

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SAMUEL RICARDO COMAR

AVALIAÇÃO DE CRITÉRIOS PARA REVISÃO MICROSCÓPICA DE  
HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS. EXPERIÊNCIA DO LABORATÓRIO DE  
HEMATOLOGIA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ

CURITIBA  
2015

SAMUEL RICARDO COMAR

AVALIAÇÃO DE CRITÉRIOS PARA REVISÃO MICROSCÓPICA DE  
HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS. EXPERIÊNCIA DO LABORATÓRIO DE  
HEMATOLOGIA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Medicina Interna, Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Professor Dr. Ricardo Pasquini  
Coorientadora: Professora Dra. Mariester Malvezzi

CURITIBA  
2015

Comar, Samuel Ricardo

Avaliação de critérios para revisão microscópica de hemogramas automatizados: experiência do Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná / Samuel Ricardo Comar. –

Curitiba, 2015.

181f.;tab.;il.;gráf.;color.;30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pasquini

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariester Malvezzi

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

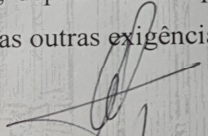
1. Hematologia. 2. Testes hematológicos. 3. Contagem de células sanguíneas. Estudos de validação. 5. Automação laboratorial. I. Pasquini, Ricardo. II. Título.

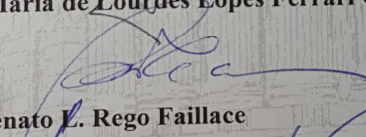
NLM WH 100

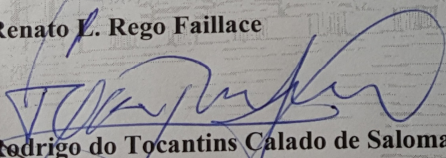


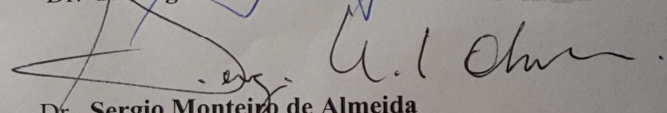
## PARECER

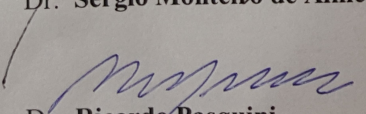
Aos dezenove dias do mês de junho do ano de dois mil e quinze, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dra. **Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille**, Dr. **Renato L. Rego Faillace**, Dr. **Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma Rodrigues**, Dr. **Sergio Monteiro de Almeida**, Dr. **Ricardo Pasquini**, exarou o presente parecer sobre a tese elaborada por **Samuel Ricardo Comar**, aluno concluinte do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna**, nível **Doutorado** da **Universidade Federal do Paraná**, intitulada: "AVALIAÇÃO DE CRITÉRIOS PARA REVISÃO MICROSCÓPICA DE HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS . EXPERIÊNCIA DO LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ". A Banca examinadora considerou que **Samuel Ricardo Comar**, apresentou trabalho adequado para Tese e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Doutor em Medicina Interna** e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

  
Dra. **Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille**

  
Dr. **Renato L. Rego Faillace**

  
Dr. **Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma Rodrigues**

  
Dr. **Sergio Monteiro de Almeida**

  
Dr. **Ricardo Pasquini**

À Danielle, minha esposa, e ao meu filho, João Pedro, fontes de minhas alegrias e inspirações. Aos meus pais Mercil e Aparecida, pelo constante incentivo para que eu esteja sempre estudando e me aperfeiçoando, mas, sobretudo, por todo o amor, por quem sou e por tudo o que alcancei. Aos meus irmãos e sobrinhos.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo presente da vida, por ser luz em meu caminho e por me dar forças e estar presente em cada momento de minha vida.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pasquini. Para mim foi uma imensa honra e orgulho tê-lo como orientador. Agradeço por seu apoio, incentivo e confiança, pela qualidade deste trabalho e, sobretudo, pela oportunidade de compartilhar de sua grande experiência e conhecimentos.

À Profa. Dra. Mariester Malvezzi, pela coorientação, amizade, paciência, oportunidade, sensibilidade e significativas contribuições e sugestões nesse trabalho. Não esquecerei seus conselhos, ensinamentos e inestimável confiança.

A todos os colegas, de todos os turnos, do Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio prestado na parte prática deste trabalho e pelo constante apoio e colaboração.

À gerência da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo constante incentivo.

À Dra. Ana Paula de Azambuja pelo incentivo no começo deste trabalho e por acreditar que ele pudesse se tornar a presente tese de doutorado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço em especial às secretárias do curso de Pós-graduação em Medicina Interna Lúcia Lemiska e Valéria Knapp por estarem sempre prontas a cooperar.

Meus respeitosos agradecimentos pelas contribuições da banca do exame de qualificação, composta pelos Doutores Luine Rosele Renaud Vidal, Miriam Perlingeiro Beltrame e Sérgio Monteiro de Almeida e pela valiosa participação dos membros da banca examinadora da defesa, composta pelos Professores Doutores Ricardo Pasquini, Rodrigo do Tocantis Calado de Saloma Rodrigues, Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille, Renato Rego Faillace e Sérgio Monteiro de Almeida.

Aos pacientes atendidos pela Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da UFPR, que tanto colaboraram com este trabalho por meio dos exames laboratoriais, sem os quais não teria sido possível a realização desse trabalho.

Por fim, à minha amada família, que sempre me apoiou incondicionalmente, que acreditou plenamente em mim e que, sem sombra de dúvidas, são os que mais compartilham de minha alegria.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna da Silva

## RESUMO

Há um grande interesse em laboratórios de hematologia em reduzir o número de hemogramas automatizados que exijam a análise microscópica, sem sacrificar a qualidade. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi estabelecer e avaliar critérios para revisão microscópica de hemogramas automatizados (CRMHA) a fim de indicar os mais apropriados para o Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da UFPR (HC-UFPR). Em uma primeira etapa foram utilizadas e testadas 1977 amostras, empregando-se os critérios de triagem (CT) e os critérios de positividade em lâmina (CPL) da *International Society for Laboratory Hematology* (ISLH), cuja taxa de falsos negativos foi de 6,73% e não foram considerados seguros para indicar os hemogramas que poderiam ter sido liberados sem a revisão microscópica da lâmina. Para melhor atender as necessidades e peculiaridades desse Laboratório de Hematologia, em uma segunda etapa, novos CPL foram estabelecidos e analisados nas mesmas amostras, através de quatro conjuntos de CT, sendo um deles o adaptado da ISLH e outros três propostos nesse estudo, denominados de Estudo 1 (limites estreitos), Estudo 2 (limites intermediários) e Estudo 3 (limites amplos). Para cada conjunto de CT, as taxas de falsos positivos, falsos negativos (FN), verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, taxa de revisões microscópicas e eficiência foram determinadas. Nos Estudos 1, 2, 3 e ISLH adaptados, considerando os CPL propostos neste estudo, as taxas de revisões microscópicas foram de 73,85%, 54,52%, 46,33% e 46,38%, respectivamente. Já as taxas de resultados FN foram de 0,50%, 1,97%, 2,73% e 3,95%, respectivamente. A eficiência e o valor preditivo negativo do Estudo 3 foram 73,04% e 94,91%, respectivamente. O Estudo 3 mostrou a melhor relação entre segurança e eficiência para estimar os limites da automação na realização de hemogramas. Cada laboratório deve avaliar os CRMHA baseados no Grupo Internacional de Consenso em Revisões Hematológicas da ISLH e, caso necessário, otimizá-los para maximizar sua eficiência e segurança. Esse estudo fortalece a necessidade de respeitar a heterogeneidade da população que utiliza o laboratório de modo que os CRMHA atendam às características de diferentes contextos nos quais se realizam determinações hematimétricas.

Palavras-chave: Hematologia. Critérios de revisão de lâminas de hemograma. Analisadores hematológicos. Estudos de validação. Automação



## ABSTRACT

To reduce costs and the time required to release full blood count results, there is great interest in reducing the number of automated blood count results requiring microscopic review without sacrificing quality in hematology laboratories. Towards to expand the knowledge on how to establish criteria for mandatory manual blood smear review we aimed to establish and evaluate criteria for manual blood smear review (CMBSR) in the Hematology Laboratory of the Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná in order to indicate the more appropriate CMBSR for this Hematology Laboratory. As a first step, a total of 1977 samples were utilized, which were tested using the adapted CMBSR of the International Society for Laboratory Hematology (ISLH), consisting of screening criteria adapted locally to capture samples with positive smear findings (PSF) defined by the ISLH. CMBSR adapted from ISLH shows 6.73% of FN and were unsafe to indicate blood counts that could have been released without manual peripheral blood smear review. In a second stage, we also evaluated on the same samples, four sets of screening criteria to capture samples of PSF proposed in this study, the set of screening criteria adapted ISLH and three other sets of screening criteria proposed by this study, called Study 1 (narrow ranges), Study 2 (intermediate ranges) and Study 3 (wide limits). For each set of screening criteria, false positive rates, false negatives (FN), true positives, true negatives, sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, microscopic review rate and efficiency were determined. In Studies 1, 2, 3 and adapted from ISLH considering PSF proposed in this study, microscopic review rates were 73.85%, 54.52%, 46.33% and 46.38%, respectively. The FN rates were 0.50%, 1.97%, 2.73% and 3.95%, respectively. The efficiency and negative predictive value of Study 3 were 73.04% and 94.91%, respectively. Study 3 showed the best relationship between safety and efficiency to estimate the limits of automation in performing complete blood counts. Each laboratory should evaluate the criteria for manual blood smear review based on the International Consensus Group for Hematology Review, and, if necessary, optimize them to maximize their efficiency and safety. This study strengthens the necessity of respecting the heterogeneity of the population using the laboratory in order that CMBSR may match the characteristics of different contexts in which hematological determinations are performed.

