.* (2006), respectivamente. Dissolveu-se azul de metileno novo (1g/dl) em tampão fosfato 150 mmoles/l, pH 6,48. Dissolveu-se azul de cresil brilhante (1g/dl) em salina citratada 3,8%, pH 7,04. Os corantes preparados foram acondicionados em embalagens de vidro âmbar, mantidos em maceração por 24 horas, e filtrados em papel de 8  $\mu$ m de porosidade.

#### 4.2.4 Coleta das amostras

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa em EDTA K<sub>3</sub> (1,5 mg/ml de sangue), conforme os procedimentos de coleta descritos por LEWIS *et al.* (2006) e homogeneizadas por rotação (Homogeneizador de sangue AP 22 PHOENIX).

#### 4.2.5 Métodos empregados

##### 4.2.5.1 Eritrograma

Foram analisados os parâmetros do eritrograma em equipamento multicanal de Hematologia CELL DYN 3500 SL: eritrócitos (RBC), hemoglobina (HGB), volume globular (VG), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), para fornecer dados relevantes sobre os pacientes aos participantes do estudo inter-observadores para contagens de reticulócitos.

##### 4.2.5.2 Contagem manual de reticulócitos

A técnica para contagem de reticulócitos foi realizada de acordo com LEWIS *et al.* (2006), modificada. Alíquotas de 100 µl da solução corante foram misturadas a 200 ou 250 µl de sangue, incubando-se a 37°C por 20 a 25 min. O volume de sangue adicionado ao corante dependeu da contagem global de células vermelhas, ou seja, 200 µl de amostra para volume globular igual ou superior a 30% e 250 µl de amostra para volume globular igual ou inferior a 29%. Após a incubação com o corante, foram feitas finas extensões em lâmina para as contagens.

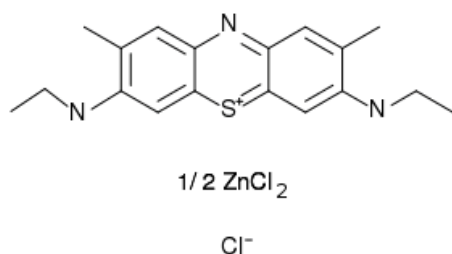
## 4.2.5.2.1 Padronização do corante

Para o estudo inter-observadores utilizou-se como corante da técnica manual, o azul de cresil brilhante comercial pronto para uso. Posteriormente, para o estudo de comparação entre metodologia manual e automatizada, foram utilizados o azul de cresil brilhante e o azul de metileno novo preparados no laboratório.

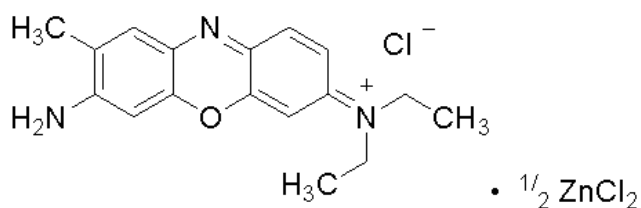
A presença do elemento oxigênio na fórmula estrutural do azul de cresil brilhante provavelmente pode aumentar a força de ligação da reação química com o reticulócitos, formando compostos mais insolúveis em relação ao emprego do azul de metileno novo de acordo com as noções fundamentais em química (SOLOMONS, *et al.* 2005/2006). As fórmulas estruturais de ambos os corantes estão ilustradas na Figura 2.

FIGURA 2. FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS CORANTES AZUL DE METILENO NOVO E AZUL DE CRESIL BRILHANTE

A



B



A - Azul de metileno novo; B – Azul de cresil brilhante

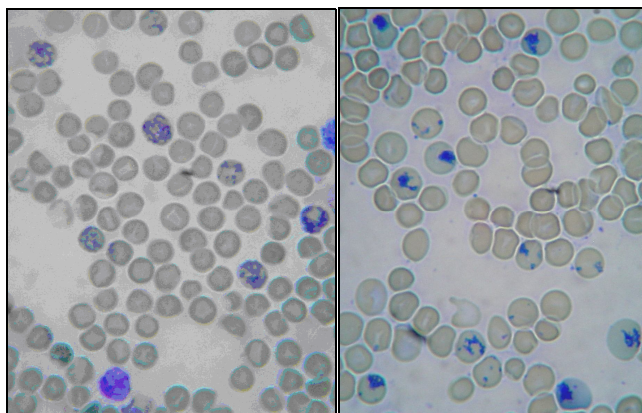
Padronizou-se a coloração através de um estudo da técnica manual com ambos os corantes preparados para a contagem de reticulócitos e verificou-se que as lâminas confeccionadas, quando observadas ao microscópio óptico, apresentavam diferenças de coloração. Os valores obtidos na contagem de reticulócitos realizada em preparações feitas com 5 amostras diferentes não apresentaram diferenças significativas (Tabela 4). Assim, o azul de cresil brilhante foi o corante eleito para as demais determinações de metodologia manual e a Figura 3 ilustra comparativamente amostras preparadas com as duas colorações. A escolha foi devido ao fato que, o azul de cresil brilhante era de fácil obtenção comercial e de custo mais baixo.

TABELA 4. COMPARAÇÃO DE RESULTADOS DE CONTAGENS RELATIVAS DE RETICULÓCITOS ENTRE CORANTES DE METODOLOGIA MANUAL

PACIENTE	Contagem de reticulócitos (%)	
	ACB	AMN
1	4,1	4,5
2	1,7	1,5
3	6,5	6,5
4	0,5	0,6
5	1	0,9

Os resultados são as médias de 2 leituras para cada amostra do paciente. ACB – azul de cresil brilhante; AMN – azul de metileno novo.

FIGURA 3. ASPECTO MORFOLÓGICO DE RETICULÓCITOS PELAS COLORAÇÕES AZUL DE CRESIL BRILHANTE (ACB) E AZUL DE METILENO NOVO (AMN) EM MICROSCOPIA ÓPTICA DE IMERSÃO (x1000)



Coloração com ACB

Coloração com AMN

#### 4.2.5.2.2 Padronização da técnica de preparo de extensões em lâmina

Estendeu-se 5  $\mu$ l de suspensão de células e corante em lâmina com o auxílio de lâmina extensora, para se obter campos sem sobreposição de eritrócitos. Em seguida, as lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por 30 min, para acelerar a secagem das preparações e evitar, desta forma, que a umidade provocasse o desbotamento dos reticulócitos e dificultasse a sua identificação; e acondicionadas em recipiente hermético.

Padronizou-se o tempo máximo para a contagem manual de reticulócitos nas extensões em lâmina, utilizando-se 3 amostras de sangue colhidas de um único paciente em dias consecutivos. As leituras em duplicata das lâminas foram realizadas até 72 h após a sua preparação, e os resultados obtidos estão representados na Tabela 5.

TABELA 5. CONTAGEM RELATIVA DE RETICULÓCITOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE LEITURA

Leitura (dias)	Amostras (%)		
	1	2	3
0	0,9	1,1	1
	0,9	0,9	1,1
1	0,7	1,1	1
	0,5	0,9	1,2
2	0,8	0,8	0,9
	1	1	1
3	0,9	1	0,8
	0,7	0,8	0,9

As extensões foram lidas durante 3 dias para avaliar a estabilidade. Foram realizadas duas leituras em 3 extensões independentes

#### 4.2.5.2.3 Padronização da contagem de reticulócitos em microscópio óptico

Critérios morfológicos para o reconhecimento dos reticulócitos – Os critérios morfológicos foram seguidos de acordo com os princípios preconizados por LEWIS *et al.* (2006). As extensões em lâmina devem ser analisadas em microscópio óptico com a objetiva de imersão (1000x). Pode-se observar a presença de conjuntos de filamentos ou grânulos de RNA corados em azul intenso, dispostos ao acaso no interior dos reticulócitos. Os reticulócitos mais maduros são caracterizados pela presença de poucos filamentos ou grânulos de RNA, enquanto os mais jovens, pela maior quantidade de grânulos ou massa densa reticular, são mais bem definidos, conforme a classificação em 4 estágios de maturação (item 4.1). Reticulócitos que ainda apresentem ao menos dois pequenos corpúsculos ou filamentos corados ainda devem ser considerados como reticulócitos. A diferenciação entre reticulócitos e outras inclusões eritrocitárias, ou mesmo de artefatos deve ser criteriosa.

Região da extensão adequada para a contagem de reticulócitos - A área da preparação analisada não foi de campos com superposição de células, ou mesmo de campos muito finos, ou seja, com muito poucas células ou que apresentassem extensos espaços vazios entre as células.

---

Padrão da coloração supra-vital - A técnica de coloração foi realizada de maneira que a mesma estivesse adequada, ou seja, nem muito fraca a ponto de não se ver os retículos, nem muito forte, a ponto de tornar os retículos borrados ou espessos.

Número de células a serem contadas – De acordo com Dacie *et al.* (1973), o erro médio encontrado nas contagens pode ser significativo quando a concentração encontrada for inferior a 10%. De um modo geral, recomenda-se examinar campos sucessivos até a contagem de 100 reticulócitos e no mínimo 10 campos, para obter a média do número por campo. Quando o número de reticulócitos exceder a 10%, o exame de um número pequeno de células será suficiente para se obter um erro-padrão menor que 10%. Assim, a determinação do número de células a serem contadas deve se basear na porcentagem de reticulócitos encontrados na contagem das primeiras 1.000 a 2.000 células. Um grande número de células deve ser contado quando o número de reticulócitos for baixo. Portanto, o número de células a ser contado, para se obter um grau aceitável de reprodutibilidade, é tanto maior quanto menor for a porcentagem de reticulócitos, de acordo com a Tabela 1 do item 2.3.2.1. Por exemplo, para uma concentração de reticulócitos obtida nas primeiras 1000 células contadas, foi estabelecido que, considerando-se campos com cerca de 200 eritrócitos, deveriam ser contados os reticulócitos de 20 a 50 campos, totalizando 4.000 a 10.000 eritrócitos. Este critério foi seguido rigorosamente pelos examinadores K e L.

Valores considerados controles - As contagens de todas as amostras foram realizadas em duplicata por dois examinadores com 10 anos de experiência, em média, em rotina laboratorial para contagem de reticulócitos (K e L), de forma independente, sendo que os resultados médios obtidos foram considerados controles, por apresentarem valores muito próximos.

Forma de se expressar os resultados – Os resultados das contagens de reticulócitos somente foram expressos em porcentagens. As contagens absolutas estão vinculadas a outro dado do eritrograma do paciente, o número total de eritrócitos no sangue e, não foram utilizadas para as análises estatísticas.

#### 4.2.5.3 Metodologia automatizada

A técnica empregada para a metodologia automatizada seguiu as instruções do fabricante. A contagem de reticulócitos foi realizada no equipamento semi-automatizado Cell Dyn 3500 SL (*Abbott Diagnostics*) por dispersão de luz a 0°, 10° e 90°, no qual o corante supra-vital tem propriedade catiônica e precipita o RNA ribossômico do reticulócito, com propriedade aniônica, formando uma rede. A alta concentração do corante no reagente de reticulócitos produz um efeito estabilizador nos eritrócitos e a leitura do espalhamento de luz é realizada em 30.000 células em cada determinação. Empregou-se como solução corante-diluyente, 3,7 ml do azul de metileno novo comercial (*Abbott Diagnostics*), previamente incubada em temperatura ambiente, ao abrigo da luz por 15 min a 2 h, com 20 µl de amostra de sangue. Após a incubação, a suspensão de sangue-corante-diluyente foi homogeneizada e processada no aparelho por aspiração de 200 µl de amostra.

No manual de uso do equipamento, o fabricante explicita que o tempo máximo de processamento da amostra após a coleta é de 8 h em temperatura ambiente e que, a preparação da amostra-corante é estável por 1 ou 2 dias em temperatura ambiente ou 3 a 5 dias a 4°C. Os resultados são expressos em valores relativos e absolutos, não fornecendo outras informações a respeito do reticulócito.

Para a calibração do equipamento, foram utilizados os controles comerciais Retic Plus Control I e II, com valores conhecidos para a contagem de reticulócitos, específicos para este aparelho. Para o início das determinações com o uso de cada corante, foi feita uma contagem de reticulócitos empregando-se apenas o próprio corante, no chamado teste de *background* ou recontagem da leitura de fundo, no qual se espera que a contagem de reticulócitos não exceda a 100. Este processo tem objetivo, avaliar a qualidade do corante quando se utiliza tubos de lotes diferentes de reativos de reticulócitos. O coeficiente de variação para esta metodologia é menor ou igual a 15% e o coeficiente de correlação é maior ou igual a 0,9.

---

Segundo o fabricante, a linearidade da metodologia automatizada do aparelho é de 0 a 30% ( $\pm 7\%$ ) de reticulócitos e os valores de referência de 0,88 a 2,37% para adultos.

#### 4.2.6 Experimentos

##### 4.2.6.1 Estudo da variação inter-observadores para a contagem manual de reticulócitos

Foram realizadas parcerias com 10 Laboratórios de Análises Clínicas, públicos e privados na região dos Campos Gerais (PR) para o estudo da variação inter-observadores para a contagem de reticulócitos. Para que a avaliação fosse confidencial e a identificação dos laboratórios participantes, mantida em sigilo, os examinadores dos laboratórios receberam a denominação de A a J e os observadores responsáveis pelos resultados considerados corretos, K e L.

As lâminas preparadas com as amostras de sangue dos 25 pacientes, foram acondicionadas em porta-lâminas e distribuídas em duplicata, aos observadores A a J para o estudo da variação inter-observadores, recomendando-se que fizessem a contagem de reticulócitos em até 48 horas, de acordo com um roteiro explicativo que seguiu os critérios preconizados no item 4.2.5.2, deste trabalho, de 2 a 3 vezes por semana e a transcrever os resultados médios obtidos nas contagens de reticulócitos em valores relativos. Foram enviados, ainda, aos laboratórios, os dados do eritrograma de cada paciente enumerados de 1 a 25, bem como orientações sobre a leitura das lâminas (Anexo 2).

As preparações foram analisadas, em duplicata, também pelos examinadores K e L com experiência rotineira de dez anos em contagem de reticulócitos, e de acordo com os critérios preconizados por LEWIS *et al.* (2006), de acordo com o item 4.2.5.2.3.

Foi distribuído ainda um instrumento de avaliação na forma de questionário aos responsáveis pelos laboratórios participantes, para se obter informações a respeito de seus procedimentos usuais para a contagem de reticulócitos, incluindo a metodologia de preparo do material, os critérios morfológicos, de seleção de campos

---

microscópicos e de número de células contadas empregados; ao emprego de Controle de Qualidade interno e externo; e à sua certificação pela NBR ISO 9002 (Anexo 3).

#### 4.2.6.2 Estudo comparativo da contagem de reticulócitos pelos métodos manual e automatizado

A análise de comparação entre as metodologias manual e automatizada (Cell Dyn 3500 SL, *Abbott Diagnostics*) foi realizada com 341 amostras de pacientes indiscriminadamente, através do preparo de 2 lâminas para cada amostra e o resultado obtido foi a média das contagens microscópicas de acordo com os princípios preconizados por LEWIS *et al.* (2006). A contagem de reticulócitos por metodologia automatizada ocorreu seguindo as instruções técnicas do fabricante.

#### 4.2.6.3 Estudo comparativo entre contagens de reticulócitos automatizadas com o emprego de reagente do fabricante do aparelho e de diluentes-corantes preparados no laboratório

Para o estudo de uma adaptação da metodologia automatizada, baseada no emprego de uma solução corante-diluyente alternativa, foram testados os dois corantes de emprego usual para a contagem de reticulócitos, o azul de cresil brilhante e o azul de metileno novo, em meio isotônico e tamponado, em pH 7,0 e 6,5 respectivamente, nas mesmas proporções do corante do fabricante, de concentração incerta, no método convencional automatizado e em diluições em NaCl 0,85 g/dl, equivalentes a 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 e 1:100. Utilizou-se o volume de 1,85 ml de corante puro ou diluído para um volume de 10 µl de amostra. As amostras foram agitadas cuidadosamente para evitar a formação de bolhas. Após as respectivas contagens de reticulócitos, foi determinada a menor diluição de corante com o qual se obteve resultados comparáveis aos resultados da contagem automatizada obtida com o corante do fabricante.