Key-words: Hematology. Blood cell count. Criteria for blood smear review. Hematology analyzers. Validation studies. Automation

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – OBTENÇÃO DO RDW-CV E RDW-SD A PARTIR DO HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DOS VOLUMES ERITROCITÁRIOS .....	27
FIGURA 2 – HISTOGRAMA DE VOLUMES PLAQUETÁRIOS E DEFINIÇÃO DO VPM, PDW E P-LCR EM ANALISADORES SYSMEX .....	29
FIGURA 3 – GRÁFICO DE DISPERSÃO DO CANAL 4-DIFF DO XE-2100D MOSTRANDO A POSIÇÃO EM QUE SÃO ENCONTRADOS TIPOS CELULARES ANORMAIS .....	52
FIGURA 4 – HISTOGRAMAS DERIVADOS DO CANAL RBC/PLT DO XE-2100D MOSTRANDO A POSIÇÃO EM QUE SÃO ENCONTRADAS ANORMALIDADES .....	53
FIGURA 5 – COMPARAÇÃO DE CURVAS ROC DOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM DOS ESTUDOS 1, 2, 3 E ADAPTADOS DA ISLH X CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA DO HC-UFPR .....	88

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – INFORMAÇÕES TÉCNICAS DOS ANALISADORES HEMATOLÓGICOS EMPREGADOS NESSE ESTUDO .....	51
TABELA 2 – NÍVEL DE AJUSTE DOS PRINCIPAIS Q-FLAGS DOS ANALISADORES HEMATOLÓGICOS DESTE ESTUDO .....	54
TABELA 3 – CRITÉRIOS DE TRIAGEM ADAPTADOS DA ISLH EMPREGADOS NESSE TRABALHO .....	58
TABELA 4 – CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA RECOMENDADOS PELA ISLH .....	60
TABELA 5 – CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA DO HC-UFPR.....	62
TABELA 6 – CRITÉRIOS DE TRIAGEM PARA REVISÃO MICROSCÓPICA DE HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS DESSE TRABALHO.....	63
TABELA 7 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ANALISADOS NESSE ESTUDO .....	70
TABELA 8 – OCORRÊNCIA DE CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA ADAPTADOS ISLH .....	73
TABELA 9 – TAXAS DE INDICAÇÃO PARA A RMLH DE ACORDO COM OS CRITÉRIOS DE TRIAGEM ADAPTADOS DA ISLH.....	74
TABELA 10 – AVALIAÇÃO DA IMPLANTAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE REVISÃO DE HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS. CRITÉRIOS DE TRIAGEM X CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA, AMBOS ADAPTADOS DA ISLH .....	75
TABELA 11 – OCORRÊNCIA DE FALSO-NEGATIVOS APÓS A APLICAÇÃO DOS CRMHA ADAPTADOS DA ISLH.....	77
TABELA 12 – CAUSAS DE FALSO-POSITIVOS NA AVALIAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM ADAPTADOS DA ISLH .....	78
TABELA 13 – OCORRÊNCIA DOS CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA DO HC-UFPR .....	80
TABELA 14 – TAXAS DE INDICAÇÃO PARA A RMLH DE ACORDO COM OS CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUANTITATIVOS DOS ESTUDOS 1, 2 E 3	82
TABELA 15 – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES CONJUNTOS DE CRITÉRIOS DE TRIAGEM.....	85

TABELA 16 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DIFERENTES CONJUNTOS DE CRITÉRIOS DE TRIAGEM.....	86
TABELA 17 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS ENTRE AS CURVAS ROC PARA VERIFICAÇÃO DO DESEMPENHO DA APLICAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM DOS ESTUDOS 1, 2, 3 E ADAPTADOS DA ISLH.....	89
TABELA 18 – AVALIAÇÃO GERAL DO DESEMPENHO DOS ALERTAS SUSPEITOS UTILIZADOS NESSE ESTUDO.....	90
TABELA 19 – ANÁLISE DOS CASOS POSITIVOS OBSERVADOS NOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM DOS ESTUDOS 1, 2, 3 E ADAPTADOS DA ISLH.....	91
TABELA 20 – FALSO-NEGATIVOS E VALORES PREDITIVOS NEGATIVOS OBSERVADOS NOS ESTUDOS 1, 2, 3 E ADAPTADO DA ISLH .....	92
TABELA 21 – DISCRIMINAÇÃO DOS 15 PRINCIPAIS CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUE CAUSARAM RESULTADOS FALSO-POSITIVOS NOS ESTUDOS 1, 2, 3 E ADAPTADO DA ISLH.....	94
TABELA 22 – TAXAS DE FALSO-POSITIVOS E FALSO-NEGATIVOS EM AMOSTRAS ENTRE OS LIMITES DE CORTE DOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM DA ISLH E DO ESTUDO 3.....	96

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – INDICAÇÕES CLÍNICAS PARA O EXAME DE LÂMINA DE HEMOGRAMA .....	35
QUADRO 2 – ACHADOS MORFOLÓGICOS NÃO DETECTÁVEIS OU PRECISAMENTE QUANTIFICÁVEIS PELOS ANALISADORES HEMATOLÓGICOS ATUAIS.....	37
QUADRO 3 – EXEMPLOS DE CRITÉRIOS DE AUTOVERIFICAÇÃO DE RESULTADOS DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ( <i>DELTA CHECK</i> ) .....	43
QUADRO 4 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PACIENTES E DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DE CRMHA .....	48

## LISTA DE SIGLAS

- CDML – Contagem diferencial manual de leucócitos
- CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CRMHA – Critérios para revisão microscópica de hemogramas automatizados
- CPL – Critérios de positividade em lâmina
- CT – Critérios de triagem
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- EDTA – Etileno diamino tetraacetato de sódio
- FN – Falso-negativo, falso-negativa, falso- negativos, falso-negativas
- FP – Falso-positivo, falso-positiva, falso-positivos, falso-positivas
- HCM – Hemoglobina corpuscular média
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- ICSH - *International Council for Standardization in Haematology*
- IG – *Immature granulocytes* (granulócitos imaturos)
- IRF – *Immature reticulocyte fraction* (fração de reticulócitos imaturos)
- ISLH – *International Society for Laboratory Hematology*
- ITR – Instrução de trabalho
- LSS – Lauril sulfato de sódio
- NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
- PCT – Plaquetócrito
- PDW – *Platelet distribution width* (índice de distribuição do tamanho das plaquetas)
- P-LCR – *Platelet large cell ratio* (proporção de plaquetas gigantes)
- POP – Procedimento operacional padrão
- RDW-CV – *Red cell distribution width* (índice de distribuição do tamanho dos eritrócitos – coeficiente de variação)
- RDW-SD – *Red cell distribution width* (índice de distribuição do tamanho dos eritrócitos – desvio padrão)
- RMLH – Revisão microscópica de lâminas de hemograma
- RNA – Ácido ribonucleico
- VCM – Volume corpuscular médio

VN – Verdadeiro-negativo, verdadeiro-negativa, verdadeiro-negativos, verdadeiro-negativas

VP – Verdadeiro-positivo, verdadeiro-positiva, verdadeiro-positivos, verdadeiro-positivas

VPM – Volume plaquetário médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
2.1 O HEMOGRAMA .....	19
2.2 SISTEMAS AUTOMATIZADOS EM HEMATOLOGIA.....	20
2.2.1 Aplicações e impacto laboratorial .....	21
2.3 CONFIABILIDADE DOS ANALISADORES HEMATOLÓGICOS .....	23
2.3.1 Precisão, exatidão e sensibilidade clínica.....	23
2.3.2 Monitoramento da calibração dos analisadores hematológicos.....	24
2.4 NOVOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	25
2.4.1 Índice de anisocitose ou variação do tamanho dos eritrócitos.....	26
2.4.2 Parâmetros de volume plaquetário .....	29
2.5 ALERTAS EMITIDOS PELOS ANALISADORES HEMATOLÓGICOS .....	32
2.6 EXAME DA LÂMINA DE HEMOGRAMA .....	34
2.6.1 Avaliação macroscópica da lâmina.....	39
2.6.2 Avaliação microscópica da lâmina .....	39
2.7 AUTOVERIFICAÇÃO DAS CONTAGENS OU <i>DELTA CHECK</i> .....	41
2.8 CRITÉRIOS DE REVISÃO MICROSCÓPICA DE HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS .....	43
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
4.1 LOCAL DA PESQUISA .....	47
4.2 AMOSTRAS E PACIENTES .....	47
4.3 ANÁLISE DOS HEMOGRAMAS .....	49
4.3.1 Analisadores hematológicos .....	49
4.3.2 Geração dos alertas suspeitos .....	52
4.3.3 Preparo das extensões sanguíneas.....	54
4.3.4 Contagem diferencial manual de leucócitos e revisão microscópica da lâmina de hemograma .....	54



4.4 FORMULAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE REVISÃO MICROSCÓPICA DE HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS .....	55
4.5 DESENHO DO ESTUDO DE AVALIAÇÃO DE CRMHA.....	56
4.6 AVALIAÇÃO DOS CRMHA PROPOSTOS PELO GRUPO INTERNACIONAL DE CONSENSO EM REVISÕES HEMATOLÓGICAS DA ISLH NO LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA DO HC-UFPR.....	57
4.6.1 Classificação das amostras para posterior análise com os critérios de triagem adaptados da ISLH .....	61
4.7 ESTABELECIMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM E DE NOVOS CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA PRÓPRIOS PARA O LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA DO HC-UFPR.....	61
4.7.1 Classificação das amostras para posterior análise com os novos critérios de triagem.....	66
4.8 CONTROLE DE QUALIDADE.....	67
4.9 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO .....	68
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	68
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
5.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS PARÂMETROS OBTIDOS PELA AUTOMAÇÃO.....	70
5.2 AVALIAÇÃO DA IMPLANTAÇÃO DOS CRMHA PROPOSTOS PELO GRUPO INTERNACIONAL DE CONSENSO EM REVISÕES HEMATOLÓGICAS DA ISLH NO LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA DO HC-UFPR .....	71
5.2.1 Análise dos achados morfológicos encontrados na revisão das lâminas conforme critérios de positividade em lâmina da ISLH.....	71
5.2.2 Avaliação da taxa de indicação para a RMLH de acordo com os critérios de triagem adaptados da ISLH .....	74
5.2.3 Avaliação das características de desempenho da implantação dos CRMHA adaptados da ISLH .....	75
5.2.4 Análise dos falso-negativos e dos falso-positivos após aplicação dos CRMHA adaptados da ISLH.....	76
5.3 ESTABELECIMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM E DE NOVOS CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA PRÓPRIOS PARA O LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA DO HC-UFPR.....	79
5.3.1 Análise dos achados morfológicos encontrados na revisão das lâminas conforme critérios de positividade em lâmina do HC-UFPR.....	79
5.3.2 Avaliação da taxa de indicação para a RMLH de acordo com os critérios de triagem dos Estudos 1, 2 e 3 .....	81
5.3.3 Avaliação das características de desempenho da implantação dos novos CRMHA no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR .....	83

5.3.4 Análise dos falso-negativos e dos falso-positivos dos novos CRMHA.....	92
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>115</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO 1 - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) .....</b>	<b>134</b>
<b>APÊNDICE 1 – Instrução de Trabalho ITR – UAD – HEM 005 – Padronização da leitura de lâminas de hemograma.....</b>	<b>136</b>
<b>APÊNDICE 2 – Análise completa das causas de resultados falso-positivos na avaliação dos critérios de triagem dos Estudos 1, 2, 3 e adaptados da ISLH .</b>	<b>177</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Na hematologia laboratorial atual, em razão da necessidade de redução de custos e do tempo de liberação dos resultados, tem havido um grande interesse em encontrar maneiras de diminuir a quantidade de resultados de hemogramas automatizados que devam ser revisados microscopicamente, sem sacrificar sua qualidade. O preparo, a coloração e a revisão microscópica das lâminas de hemogramas (RMLH) estão entre as tarefas mais demoradas do laboratório de hematologia, além de requererem elevada competência técnica dos profissionais envolvidos (GULATI *et al.*, 2002; PIERRE, 2002a, 2002b).