Todas as análises com o corante comercial e com o corante preparado para a seleção da melhor diluição foram realizadas em duplicata e, após a escolha da

---

diluição mais apropriada, foram realizadas de 2 a 10 determinações para avaliar a estabilidade e a reprodutibilidade. Para tanto, o estudo foi realizado separadamente, 30 amostras para testes de seleção e adequação do produto e 50 amostras para a realização da análise de comparação com o corante comercial.

O produto caseiro foi mantido sem a presença de aditivos ou conservantes e as determinações realizadas num período de até 2 h do preparo da suspensão amostra-corante após a incubação, sem a realização de provas de estabilidade após este tempo. A validação do método foi realizada por métodos estatísticos.

### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A comparação entre os resultados pela análise estatística de concordância inter-observadores foi realizada por correlação intra-classe para dados paramétricos, com mais de dois examinadores (BARTKO, 1974; PORTNEY e WATKINS, 1993) com utilização do pacote estatístico “on-line” da Universidade de Hong Kong (2008). Os dados obtidos foram também analisados com o uso dos gráficos cartesianos de dispersão, gráficos de controle de qualidade (SHAININ e SHAININ, 1993), pelo teste de correlação de Pearson, e pela Análise de Variância (ANOVA), modelos inteiramente casualizados ou fatoriais. Os dados foram analisados com o auxílio da planilha Excel (Microsoft) ou pacote de estatística Statistica 8.0 (StatSoft). A significância estatística foi considerada para  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão apresentados de acordo com os experimentos realizados, conforme os itens abaixo.

### 5.1 ESTUDO DAS ANÁLISES INTER-OBSERVADORES

No instrumento de avaliação distribuído aos responsáveis pelos laboratórios participantes do estudo na região dos Campos Gerais (PR) (Anexo 3) foi relatado que, somente um dos 10 laboratórios não participam de Programas de Controle de Qualidade Externo; 5 laboratórios realizam os procedimentos e normas para o Controle de Qualidade Interno; apenas um laboratório é certificados pela ISO; todos realizam POP para a contagem de reticulócitos e; apenas um único laboratório possui equipamento para metodologia automatizada, conforme os dados do Anexo 4.

Todas as informações quanto aos critérios de execução, identificação e contagens de reticulócitos realizados rotineiramente em Laboratório de Análises Clínicas, fornecidas pelos observadores do trabalho e dos laboratórios participantes estão ilustradas no Anexo 5. Dentre os observadores, o G não obedece ao critério de variar o volume de sangue em relação ao resultado do VG; o D executa rotineiramente a contra-coloração das lâminas preparadas para a contagem microscópica com May Grünwald-Giemsa; os observadores A, E, F, H, K e L fizeram a leitura de todas as lâminas recebidas no tempo preconizado nas orientações contida na planilha para o estudo, os observadores B, C, D, G e J leram parte das lâminas no tempo preconizado e o observador I não seguiu esta orientação; os observadores C, K e L relataram que analisam a interrelação entre as contagens de reticulócitos, os dados do eritrograma e a observação das lâminas coradas com May Grünwald-Giemsa, como forma de controle de qualidade; apenas o observador G adiciona aos resultados o cálculo da CRC; os observadores C e G contam todas as células em todos os campos de contagem, K e L contam todas as células em alguns campos de contagem, estabelecendo o número médio de células por campo e, os demais observadores, estabelecem o número de células por campo de acordo com

---

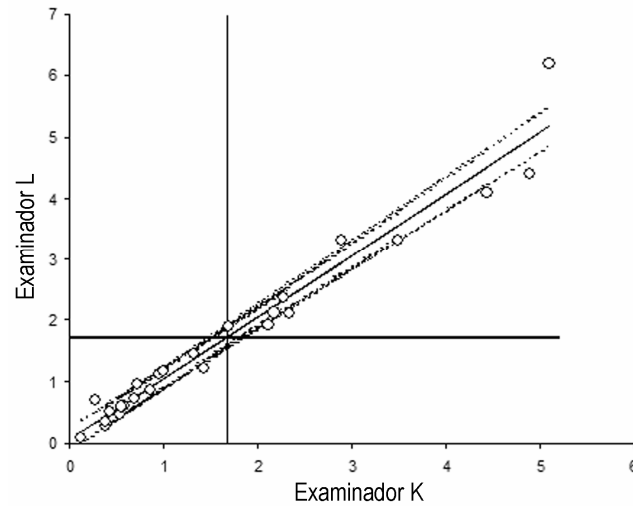
sua experiência e contam apenas os reticulócitos; os observadores A, C, D, E, F, G, I, K e L contam um maior número de campos com células quando o número de reticulócitos for baixo; todos os observadores utilizam microscópio de alta resolução com objetiva de imersão; todos utilizam, entre os critérios de identificação, a inclusão de reticulócitos com poucos e muitos filamentos ou grânulos; nenhum observador relata a contagem de reticulócitos em campos com sobreposição de células e para todos os observadores, a quantidade média de células contadas por campo é, em geral, 200. A quantidade média de células contadas ou avaliadas na lâmina é variada: os observadores A, I e J contam reticulócitos entre 1.000 a 2.000 células (5 a 10 campos), D e G contam entre 2.000 e 4.000 células (10 a 20 campos), C conta todas as células do campo até mais ou menos 2.500 células, H conta 2.000 células (10 campos), E conta 4.000 células (20 campos) e os observadores K e L contam de 4.000 a 10.000 células (20 a 50 campos).

Todos os participantes relataram desconhecer ou não utilizar a técnica de contagem manual por porcentagem de erro encontrada na Tabela 1, ou mesmo a ocular de Miller (Tabela 2).

Os resultados dos examinadores K e L foram considerados como exatos, para efeito de comparação, por serem experientes, por serem responsáveis pela pesquisa, preparação e exame minucioso das lâminas recém-preparadas, e por seguirem estritamente os critérios preconizados para este trabalho, baseados nas recomendações de LEWIS *et al.* (2006).

Os dados da Figura 4 indicam que o erro sistemático entre os examinadores K e L foi praticamente zero. O erro casual ( $1-R^2$ ) entre as duas avaliações foi de apenas 4,1%, o que significa grande precisão entre as contagens dos examinadores. Portanto, pode-se considerar que os dois examinadores estavam padronizados de acordo com os critérios estabelecidos.

FIGURA 4. CORRELAÇÃO PARA AS CONTAGENS DE RETICULÓCITOS (%) ENTRE OS EXAMINADORES K E L



n = 25 amostras; o coeficiente de correlação de Pearson (R) foi de 0,98; Linha sólida – regressão linear estimada ( $y = 1.018x$ ); linhas pontilhadas – 95% limite de confiança para os resíduos. Linhas cruzadas – valores médios para x e y.

A comparação entre os resultados pela análise estatística de concordância por correlação intra-classe para dados paramétricos, com mais de dois examinadores (PORTNEY e WATKINS, 1993), utilizando o pacote estatístico “on-line” da Universidade de Hong Kong (2008), está ilustrada na Tabela 6.

Exceto para leituras baixas, as maiores concordâncias foram obtidas com os examinadores K e L.

Considerando o erro casual ( $1-R^2$ ) para leitura de todas as lâminas examinadas, os examinadores G, B, C e F apresentaram erro < 20%, os examinadores D, J, H e A apresentaram entre 20 – 40% de erro e os examinadores E e I, erro > 40%.

TABELA 6. ANÁLISE DE COMPARAÇÃO POR ESTATÍSTICA DE CORRELAÇÃO INTRA-CLASSE ENTRE OS EXAMINADORES “K” E “L” E OS DEMAIS, PARA A CONTAGEM DE RETICULÓCITOS (%)

Geral		Baixo (<0,5%)		Médio (0,5-2,5%)		Alto (>2,5%)	
Lab	R	Lab	R	Lab	R	Lab	R
KL	0,9796	KL	0,5119	KL	0,9571	KL	0,8410
KL G	0,9365	KL D	0,5414	KL G	0,7249	KL B	0,8268
KL B	0,9289	KL F	0,4754	KL B	0,6583	KL C	0,7584
KL C	0,9130	KL A	0,3827	KL D	0,6411	KL G	0,6584
KL F	0,9056	KL G	0,2373	KL I	0,5940	KL A	0,3973
KL D	0,8810	KL B	0,1426	KL F	0,5726	KL D	0,3837
KL J	0,8415	KL J	0,0944	KL C	0,5493	KL J	0,3709
KL H	0,8134	KL E	0,0812	KL J	0,4717	KL F	0,3489
KL A	0,8010	KL I	0,0567	KL A	0,4314	KL E	0,1233
KL E	0,7610	KL C	0,0544	KL H	0,3586	KL I	0,1072
KL I	0,6395	KL H	-0,1850	KL E	0,0537	KL H	0,0791

Para a concordância por correlação intra-classes, de contagem de reticulócitos, foram consideradas todas as contagens, contagens baixas (<0,5%), médias (0,5-2,5%) e altas (>2,5%). N = 25 pacientes e 12 examinadores.

Apenas o examinador I apresentou discrepância maior (R= 0,64).

Com o fracionamento em contagem de reticulócitos (CR) baixos, médios e altos, o tamanho amostral ficou pequeno, comprometendo a análise de correlação. Entretanto, observa-se certa dificuldade na concordância para CR baixos para todos os examinadores e uma maior concordância numérica para CR médios do que para CR altos.

O perfil das observações das 25 lâminas feito pelos 12 observadores está ilustrado na Figura 5. Pode-se facilmente observar que o examinador I apresenta um perfil bastante destoante dos demais examinadores. Já os examinadores K, L e G apresentaram perfis quase idênticos.

As contagens de reticulócitos acima da média nas lâminas, 6, 8, 10, 11 e 15 foram detectadas como altos CR para quase todos exceto o examinador A que considerou a lâmina 8 normal e I que apresentou um perfil destoante. As contagens de reticulócitos abaixo da média nas lâminas 9, 14, 16 e 17 foram observadas para

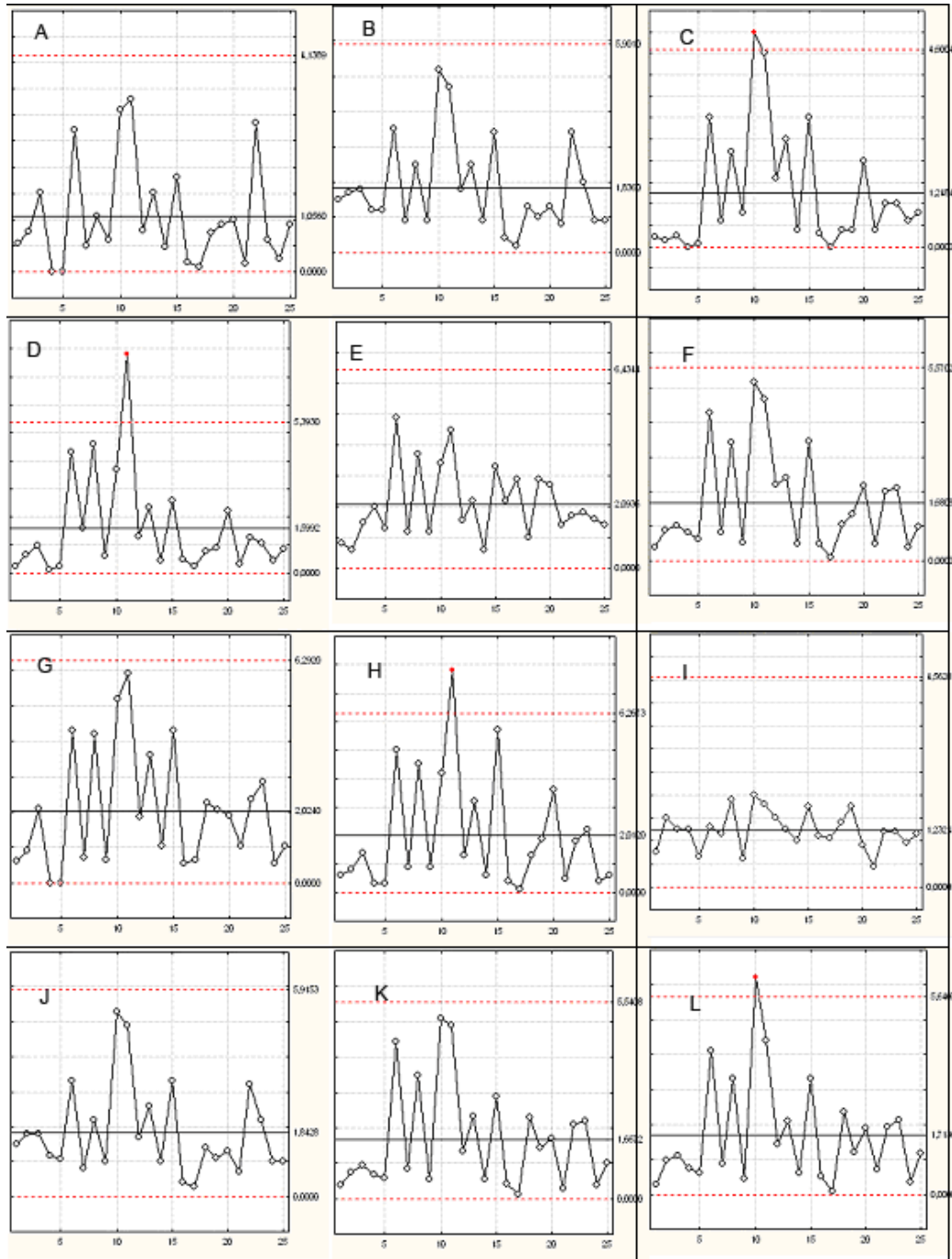
---

quase todos examinadores exceto o E que foi discordante em relação às lâminas 16 e 17 (resultados não mostrados).

Os resultados entre observadores podem também ser analisados na Figura 6, pelo gráfico de dispersão. Apesar de alguma discordância numérica ao rigor da análise estatística, observa-se que o perfil entre os examinadores é bastante semelhante, no que diz respeito à ocorrência de contagens altas, baixas e médias, exceto o examinador I. Esses resultados indicam uma tendência a baixos índices de erros diagnósticos, ou seja, não afetando o diagnóstico, uma vez que os valores de referências encontrados na maior parte das literaturas são amplos e podem diferir em relação ao sexo e idade dos pacientes. Em relação às contagens manuais de reticulócitos deve-se levar em consideração, que, para o diagnóstico em laboratório clínico, o limite de erro máximo entre observadores é de 20%. Portanto, o erro entre os observadores desta etapa da pesquisa foi elevado.

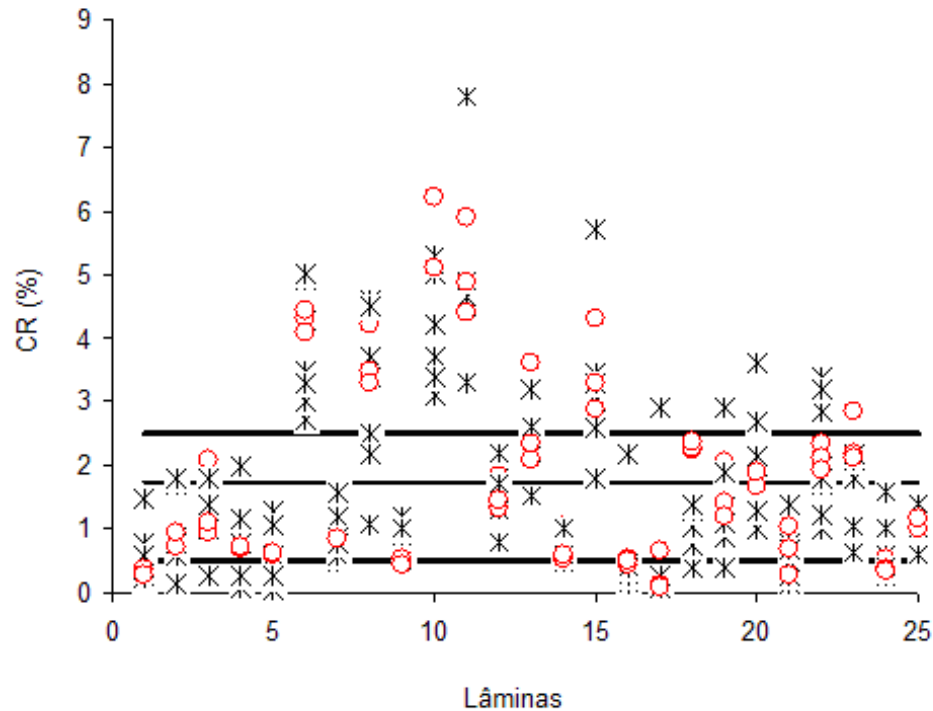
Os resultados do examinador I apresentaram variação maior que a esperada, fato este que poderia ser causado por diversos fatores analíticos, entre eles, não ter seguido os critérios preconizados para a contagem dos reticulócitos, ou mesmo não ter realizado as leituras nos prazos estabelecidos. Esse resultado pode ser relevante como alerta ao fato que as lâminas coradas não são permanentes, e que o prazo de leitura deve ser rigorosamente observado para se evitar um erro sistemático.

FIGURA 5. PERFIL DA AVALIAÇÃO DE 25 PREPARAÇÕES PARA A CONTAGEM DE RETICULÓCITOS (%) DOS 12 OBSERVADORES EM GRÁFICOS DE CONTROLE DE QUALIDADE



Gráficos de controle de qualidade para os 12 avaliadores (SHAININ e SHAININ, 1993)  
Eixo dos x – números das preparações; Eixo dos y – contagem de reticulócitos (%).

FIGURA 6. GRÁFICO DE DISPERSÃO PARA OS VALORES DE CONTAGENS DE RETICULÓCITOS (%) DE TODOS EXAMINADORES PARA TODAS AS LÂMINAS



○ - Examinadores K, L e G; \* - demais examinadores; linha grossa – Valores médios entre 0,5 e 2,5 % de CR; linha fina – Valor médio de todos os dados (1,7%). Os dados do examinador I não foram incluídos nesse gráfico. N = 25 pacientes e 11 examinadores.

Em termos de Controle de Qualidade, os resultados apresentaram discrepâncias, com alta variabilidade inter-observadores, o que era esperado, devido às diferenças na padronização dos critérios de identificação e número de células contadas para a determinação dos reticulócitos, conforme informado nas respostas do instrumento de avaliação, seguindo suas próprias padronizações e não as preconizadas por Lewis *et al.* (2006). Como os observadores convidados a participar do estudo realizaram as leituras das lâminas já preparadas, pode-se afirmar que os possíveis erros pré-analíticos de execução da amostra foram minimizados.

---

Desta forma, os fatores inerentes à variabilidade inter-observadores podem estar entre os mesmos já conhecidos e discutidos por outros autores, porém apenas aos analíticos. As amostras foram de população bem diversificada, resultando em contagens baixas, médias e altas de modo a ficarem bem distribuídas. O atraso das contagens, para os observadores que cometeram esta impropriedade foi considerado, uma vez que, a qualidade do material em lâminas preparadas sem fixação prévia, após alguns dias, diminui e resulta no desbotamento dos reticulócitos a ponto de desaparecerem na observação microscópica. Os observadores devem estar treinados e padronizados por que erros de reconhecimento de reticulócitos acontecem quando inclusões eritrocitárias em alterações patológicas em hematologia se coram com corantes supra-vitais, bem como, artefatos ou restos de corante. Entre as diversas inclusões eritrocitárias, os corpos de Heinz, potencialmente, podem levar a mais erros na contagem de reticulócitos, por serem evidenciados em azul claro. (McKENZIE, 1996; STIENE-MARTIN *et al.*, 1998; LEWIS *et al.*, 2006). A identificação de reticulócitos com poucos grânulos ou retículos e o número de células contadas são potenciais fatores de variabilidade. Observadores que não seguem os critérios podem deixar de contar os reticulócitos mais maduros e geralmente, contam apenas 1.000 células.

Peebles *et al.* (1981) encontraram um coeficiente de variação (CV) inter-observadores superior a 30% utilizando ANOVA. Estes autores relataram a variabilidade de distribuição da amostra na lâmina, variações de coloração, número limite de células contadas e diferenças na identificação morfológica pelos observadores como as causas de erro, bem como, a dificuldade de contagem daqueles reticulócitos que possuem poucos grânulos pelos observadores. Fernández (2007) descreve outros erros relacionados com a metodologia manual, como os artefatos de coloração, a variação da coloração dos reticulócitos devido ao tempo decorrido entre a preparação da lâmina e a contagem e mesmo, à fadiga do observador ao realizar a contagem, resultando em CV inter-observadores entre 15 e 20% para contagens elevadas de reticulócitos e aproximadamente 40% para contagens que estão dentro dos valores de referência biológicos. Segundo Davis (1994), a alta imprecisão da metodologia manual é de CV de 25 a 50% ou mais, e se deveria seguir as padronizações mundiais que sugerem o uso do disco ocular de Miller.

---

Riley *et al.* (2002) descreveram a preocupação dos comitês internacionais como o CAP, por exemplo, com a realização de estudos em 1971, 1972 e 1974 visando analisar o coeficiente de variação inter-observadores em técnicas manuais preparadas com 3 corantes diferentes, nos quais se obteve variações de 25 a 48%. Em outro estudo semelhante, feito pelo CAP em 1984 foi observado um CV de 26,2 a 32,4%. A partir daí, o CAP adotou as recomendações do NCCLS de se utilizar o disco de Miller, bem como, minimizar fontes de erros pré-analíticos, através da padronização da homogeneização da amostra, da coloração e da preparação das lâminas. Riley *et al.* (2002) também citam estudos em que a maior causa de imprecisão na contagem de reticulócitos é a identificação morfológica destas células e apontam outros, em que o CV ultrapassou 30% para cada observador, considerando que, especialmente os reticulócitos mais maduros ou grupo IV da classificação de Heilmeyer, que possuem apenas dois ou mais retículos e compreendem aproximadamente 60% dos reticulócitos da circulação, são as células mais dificilmente reconhecíveis. Os grupos I e II da classificação de reticulócitos normalmente não estão presentes na circulação e são chamados reticulócitos de transição.

## **5.2 ESTUDO DE COMPARAÇÃO ENTRE METODOLOGIA MANUAL E AUTOMATIZADA**

Foram realizados estudos para a comparação entre as metodologias manual e automatizada, utilizando-se amostras de sangue de 341 pacientes. A comparação de médias entre os resultados obtidos através das duas metodologias, realizada pela análise de variância (ANOVA), está apresentada nas Tabelas 7 e 8. Os valores obtidos demonstram que não houve diferenças entre ambas ( $p=0,21$ ).

TABELA 7. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA, MODELO INTEIRAMENTE CASUALISADO) PARA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE A METODOLOGIA MANUAL E AUTOMATIZADA PARA A CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

	SQ	GL	QM	F	P
Intercepto	30128,76	1	30128,76	1371,65	0,000
Tratamento	33,98	1	33,98	1,55	0,21
Erro	14936,45	680	21,97		

Metodologia manual segundo Lewis *et al.* (2006); Metodologia automatizada: Cell Dyn 3500 SL (*Abbott Diagnostics*); SQ - soma de quadrados; GL - grau de liberdade; QM - quadrado médio; F - teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade. N= 341 pacientes em duas repetições independentes.

Pode-se observar que ambos os métodos apresentaram desvios padrões (DP) bastante próximos, sendo de 4,6 e 4,7 para as contagens manual e automatizada, respectivamente, como pode ser observado na Tabela 8.

TABELA 8. CONTAGEM DE RETICULÓCITOS (%) PELOS MÉTODOS MANUAL E AUTOMATIZADO

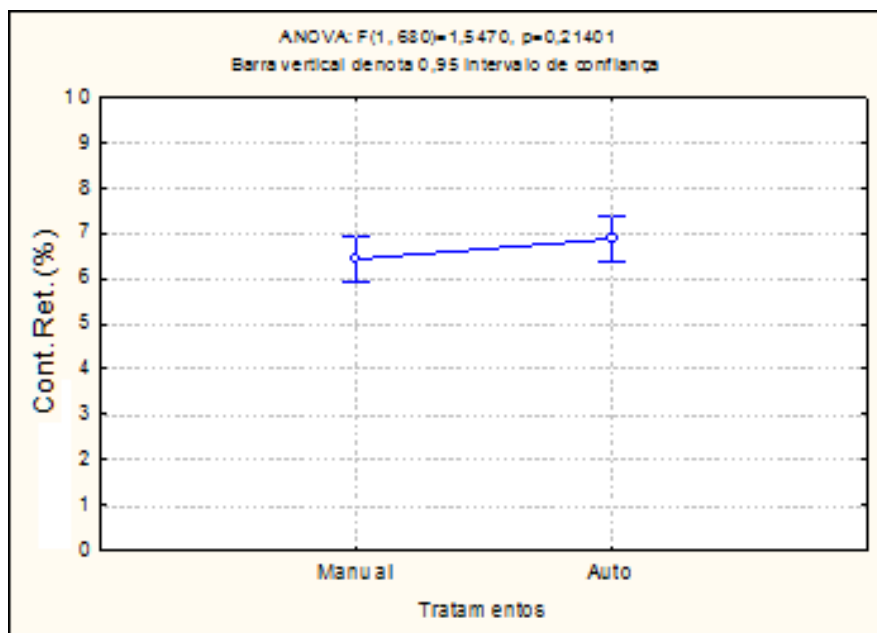
Métodos	N	Média	DP	EP	Lim. Confiança		Min	Máx
					-95%	+95%		
Total	682	6,65	4,69	0,18	6,29	7,00	0,40	21,10
Manual	341	6,42	4,62	0,25	5,93	6,92	0,40	18,60
Auto	341	6,87	4,75	0,26	6,36	7,38	0,82	21,10

Metodologia manual segundo Lewis *et al.* (2006); Metodologia automatizada: Cell Dyn 3500 SL (*Abbott Diagnostics*); N – número de amostras; DP – desvio padrão; EP – erro padrão da média; Min menor valor; Máx – maior valor. N= 341 pacientes em duas repetições independentes.

Pode-se verificar, pelos dados da Tabela 8, que a medida da amplitude dos valores de reticulócitos da amostragem analisada, pelo coeficiente de variação de Pearson (CV) é de 70% (0,4 a 21,1% reticulócitos). Essa variabilidade ilustra que a amostra era constituída de uma ampla faixa de valores de reticulócitos.

A Figura 7 ilustra a comparação de médias entre os métodos manual e automatizado. Os valores de tendência central e de dispersão, que ilustram a amplitude de valores da amostra, foram muito próximos para a metodologia manual e para a metodologia automatizada.

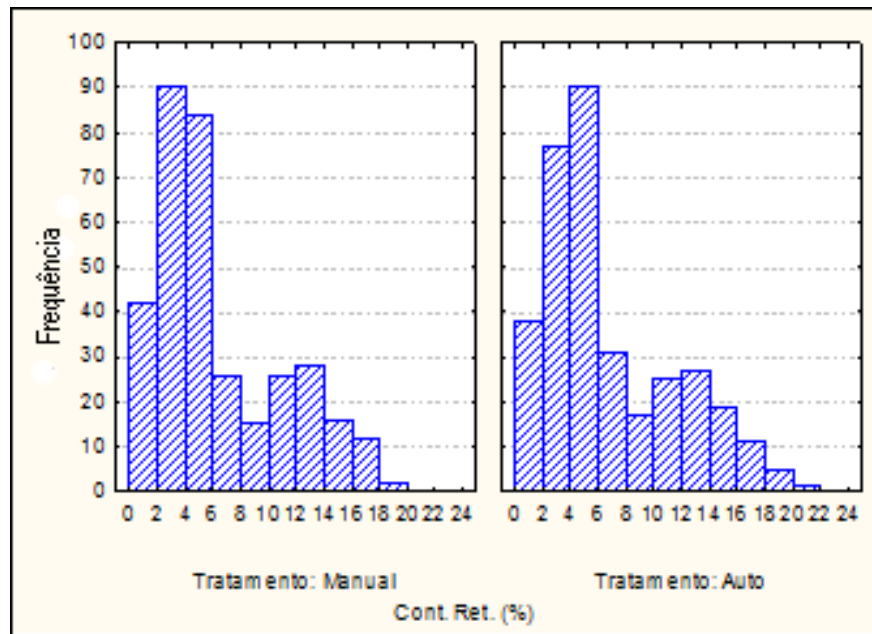
FIGURA 7. GRÁFICO DAS MÉDIAS DAS CONTAGENS DE RETICULÓCITOS (%) ENTRE METODOLOGIA MANUAL E AUTOMATIZADA



Metodologia manual segundo Lewis *et al.* (2006); Metodologia automatizada: Cell Dyn 3500 SL (*Abbott Diagnostics*); Os pontos representam os valores médios e a barra de erro representa 95% dos limites de confiança. F – teste de variâncias para comparações de médias; p – probabilidade para a hipótese de nulidade; Auto – método automatizado; N= 341 pacientes em duas repetições independentes.

A Figura 8 ilustra o histograma de frequência de dados para as metodologias manual e automatizada. Observa-se que o perfil de distribuição de frequência dos dados de ambos é muito semelhante, e que existem duas populações diferentes, uma com média entre 2 e 6%, e outra com média entre 10 e 14%.

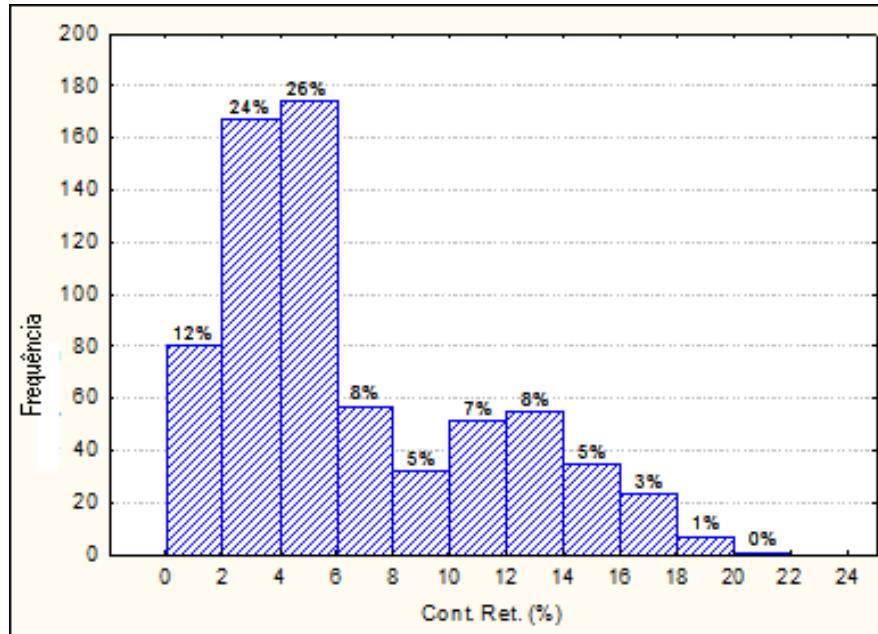
FIGURA 8. HISTOGRAMA DE FREQUÊNCIA DOS DADOS OBTIDOS PELO MÉTODO MANUAL E AUTOMATIZADO PARA A CONTAGEM DE RETICULÓCITOS(%)



Metodologia manual segundo Lewis et al. (2006); Metodologia automatizada: Cell Dyn 3500 SL (Abbott Diagnostics); Cont. Ret. (%) – Contagem de reticulócitos (%). N – 341 pacientes em duas repetições independentes.