A RMLH pode ser definida como uma minuciosa e cuidadosa análise microscópica de uma extensão sanguínea devidamente bem confeccionada e corada. Tem como objetivo a procura de alterações hematológicas relevantes para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes, bem como analisar e comparar os valores fornecidos pelos analisadores hematológicos com os achados da lâmina. Em comparação com a contagem automatizada, a RMLH exige intenso trabalho e mais tempo para ser realizada. Necessita-se de profissionais devidamente treinados e qualificados, sobretudo para minimizar os erros inerentes da subjetividade das RMLH e das contagens diferenciais manuais de leucócitos (CDML) (GULATI *et al.*, 2002; PIERRE, 2002a; GREER *et al.*, 2009; GULATI *et al.*, 2013; BAIN, 2015). Uma RMLH completa deve incluir tanto a observação em baixa (x100) como em alta magnificação (x400 e/ou x1000), e, conforme o caso, um relatório com a descrição e a interpretação das alterações hematológicas pode ser gerado, a fim de facilitar o entendimento por parte dos médicos (GULATI *et al.*, 2002).

Ao longo dos anos, o desempenho e as aptidões dos analisadores hematológicos melhoraram consideravelmente, propiciando maior confiança da não realização de RMLH em amostras com resultados dentro de certos limites de triagem dos parâmetros hematológicos e sem a presença de alertas suspeitos emitidos pelos analisadores hematológicos (WARD, 2000; HOUWEN, 2001; RUZICKA *et al.*, 2001; PIERRE, 2002a, 2002b; STAMMINGER *et al.*, 2002; HUR *et al.*, 2011; BRIGGS *et al.*, 2012).

Tais limites de triagem, os alertas suspeitos e a definição de critérios de positividade em lâmina, que indiquem quais alterações morfológicas e em qual

quantidade são relevantes para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes, constituem a base do estabelecimento de critérios para revisão microscópica de hemogramas automatizados (CRMHA). A decisão de revisar microscopicamente ou não os resultados automatizados é possivelmente uma das mais complexas tarefas do laboratório de hematologia. Critérios devem ser formulados na tentativa de que as RMLH ocorram somente nos casos em que haja necessidade de confirmação dos resultados ou para fornecer informações clínicas relevantes, adicionais àquelas geradas pelos analisadores hematológicos (CORBERAND; LAHARRAGUE; FILLOLA, 1992; CHAPMAN, 2000; LANTIS *et al.*, 2003; BARNES *et al.*, 2005; FAILACE, 2009; PRATUMVINIT *et al.*, 2013; COMAR; MALVEZZI; PASQUINI, 2013).

Os CRMHA, portanto, têm por objetivo dar conformidade a resultados anômalos, verificando sua autenticidade mediante uma série de regras de decisão predefinidas pelo laboratório, indicando a realização de ações dentre as quais a principal é o preparo adequado de uma lâmina de sangue periférico para revisão microscópica e, conforme o caso, CDML (HYUN; GULATI; ASHTON, 1991; HILLMAN, 2001; PETERSON *et al.*, 2001; GULATI *et al.*, 2002; LANTIS *et al.*, 2003; FAILACE; PRANKE, 2004; BARNES *et al.*, 2005; FRIIS-HANSEN *et al.*, 2008; SEVILLA; CORRONS, 2009; CUI *et al.*, 2010; XING *et al.*, 2010; PRATUMVINIT *et al.*, 2013; COMAR; MALVEZZI; PASQUINI, 2013; COMAR; MALVEZZI; PASQUINI, 2014a).

O estabelecimento de CRMHA também tem papel importante na acreditação laboratorial, servindo como ferramenta de garantia de qualidade para os resultados reportados. Também podem ser utilizados como um excelente recurso pedagógico para a formação de alunos, residentes e na educação continuada da equipe técnica. Os principais fatores que servem de base para constituir os CRMHA podem variar de instituição para instituição, todavia, incluem características como o tipo de população atendida, a formação e a experiência da equipe médico-laboratorial, o volume de trabalho e o número de profissionais do laboratório, especialidades médicas atuantes, a complexidade dos serviços ofertados e, ainda, considerações financeiras e de políticas regulatórias das instituições (PETERSON *et al.*, 2001; GULATI *et al.*, 2002; BAIN, 2005).

Embora muitos CRMHA tenham sido propostos, dificilmente eles se enquadram inteiramente em todos os laboratórios em virtude de fatores intrínsecos.

Portanto, cada laboratório de hematologia, levando em conta as singularidades, o conhecimento e a experiência dos clínicos e dos profissionais do laboratório, deve desenvolver seus próprios CRMHA, os quais devem se basear em achados morfológicos de significado clínico relevante, assim como em critérios de triagem (CT) adequados para identificar tais achados (HYUN; GULATI; ASHTON, 1991; HILLMAN, 2001; PETERSON *et al.*, 2001; GULATI *et al.*, 2002; PIERRE, 2002a; LANTIS *et al.*, 2003; FAILACE; PRANKE, 2004; BARNES *et al.*, 2005; FRIIS-HANSEN *et al.*, 2008; WOO *et al.*, 2010; COMAR; MALVEZZI; PASQUINI, 2013).

Este estudo teve como objetivo geral a avaliação de critérios de revisão microscópica de hemogramas automatizados, CRMHA. Alguns trabalhos que propõem CRMHA recomendam que cada instituição estabeleça seus próprios critérios ou implante protocolos padronizados e aceitos internacionalmente, considerando suas necessidades e possibilidades. Portanto, esta tese relata o desenvolvimento de uma metodologia de avaliação de CRMHA para a sua implantação na rotina do Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O HEMOGRAMA

A inspeção do sangue humano há muito tempo tem sido uma ferramenta básica de diagnóstico. As invenções relacionadas à análise dos componentes do sangue sempre foram caracterizadas por observações cuidadosas e meticulosas, que resultaram em técnicas avançadas para sua época. Na década de 1850, contagens mais precisas e exatas de eritrócitos, leucócitos e plaquetas tornaram-se possíveis devido à introdução das câmaras de contagem ou hemocitômetros por Welker e Cramer. A primeira tentativa para se determinar a concentração de hemoglobina no sangue foi realizada por Gowers, em 1878. Contudo, o método da cianometahemoglobina, atualmente recomendado pelo *International Council for Standardization in Haematology* (ICSH) como método de referência, foi introduzido por Stadie em 1920. O emprego da técnica de centrifugação para a determinação do hematócrito foi aperfeiçoado por Wintrobe, em 1929. Wintrobe formulou, ainda, um método para calcular o volume e o conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos e a sua correlação nas anemias, que foi a base da classificação morfológica das anemias. O desenvolvimento das colorações do tipo Romanowsky, uma mistura de corantes ácidos e básicos, incluindo Leishman (1901), May e Grünwald (1902), Wright (1902) e Giemsa abriu um novo horizonte para o exame morfológico das células sanguíneas por meio de um microscópio, possibilitando o estabelecimento de relações entre as observações microscópicas e a aceção clínica. Na década de 1950, Coulter desenvolveu o método da impedância, que se tornou amplamente utilizado para contar células sanguíneas. A partir dessa época, o incremento das pesquisas aliado à evolução tecnológica fez com que a utilidade clínica do hemograma se consolidasse, e ele passou a ser solicitado rotineiramente para um grande número de pacientes com o propósito de diagnosticar doenças e fazer acompanhamento de terapias específicas (VIERORDT, 1852; ROMANOWSKY, 1891; WINTROBE, 1929a, 1929b, 1930; MOLDAVAN, 1934; DRABKIN, 1942; RIMINGTON, 1942; COULTER, 1953; CROSLAND-TAYLOR, 1953; COULTER, 1956; CARTWRIGHT, 1963; LEWIS, 1982; ROWAN; ENGLAND, 1986; ENGLAND,

1991; BROWN, 1993; GRONER; SIMSON, 1995; FUJIMOTO, 1999; GRONER; KANTER, 1999; LEWIS, 1999; OKADA, 1999; TATSUMI *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2001; HOUWEN, 2002; PIERRE, 2002b; WORONZOFF-DASHKOFF, 2002; SULLIVAN, 2006; LEHNER; GREVE; CASSENS, 2007; LICHTMAN *et al.*, 2007; GREER *et al.*, 2009; BAIN *et al.*, 2012; KOTTKE-MARCHANT; DAVIS, 2012; BAIN, 2015).

## 2.2 SISTEMAS AUTOMATIZADOS EM HEMATOLOGIA

A automação no setor de hematologia vem crescendo substancialmente nos últimos anos, e os fabricantes oferecem cada vez mais inovações em seus analisadores hematológicos, com o intuito de diminuir custos, a intervenção humana e o tempo de liberação dos resultados. Além disso, os resultados são mais precisos e exatos que os dos métodos manuais. Desde a década de 1980, os analisadores hematológicos automatizados vêm substituindo totalmente os métodos manuais de contagem, com exceção da contagem diferencial de leucócitos e da contagem de plaquetas por microscopia de contraste de fase, em certas situações (COMAR; PASQUINI, 2013).

Em menos de um minuto, os contadores fornecem vários parâmetros de série branca, vermelha e plaquetas, incluindo a contagem diferencial de leucócitos em três, cinco ou mais partes. Utilizam pequenos volumes de amostra, geralmente abaixo de 150  $\mu$ l, além de conferirem mais eficiência no manejo da rotina laboratorial, aumentando a produção e a qualidade dos exames e possibilitando que mais diagnósticos e tratamentos sejam realizados em tempo adequado (CHAPMAN, 2000; LEHNER; GREVE; CASSENS, 2007).

Dependendo do instrumento, pode ser possível ainda analisar células de líquidos cavitários, líquido sinovial, líquido cefalorraquidiano e células da medula óssea. Os instrumentos se baseiam em várias tecnologias de medição utilizadas de diferentes maneiras, sendo as principais delas a medida da impedância, em baixas e altas frequências; a medida do desvio da luz, a qual pode ser incidida frontalmente e lateralmente; a emissão de fluorescência e reações de absorção da luz, precedida de reações citoquímicas (BROWN, 1993; CHAPMAN, 2000; YAMAMURA *et al.*,

2000; MORI *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2007; FAILACE, 2009; COMAR; PASQUINI, 2013; BAIN, 2015).