A existência de grupos fica facilmente compreendida através do histograma de frequência com todos os dados, conforme a Figura 9, onde fica evidente a existência de duas modas, com 5 e 13% de reticulócitos.

FIGURA 9. HISTOGRAMA DE FREQUÊNCIA COM TODOS OS RESULTADOS OBTIDOS PELAS CONTAGENS DE RETICULÓCITOS (%)

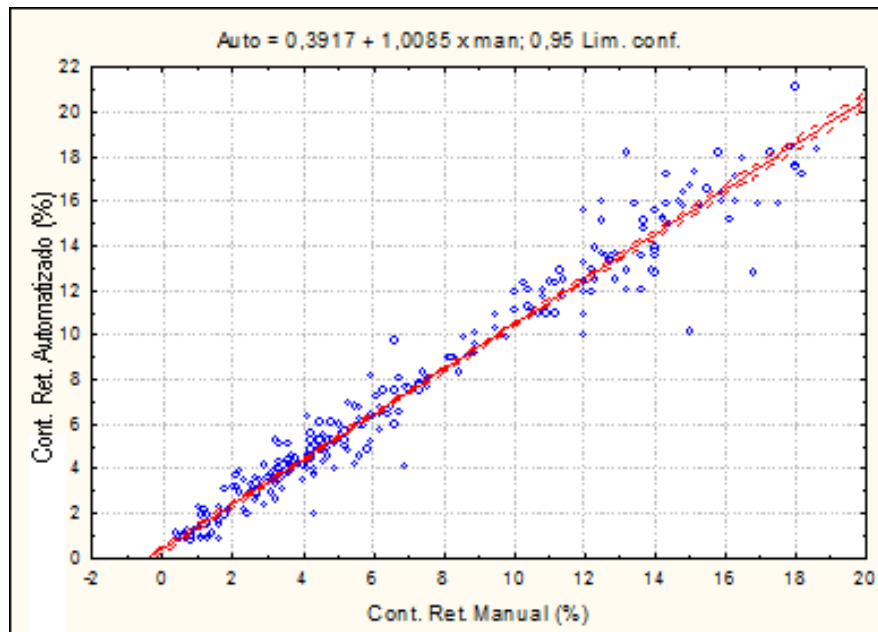


Metodologia manual segundo Lewis *et al.* (2006); Metodologia automatizada: Cell Dyn 3500 SL (*Abbott Diagnostics*); Cont. Ret. (%) – Contagem de reticulócitos; N – 341 pacientes em duas determinações independentes.

As amostras para o estudo apresentaram praticamente 2 populações distintas: 65,4% de recém-natos (RN) e 34,6% de crianças e adultos, o que explica a maioria dos resultados muito altos para as determinações. Riley *et al.* (2002) relata que os efeitos da idade e outras variações fisiológicas devem ser considerados nas contagens de reticulócitos.

Na Figura 10, o gráfico de dispersão denota todos os resultados percentuais obtidos de reticulócitos para a comparação entre as metodologias manual e automatizada. Calcula-se, pela regressão obtida, um erro sistemático constante de 0,4% para mais, em média, nas determinações em automação em relação às contagens manuais. O erro casual ( $1-R^2$ ) foi de 3,9%.

FIGURA 10. GRÁFICO DE DISPERSÃO DE COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS DA METODOLOGIA MANUAL E AUTOMATIZADA PARA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS (%)



Metodologia manual segundo Lewis *et al.* (2006); Metodologia automatizada: Cell Dyn 3500 SL (*Abbott Diagnostics*); Cont. Ret. (%) – Contagem de reticulócitos (%). N – 682; R = 0,980; R<sup>2</sup> = 0,961; Linha sólida – regressão linear estimada (Auto = 0,3917 + 1,0085 x Manual); linhas pontilhadas – 95% de limite de confiança para os resíduos. N = 341 pacientes em duas repetições independentes.

A metodologia automatizada exigiu cuidados com a realização da técnica por dificuldades que refletiram em variações maiores de resultados nos testes preliminares; por exemplo, ao agitar a amostra no frasco de reagente de modo a evitar a formação de bolhas, ao incubar a suspensão de amostra-corante-diluyente em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Tais informações não são relatadas de forma criteriosa no manual do fabricante. Assim, para este trabalho, a reação ocorreu após 15 min e a determinação foi realizada dentro de 2 h no equipamento, que levou aproximadamente 1 min para cada leitura e o grande número de amostras foi processado em séries para não exceder o tempo limite padronizado para as

---

determinações e evitar erros, mesmo que a suspensão apresentasse estabilidade conforme informa o fabricante.

No estudo de comparação, a variação entre as metodologias foi muito baixa, o que mais uma vez confirma que, se forem seguidos critérios de execução, identificação e avaliação de reticulócitos em um maior número de células contadas em campos adequados na microscopia da metodologia manual; bem como, critérios de execução e emprego tanto de calibração em equipamentos, quanto o uso de controle comercial na metodologia automatizada, refletem em resultados de contagens de reticulócitos mais precisos e confiáveis para o diagnóstico e monitoramento de terapias de pacientes com doenças hematológicas, promovendo qualidade ao laboratório clínico.

Davis *et al.*(1994) defende a grande precisão analítica de contadores eletrônicos pela análise rápida de 20.000 a 50.000 eritrócitos na amostra e a exclusão da subjetividade de reconhecimento do reticulócito pelos observadores da técnica manual e que a padronizações dos comitês, como por exemplo, o NCCLS devem ser seguidas.

Riley *et al.* (2002) apontaram, em seus estudos, os primeiros relatos da utilização clínica da contagem de reticulócitos por citometria de fluxo (EPICS C) através de fluorescência em comparação com a metodologia manual, que resultou em uma correlação excelente ( $R=0,984$ ). No entanto, os CV obtidos foram de 1,3% a 6,4% entre métodos, para a mesma amostra. Com a metodologia manual, estes autores encontraram CV de 17,1% para contagens de reticulócitos acentuadamente elevadas, e de 47,3% para contagens normais.

Alguns estudos de comparação entre a metodologia manual e a automatização para contagem de reticulócitos, realizados com diversos equipamentos, resultaram em: coeficientes de determinação ( $R^2$ ) com variações entre 0,902 a 0,967 para o reticONE (COULTER) por Rabesandratana *et al.* (1998);  $R^2 = 0,9916$  para o XE-2100 (SYSMEX) por Briggs *et al.* (1999); CV – 6,5-24,1%, CV – 3,5-18,1%, CV – 5,1-15,1%, CV – 4,3-15,0% e CV – 6,9-18,9% para o ADVIA 120, o CELL DYN 4000 (ABBOTT), o GEN-S (COULTER), o SE 9500 RET e o VEGA RETIC, respectivamente, por Buttarello *et al.* (2001); e  $R^2 = 0,774$  e CV – 0,8-4,4% para o GEN-S (COULTER) por Fernández *et al.* (2007). Portanto, há boa correlação entre metodologia manual e automatizada. Estes autores observaram também, que

---

o coeficiente de variação para todos os métodos é menor quando o número de reticulócitos está aumentado nas contagens e que, em situações de reticulocitopenia, o CV é no mínimo de 11% e com certeza, apresentam os maiores índices de discrepância entre as análises.

Em contrapartida, Nascimento e da Silva (1999) avaliaram 724 amostras com resultados de leituras microscópicas de reticulócitos entre 0,5 e 1,5%, considerados normais. No entanto, por metodologia automatizada, 11,2% dos pacientes apresentaram reticulocitopenia.

Tabata *et al.* (1997), estudando contagens de reticulócitos em laboratório de animais com ratos, cachorros e macacos, relacionaram a metodologia manual e automatizada (Sysmex R-3000) e encontraram entre as 3 espécies, CV de 9,7-20,5% para as contagens manuais e CV de 4,4-9,4% para a automatização. A citometria de fluxo vem sendo cada vez mais empregada em estudos animais.

### 5.3 ESTUDO DE COMPARAÇÃO ENTRE CORANTES DA METODOLOGIA AUTOMATIZADA

Para o estudo de uma adaptação da metodologia automatizada empregando-se um corante alternativo ao comercial, foram necessários vários testes até se obter resultados aproximados aos das contagens relativas de reticulócitos aos encontrados com o diluente-corante comercial fornecido pelo fabricante e que, portanto, pudessem ser confiáveis. A concentração exata de corante azul de metileno novo no reagente para reticulócitos Abbott é incerta.

Inicialmente, utilizou-se os dois corantes empregados na técnica manual, o azul de cresil brilhante e o azul de metileno novo, isoladamente, sem a presença de conservantes ou aditivos para as determinações da contagem automatizada de reticulócitos, com as mesmas diluições e com volume constante de amostra, conforme preconiza a técnica do fabricante. Nesta situação, não houve leituras de reticulócitos pelo equipamento, provavelmente, devido à alta concentração do corante para os retículos. Em seguida, testou-se diluições 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 e 1:100 do azul de cresil brilhante e azul de metileno novo. Avaliando-se os resultados sempre em comparação aos encontrados com o corante comercial do equipamento.

Os resultados obtidos com o corante azul de cresil brilhante em todas as diluições, embora reprodutíveis, foram discrepantes em relação aos do diluente-corante do aparelho, tendo-se excluído o mesmo das próximas análises. O mesmo ocorreu com os resultados obtidos com o azul de metileno novo, quando se empregou as diluições 1:1, 1:80 e 1:100.

Assim, realizou-se novos testes com o corante azul de metileno novo com as diluições 1:10, 1:20 e 1:40, com o objetivo de selecionar a melhor diluição, de forma criteriosa. Testou-se a contagem de reticulócitos (%) em 10 repetições seriadas de 10 amostras com a finalidade de analisar a precisão dos resultados. Os melhores valores das contagens de reticulócitos para a metodologia automatizada foram obtidos com a diluição 1:10 (resultados não mostrados).

Uma vez eleito o azul de metileno novo 1:10 para a utilização na contagem automatizada, realizou-se um estudo sistemático para comparação de médias com o uso do corante comercial e azul de metileno novo 1:10, com maior número de amostras (Tabela 9). A análise de variância mostrou que não foi observada diferença entre as médias obtidas nas determinações com o corante comercial e com azul de metileno novo 1:10 ( $p=0,9$ ) e entre as repetições ( $p=0,63$ ). O intercepto foi menor que 0,05, indicando que existe certo grau de erro sistemático entre os dois métodos.

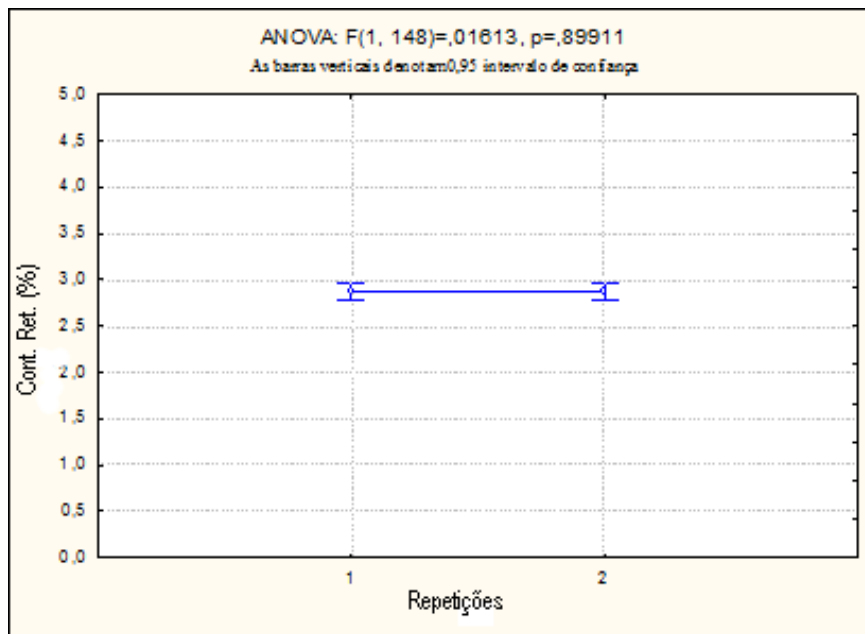
TABELA 9. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA, MODELO FATORIAL) PARA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS ENTRE O USO DO CORANTE COMERCIAL E AZUL DE METILENO NOVO 1:10

F. variação	SQ	GL	QM	F	p
Intercepto	1659,28	1	1659,28	7770,44	0,000
Pacientes	357,50	49	357,50	34,17	0,000
Corantes	0,003	1	0,003	0,02	0,90
Repetição	0,052	1	0,052	0,24	0,62
Resíduo	31,60	148	0,21		

Metodologia automatizada: Cell Dyn 3500 SL (*Abbott Diagnostics*); SQ - soma de quadrados; GL - grau de liberdade; QM - quadrado médio; F - teste de variâncias; p - probabilidade para a hipótese de nulidade; N = 50 pacientes com dois corantes e em duas repetições independentes.

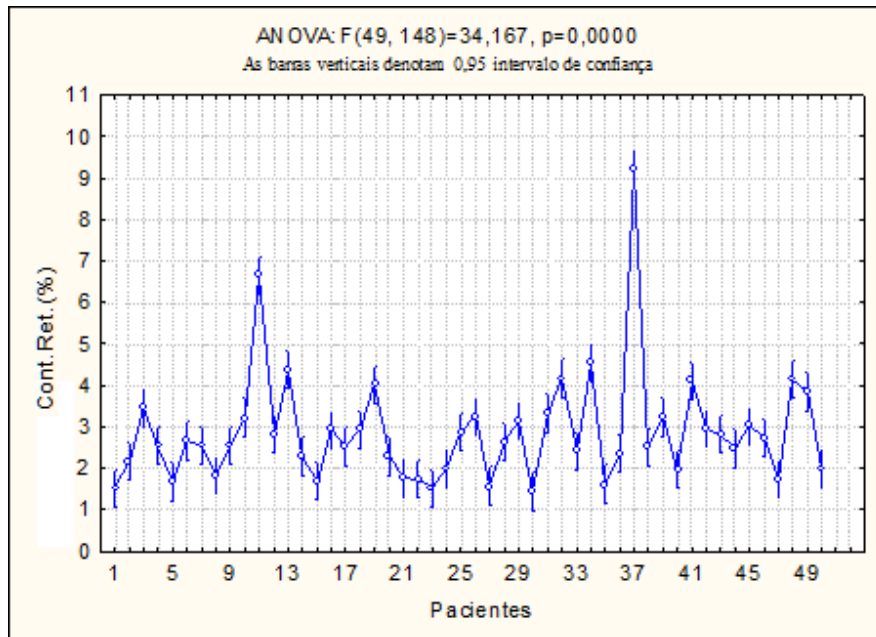
A partir dos resultados de comparações de médias e dispersão, pode-se inferir que: i) não houve diferença entre as repetições, indicando precisão nas medidas. O gráfico de média das repetições está ilustrado na Figura 11; ii) houve diferenças entre os resultados obtidos, indicando que a amostra era heterogênea. O gráfico de dispersão da contagem de reticulócitos da Figura 12 confirma que a amostra é heterogênea. Os valores das contagens variaram de 1,5 a 9%; iii) as médias obtidas com os corantes são semelhantes. O gráfico de médias das contagens está ilustrado na Figura 13.