### 2.2.1 Aplicações e impacto laboratorial

Os analisadores hematológicos podem ser divididos, em relação à sua capacidade, em analisadores pequenos, médios e grandes. Os analisadores hematológicos pequenos são geralmente encontrados em laboratórios com pouco volume de exames e, em alguns países, até mesmo em consultórios médicos. Podem, ainda, ser igualmente utilizados em hospitais e em laboratórios comerciais como apoio para analisadores maiores. Seu repertório de testes é limitado e consiste, geralmente, em contagem global de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, dosagem de hemoglobina e determinação do volume corpuscular médio. Calculam a hemoglobina corpuscular média (HCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), a amplitude de distribuição dos tamanhos dos eritrócitos, do inglês *red cell distribution width* (RDW) e o volume globular. Alguns ainda podem oferecer uma contagem diferencial de leucócitos de três a cinco partes. A capacidade de produção, entretanto, geralmente não excede 30 testes por hora, em virtude desses instrumentos não possuírem perfurador de tampa e leitor de códigos de barras. Eles devem ser alimentados manualmente, sendo necessário, dessa forma, precauções extras em relação à biossegurança (CHAPMAN, 2000).

Os analisadores hematológicos médios são utilizados em laboratórios de hospitais de pequeno porte e até mesmo em grandes hospitais e laboratórios de referência. Oferecem o mesmo repertório de testes dos analisadores pequenos. A contagem diferencial de leucócitos em cinco partes está presente na maioria deles, e a capacidade de produção varia de 50 a 100 testes por hora. Alguns analisadores oferecem contagem de reticulócitos e contagem de linfócitos CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, sendo essa última útil na verificação de rejeição de órgãos transplantados e avaliação da condição dos pacientes com HIV. Os analisadores hematológicos médios se conectam a sistemas de interfaceamento, leem códigos de barra, perfuram as tampas dos tubos, de modo a não haver intervenção manual do operador, e muitos



possuem *software* de controle de qualidade (CHAPMAN, 2000; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008).

Os analisadores hematológicos grandes são projetados para hospitais com grandes rotinas de trabalho e para laboratórios de referência, que realizam milhares de testes por dia. Esses instrumentos automatizam quase todos os aspectos dos exames hematológicos, fazem mais de 100 testes por hora e são projetados para se conectar com sistemas de informação laboratorial e até mesmo entre um equipamento e outro (KUNISHI *et al.*, 1999; CHAPMAN, 2000; HAWKER, 2007).

Alguns analisadores possuem sistemas inteligentes, baseados em programas de computador para automatizar a aplicação dos CRMHA de modo a otimizar o trabalho dos profissionais de laboratório. Os sistemas desses analisadores podem ser programados para analisar os resultados dos exames e realizar ações como, por exemplo, sugerir a realização de nova contagem em uma determinada amostra ou confeccionar e corar extensões sanguíneas de acordo com os critérios de triagem estabelecidos pelo usuário. Outros analisadores se conectam a um sistema externo capaz de analisar os critérios de triagem para indicar a necessidade de RMLH (CHAPMAN, 2000; BURGESS *et al.*, 2009).

O perfil de parâmetros hematológicos fornecidos tanto nos analisadores médios como nos grandes inclui, atualmente, novos testes, tais como contagem de reticulócitos, de granulócitos imaturos, de progenitores hematopoéticos e de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Os avanços no campo da citometria de fluxo tornaram possível realizar a contagem de blastos, eritroblastos e linfócitos atípicos nos analisadores hematológicos mais atuais (SULLIVAN, 2006; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; BRIGGS, 2009; LISSEN; JENNISSSEN, 2009).

Idealmente, cada laboratório de hematologia deve ter um analisador hematológico que faça a diferencial de leucócitos em cinco partes, que forneça os principais parâmetros eritrocitários e plaquetários e realize a contagem automatizada de reticulócitos. Essa situação não é possível em muitos laboratórios de análises clínicas por causa da relação entre custo e benefício. O custo leva em consideração o preço dos reativos, dos controles diários e calibradores e das manutenções que o aparelho necessita. O benefício se refere aos objetivos que o laboratório pretende alcançar com a aquisição do analisador hematológico, como, por exemplo, agilizar a rotina para poder implantar outras técnicas hematológicas até então não realizadas e disponibilizar novos parâmetros para melhorar a qualidade pós-analítica do

hemograma, possibilitando a divulgação desses novos parâmetros junto aos clínicos e clientes (SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

Hoje em dia, todo e qualquer analisador hematológico deve ser compatível com sistemas de interfaceamento, pelo fato de poder aumentar a produtividade e diminuir o tempo de liberação dos resultados sem expô-los a erros de digitação. Os profissionais do setor de hematologia devem ser devidamente capacitados para operar adequadamente os analisadores hematológicos. Isso inclui a passagem das amostras sanguíneas da rotina diária, as manutenções periódicas, o controle de qualidade e, por fim, a capacidade de interpretar os resultados fornecidos, correlacionando-os com os histogramas e citogramas liberados pelo analisador e, principalmente, saber utilizar essa gama de informações nas RMLH. O trabalho de adequar um analisador hematológico à rotina do laboratório é árduo, contudo, tem a vantagem da tranquilidade futura (SILVA; HASHIMOTO; ALVES, 2009).

## 2.3 CONFIABILIDADE DOS ANALISADORES HEMATOLÓGICOS

### 2.3.1 Precisão, exatidão e sensibilidade clínica

O desempenho analítico dos analisadores hematológicos é tradicionalmente avaliado por meio de testes de precisão, exatidão e sensibilidade clínica (CLSI, 2007, 2010). A precisão tem como base o coeficiente de variação de uma série de repetições da mesma amostra. Já a exatidão é o grau de concordância entre o valor médio obtido e o valor de referência aceito. A falta de exatidão e precisão na determinação dos parâmetros hematológicos pode ter como consequência um resultado equivocado em relação aos valores limítrofes estabelecidos para os intervalos de referência e limites de corte para tomada de decisões clínicas. Pode, ainda, diminuir a sensibilidade ou especificidade de um teste, dependendo da direção do desvio analítico (BUTTARELLO; PLEBANI, 2008).

A sensibilidade clínica é definida como a habilidade do analisador em fazer a distinção entre amostras normais e patológicas em termos de anormalidades quantitativas e qualitativas, tais como a presença de células imaturas e alterações

morfológicas significativas dos eritrócitos. Atualmente, a sensibilidade dos analisadores hematológicos ainda necessita de avanços adicionais, contudo, o uso combinado de anormalidades quantitativas e alertas suspeitos, permite a construção de algoritmos de tomada de decisão com uma taxa de resultados falsos negativos menores que 5% (HOFFMANN; HOEDEMAKERS, 2004; BARNES *et al.*, 2005; COMAR; PASQUINI, 2013).

A confiabilidade dos analisadores hematológicos é satisfatória para a maioria dos parâmetros do hemograma, no entanto, quando se interpreta tais resultados é importante saber que eles podem variar em consequência de três principais fatores: influências pré-analíticas, erros analíticos dos contadores, variação biológica normal e, ainda, aquela inerente ao estado de saúde dos indivíduos. As influências pré-analíticas dizem respeito ao preparo do paciente para a coleta da amostra e ao procedimento de coleta propriamente dito. Os erros analíticos (imprecisão e inexatidão) aos quais os analisadores hematológicos estão sujeitos possuem causas específicas e, embora não possam ser totalmente eliminados, podem ser minimizados por práticas adequadas de controle de qualidade (COMAR; PASQUINI, 2013).

Maciel, Comar e Beltrame (2014) avaliaram o desempenho analítico do analisador hematológico Sysmex XE-2100D, e os resultados obtidos mostraram-se de acordo com as especificações da qualidade analítica descritas na literatura, indicando confiabilidade nos resultados reportados pelo Sysmex XE-2100D.

### 2.3.2 Monitoramento da calibração dos analisadores hematológicos

A obrigação ética de produzir resultados confiáveis e reproduzíveis jamais pode ser deixada em segundo plano e, para isso, os laboratórios de hematologia devem adotar práticas que garantam o fornecimento de resultados inequívocos e relevantes para o problema clínico em questão. Nesse sentido, entre as tarefas mais importantes estão a calibração inicial dos analisadores hematológicos e o seu correto monitoramento (CEMBROWSKI; CAREY, 1989; CEMBROWSKI; SMITH; TUNG, 2010). Os calibradores próprios para analisadores possuem composição semelhante ao sangue humano, contudo, sua principal característica é o fato de

possuírem um estreito intervalo de aceitabilidade para cada parâmetro hematológico, o que permite aproximar os valores fornecidos pelo instrumento dos valores reais conhecidos. Esse fato distingue os calibradores de outros materiais, como amostras de controles comerciais, as quais possuem variação aceitável mais ampla. Amostras de pacientes processadas e validadas em um determinado equipamento nunca devem ser utilizadas como calibrador para outros equipamentos, pois não há como garantir que os valores-alvo estejam livres de fontes de variação, que podem provocar desvios analíticos significativos nos resultados do analisador a ser calibrado (COMAR; PASQUINI, 2013).

O monitoramento da calibração é realizado por meio de práticas de controle de qualidade, as quais visam detectar erros que ocorrem nas análises, prevenir a liberação de resultados incorretos e garantir que o desempenho dos analisadores seja estável ao longo do tempo. Entre as abordagens mais utilizadas no laboratório de hematologia estão incluídas a utilização de controles comerciais, de amostras retidas de pacientes e a verificação da consistência das médias móveis dos pacientes ao longo do tempo. Cada um desses processos tem certas vantagens e desvantagens em termos de praticidade e capacidades de detecção de erros analíticos, os quais, por sua vez, se enquadram em duas categorias, os erros sistemáticos e os erros randômicos ou aleatórios (GULATI; HYUN, 1986).

Cabe ressaltar que, antes da implantação de práticas de controle de qualidade para melhorar a qualidade dos resultados e do laboratório de um modo geral, deve-se primeiramente saber que nível de qualidade é necessário para satisfazer as necessidades dos profissionais do laboratório, dos médicos e dos pacientes. Esse nível de desempenho recebe o nome de especificação da qualidade (FRASER, 2001; BUTTARELLO, 2004).

## 2.4 NOVOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os analisadores hematológicos estão cada vez mais sofisticados, e o número de parâmetros disponíveis e reportáveis vem aumentando. Tais parâmetros possuem um grande potencial para serem utilizados na prática médica e laboratorial e podem permitir o desenvolvimento de novos indicativos para certas doenças e

anormalidades morfológicas. Esses novos parâmetros requerem conhecimento especializado na sua interpretação e limitações analíticas, o que torna necessário a realização de constantes atualizações por parte dos médicos e profissionais do laboratório. Para assegurar a confiabilidade dos resultados reportados os laboratórios devem realizar controle de qualidade interno desses parâmetros e garantir que as determinações sejam suficientemente precisas e exatas. Em alguns analisadores que possuem parâmetros disponíveis na ausência de material de controle interno disponibilizado pelo fabricante, os resultados devem ser reportados com cautela. É importante, ainda, que o laboratório participe de um programa de avaliação externa da qualidade, de modo a identificar e corrigir desvios analíticos (BRIGGS, 2009).

Atualmente, dentre os novos parâmetros hematológicos fornecidos pela automação, destacam-se a contagem de granulócitos imaturos, a contagem de células progenitoras hematopoéticas, a contagem de eritroblastos, a contagem de células imaturas ou atípicas, tais como blastos, a fração de reticulócitos imaturos, índices reticulocitários que refletem o seu tamanho e o conteúdo de hemoglobina, parâmetros relacionados com o tamanho e o conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos, contagem de fragmentos eritrocitários, parâmetros de volume e massa plaquetários, fração de plaquetas imaturas, contagem de plaquetas gigantes e de agregados plaquetários e parâmetros posicionais leucocitários (JACKSON; CARTER, 1993; HOUWEN, 2001; MORI *et al.*, 2003; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; BRIGGS, 2009; COMAR; SILVA, 2009; WU *et al.*, 2011). Nos parágrafos a seguir, será discutido o essencial sobre os novos parâmetros hematológicos disponibilizados pelos analisadores hematológicos empregados neste estudo.

#### 2.4.1 Índice de anisocitose ou variação do tamanho dos eritrócitos

Ambos analisadores hematológicos utilizados neste estudo calculam, a partir do histograma eritrocitário, um índice de heterogeneidade do tamanho das hemácias conhecido como RDW, do inglês *red cell distribution width*. Esse índice quase sempre é expresso como coeficiente de variação em porcentagem (RDW-CV), mas também pode ser expresso como desvio padrão (RDW-SD), particularmente nos

analísadores Sysmex, Beckman Coulter e Mindray (SYSMEX, 2003; SYSMEX, 2006; COMAR, 2012).

O RDW-SD é determinado calculando-se o índice de distribuição de tamanho dos eritrócitos no nível de 20% da altura do histograma, e é expresso em fentolitros. Já o RDW-CV é calculado matematicamente como o coeficiente de variação, ou seja,  $RDW-CV = 1SD/VCM \times 100\%$ , conforme FIGURA 1 (BUTTARELLO; PLEBANI, 2008).

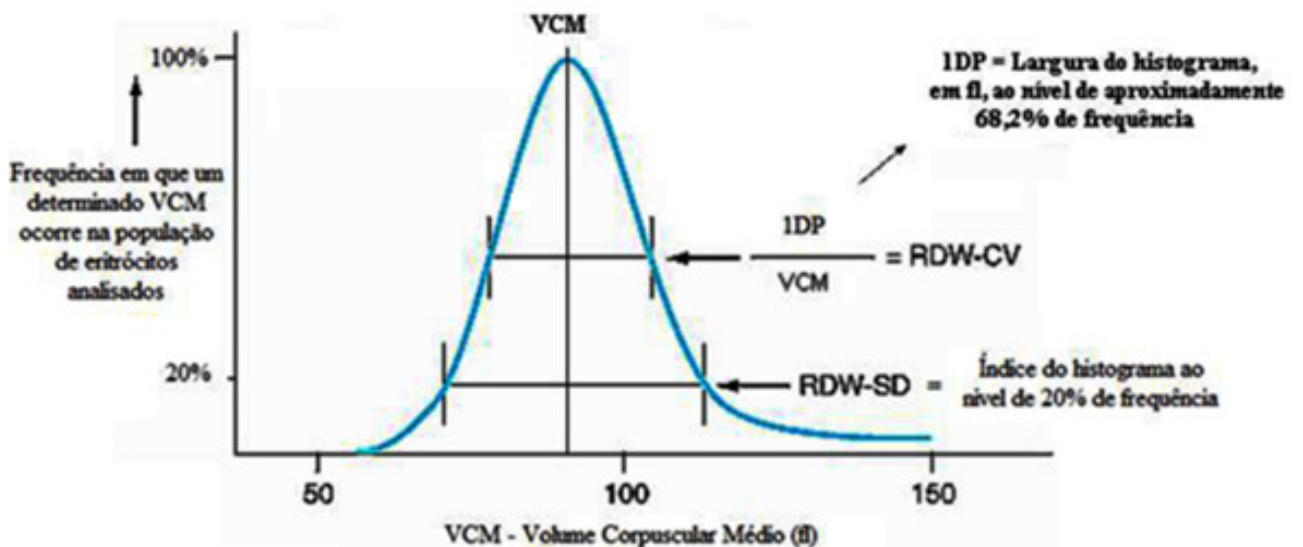


FIGURA 1 – OBTENÇÃO DO RDW-CV E RDW-SD A PARTIR DO HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DOS VOLUMES ERITROCITÁRIOS

FONTE: Adaptado de COMAR (2012)

LEGENDA: 1DP = 1 desvio padrão.

Caporal e Comar (2013) demonstraram que o RDW-CV tem mais sensibilidade em detectar anisocitose em faixas de VCM microcíticos ( $VCM < 80$  fl), e que o RDW-SD é mais sensível na detecção da anisocitose em VCM normocíticos ( $80 \leq VCM \leq 99$ ) e macrocíticos ( $VCM > 99$ ). Além disso, sugeriram que apesar do RDW-CV e do RDW-SD possuírem desempenhos diferentes em detectar anisocitose em lâmina conforme a faixa de VCM, ambos se complementam e devem ser utilizados em conjunto na identificação de heterogeneidade dos tamanhos eritrocitários.

Um RDW dentro dos valores de referência indica que os eritrócitos possuem um padrão de distribuição de tamanho que se aproxima do normal de uma população. Isso sugere a presença de uma população homogênea de células, mas não necessariamente que todas possuem tamanho normal. É importante deixar claro

que um RDW normal não exclui a presença de uma quantidade significativa de células que são muito maiores ou muito menores que a população majoritária de células. Também não significa que a população majoritária de eritrócitos seja normal (COMAR, 2012).

Valor de RDW abaixo dos valores de referência convencionais é infrequente e clinicamente insignificante. Ao contrário, RDW aumentado indica aumento da variabilidade do tamanho dos eritrócitos, também conhecida como anisocitose e comumente observada nas deficiências nutricionais, como ferro, folato, vitamina B<sub>12</sub>, uma vez que as quantidades disponíveis desses nutrientes para os precursores de células vermelhas podem variar amplamente (WALTER; GARRITY, 1993; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; BRIGGS, 2009). No entanto, evidências recentes atestam que a anisocitose é comum em outras enfermidades, como doenças cardiovasculares, tromboembolismo venoso, câncer, diabetes, pneumonia, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência hepática e renal, bem como em outras condições agudas ou crônicas; além do RDW ser considerado um fator de risco de mortalidade na população em geral, com ou sem comorbidades. O hormônio eritropoetina, que regula a produção e maturação eritrocitária é um dos componentes mais determinantes do RDW, mas uma série de alterações metabólicas subjacentes como o encurtamento dos telômeros, estresse oxidativo, inflamação, estado nutricional, dislipidemia, hipertensão, fragmentação dos eritrócitos, podem estar envolvidos na sua elevação. A questão ainda sem resposta é se a anisocitose é realmente um fator de risco ou um simples epifenômeno de um desequilíbrio biológico ou metabólico subjacente. Causa ou efeito? Parece razoável sugerir que a avaliação deste parâmetro deve ser ampliada para além do diagnóstico diferencial das anemias (SALVAGNO *et al.*, 2014).

Nos casos em que o RDW é expresso da mesma maneira, os intervalos de referência calculados para indivíduos saudáveis diferem quando realizados por analisadores de diferentes fabricantes e, algumas vezes, em diferentes modelos de um mesmo fabricante. Isso pode ser explicado pelo fato dos analisadores utilizarem diferentes algoritmos para analisar a distribuição das células, os quais são indispensáveis para eliminar valores extremos, normalmente em razão de artefatos (WALTER; GARRITY, 1993; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; BRIGGS, 2009).

## 2.4.2 Parâmetros de volume plaquetário

Ambos analisadores hematológicos utilizados neste estudo fornecem a contagem de plaquetas e o plaquetócrito (PCT). Esse último indica a massa plaquetária e é análogo ao hematócrito. Calculam o volume plaquetário médio (VPM) e, através do histograma de distribuição dos volumes plaquetários geram o índice de variação do tamanho das plaquetas, conhecido como PDW, do inglês, *platelet size deviation width*, análogo ao RDW dos eritrócitos e o P-LCR (*platelet large cell ratio*), que demonstra a proporção de plaquetas com volume superior a 12 fl em relação à população total de plaquetas, FIGURA 2 (JACKSON; CARTER, 1993; SYSMEX, 2006; COMAR; SILVA, 2009).

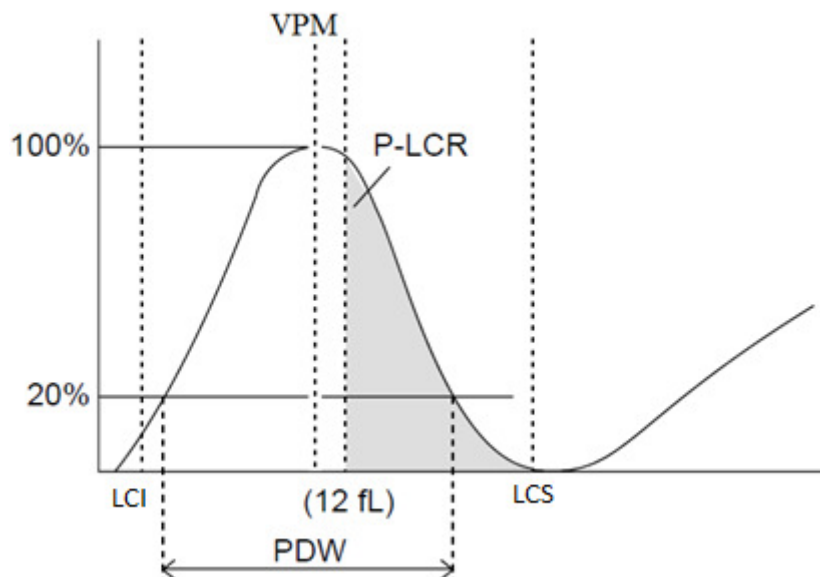


FIGURA 2 – HISTOGRAMA DE VOLUMES PLAQUETÁRIOS E DEFINIÇÃO DO VPM, PDW E P-LCR EM ANALISADORES SYSMEX

FONTE: Adaptado de SYSMEX XE-2100D – Manual do operador (2011)

LEGENDA: VPM: volume plaquetário médio; PDW: *platelet size deviation width*; P-LCR: *platelet large cell ratio*; LCI: limite de corte inferior; LCS: limite de corte superior

NOTA: O índice de distribuição dos tamanhos plaquetários ao nível de 20% é definido como o PDW e a porcentagem de plaquetas com volume superior a 12 fl é definida como o P-LCR

O *software* dos analisadores hematológicos, de posse dos dados relativos ao tamanho plaquetário, gera um histograma, que é uma curva de distribuição da frequência dos volumes plaquetários observados na população de plaquetas analisadas. Trata-se de uma curva de Gauss com distribuição do tipo *log normal*, que é utilizada para determinar a amplitude de distribuição dos volumes plaquetários. O histograma de volume plaquetário é normalmente do tipo *right*



*skewed* (tendenciosa para a direita), e variações dessa forma são anormais (COMAR; SILVA, 2009).