FIGURA 11. GRÁFICO DA ANÁLISE DE REPETIÇÕES DOS DADOS OBTIDOS PELA CONTAGEM DE RÉTICULÓCITOS (%) COM O CORANTE AZUL DE METILENO NOVO 1:10 EM 50 AMOSTRAS



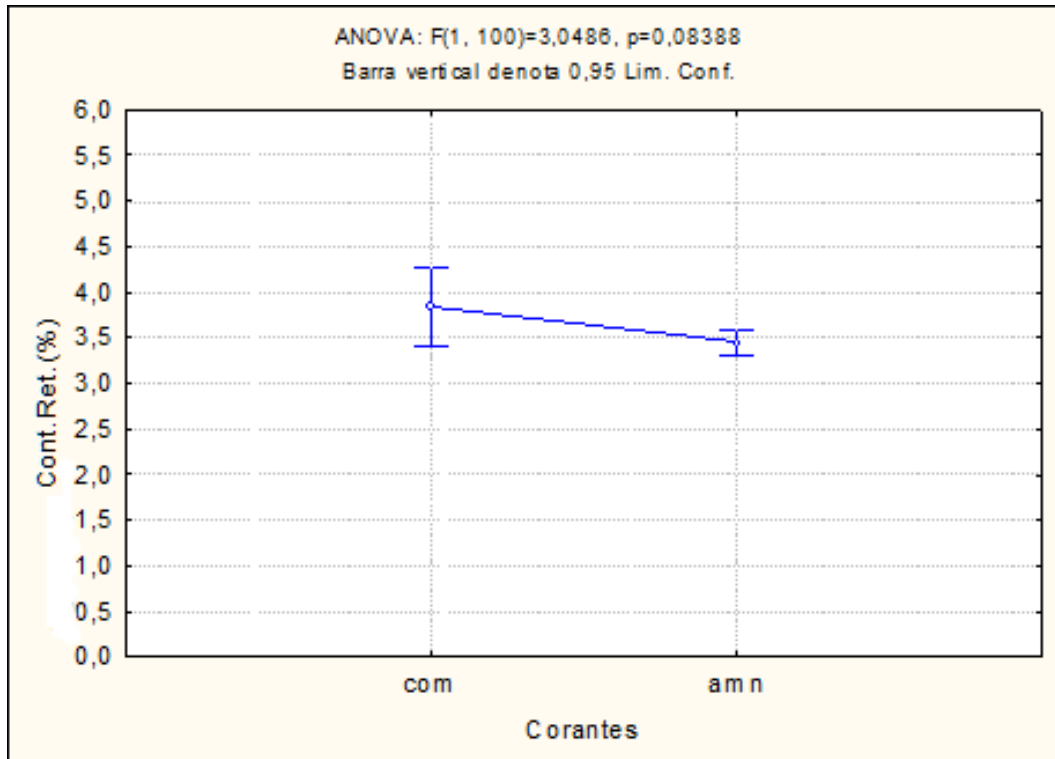
Metodologia automatizada: Cell Dyn 3500 SL (*Abbott Diagnostics*); rep - Repetições das determinações de reticulócitos; as barras de erros indicam 95% de limite de confiança dos dados. N= 50 pacientes com dois corantes em duas repetições independentes.

FIGURA 12. GRÁFICO DA DISPERSÃO DA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS DE AMOSTRAS DE PACIENTES COM O USO DOS CORANTES COMERCIAL E AZUL DE METILENO NOVO NA DILUIÇÃO 1:10



Metodologia automatizada: Cell Dyn 3500 SL (*Abbott Diagnostics*); Cont. Ret. – contagem de reticulócitos; as barras de erros indicam 95% de limite de confiança dos dados. N = 50 pacientes com dois corantes em duas repetições independentes.

FIGURA 13. GRÁFICO DAS MÉDIAS DA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS DOS PACIENTES COM O USO DO CORANTE COMERCIAL E AZUL DE METILENO NOVO NA DILUIÇÃO 1:10

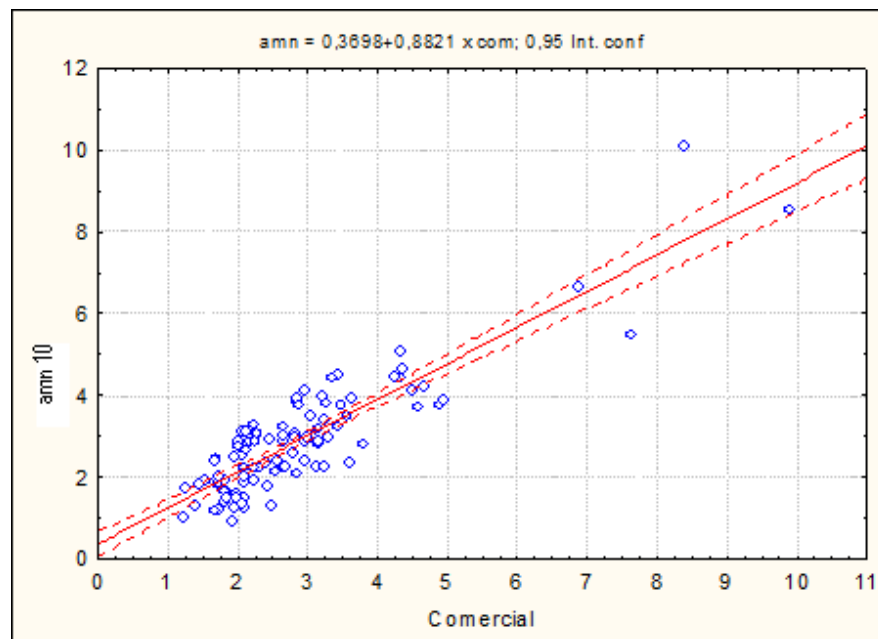


Metodologia automatizada: Cell Dyn 3500 SL (*Abbott Diagnostics*); Cont. Ret. – contagem de reticulócitos (%); com - corante comercial; amn - corante azul de metileno novo preparado na diluição 1:10; as barras de erros indicam 95% de limite de confiança dos dados. N = 50 pacientes com dois corantes em duas repetições independentes.

O gráfico de dispersão ilustrado na Figura 14 mostra todos os resultados obtidos de reticulócitos em porcentagem de todas as amostras para a comparação entre os dois tipos de corantes. Calcula-se, pela reta de regressão obtida, um erro sistemático constante com valores aproximadamente 0,4% maiores para as determinações com o corante azul de metileno novo (1:10) em relação ao comercial. O erro casual ( $1 - R^2$ ) é de 19%. Observando-se a distribuição de dados, fica claro que há uma correlação entre os dois métodos. O erro de precisão não está muito além do erro apresentado pela metodologia ( $\pm 15\%$ ).

Podemos concluir que a adaptação de um corante preparado de forma alternativa ao comercial, o azul de metileno novo 1 g/dl na diluição 1:10, substitui o corante comercial apresentando resultados estatisticamente idênticos, ( $R= 0,9$ ;  $p=0,0000$ ). Conseqüentemente, se calcularmos a concentração do corante alternativo, o resultado será 0,1 g/dl, o que pode ser comparada com a concentração relatada na fórmula do fabricante do equipamento, que é inferior a 0,2% ou 0,2 g/dl.

FIGURA 14. CORRELAÇÃO PARA AS CONTAGENS DE RETICULÓCITOS (%) EM ANÁLISE DE COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS OBTIDOS COM O CORANTE COMERCIAL E O AZUL DE METILENO NOVO 1:10



Metodologia automatizada: Cell Dyn 3500 SL (*Abbott Diagnostics*); Linha Sólida – regressão linear estimada ( $amn = 0,3698 + 0,8821 \times com$ ); linhas pontilhadas – 95% de limite de confiança para os resíduos. N = 50 pacientes com dois corantes e em duas repetições independentes.

O desenvolvimento de técnicas com corantes supra-vitais estão sempre em estudo. Sugihara et al. (2000) desenvolveram um procedimento de preparação em

---

colorações, utilizando a associação de azul de metileno novo e laranja de acridina para aumentar o tempo de preservação de reticulócitos nas preparações. O teste comparou as contagens de reticulócitos de ratos com o emprego de azul de metileno novo, laranja de acridina e a associação de ambos os corantes obtida através dos seguintes passos: a) a amostra foi tratada com 0,5% de azul de metileno novo; b) misturada com metanol por 10 min para fixação e remoção do azul de metileno novo e após a secagem; c) coloração com 0,007% de laranja de acridina por 3 min, seguida de lavagem com tampão Sørensen (pH 6,8). A frequência de reticulócitos não foi afetada durante 95 dias.

Foi observado que, durante o processo de lavagem dos tubos contendo as suspensões de corante e amostra utilizados para a determinação das contagens de reticulócitos em automatização, para aqueles que continham o azul de metileno novo, o processo de remoção com água e detergente foi fácil e mais rápido, enquanto para aqueles que continham o azul de cresil brilhante, o processo foi mais demorado, e visivelmente, apresentou um depósito (precipitado) mais resistente no fundo do tubo, considerando-se, inicialmente, para o uso no equipamento, os corantes foram filtrados várias vezes antes das determinações. Provavelmente, a maior dificuldade de empregar o azul de cresil brilhante na metodologia automatizada é a sua propriedade de solubilidade que exige maiores cuidados e novos estudos, principalmente, para prevenir a formação de crostras do corante em tubulações dos equipamentos e evitar entupimentos, uma vez que a força de ligação com os restos de RNA parece ligeiramente maior que com o azul de metileno novo.

Sabendo-se que os reagentes para a contagem de reticulócitos são importados, em relação ao custo entre os corantes azul de metileno novo comercial (*Abbott Diagnostics*) e azul de metileno novo preparado (INC. BIOMEDICALS INC.) utilizados no estudo de comparação de metodologia automatizada, a diferença foi de 87%. Um levantamento de preços foi realizado e, observou-se que, uma única determinação com o reagente comercial custa em média, R\$ 9,50, enquanto, com o corante preparado na diluição que corresponde aos mesmos resultados, US\$ 0,53 (R\$ 1,22), para o corante a 70% ou de US\$ 0,11 (R\$ 0,25), para o corante a 90%, deve-se considerar a cotação atual das moedas citadas.

A contagem de reticulócitos é, sem dúvida, um exame de grande importância na rotina laboratorial para o acompanhamento de muitas condições clínicas. O fato de que os laboratórios trabalham com metodologias diversas exige um controle de qualidade rigoroso no sentido de se estudar os resultados obtidos e, especialmente, a padronização das metodologias empregadas, para se diminuir as variações inter-laboratórios e, assim, permitir a valorização das interpretações clínicas possíveis.

Neste trabalho, contribuiu-se com o estudo do erro na contagem de reticulócitos, especialmente em relação à sua contagem manual, e com a proposta de uma alternativa mais acessível à maioria dos laboratórios clínicos para a contagem automatizada.

É relevante a continuidade dos estudos relativos à padronização e ao controle de qualidade da contagem de reticulócitos, especialmente no que se refere ao controle de qualidade externo, com comparações inter-laboratórios, envolvendo contagens manuais e automatizadas, inclusive entre aparelhos eletrônicos de diversas marcas e modelos. Novos estudos devem contemplar maior número de amostras com valores abaixo do normal, que são os mais críticos do ponto de vista clínico, e que, evidentemente, podem levar a maiores coeficientes de variação ou mesmo, o preparo do corante azul de metileno novo 1 g/dl na diluição 1:10 com outras soluções, como o oxalato de potássio por exemplo, visando aumentar a estabilidade da suspensão.

## **6 CONCLUSÕES**

---

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em estudos realizados com a metodologia manual e automatizada (ABBOTT Cell Dyn 3500 SL) para a contagem dos reticulócitos, em amostras de sangue venoso do Laboratório Pontagrossense de Análises Clínicas, Ponta Grossa – PR e do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, permitem concluir que:

- Houve variações entre 12 observadores na contagem manual de 25 preparações, com erro casual ( $1-R^2$ ) de 4 a 60%, com perfil geral similar entre os observadores, e sem diferenças intra-classes para valores considerados baixos, médios e altos;
- Na comparação entre metodologias manual e automatizada, com amostras de 341 pacientes, a análise de variância (ANOVA) dos resultados não demonstrou diferenças entre as médias obtidas com as duas metodologias ( $p = 0,21$ ), com valores de tendência central e dispersão muito próximos.
- No emprego de azul de metileno novo 1g/dl diluído 1:10 em NaCl 0,85 g/dl como corante-diluyente alternativo, em comparação ao fornecido pelo fabricante do aparelho, para contagem automatizada, a análise de variância não mostrou diferenças entre as médias obtidas ( $p = 0,9$ ) e entre as repetições ( $p = 0,63$ ), porém houve um erro sistemático, com valores 0,4% maiores para as determinações com o corante-diluyente alternativo, bem como um erro casual ( $1- R^2$ ) de 19%, dentro do erro apresentado pela metodologia.

Desta forma, conclui-se que: no estudo inter-observadores, o coeficiente de correlação inter-observadores indicou resultados clinicamente úteis; a comparação entre as metodologias manual e automatizada indicou precisão entre os dados obtidos; e o corante-diluyente alternativo apresentado pode substituir o corante-diluyente comercial, por apresentar resultados estatisticamente idênticos.

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAIN, B. J. **Células Sanguíneas: um guia prático**. 2. ed., Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

BANFI, G.; MAURI, C.; MORELLI, B.; DI GAETANO, N.; MALGERI, U.; MELEGATI, G. Reticulocyte count, mean reticulocyte volume, immature reticulocyte fraction, and mean sphered cell volume in elite athletes: reference values and comparison with the general population. **Clinical Chemical Laboratory Medicine**, Berlin, v. 44, n. 5, p. 616-622, 2006.

BANFI, G.; MORELLI, P. Relation between values of haemoglobin, erythrocytes and reticulocytes and body mass index in elite athletes of different sports disciplines. **International Journal of Laboratory Hematology**, England, v. 29, n. 6, p. 484-485, 2008.

BARBONE, A. G.; APARICIO, B.; ANDERSON, D. W.; NATARAJAN, J.; RITCHIE, D. M. Reticulocyte measurements as a bioassay for erythropoietin. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, England, v. 12, n. 4, p. 515-522, 1994.

BARTKO, J. J. Conectiv mote to: the intraclass correlation as a measure of reliability. **Psychological Reports**, n. 34, p. 418, 1974.

BICK, R.L. **Hematology: Clinical and Laboratory Practice**. St. Louis: Mosby, 1993.

BRIGGS, C.; HARRISON, P.; GRANT, D.; STAVES, J.; CHAVADA, N.; MACHIN, S. J. Performance Evaluation of the Sysmex XE-2100™, Automated Haematology Analyser. **Sysmex Journal International**, USA, v. 9, n. 2, 1999.

BRUGNARA, C.; ZELMANOVIC, D.; SORETTE, M.; BALLAS, S. K.; PLATT, O. Reticulocyte Hemoglobin: An Integrated Parameter for Evaluation of Erythropoietic Activity. **American Journal Clinical Pathology**, USA, vol. 108, p: 133-142, 1997.

BRUGNARA, C.; ZURAKOWSKI, D.; Di CANZIO, J.; BOYD, T.; PLATT, O. Reticulocyte Hemoglobin Content to diagnose Iron Deficiency in Children. **JAMA**, USA, v. 281, n. 23, p. 2225-2230, 1999.

BUTTARELLO, M.; BULIAN, P.; FARINA, G.; TEMPORIM, V.; TOFFOLO, L.; TRABUIO, E.; RIZZOTTI, P. Flow Cytometric Reticulocyte Counting Parallel Evaluation of Five Fully Automated Analyzers: An NCCLS/ICSH Approach. **American Journal Clinical Pathology**, USA, v. 115, p. 100-111, 2001.

BUTTARELLO, M.; BULIAN, P.; FARINA, G.; PETRIS, M. G.; TEMPORIN, V.; TOFFOLO, L. Five Fully Automated Methods For Performing Immature Reticulocyte Fraction – Comparison in Diagnosis of Bone Marrow Aplasia. **American Journal Clinical Pathology**, USA, v.117, p. 871-879, 2002.

---

CANÇADO, R. D. Mieloma Múltiplo e anemia, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro v. 29, n. 1, p. 67-76, 2007.