Nos analisadores hematológicos da linha Sysmex, o PDW é obtido no nível de 20% (o pico do histograma é de 100%) de frequência do histograma plaquetário e é expresso em fentolitros (SYSMEX, 2003, SYSMEX, 2006; COMAR; SILVA, 2009; SYSMEX, 2011).

O PCT tem sido proposto como indicador da massa das plaquetas e nos contadores da linha Sysmex é determinado através da soma dos pulsos elétricos que cada plaqueta provoca quando contada pelo princípio da impedância. Já o VPM é calculado por meio da fórmula:  $VPM (fl) = [(\text{plaquetócrito } (\%) / \text{contagem de plaquetas } (\times 10^3/\mu\text{l}))] \times 10^5$  (DOW, 1994; COMAR; SILVA, 2009, SYSMEX, 2011).

Em indivíduos saudáveis, há uma correlação não linear e inversa entre VPM e a concentração de plaquetas, sendo que o VPM tende a diminuir em indivíduos com altas contagens de plaquetas e a aumentar em contagens baixas. Essa relação é tal que a massa plaquetária, expressa pelo plaquetócrito ( $PCT = VPM \times \text{contagem de plaquetas}$ ), é relativamente constante dentro de um largo intervalo de contagens de plaquetas, resultando em ações hemostáticas equivalentes. A ampla dispersão dos valores normais limita o uso do VPM como um teste de triagem para condições clínicas caracterizadas por valores extremos, tais como trombocitopenias hereditárias (LEVIN; BESSMAN, 1983; JACKSON; CARTER, 1993; COMAR; SILVA, 2009).

Nas trombocitopenias adquiridas, VPM aumentado evidencia a produção aumentada das plaquetas e função megacariocítica normal, como púrpura trombocitopênica imunológica e coagulação intravascular disseminada, enquanto que um VPM normal ou diminuído sugere um defeito na produção de plaquetas, como na aplasia medular, leucemias agudas e quimioterapia. É útil também para monitorar a recuperação de plaquetas nas trombocitopenias, pelo seu aumento precoce. No entanto, em casos de contagens de plaquetas extremamente baixas os analisadores podem falhar em fornecer o VPM. (TONG; SETH; PENINGTON, 1987; JACKSON; CARTER, 1993; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; COMAR; SILVA, 2009; CHANDRA *et al.*, 2010).

Tem sido demonstrado que o fumo aumenta o VPM em idosos com fatores de risco para aterosclerose. O tamanho das plaquetas é um marcador importante de morte por infarto do miocárdio em homens. Aumentos anormais no PDW e

diminuição na contagem de plaquetas podem ser características de estados pré-trombóticos em doenças coronarianas (JACKSON; CARTER, 1993; COMAR; SILVA, 2009; MURAT *et al.*, 2013).

Em populações saudáveis, há uma relação direta entre VPM e PDW, e essa relação é mantida na púrpura trombocitopênica idiopática e na leucemia mieloide crônica, nas quais ambos estão aumentados. Esse fato não ocorre na anemia megaloblástica ou durante quimioterapia, nas quais o VPM diminui com o aumento do PDW. Um VPM baixo acompanhado de uma contagem de plaquetas normal, alta ou baixa, é associado com doenças que causam danos na medula óssea, como, por exemplo, quimioterapia citotóxica e supressão da medula em consequência de uma septicemia (ROPER *et al.*, 1977; VAN DER LELIE; VON DEM BORNE, 1986; DUDLEY *et al.*, 1989; DOW, 1994; OSSELAER; JAMARI; SCHEIFE, 1997; VINHOLT; HVAS; NYBO, 2014).

O EDTA é o anticoagulante mais comumente utilizado para contagens celulares, contudo, altera a morfologia plaquetária, mudando a forma elíptica nativa para a forma de esferas com pseudópodes, imediatamente após a exposição. O EDTA também promove um aumento da concentração intracelular de AMP cíclico, alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática e induzindo intumescência progressiva e diminuição da densidade óptica. Como consequência, o VPM aumenta em função do tempo de coleta quando determinado por impedância e diminui quando determinado por método ótico. De uma forma geral, o VPM pode aumentar de 7,9% dentro de 30 minutos até 13,4% no decorrer de 24 horas quando medido por impedância e diminuir até 10% quando determinado por método ótico (BOWLES *et al.*, 2005; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; BRIGGS, 2009; VINHOLT; HVAS; NYBO, 2014).

Como o método tem um impacto significativo sobre a determinação do VPM, recomenda-se que o anticoagulante utilizado, o tempo decorrido da coleta até a análise, a temperatura de armazenamento e a tecnologia empregada sejam especificados nos laudos de hemograma para uma interpretação adequada (COMAR; SILVA, 2009). Quando essas variáveis laboratoriais são padronizadas, estudos têm mostrado que o VPM é muito constante em exames consecutivos, com um coeficiente de variação menor que 4% (SIEBERS; WAKEM; CARTER, 1989).

Valores fora dos limites normais são indicativos de distúrbios da trombopoese, porém, se métodos não padronizados são empregados, a significância

das alterações no VPM são questionáveis e qualquer relação com estados patológicos pode ser obscura (JACKSON; CARTER, 1993; COMAR; SILVA, 2009; VINHOLT; HVAS; NYBO, 2014).

## 2.5 ALERTAS EMITIDOS PELOS ANALISADORES HEMATOLÓGICOS

Os analisadores hematológicos fornecem, simultaneamente com os parâmetros básicos do hemograma, os chamados alertas, os quais sinalizam sobre a possível ocorrência de anormalidades quantitativas ou qualitativas nas amostras que estão sendo analisadas. Os alertas quantitativos são normalmente chamados de alertas definitivos e são acionados quando ultrapassam limites numéricos preestabelecidos dos parâmetros hematológicos, ou seja, quando há contagens celulares aumentadas ou diminuídas. Já os alertas qualitativos são usualmente chamados de alertas suspeitos e são produzidos quando o *software* do analisador detecta a presença de distribuições celulares anormais ou de tipos celulares que não podem ser atribuídos a qualquer categoria específica de células. As células anormais possuem características tais como tamanho celular, tamanho nuclear e conteúdo de grânulos, que as diferenciam das células normais (DAVIS; BARNES, 2012; BRIGGS; BAIN, 2012).

Normalmente, as amostras sinalizadas com alertas definitivos ou suspeitos são encaminhadas para a RMLH para confirmação dos resultados automatizados e para procura de alterações morfológicas relevantes. O emprego adequado desses alertas possibilita o uso direcionado das RMLH, promovendo um aumento da eficiência e produtividade em laboratórios com grandes rotinas diárias de hemogramas e conferindo mais confiabilidade e segurança aos profissionais do laboratório (KOEPEKE, 1991).

Nas avaliações de desempenho de analisadores hematológicos, o termo utilidade dos alertas suspeitos se refere à habilidade que eles possuem para identificar alterações morfológicas e tipos celulares anormais no hemograma de indivíduos com determinadas doenças. É avaliada por meio da comparação da contagem diferencial automatizada, juntamente com os alertas suspeitos fornecidos,

com um método microscópico de referência (CLSI, 2007; KANG *et al.*, 2008), o qual utiliza critérios de positividade em lâmina para as alterações avaliadas.

Apesar dos grandes avanços observados nos analisadores hematológicos, ainda existem problemas associados com a análise de amostras de sangue anormais. Pode-se facilmente compreender a dificuldade que um analisador hematológico encontra ao avaliar células anormais, incluindo blastos, granulócitos imaturos, linfócitos atípicos, eritroblastos e até mesmo amostras com hemoparasitas. De modo geral, os analisadores são projetados para reconhecer células normais, e os alertas suspeitos são emitidos pelos analisadores na tentativa de suprimir limitações na identificação e quantificação de células anormais.

Contudo, a presença de um ou mais alertas suspeitos não afirma que determinada anormalidade deva estar presente, apenas indica que há uma probabilidade aumentada dela ocorrer; e a mesma só poderá ser excluída ou confirmada pela RMLH (COMAR; PASQUINI, 2013).

Uma lâmina de hemograma é revisada a fim de fornecer informações adicionais, geralmente não discriminadas pelos analisadores ou simplesmente para confirmar os resultados quali-quantitativos automatizados. Se nenhuma anormalidade qualitativa é identificada microscopicamente e a distribuição quantitativa das populações de células normais na lâmina correspondem aos valores automatizados, os resultados do analisador podem ser liberados diretamente. O grande desafio é reduzir o número de lâminas examinadas sem que ocorra omissão de informações relevantes para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes (GRONER; SIMSON, 1995; BRIGGS *et al.*, 2011).

Em hospitais de grande porte, com elevada incidência de anemias, trombocitopenias, neutropenia e neutrofilia decorrentes de doenças não hematológicas, esses alertas suspeitos podem ser de grande utilidade se eles identificarem corretamente amostras com células anormais (CORNBLEET *et al.*, 1992).

Na comparação com a revisão microscópica em lâminas, a sensibilidade de um alerta suspeito se refere à capacidade do analisador de detectar amostras com achados morfológicos relevantes, ou seja, as verdadeiro-positivas; a especificidade é a capacidade em detectar amostras verdadeiro-negativas; o valor preditivo positivo é a probabilidade de um resultado positivo ou sinalizado pelo analisador, ser verdadeiramente positivo e o valor preditivo negativo é a probabilidade de um

resultado negativo ser verdadeiramente negativo. A eficiência expressa a quantidade de casos verdadeiro-positivos e verdadeiro-negativos classificados corretamente. Idealmente, um alerta suspeito deve apresentar uma baixa taxa de falso-positivos e falso-negativos, de modo a resultar em uma elevada eficiência para identificar amostras com anormalidades morfológicas relevantes. No entanto, sabe-se que há situações em que a ocorrência de falsos positivos e falsos negativos é inevitável. Nesse sentido, os esforços devem ser direcionados para manter as taxas de falso-negativos dentro de limites seguros e aceitáveis (GRONER; SIMSON, 1995; BRIGGS, 2012).

## 2.6 EXAME DA LÂMINA DE HEMOGRAMA

Nos tempos atuais, em que tecnologias avançadas são utilizadas no diagnóstico de muitas doenças, o exame microscópico de uma extensão sanguínea ainda se destaca como uma ferramenta de diagnóstico rápida e de baixo custo, realizada na maioria dos laboratórios clínicos. Portanto, compreender quando é necessário analisar uma extensão sanguínea e como fazer tal procedimento é fundamental para o uso eficiente desse recurso (GULATI *et al.*, 2013). Nesse sentido, critérios de triagem baseados em valores considerados anormais das contagens automatizadas e na presença de alertas suspeitos produzidos pelos analisadores hematológicos podem ser programados junto ao sistema de informação dos analisadores hematológicos, e se os resultados de uma determinada amostra não satisfazem tais critérios, a verificação microscópica da extensão sanguínea torna-se compulsória. A RMLH também deve ser realizada em decorrência de solicitações médicas baseadas em aspectos clínicos observados (QUADRO 1).

<b>INDICAÇÕES CLÍNICAS PARA O EXAME DE LÂMINA DE HEMOGRAMA</b>
Características sugestivas de anemia, icterícia não esclarecida ou ambas.
Características sugestivas de doença falciforme (dactilite ou aumento repentino do tamanho do baço e palidez em crianças pequenas, ou em crianças maiores e adultos, dor abdominal, torácica e em membros).
Características sugestivas de trombocitopenia (petéquias, equimoses e hematomas).
Características sugestivas de neutropenia (infecções severas não esclarecidas).
Características sugestivas de linfoma ou outra doença linfoproliferativa (linfadenopatia, esplenomegalia, aumento do timo ou outro órgão linfoide, lesões de pele sugestivas de infiltração, dores nos ossos e sintomas sistêmicos, como febre, suor, prurido e perda de peso).
Características sugestivas de doença mieloproliferativa (esplenomegalia, pletora, pruridos ou perda de peso).
Suspeita de coagulação intravascular disseminada.
Falência renal aguda ou de início recente ou aumento renal não esclarecido, particularmente em crianças.
Após um exame de retina, hemorragias, exsudatos, sinais de hiperviscosidade ou atrofia ótica.
Suspeita de infecções bacterianas ou parasitárias que podem ser diagnosticadas a partir do exame de uma lâmina de sangue periférico.
Características sugestivas de neoplasias não hematopoéticas disseminadas (perda de peso, mal-estar, dor óssea).
Problemas de saúde em geral, frequentemente com mal-estar e febre, sugerindo mononucleose infecciosa ou outras infecções virais ou doenças inflamatórias e neoplásicas.
Leucocitose em pacientes com doenças em estágios terminais como tumores sólidos, nas quais, muitas vezes, estratégias paliativas são apropriadas (em alguns casos, a leucocitose registrada pelos analisadores hematológicos automatizados decorre da presença de células de carcinomas ou de sarcomas no sangue periférico, e quando essas células são visualizadas e corretamente identificadas, um diagnóstico definitivo pode ser feito sem extensos procedimentos invasivos).

QUADRO 1 – INDICAÇÕES CLÍNICAS PARA O EXAME DE LÂMINA DE HEMOGRAMA  
 FONTE: Adaptado de BAIN (2005); SILL; NEUBAUER (2005)

Os médicos geralmente solicitam o exame microscópico da lâmina de hemograma em decorrência de características clínicas ou em virtude de alguma anormalidade observada em hemograma anterior. Já os profissionais do laboratório de hematologia solicitam a revisão microscópica caso seja verificado algum resultado anormal das contagens ou produção de algum alerta suspeito pelos instrumentos automatizados (BAIN, 2005).

A RMLH pode auxiliar no diagnóstico de doenças que envolvem todas as células do sangue, contudo, a revisão microscópica da morfologia da série vermelha é um passo importante na avaliação de pacientes com anemia, e pode ser

considerada a melhor ferramenta para recomendar condutas clínicas e laboratoriais e para selecionar os testes adequados para o diagnóstico definitivo (FORD, 2013).

A *International Society for Laboratory Hematology* (ISLH) publicou um conjunto de 41 diretrizes que podem ser aplicadas como critérios para revisão de hemogramas automatizados (disponíveis em <[www.islh.org](http://www.islh.org)>) (BARNES *et al.*, 2005).

Para realizar o exame microscópico, é fundamental o preparo adequado de uma extensão sanguínea, que após ser corada, é levada ao microscópio ótico no intuito de constatar anormalidades quantitativas e qualitativas das células. Pode limitar-se a um rastreamento rápido da extensão para confirmar ou refutar os valores fornecidos pela automação, ou pode incluir um exame completo com a contagem diferencial manual de leucócitos e revisão morfológica com quantificação das alterações e emissão de comentários interpretativos (GULATI *et al.*, 2013).

A quantidade de hemogramas que necessitam de revisões microscópicas pode variar muito entre os laboratórios, alcançando taxas de revisão entre cinco e 90% na rotina laboratorial. Essa tarefa é altamente dependente da habilidade e acuidade visual do observador e da qualidade da coloração e da extensão sanguínea. Quando bem feita, fornece muitas informações diagnósticas importantes para um grande número de situações. Contudo, cabe ressaltar que a subjetividade inter-observadores e a diferenciação de apenas 100 leucócitos resultam em grande variação das contagens manuais quando comparadas com as contagens automatizadas, as quais são muito confiáveis para tipos celulares normais (RÜEMKE, 1985; HOUWEN, 2001; CORNBLEET, 2002; LICHTMAN *et al.*, 2007; GREER *et al.*, 2009). Apesar disso, esse método ainda se mantém como o cerne da identificação das células do sangue, fornecendo grandes contribuições para o diagnóstico e tratamento de doenças, sobretudo pelo fato de muitas células anormais e alterações morfológicas de eritrócitos, leucócitos e plaquetas ainda não serem totalmente reconhecidas ou precisamente detectáveis pelos analisadores hematológicos atuais, conforme QUADRO 2.

Briggs *et al.* (2011) comentaram que a microscopia tradicional sempre será utilizada nos laboratórios de hematologia de rotina em combinação com sistemas automatizados, e até mesmo com sistemas de imagens, os quais estão proporcionando avanços adicionais na tecnologia de reconhecimento automatizado de células sanguíneas.

<b>Achados observados na extensão sanguínea</b>	<b>Condições clínicas</b>
Acantócitos	Acantocitose hereditária, abetalipoproteinemia, coreia-acantocitose, doença hepática avançada, hipoesplenismo, deficiência de piruvato quinase, fenótipo McLeod, queimaduras severas, anorexia nervosa/fome, deficiência de vitamina E, hipotireoidismo, mixedema, doença renal
Agregados plaquetários e satelitismo plaquetário	Pseudotrombocitopenias
Anel de Cabot	Anemia megaloblástica
Bastonete de Auer	Leucemias mieloides agudas
Codócitos	Talasseмии e doenças hepáticas, hipoesplenismo, hemoglobinopatias C e SC, deficiência de ferro
Corpúsculos de Howell-Jolly	Hipoesplenismo, eritroblastose, mielodisplasia, anemia megaloblástica, pós-quimioterapia
Cristais de hemoglobina C	Hemoglobinopatia C
Dacriócitos	Mielofibrose com metaplasia mieloide
Desvio nuclear à esquerda, granações tóxicas, corpúsculos de Döhle e vacúolos citoplasmáticos	Infecção e doenças hereditárias dos leucócitos
Drepanócitos	Anemia falciforme, hemoglobinopatias SC e SD
Eliptócitos	Eliptocitose hereditária, deficiência de ferro, anemia megaloblástica, pós-quimioterapia, piropoiquilocitose hereditária, recém-nascidos
Equinócitos	Artefato, insuficiência renal, pós-transfusão, deficiência de fosfato, queimaduras
Eritroblastos	Múltiplas
Esferócitos e aglutinação eritrocitária	Anemia hemolítica autoimune
Esferócitos e policromatofilia	Esferocitose hereditária
Estomatócitos	Artefato, estomatocitose hereditária, doença hepática obstrutiva, síndrome do Rh nulo
<i>Faggot cells</i>	LMA M3
Fragmentos eritrocitários ou esquistócitos	Anemia hemolítica microangiopática, coagulação intravascular disseminada, hemólise secundária a válvulas cardíacas, queimaduras severas, piropoiquilocitose hereditária
<i>Hairy cells</i>	Tricoleucemia
Hemoparasitas	Malária
Hipogranulação e degranulação de neutrófilos e plaquetas	Síndromes mielodisplásicas (SMD)
Linfoblastos pequenos	Leucemias linfoides agudas
Linfócitos atípicos ou reativos	Viroses
Linfócitos clivados, lobulados e foliares	Doenças linfoproliferativas
Neutrófilos hiperssegmentados	Anemia megaloblástica

QUADRO 2 – ACHADOS MORFOLÓGICOS NÃO DETECTÁVEIS OU PRECISAMENTE QUANTIFICÁVEIS PELOS ANALISADORES HEMATOLÓGICOS ATUAIS

continua



conclusão

Achados observados na extensão sanguínea	Condições clínicas
Pelger Huët e pseudo Pelger-Huët	Doenças hereditárias dos leucócitos e SMD
Plaquetas cinzentas	SMD e síndrome das plaquetas cinzentas
Plasmócitos e formação de <i>Rouleaux</i>	Hipergamaglobulinemia monoclonal ou policlonal
Policromatofilia	Reticulocitoses
Ponteado basófilo	Intoxicação pelo chumbo e talassemias, mielodisplasias, deficiência de pirimidina 5' nucleotidase, pós-quimioterapia

QUADRO 2 – ACHADOS MORFOLÓGICOS NÃO DETECTÁVEIS OU PRECISAMENTE QUANTIFICÁVEIS PELOS ANALISADORES HEMATOLÓGICOS ATUAIS

FONTE: Adaptado de FAILACE (2009); COMAR; PASQUINI (2013); FORD (2013)

NOTA: As condições clínicas apresentadas são apenas exemplos, não restringindo a ocorrência dos achados morfológicos a tais condições. Achados morfológicos como *faggot cells* e esquistócitos são clinicamente relevantes, pois as doenças a eles associadas requerem diagnóstico urgente de modo que o tratamento possa ser iniciado mais precocemente, contribuindo para a redução significativa da mortalidade e morbidade.

Na literatura, existem vários sistemas de classificação para quantificar e relacionar o grau das alterações morfológicas das células sanguíneas. Alguns utilizam uma escala de um a quatro cruces e outros de um a três cruces, a qual está vinculada à quantidade da alteração observada. A International Society for Laboratory Hematology (ISLH) sugere que mudanças  $\geq 2+$  (duas cruces) são clinicamente relevantes (BARNES *et al.*, 2005). Outros autores utilizam pontos de corte para definir se uma alteração é clinicamente significativa. Por exemplo, quando mais de 5% dos eritrócitos apresentam determinada anormalidade morfológica, ela passa a ser relevante. Contudo, deve-se entender claramente que, em alguns casos, uma quantidade muito inferior pode ser crítica e clinicamente relevante, como a presença de 1% a 2% (1+) de esquistócitos em pacientes com trombocitopenia, a qual pode significar um processo microangiopático tal como a púrpura trombocitopênica trombótica, e que o reconhecimento precoce dessas alterações pode salvar vidas (BARTH, 2012).