CROMER, D.; EVANS, K. J; SCHOFIELD, L.; DAVENPORT, M. P. Preferential invasion of reticulocytes during late-stage *Plasmodium berghei* infection accounts for reduced circulating reticulocyte levels. **International Journal for Parasitology**, England, v.36, p.1389-1397, 2006.

DACIE, S. J. V.; LEWIS, S. M. **Hematología Práctica**. 3. ed., Barcelona: Ediciones Toray, 1965.

DACIE, S. J. V.; LEWIS, S. M. **Practical Haematology**. 8. ed., New York: Churchill Livingstone, 1995.

DAVIS, B. H. Immature reticulocyte fraction (IRF): by any name, a useful clinical parameter of erythropoietic activity. **Laboratory Hematology**, USA, v. 2, p: 2-8, 1996.

DICQ. Departamento de Inspeção e Credenciamento da qualidade da SBAC. Disponível em<<http://www.pncq.org.br/>> Acesso em 16 setembro de 2008.

DIMOPOULOU, H. A.; THEODORIDIS, T.; GALEA, V.; CHRISTOPOULOU-COKKINO, M.; SPYRIDAKI, H. E.; GEORGAKOPOULOS, C. G. ISO/IEC 17025 Sysmex R-500 Hematology Reticulocyte Analyser Validation. **Laboratory Hematology**, USA, v. 13, n. 2, p. 43-48, 2007.

D'ONOFRIO, G.; CHIRILLO, R.; ZINI, G.; CAENARO, G.; TOMMASI, M.; MICCIULLI, G. Simultaneous Measurement of Reticulocyte and Red Blood Cell Indices in Healthy Subjects and Patients With Microcytic and Macrocytic Anemia. **Blood**, USA, v. 85, n. 3, p: 818-823, 1995.

ENGLAND JM, ROWAN RM, VAN ASSENDELFT OW, BULL BS, COULTER WH, FUJIMOTO K, GRONER W, VAN HOVE L, JONES AR, KANTER RJ, KLEE G, KOEPKE JA, LEWIS SM, D'ONOFRIO G, TATSUMI N, MCLAREN CE. Guidelines for organization and management of external quality assessment using proficiency testing. Expert panel on cytometry of the International Council for Standardization in Haematology. **International Journal of Hematology**, USA, v. 68, n.1, p. 45-52, 1998.

ERVASTI, M.; MARTINLAURI, I.; PUNNONEN, K. Quantitative flow cytometric analysis of transferrin receptor expression on reticulocytes. **Clinica Chimica Acta**, Netherland, v. 383, p. 153-157, 2007.

FELICIANO, A.; COSTA, A.; MELO, M.J. Anemia no doente oncológico. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, Portugal, v. 9, n. 2, p. 117-128, 2003.

FERNANDÉZ, L. H. GALLARDO, A.; GARCIA, G. Evaluación del recuento de reticulocitos por el sistema Coulter GEN-S. **Academia Biomédica Digital**, Facultad de Medicina – Universidade Central da Venezuela, nº 30, Enero-Marzo: 2007.

---

FIGUEIRÓ, T. R.; SOARES, A.; GUIMARÃES, L.; RODRIGUES, M. BITTAR, C.; SUSIN, A. Detecção automática de reticulócitos por processamento digital de imagens. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 26, supl. 1, p. 1-267, 2006.

HAUSER, Aline Borsato; PROCHASKA, Caroline Luise; NASCIMENTO, Aguinaldo Jose Do; LEONART, Maria Sueli S. Análise de amostras preservadas para controle de qualidade em hematologia em laboratórios de análises clínicas de Curitiba e Região Metropolitana, PR. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 3, p. 123-126, 2003.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J.W. **Química Clínica: Bases e Técnicas**. 2 ed. Barcelona: Jims, 1980.

HOXTER, G. Aula proferida no Programa de Pós-graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas, USP, 1986.

HOWANITZ, P.J.; TETRAULT, G.A.; STEINDEL, S.J. Clinical laboratory quality control: a costly process now out of control. **Clinica Chimica Acta**, Netherland, v.260, p.163-174, 1997.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - **INMETRO**. Avaliação da Conformidade, Comitês e Educação para Qualidade. Disponível em <<http://www.inmetro.gov.br/>> Acesso em 15 de setembro de 2008.

KIM, M. H. Clinical Significance of Reticulocyte Maturation Parameters in the Differential Diagnosis of Macrocytic Anemias. **The Korean Journal of Laboratory Medicine**, Korea (South), v. 27, n. 1, p. 13, 2007.

LEE, G. R. et al. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10. ed. Baltimore: Lippincott William's & Wilkins, 1999.

LEWIS, S. M.; BAIN, B.; BATES, I. **Hematologia Prática**. 9. ed. São Paulo: Artmed, 2006.

McKENZIE, S. B. **Textbook of Hematology**. 2. Ed. Baltimore: William's & Wilkins, 1996.

MINICH, W. B.; EVDOKIMOVA, V. M.; OLEINIKOV, A. V.; HÖHNE, M.; THIELE, B. J.; RAPOPORT, S. M. Evidence for the appearance of a reticulocyte population low in lipoxigenase mRNA during the recovery from a phenylhydrazine-induced anemia in rabbits. **Federation of European Biochemical Societies**, Moscow, v. 245, n. 1-2, p. 127-130, 1989.

MOLINA, F. R. et al. Reticulocyte Maturation Parameters Are Reliable Early Predictors of Hematopoietic Engraftment after Allogeneic Stem Cell Transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, USA, v. 3, p. 172-182, 2007.

---

NARAYANAN, S. The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. **American Journal of Clinical Pathology** Philadelphia, v.114, n.5, p.820-821, 2000.

NASCIMENTO, M. L. P.; da SILVA, L. L. Reticulocitopenias: antes e depois da Automação. **NewsLab**, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 158-168, 2002.

NASCIMENTO, M. L. P. Importância do Volume Reticulocitário Médio para a Evidência da Macrocitose. **NewsLab**, São Paulo, v. 66, p. 130-145, 2004.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS/ INTERNATIONAL COMMITTEE FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY: **Methods for reticulocyte counting (Flow Citometry and Supravital Dyes). Approved guideline**. NCCLS document H44-A. Villanova, PA: NCCLS, 1997.

NORONHA, J. F. A.; GROTTTO, H. Z. W. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in patients with iron deficiency anemia and  $\beta$ -thalassemia minor. **Clinical Chemical Laboratory Medicine**, Berlin, v. 43, n. 2, p. 195-197, 2005.

NORONHA, J. F. A.; GROTTTO, H. Z. W. Reticulócitos imaturos como preditores precoces do sucesso do enxertamento no transplante de medula óssea alogênico e autólogo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, p. 61-62, 2002.

NORONHA, J. F. A., LORAND-METZE, I.G., GROTTTO, H. Z. Hematopoietic Progenitor Cells (HPC) and Immature Reticulocytes Evaluations in Mobilization Process: New Parameters Measured by Conventional Blood Cell Counter. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, USA, v.106, n. 20, p. 149-153, 2006.

PALC. Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos. Disponível em <<http://www.sbpc.org.br/>> Acesso em 16 setembro de 2008.

PASQUINI, R. Transplante de Medula Óssea em Anemia Aplástica. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 209-231, 2000.

PEEBLES, D. A.; HOCHBERG, A.; CLARKE, T. D. Analysis of Manual Reticulocyte Counting. **American Journal Clinical Pathology**, USA, v. 76, p. 713-717, 1981.

PIERRE, R. V. Their Usefulness and Measurement in Peripheral Blood. **Clinics in Laboratory Medicine**, California, v. 22, n. 1, p. 63-79, 2002.

PORTNEY L.G.; WATKINS M.P. **Foundations of Clinical Research. Applications and Practice** Appleton & Lange, Conneticut: Norwalk, p. 509-516, 1993.

RAPAPORT, S. I. **Hematologia: introdução**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1990.

RILEY, R. S.; BEM-EZRA, J. M.; TIDWELL, A. Reticulocyte enumeration: Past & Present. **Laboratory Medicine**, USA, v.10, n.32, 2001.

---

RILEY, R. S.; BEM-EZRA, J. M.; TIDWELL, A.; ROMAGNOLI, G. Reticulocyte analysis by flow cytometry and other techniques. **Hematology Oncology Clinics of North America**, USA, v. 16, p. 373-420, 2002.

SHAININ, D.; SHAININ, P.D. Controle Estatístico de Processo. In: JURAN, J.M.; GRZYNA, F.M. **Controle da Qualidade: métodos estatísticos clássicos aplicados à qualidade**. 4 ed. São Paulo: Editora McGraw-Hill, p.188-250, 1993.

SIMMONS, A. **HEMATOLOGY: A Combined Theoretical and Technical Approach**. 2. ed., EUA: Butterworth-Heinemann, 1997.

SMITH, D. W. E.; WEINBERG, W. C. Transfer RNA in reticulocyte maturation,.**Biochimica et Biophysica Acta**, Netherlands, v. 655, p. 195-198, 1981.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 8. ed., Rio de Janeiro: LTC, 2 v., 2005/2006.

STIENE-MARTIN, E. A.; LOTSPEICH-STEININGER, C. A.; KOEPKE, J. A. **Clinical Hematology: Principles, Procedures, Correlations**. 2. ed., Philadelphia: Lippincott, 1998.

SUGIHARA, T.; SAWADA, S.; HAKURA, A.; HORI, Y.; UCHIDA, K.; SAGAMI, F. A staining procedure for micronucleus test using new methylene blue and acridine orange: specimens that are supravivally stained with possible long-term storage. **Mutation Research**, Netherland, v. 470, p. 103-108, 2000.

TABATA, H.; IZUMISAWA, S.; KUBO, M.; MATSUZAWA, T. Reticulocyte count in laboratory animals using a manual and a flow cytometric procedure (Sysmex R- 000). **Comparative Haematology International**, v. 1, p. 100-103, 1997.

THOMOPOULOS, P.; BERTHELLIER, M.; LAUDAT, M. H. Loss of insulin receptors on maturation of reticulocytes, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, USA, v. 85, n. 4, p. 1460-1465, 1978.

UNIVERSIDADE DE HONG KONG, Programa de estatística *online*. Disponível em: <<http://department.obg.cuhk.edu.hk/index.asp?scr=1024>> Acesso em setembro de 2008.

VAN HOVE, L.; SCHISANO, T.; BRACE, L. Anemia Diagnosis, Classification, and Monitoring Using Cell-Dyn Technology Reviewed for the New Millennium. **Laboratory Hematology**, USA, V.6 p. 93-108, 2000.

VIEIRA, S. **Introdução à Bioestatística**, 3 ed. Rio de Janeiro: Campus, 1998.

WALACH, J. **Interpretação de Exames de Laboratório**, 6. ed., Rio de Janeiro: Medsi, p. 358 e 404, 1999.

---

WAGSTAFF, W. Good Manufacturing Procedures in blood collection and processing. **Vox Sanguinis**, Basel, v. 74 (sup. 2), p. 513-521, 1998.

WATANABE, K.; KAWAI, Y.; TAKEUCHI, K.; SHIMIZU, N.; IRI, H.; IKEDA, Y.; HPUWEN, B. Reticulocyte maturity as an indicator for estimating qualitative abnormality of erythropoiesis. **American Journal Clinical Pathology**, USA, v. 47, n. 8, p. 736-739, 1994.

WEIMANN, M.; LUN, S.; MÜLLER, C.; PRATSCHKE, J.; REINKE, P.; LUN, A. Reticulocytes and Their Immature Fraction Do Not Detect Acute Rejection After Kidney Transplantation. **Transplantation Proceedings**, USA, v. 39, p. 514-517, 2007.

WESTGARD, J.O.; BARRY, P.L.; GROTH, T. Workshops for teaching quality control to laboratory personnel: objectives and guidelines. **Scandinavian Journal Clinical Laboratory Investigation**, Sweden, v. 44 (sup. 172), p. 215-218, 1984.

WICKRAMASINGHE, S. N.; BAIN, B. F. **Blood and Bone Marrow**, 3<sup>rd</sup> ed., New York: Churchill Livingstone, v. 2, 1986.

XU, L.; CHAUDHURI, A. *Plasmodium yoelii*: A differential fluorescent technique using Acridine Orange to identify infected erythrocytes and reticulocytes in Duffy knockout mouse. **Experimental Parasitology**, USA, v. 110, p. 80-87, 2005.

ZANDECKI, M.; GENEVIEVE, F.; GERARD, J.; GORDON, A. Spurious counts and spurious results non haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red cell indices and reticulocytes. **International Journal of Laboratory Haematology**, England, v. 29, p. 21-41, 2007.

ZARBO, R.J. The oncologic pathology report. **Archive of Pathology Laboratory Medicine**, Detroit, v.124, p.1004 -1010, 2000.

**ANEXOS**

---

## ANEXO 1. MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ENTREGUE A PACIENTES PARTICIPANTES DO ESTUDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um estudo intitulado “Estudo comparativo de Métodos de contagem de Reticulócitos para Controle de Qualidade”. Seu médico solicitou um Hemograma Completo e ou Contagem de Reticulócitos para detectar algum quadro diagnóstico ou monitorização terapêutica. Solicitamos sua autorização para ceder pequena quantidade de sangue para o estudo da contagem de reticulócitos.

O objetivo desta pesquisa é estudar comparativamente os métodos de contagem de execução manual e automatizado de reticulócitos, visando o Controle de Qualidade laboratorial.

- a) Caso você participe da pesquisa, não será necessário nada mais além da sua autorização.
- b) Como em qualquer tratamento, você poderá experimentar algum desconforto, principalmente relacionado à entrada de uma agulha para a coleta de sangue. No entanto, a punção de sangue é a mesma que será feita para a realização dos seus exames, solicitados por seu médico.
- c) Não há riscos para o seu tratamento ou para a sua saúde.
- d) Contudo os benefícios esperados são: melhorar a qualidade dos exames realizados em laboratórios de análises clínicas.
- e) A pesquisadora e seus orientadores poderão esclarecer eventuais dúvidas a respeito desta pesquisa.
- f) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de se recusar a participar ou, se aceitar participar, retirar o seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção do seu atendimento, que está assegurado.
- g) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **confidencialidade** seja mantida.

- 
- h) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não são da sua responsabilidade. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona que não há nenhum risco envolvido. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

---

NOME DO PACIENTE OU  
RESPONSÁVEL LEGAL

---

ASSINATURA LOCAL, DATA

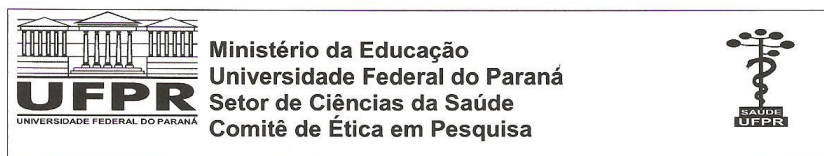
---

NOME DO PESQUISADOR

---

ASSINATURA LOCAL, DATA

ANEXO 2. APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPR



Curitiba, 14 de julho de 2008.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Mackelly Simionatto**  
Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Estudo Comparativo de Métodos de Contagem de Reticulócitos para Controle de Qualidade.**” está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 23 de abril de 2008 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 14 de julho de 2008.

Registro **CEP/SD:522.059.08.04** **CAAE:0026.0.091.000-08**

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

**Data para entrega do relatório final ou parcial: 14/01/2009.**

Atenciosamente



**Prof.ª Dr.ª Liliana Maria Labronici**  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

*Prof.ª Dr.ª Liliana Maria Labronici*  
Coordenadora do Comitê de Ética  
em Pesquisa - SD/UFPR

---

**ANEXO 3. PLANILHA DE ORIENTAÇÃO E TRANSCRIÇÃO DE RESULTADOS  
APLICADA AOS LABORATÓRIOS DE ANÁLISES CLÍNICAS PARTICIPANTES****RECOMENDAÇÕES**

As amostras são processadas para a análise, perante o *Consentimento Livre e Esclarecido* dos pacientes.

Estamos encaminhando duas lâminas de microscopia com extensões da mistura de sangue e corante, para a contagem de reticulócitos em duplicata, dos pacientes.

Seguem junto ao material de análise, os resultados do eritrograma de cada paciente, para se efetuar cálculo de valores absolutos.

As leituras deverão ser realizadas no máximo até 48 horas após o preparo da lâmina, sendo o ideal, logo após a sua confecção. Os resultados poderão ser escritos na planilha abaixo conforme a numeração das lâminas de cada paciente, informando a data da realização desta contagem.

PACIENTE	DATA DA LEITURA DA LÂMINA	CONTAGEM DE RETICULÓCITOS %	CONTAGEM ABSOLUTA
1			
2			
3			
4			
5			
6			
.			
.			

ANEXO 4. PLANILHA DE AVALIAÇÃO APLICADA AOS LABORATÓRIOS DE ANÁLISES CLÍNICAS PARTICIPANTES DA ANÁLISE INTEROBSERVADORES PARA A CONTAGEM MANUAL DE RETICULÓCITOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Nome do Laboratório:

Cidade/Estado:

Responsável pelo preenchimento:

1) Com relação à certificação:

1.1) O laboratório apresenta um programa definido e documentado que vise o Controle de Qualidade das amostras analisadas? Qual?

2) Com relação ao Controle de Qualidade Externo:

2.1) O laboratório está inscrito em algum programa externo de Controle de Qualidade? Qual?

2.2) O laboratório apresenta alguma sugestão para a melhoria nas avaliações do programa de Controle de Qualidade Externo?

3) Com relação ao Controle de Qualidade Interno:

3.1) O laboratório apresenta um sistema interno de Controle de Qualidade?

3.2) Existe padronização para as técnicas executadas por esses profissionais na realização da contagem de reticulócitos?

3.3) As técnicas utilizadas na execução da contagem de reticulócitos: preparo de reagentes; suspensão de amostra e corante; extensão; microscopia ou contagem automatizada; apresentam Procedimento Operacional Padrão (POP) já estabelecido? Quais os cuidados básicos descritos no POP?

3.4) Se a contagem de reticulócitos é automatizada, qual o equipamento utilizado no setor de hematologia para a contagem de reticulócitos ?

ANEXO 5. DADOS OBTIDOS POR MEIO DE INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO SOBRE A PARTICIPAÇÃO EM PROGRAMAS DE CONTROLE DE QUALIDADE, A CERTIFICAÇÃO, UTILIZAÇÃO DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO E REALIZAÇÃO DE CONTAGEM DE RETICULÓCITOS POR MÉTODO DE AUTOMAÇÃO DE 10 LABORATÓRIOS PARTICIPANTES NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS (PR).

Laboratório	CQE	CQI	Certificação	POPs	Automação
A	SBAC	nr	Nc	r	nr
B	nr	nr	Nc	r	nr
C	SBAC	r	Nc	r	nr
D	SBAC	nr	Nc	r	nr
E	SBAC	r	Nc	r	nr
F	SBAC	nr	Nc	r	nr
G	SBAC	r	C	r	nr
H	CONTROL LAB	r	Nc	r	nr
I	SBPC	r	Nc	r	r
J	SBAC	nr	Nc	r	nr

r - realizado; nr - não realizado; c - certificado; nc - não certificado; CQE – Controle de Qualidade Externo; CQI – Controle de Qualidade Interno; SBPC – Sociedade Brasileira de Patologia Clínica; SBAC – Sociedade Brasileira de Análises Clínicas; CONTROL LAB – empresa particular de Controle de Qualidade.

**ANEXO 6. INFORMAÇÕES QUANTO AOS CRITÉRIOS DE EXECUÇÃO,  
IDENTIFICAÇÃO E CONTAGENS DE RETICULÓCITOS FORNECIDOS  
PELOS OBSERVADORES DO TRABALHO E DOS LABORATÓRIOS  
PARTICIPANTES**

Observador	Critérios											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	s	n	s	s	s	n	nm	n	1.000 - 2.000	200	n	s
B	s	n	s	s	p	n	nm	n	1.000 - 4.000	200	n	n
C	s	n	s	s	p	n	s	n	1.076 - 2.600	200	s	s
D	s	s	s	s	p	n	nm	n	2.000 - 4.000	200	n	s
E	s	n	s	s	s	n	nm	n	4.000	200	n	s
F	s	n	s	s	s	n	nm	n	4.000 - 10.000	200	n	s
G	n	n	s	s	p	n	nm	s	2.000 - 4.000	200	s	s
H	s	n	s	s	s	n	nm	n	2.000	200	n	n
I	s	n	s	s	n	n	nm	n	1.000 - 2.000	200	n	s
J	s	n	s	s	p	n	nm	n	1.000 - 2.000	200	n	n
K	s	n	s	s	s	n	s	n	4.000 - 10.000	200	p	s
L	s	n	s	s	s	n	s	n	4.000 - 10.000	200	p	s

1 - Critério de execução – o volume de amostra na preparação depende do volume globular do paciente; 2 - Emprego de contra-coloração – corante hematológico May Grünwald Giemsa; 3 - Microscopia óptica de alta resolução – aumento de 100x; 4 - Critérios de identificação – contagem de reticulócitos com poucos e muitos grânulos de RNA; 5 - Tempo de leitura das lâminas – na data prevista conforme orientação; 6 - Critérios de contagem – campos com sobreposição de células; 7 - Cruzamento de dados com lâminas coradas May Grünwald Giemsa do hemograma; 8 - Realização de contagem corrigida de reticulócitos – CRC; 9 - Quantidade média de células contadas na lâmina; 10 – Quantidade média de células contadas ou avaliadas por campo; 11 - Realização de contagem total de células por campo; 12 - Contagem de maior número de células quando o número de reticulócitos for baixo.

s: sim; n: não; nm: não menciona; p: parcialmente.

---

ANEXO 7. PARECER DE ACEITAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGO

Artigo Aprovado SGP/ RBHH

---

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Av. Nossa Sra. de Copacabana, 1.059 sala 1.201 - Copacabana

Rio de Janeiro - RJ - Brazil

CEP 22060-001

Tel/Fax: (21) 2521-6905

email: brazilbloodjournal@yahoo.com.br

Rio de Janeiro, segunda-feira, 16 de fevereiro de 2009

Ilmo(a) Sr.(a)

Prof(a), Dr(a) Aguinaldo José do Nascimento

Referente ao manuscrito: 351

Classificação: Artigo Original

Temos o prazer de informar que o manuscrito Contagem manual de reticulócitos em laboratórios de Análises Clínicas de Ponta Grossa e Campos Gerais, PR, Brasil foi aprovado pelo Conselho Editorial da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e está na pauta para publicação. Lembramos que algumas modificações poderão ser solicitadas até a publicação do artigo.

Obrigado por submeter seu trabalho a RBHH e esperamos continuar merecendo sua preferência para divulgação de suas pesquisas.

Atenciosamente,

Milton Artur Ruiz

Editor

---

ANEXO 8. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA BRASILEIRA DE  
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA (pdf)

**Analysis of manual reticulocyte counting in Clinical  
Laboratories of Ponta-Grossa and Campos Gerais, PR,  
Brazil**

**Contagem manual de reticulócitos em laboratórios de Análises Clínicas de  
Ponta Grossa e Campos Gerais, PR, Brasil**

**Mackelly Simionatto<sup>1</sup>; Josiane Padilha de Paula<sup>1</sup>; Domenic Cicchetti<sup>2</sup>; Maria  
Suely Soares Leonart<sup>1</sup>; Aguinaldo Jose do Nascimento<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do  
Paraná. Av. Lothário Meissmer, 632, Jardim Botânico  
802210-170, Curitiba, PR

<sup>2</sup>Department of Biometry, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06512

Author for correspondence:

Aguinaldo José do Nascimento  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal do Paraná  
Av. Lothário Meissmer, 632,  
Jardim Botânico  
802210-170, Curitiba, PR  
ajnasc@ufpr.br

Running title: Analysis of manual reticulocyte counting

---

## RESUMO

A contagem do reticulócitos é usada extensamente na rotina laboratorial para avaliar a atividade eritropoiética da medula óssea, e é de grande importância no diagnóstico e no prognóstico na terapia de anemias hemolíticas. São coradas com o azul de metileno novo e o azul cresil brilhante, o que conferem o aspecto característico de retículo quando observado ao microscópio ótico. Critérios conhecidos foram observados para um bom desempenho da contagem manual de reticulócitos, principalmente, atenção especial nas películas do sangue durante a montagem das lâminas; contagem nos campos que não contém sobreposição celular; e também no número de células avaliadas. O objetivo deste estudo foi avaliar a variação interobservadores, analisar o erro estatístico da contagem manual dos reticulócitos, e demonstrar as limitações deste método. A análise de correlação intraclasses segundo Bartko [Psychol Rep 19:3,1966; 34:418,1974] foi usada para avaliar a concordância entre 12 observadores em um total de 25 lâminas do sangue, com contagens variadas de reticulócitos. Os resultados das análises estatísticas indicam que o erro casual, calculado como  $(1-r^2)$  variou de 4 a 60% entre os observadores. Embora ocorra imprecisão entre os observadores, o perfil geral entre eles é similar, e o coeficiente de correlação intraclasse indicou que os resultados obtidos são clinicamente úteis.

Palavras-chave: Hematologia, métodos estatísticos, contagem manual de reticulócitos

**ABSTRACT**

Reticulocyte counting is widely used in the laboratory to evaluate bone marrow erythropoietic activity, and has great diagnostic and prognostic importance for the therapy of anemias. Reticulocytes are supravitaly stained with new methylene blue or brilliant cresyl blue, which confer the characteristic aspect of reticulum to their organelles, at light microscopy. Known criteria were observed for a good performance of the reticulocyte manual counting, with special attention paid to reticulocyte slides preparation; in counting in fields that do not contain overlapping cells; and also in the number of evaluated cells. The aim of this study was to evaluate the amount of interobserver variation and also to analyze the statistical error of manual reticulocyte counting. The Intraclass correlation coefficient (ICC), due to Bartko [Psychol Rep 19:3,1966; 34:418,1974] was used to evaluate the level of agreement or concordance among 12 technologists who each evaluated the same 25 blood smears, with variable reticulocyte counts. The results of statistical analyses showed that the amount of random error, defined as  $(1-r^2)$ , varied from 4% to 60% among the technologists. Although imprecision occurred, the overall profiles were quite similar, and intraclass correlation coefficients indicated that the results obtained have clinical significance.

**KEY-WORDS:** Haematology, statistical methods, manual reticulocytes count

## INTRODUCTION

Reticulocytes are precursory to the erythrocyte cells in the blood. They are anucleated cells, more rounded in shape and 20% greater, in volume, than the erythrocytes. However, when stained with panoptic dyes (Romanowsky stain) they produce polychromatic slides, due to the presence of mature red blood cells with hemoglobin, synthesized during maturation, and reticulocytes with ribonucleic acid residues. These residues are stained with new methylene blue or brilliant cresyl blue dyes which confer the characteristic aspect of reticulum, when observed in optic microscopy. Such staining is not permanent<sup>1</sup>. The reticulocytes can be classified as mature or immature depending on the amount of granules or reticula they contain<sup>2</sup>.

Reticulocyte counting is routinely and widely used in the laboratory to evaluate bone marrow erythropoietic activity. It is of great diagnostic and prognostic value in hemolytic anemias, in acute hemorrhage, in response to iron, folic acid and vitamin B12 therapy<sup>3</sup>, as well as, after chemotherapy or bone marrow transplant<sup>4</sup>. The manual method of reticulocyte counting, described in 1930, is still very frequently used today due to its low cost in comparison to the automated method that has seen widespread application since 1990. However, manual counting presents some factors that cause great variation.

Peebles *et al.*<sup>4</sup> reported interobserver variation coefficients between 25% and 50%, considered higher than would be expected. Therefore, manual counting must follow standardized criteria of execution and identification in order to produce more precise results. As suggested by the H-44 technique norms of the National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) and of the International Committee for Standardization in Hematology (ICSH), some criteria must be observed for a good performance of reticulocyte manual counting. These would include paying special attention to the differentiation among reticulocyte granules, Pappenheimer, Heinz, and Howell-Jolly bodies, or remaining dyes; taking special care in the preparation of the reticulocyte slides; restricting the counting to fields that do not contain overlapping cells; and also taking into account the number of evaluated cells<sup>5</sup>.

Automated reticulocyte counting is based on the rapidly expanding technology of flow cytometry that makes the determination fast, accurate, and efficient by counting a great number of blood cells; and the methodology also provides information regarding the reticulocytes. Parameters such as amount of hemoglobin and degree of reticulocyte maturity

---

allow more trustworthy diagnostic and therapeutic monitoring, mainly for patients with lower reticulocyte counts<sup>6</sup>. However, this methodology is still expensive, and this limits its routine use in small and medium size laboratories.

Considering the relevance of the quality control of reticulocyte countings for the detection of hematologic illnesses, the aim of this study was to evaluate interobserver variations; to determine the amount of statistical error in manual reticulocyte counting, using known criteria for its determination; and also to demonstrate the limitations of this method.

## **MATERIALS AND METHODS**

*Manual reticulocyte counting* - Manual reticulocyte counting was carried out in accordance with Lewis *et al.*<sup>7</sup> modified. A new methylene blue or brilliant cresyl blue solution (100µl) was added to 200 - 250µl of blood, and incubated at 37°C for 20-25 min. The blood volume to be added to the dye depends on the volume of packed red blood cells volume (PCV), 200µl for PCV equal or superior to 30% and 250µl for less than 30% PVC. After the incubation with the dye, blood smears on glass slides were prepared for reticulocyte counting, for up to 72 hours.

*Criteria for adequate blood smear counts* - Blood smear was observed under optic microscope objective immersion (100x). Both mature erythrocytes and well defined reticulocytes could then be observed. The mature reticulocyte possesses few RNA filaments or granules, while the youngest possess a great amount of granules. Erythrocytes that present at least two small corpuscles or stained filaments are still considered to be reticulocytes.

Adequate supravital staining should not be very weak at the point of not seeing the reticule, nor very strong, at the point of becoming blurred or with thick reticule. The area to be analyzed cannot have cells overlapping, or very fine fields, so that very few cells are observed that show empty spaces between the cells.

According to Lewis *et al.*<sup>7</sup>, when the count is less than 10% a convenient method is to survey successive fields until at least 100 reticulocytes have been counted; and to count total

---

cells in at least ten fields in order to obtain an average number of cells per field. So, when the percentage of reticulocytes decreases, the examiner must count more cells to obtain an acceptable error. When the reticulocyte number exceeds 10%, the examination of a small number of cells will be enough to get a standard error of less than 10%. It is consensual that there must be about 200 erythrocytes in each field so that 20-50 fields are counted with less than 1% reticulocytes.

*Blood smear screening* - A total of 25 blood smears was screened by professional biochemists in 10 laboratories of Clinical Analyses in Ponta-Grossa and Campos Gerais, PR, Brazil. The technologists were blinded and identified only as A to J. In a first approach, the samples were carefully examined by technologists K and L. Each laboratory received the slides numbered from 1 to 25 and they were asked to screen from 2 to 3 times a week, during a 5 week period, between June 25<sup>th</sup> and July 30<sup>th</sup> 2008, and within 48 hours after receiving the slides.

*Statistical analyses* – The Intraclass Correlation Coefficient (ICC), due to Bartko<sup>8,9</sup> was used to evaluate the level of agreement or concordance among technologists for parametric measurements, for more than 2 raters<sup>10</sup>. Analyses were performed with the use of the on-line statistical package of Hong Kong University<sup>11</sup> at the following website:

[http://department.obg.cuhk.edu.hk/researchsupport/IntraClass\\_correlation.asp](http://department.obg.cuhk.edu.hk/researchsupport/IntraClass_correlation.asp)

The data were also analyzed by Pearson correlation, one way ANOVA and with the Levey-Jennings quality control chart<sup>12</sup>. The criterion for statistical significance was set at the nominal probability ( $p$ ) level of  $p \leq 0.05$ .

## **RESULTS AND DISCUSSIONS**

In order to observe if the two technologists, K and L, were calibrated, by the established criteria, their data were analyzed by Pearson correlation, as shown in Figure 1. The systematic error reflected by the slope value close to unity shows that both technologists produced quite concordant values. The random error, reflected by the variability of counts

---

around the regression line shows very little imprecision between them. The “r” value close to unity shows a high degree of correlation and concordance between the two technologists, as evidenced by a random error ( $1-r^2$ ) of only 4.1%. The plot of the 25 blood smears, arranged from lowest to highest values, illustrates the reticulocyte counts of the samples.

The statistical analyses of agreement for intra-class correlation for parametric data, with more than two examiners<sup>8</sup>, using the “on-line” statistical package of the University of Hong Kong<sup>11</sup>, is illustrated in Table I. Highest concordances were obtained between technologists K and L. They were responsible for the blood smears mounting, in accordance with the criteria established by LEWIS *et al.*<sup>7</sup>.

According to the criteria of Cicchetti and Sparrow<sup>14</sup>, Intraclass Correlation Coefficients (ICCs) can be classified for levels of clinical significance as follows: poor, < 0.40; fair, 0.40 to 0.59; good, 0.60 to 0.74; excellent, 0.75 to 1.00.

The analyses performed on the total data (Table I) show that, except for technologist I, all the technologists can be classified as having excellent ICCs .

With the data fractionated into low, medium and high counts, the sample sizes became small, causing some difficulty in interpreting the full meaning of the correlational analyses. However, the technologists do show certain difficulties in agreement for low counts (not shown).

Considering all the data, the amount of random error ( $1-r^2$ ) was observed as follows: <20% among technologists G, B, C and F; 10 - 40% among technologists D, J, H and A; >40% for technologists E and I. Technologist I with K and L showed the lowest ICC value ( $r = 0.64$ ) (Table I).

Using the one-way ANOVA, we compared the mean values of counts for technologists K and L against each rater. The result is illustrated in Table II. No significant statistical differences were observed for the mean reticulocyte counts ( $p > 0.05$ ). The mean values obtained for each rater are illustrated in Table III where it can be observed that technologist G showed the highest super-estimation in the reticulocyte countings, while A showed the lowest under-estimation.

The Levey-Jennings quality control plot<sup>12</sup> (Figure 2) for averages shows more clearly that technologists B, D, F, J, K and L had similar results; A, C and I tended to sub-estimate the counts; and E, G and H tended to super-estimate the reticulocyte counts. Figure 2 also shows the quality control chart for amplitude and the high variability of the 25 blood smear counts, especially the data of technologist I that was greatly sub estimated ( $p < 0.05$ ). All

---

this said, technologist I did not perform within the 48 hour time span, as requested. These results are quite useful to signal the fact that the blood smears in glass slides are not stable beyond the 48 hour span. The stated period for counts should be observed; otherwise it will likely result in sub estimated counts.

Interesting results were obtained with the scatterplot of the 300 data points distributed across 25 blood smears (Figure 3). Although some numerical discordance under statistical analysis was observed, it can be seen that, as far as the high, low and average counts are concerned, the profile among the technologists is quite similar, and the results obtained are therefore clinically useful. Since great discrepancies are observed for reference values due to variability in sex, age and different pathologies, the interobserver random errors should be around 20%. Applying this criterion, the interobserver random errors of the present work was higher than expected.

Normally erythrocytes do not contain inclusions. However many different inclusions may be seen in various hematological disorders, and in a supravital preparation might be confounded with a reticulocyte:<sup>7,14,15</sup> i) Pappenheimer bodies are in general a sole granule, staining darker blue than reticulocytes granule. Pappenheimer bodies are secondary lysosomes, variable in their composition of iron and protein, or mitochondria with iron micelles that appears as small irregular basophilic deposits at cell periphery. The protein matrix of the granule is staining with Romanowsky stains and the iron portion of the granule is staining with Prussian blue; ii) Heinz bodies can be visualized with supravital stains as clearly blue. They are discrete inclusion in contrast to the reticular filament material in a reticulocyte. They are composed of aggregated, denatured hemoglobin and appear as masses just under or attached to the cell membrane. When appearing singly, a Heinz body is large, but when several are present in one cell, they are small; iii) Howell-Jolly bodies are dark purple or violet spherical granules in the erythrocyte, usually occurring singly, rarely more than two per cell. The granules are nuclear DNA fragments; iv) Basophilic stipplings are bluish-black granules distributed intracellular, composed of aggregated ribosomes (RNA), and they are sometimes associated with mitochondria and siderosomes; v) Protozoan inclusions as *Malaria* and *Babesia* present blue ring with red dot in erythrocyte and others evolution shapes (trophozoite stages) outside cells; vi) Erythrocyte artifacts that occurs when cells are mechanically traumatized, or remaining dyes, can also confound the identification of reticulocyte.

The results obtained in this work suggest that the experienced technologists involved in this work have their own criteria, and they are not calibrated as proposed by Lewis *et al*<sup>7</sup>.

---

Acknowledgments: the authors wish to thank each of the laboratory participants, for a clinically valuable contribution.

## REFERENCES

1. Wickramasinghe SN, Bain BF. *Blood and Bone Marrow*. 3<sup>rd</sup> ed., New York: Churchill Livingstone, v. 2, 1986.
2. Lee, GR. et al. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10. ed. Baltimore: Lippincott William's & Wilkins, 1999.
3. Peebles DA, Hochberg, A; Clarke, TD. Analysis of Manual Reticulocyte Counting. *American Journal of Clinical Pathologists*, 1981;76(5):713-717.
4. van Hove, L.; Schisano, T.; Brace, L. Anemia Diagnosis, Classification, and Monitoring Using Cell-Dyn Technology Reviewed for the New Millennium. *Laboratory Hematology*, 2000;6:93-108.
5. Bain, BJ. *Células Sanguíneas: um guia prático*. 2. ed., Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
6. Davis, BH.; Bigelow, NC. Automated Reticulocyte Analysis. *Diagnostic Hematology*, 1994;8(4):617-630.
7. Lewis, SM.; Bain, B.; Bates, I. *Hematologia Prática*. 9. ed. São Paulo: Artmed, 2006.
- Lewis, SM.; Bain, BJ.; Bates, I. *Laboratory Hematology*. 9 ed., London: Churchill Livingstone, 2001
8. Bartko, JJ. The intraclass correlation coefficient as a measure of reliability. *Psychological Reports*, 1966;19: 3-11.
9. Bartko, J.J. Corrective note to: "the intraclass correlation as a measure of reliability." *Psychological Reports*, 1974;34:418.
10. Portney LG, Watkins MP. *Foundations of Clinical Research. Applications and Practice* Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange, ISBN 0-8385-1065-5 p. 509-516, 1993.
11. Hong Kong University. On-line statistical programs.

---

<<http://department.obg.cuhk.edu.hk/index.asp?scr=1024>> Access in September, 2008.

12. Shining, D; Shining, PD. Statistical control of process. In [\*Juran's Quality Control Handbook\*](#). [J.M. Juran](#) and [Frank M. Gryna](#) Ed. London: McGraw Hill, 1988

13. Cicchetti, DV.; Sparrow, SS. Developing criteria for establishing interrater reliability of specific items: applications to assessment of adaptive behavior. *American Journal of Mental Deficiency* , 1981;86:127-137.

14. Mckenzie, SB. *Textbook of Hematology*. 2. ed. Baltimore: William's & Wilkins, 1996.

15. Stiene-Martin, EA; Lotspeich-Steininger, CA; Koepke, J A. *Clinical Hematology: Principles, Procedures, Correlations*. 2. ed., Philadelphia: Lippincott, 1998.

Table I. Intraclass correlations (ICCs) for technologists “K”, “L” and the others for reticulocyte counts (%)

Technologists	r
KL	0.9796
K L G	0.9365
K L B	0.9289
K L C	0.9130
K L F	0.9056
K L D	0.8810
K L J	0.8415
K L H	0.8134
K L A	0.8010
K L E	0.7610
K L I	0.6395

r – Intraclass correlations (ICCs)

Table II. One-way ANOVA for data of technologists “K”, “L” and the others for reticulocyte counts (%)

Technologists	SS	DF	MS	F	P
KLF	0.0284	2	0.0142	0.0064	0.9936
KLD	0.1655	2	0.0828	0.0320	0.9686
KLB	0.3802	2	0.1901	0.0924	0.9118
KLJ	0.4140	2	0.2070	0.1009	0.9041
KLH	1.7507	2	0.8753	0.3046	0.7384
KLC	2.4932	2	1.2466	0.5794	0.5629
KLE	2.7364	2	1.3682	0.7018	0.4990
KLG	4.1180	2	2.0590	0.8659	0.4251
KLI	3.5230	2	1.7615	1.1371	0.3264
KLA	4.6645	2	2.3323	1.2722	0.2866
Total	29.6283	11	2.6935	1.3156	0.2150

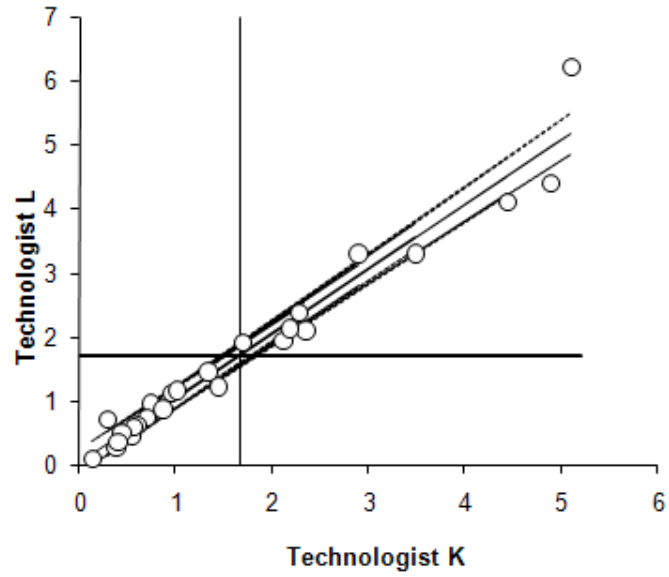
SS - sum of square; DF- degrees of freedom; MS – medium square;  
 F - Test F for variance comparisons; p - probability error (error I in statistical test of null hypothesis)

Table III. Descriptive statistic for the technologists data of the reticulocyte counts (%)

Technologists	N	Mean	Std.Dev.	Std.Err	-95,00%	+95,00%
G	23	2.200	1.636	0.341	1.493	2.907
E	25	2.094	1.169	0.234	1.611	2.576
H	25	2.012	2.035	0.407	1.172	2.852
J	25	1.843	1.293	0.259	1.309	2.376
B	25	1.836	1.299	0.260	1.300	2.372
L	25	1.714	1.516	0.303	1.088	2.340
F	25	1.681	1.463	0.293	1.077	2.285
K	25	1.667	1.477	0.295	1.057	2.277
D	25	1.599	1.814	0.363	0.851	2.348
C	24	1.300	1.402	0.286	0.709	1.892
I	25	1.232	0.406	0.081	1.065	1.400
A	23	1.148	0.971	0.203	0.728	1.568

Std.Dev.- standard deviation; Std.Err – standard error; -95.00%, +95.00% - limits of confidence

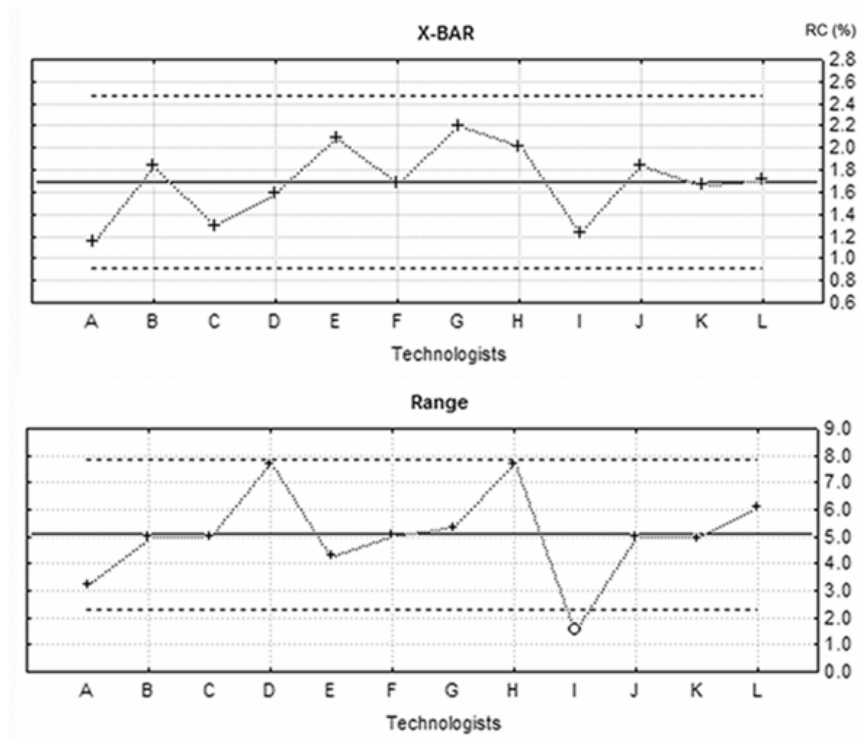
Figure 1. Data of technologist L plotted as a function of the data of technologist K



n = 25 blood smears; the Pearson correlation r was 0.96.

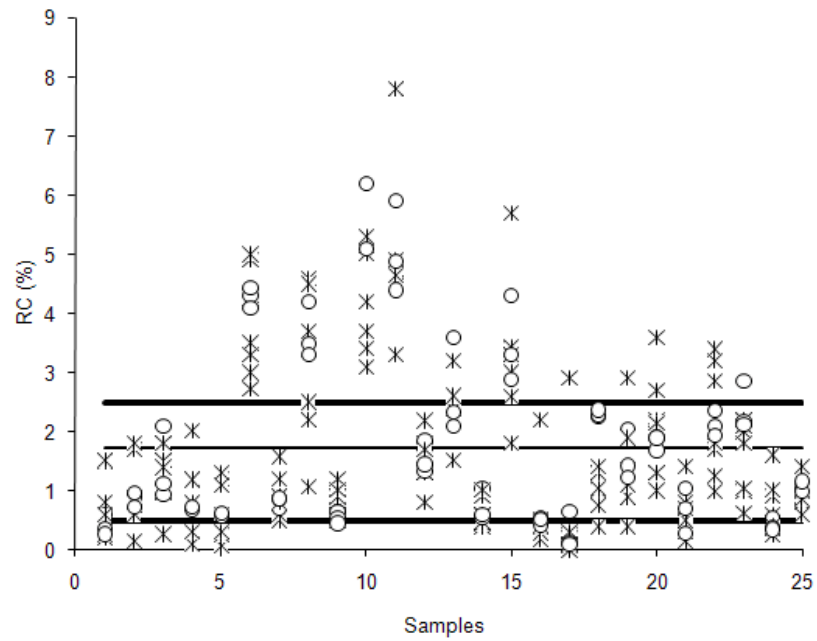
Solid line – estimated regression line ( $y = 1.018x$ ); dotted line – 95% limit of confidence for residues. Lines in cross – averages values for x and y.

Figure 2. Quality control plot for technologist profile on average reticulocyte counts



Quality control chart for average and range (SHAININ e SHAININ, 1993);  
 Solid line – grand mean; dotted line – dispersion limits

Figure 3. Scatterplot of all reticulocyte counts (%) and all samples



○ - Technologists K, L and G; \* - Technologists A-J; thick line – limit normal values between 0.5 to 2.5 % RC; thin line – grand average (1.7%). The data of technologist I was not included in this plot.