Alguns cuidados devem ser tomados pela equipe do laboratório de hematologia no sentido de padronizar os procedimentos de classificação das alterações morfológicas na leitura das lâminas. Tais cuidados conferem mais qualidade nas leituras, tornando possível a comparação de resultados sequenciais emitidos por diferentes profissionais do mesmo laboratório. Neste estudo, foram utilizadas diretrizes para a leitura de lâminas na tentativa de uniformizar os termos utilizados nos relatórios de resultados dos hemogramas para as diversas alterações passíveis de ocorrência. Essas diretrizes foram estabelecidas por meio de pesquisas

em literaturas e da experiência dos profissionais do laboratório e estão descritas na forma de Instrução de Trabalho (APÊNDICE 1).

### 2.6.1 Avaliação macroscópica da lâmina

A avaliação macroscópica da lâmina pode fornecer indicativos da alteração que será observada na microscopia ou do resultado da contagem a ser verificada. Uma extensão de sangue que é mais azulada que o normal pode sugerir a presença de determinadas proteínas no plasma, como no mieloma múltiplo, e o *rouleaux* pode ser visto na microscopia. Uma extensão com aparência granular pode indicar presença de aglutinação eritrocitária, evidenciando a presença de crioaglutininas. Buracos na extensão podem significar que o paciente tem hiperlipidemia e que os parâmetros de série vermelha devem ser revisados quanto a possível interferência da lipemia. Contagens de leucócitos e de plaquetas extremamente altas podem ser detectadas pela presença de pontinhos azuis nos arredores da cauda da extensão. Extensões extremamente finas e com tonalidade clara podem sugerir uma amostra anêmica. Portanto, valiosas observações podem ser obtidas antes da análise microscópica (MAEDEL; DOIG, 2012).

### 2.6.2 Avaliação microscópica da lâmina

Uma avaliação inicial da lâmina corada em baixo aumento (x100) permite acessar a qualidade da extensão sanguínea em relação à distribuição das células, tamanho da área de trabalho, formação de *rouleaux* e aglutinação, qualidade da coloração e área ideal para avaliação dos detalhes morfológicos. As bordas podem conter acúmulo de leucócitos, agregados plaquetários e filamentos de fibrina, os quais indicam necessidade de recoleta. É possível a avaliação parcial das contagens, se muito altas ou muito baixas, e observação de células grandes como blastos, promielócitos, fragmentos de megacariócitos e linfócitos atípicos, além de

duplas populações de eritrócitos e parasitas grandes como a filaria (MAEDEL; DOIG, 2012; PETERSON *et al.*, 2012; BARTH, 2012).

Apesar dos erros inerentes a esse tipo de contagem por microscopia, a estimativa microscópica das contagens automatizadas serve como controle interno de qualidade, devendo a média ser obtida pela contagem mínima de dez campos microscópicos, independente do aumento utilizado (ESCOBAR *et al.*, 2002; COMAR; DANCHURA; SILVA, 2009; MAEDEL; DOIG, 2012).

No aumento de 400x, faz-se a seleção da área de trabalho, na qual se pode fazer a contagem diferencial de leucócitos e a avaliação da morfologia celular, caso seja um profissional experiente. Células grandes, como neutrófilos e monócitos, podem se concentrar nas bordas, resultando no acúmulo de células menores, como os linfócitos, no centro da extensão. Tal fato aumenta a imprecisão da contagem diferencial manual de leucócitos. Discrepâncias muito grandes entre a estimativa leucocitária e a contagem automatizada podem indicar problemas, como troca de amostra ou erros de identificação (MAEDEL; DOIG, 2012; PETERSON *et al.*, 2012; BARTH, 2012).

No aumento de 1000x com objetiva de imersão também se pode fazer a contagem diferencial de leucócitos, sobretudo para iniciantes. É nesse aumento que deve ser realizada a confirmação dos detalhes e nuances morfológicos de células imaturas ou com morfologia duvidosa, assim como a quantificação das alterações dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Nesse aumento, os neutrófilos segmentados são mais facilmente diferenciados dos bastões e as inclusões celulares são mais facilmente vistas. Pode-se estimar a contagem de plaquetas e correlacionar com a contagem automatizada, contudo, deve ser feita na região da lâmina em que os eritrócitos tenham um mínimo de sobreposição (COMAR; DANCHURA; SILVA, 2009).

Pode-se, ainda, estimar o tamanho dos eritrócitos por meio da comparação com o núcleo dos linfócitos pequenos. Eritrócitos normais possuem diâmetro semelhante ao do núcleo de um linfócito pequeno. A macrocitose e a microcitose são observadas quando o tamanho da maioria dos eritrócitos foge a essa regra. Tal procedimento é uma boa ferramenta de controle interno de qualidade do VCM fornecido pela automação (LEWIS, 1990; TKACHUK; HIRSCHMANN, 2007).

A análise microscópica deve ser realizada na melhor região da extensão, a qual se situa entre a região grossa da lâmina, em que a gota de sangue é

inicialmente colocada para confeccionar a extensão, e a região muito fina. Nessa região, denominada de área de trabalho, os eritrócitos estão uniformemente distribuídos, com poucos se tocando ou se sobrepondo. Nessa área, os eritrócitos possuem a forma clássica de disco bicôncavo, com o halo central pálido bem evidenciado. Quando a área de trabalho de uma extensão com contagem normal é vista, há geralmente cerca de 200 a 250 eritrócitos por campo de 1000x. Em amostras com contagens globais dentro dos valores de referência, a área de trabalho deve conter uma área suficientemente grande para permitir uma avaliação morfológica adequada e possibilitar a contagem de 100 leucócitos com facilidade. Uma extensão adequada deve possuir uma transição gradual na espessura da área grossa para a área fina, terminando em uma borda em linha reta ou levemente arredondada (CLSI, 2007).

Antes de iniciar a revisão das lâminas, deve-se verificar se o relatório fornecido pelos analisadores hematológicos das contagens automatizadas confere com a identificação da extensão sanguínea. Para se obter resultados mais precisos com as estimativas de leucócitos e plaquetas, sugere-se que os laboratórios padronizem os procedimentos de estimativa microscópica em relação aos diâmetros das oculares microscópicas utilizadas, à região ótima de leitura das lâminas e ao pessoal envolvido. Isso pode ser feito com um fator de correção em relação às técnicas originais descritas na literatura, o qual é obtido pela equação da reta ( $y = ax + b$ ), quando se faz análise de correlação em programas como o Excel (Microsoft Corporation) (COMAR; DANCHURA; SILVA, 2009).

## 2.7 AUTOVERIFICAÇÃO DAS CONTAGENS OU *DELTA CHECK*

*Delta check* (checagem da diferença) é uma técnica de controle de qualidade de amostras clínicas, que mede a diferença entre os resultados de duas análises consecutivas de um mesmo paciente, ou seja, um resultado atual é comparado com o seu resultado anterior a fim de detectar se a diferença entre os dois resultados excederam critérios predefinidos. Se a diferença é menor que o critério predefinido, o resultado é automaticamente reportado. Entretanto, se a diferença ultrapassa um critério predefinido, a nova amostra é sinalizada, indicando

que há necessidade de, por exemplo, examinar ou reanalisar a lâmina e as condições da amostra por causa de um possível erro preanalítico, analítico, de escrita de resultado e erros randômicos que não são detectados com o emprego dos métodos de controle de qualidade comumente utilizados. A utilização do *delta check* aumenta a confiabilidade dos resultados reportados, contudo, o uso excessivo e inapropriado de métodos de *Delta check* pode atrasar a liberação dos resultados e aumentar a carga de trabalho devido à necessidade maior de validações manuais dos resultados dos exames. A maioria dos laboratórios que contam com um método padrão de *delta check* utilizam a diferença absoluta e a diferença relativa entre os valores dos parâmetros (LADENSON, 1975; FRASER, 2001; FRASER *et al.*, 2002; BUTTARELLO, 2004; PARK *et al.*, 2012; CEMBROWSKI; CLARKE, 2015).

O *delta check* funciona bem quando o laboratório dispõe de um bom sistema de informação, que permite inserir os valores limites e sinalize os resultados alterados. Os erros mais comuns e graves detectados pelo *delta check* são falhas na homogeneização da amostra, microcoágulos que interferem em contagens sucessivas de plaquetas e trocas de amostras. Para que a utilização do *delta check* seja mais adequada, em algumas situações, como, por exemplo, a contagem de leucócitos, o resultado anterior deve ter sido liberado dentro de até sete dias antes do resultado atual a fim de não causar validações manuais desnecessárias, decorrentes da ampla variação biológica que este parâmetro pode apresentar (BARNES *et al.*, 2005). O QUADRO 3 mostra sugestões de critérios de autoverificação de resultados (*delta check*). Os critérios podem ser em valores relativos ou absolutos.

Essa diferença depende de muitas variáveis tanto na amostra analisada como do método de *delta check* utilizado, e os limites que são propostos são um compromisso entre variações fisiológicas devido à variação biológica intraindividual e as modificações que ocorrem com as alterações no perfil de saúde do paciente ou erros analíticos ou pré-analíticos. Não há consenso sobre os limites de *delta check*, que dependem do tipo de paciente e do prazo utilizado entre análises consecutivas. É intuitivo que se o limite delta escolhido seja muito pequeno, haverá excessivas validações manuais injustificadas (falsos positivos). Se for muito grande, há um risco de não identificar situações clínicas que exigem uma análise mais aprofundada (falsos negativos). A principal meta para os CRMHA são aumentar o número de resultados de testes que podem ser liberados sem a revisão e / ou reanálise da

lâmina de sangue periférico. No entanto, não há consenso sobre as diversas abordagens ou os limites de revisão (ambos os limites de ação e de *delta check*) (BUTTARELLO, 2004).

<b>Parâmetro</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Delta check (%)</b>	<b>Delta check (absoluto)</b>
Leucócitos	2,0 a 50,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	50	10,0 x 10 <sup>3</sup> /μl
Eritrócitos	2,0 a 8,0 x 10 <sup>6</sup> /μl	50	1,5 x 10 <sup>6</sup> /μl
Hemoglobina	8,0 a 20,0 g/dl	30	4 g/dl
Volume globular	23 a 60%	12%	
VCM	50 a 110 fl	7	6 fl
HCM	Qualquer valor	10	-
CHCM	30 a 45%	-	3%
RDW-CV	Qualquer valor	-	2,5%
Plaquetas	20 a 1000 x 10 <sup>3</sup> /μl	30	150 x 10 <sup>3</sup> /μl
VPM	Qualquer valor	-	2,5
Neutrófilos	Qualquer valor		
Bastões	≤ 30%	-	20
Monócitos	Qualquer valor	30	1,0 x 10 <sup>3</sup> /μl
Eosinófilos	≤ 20%	50	% ± 8
Linfócitos atípicos	10 a 20%	-	% ± 15
Linfócitos atípicos	≤ 10%	-	% ± 10
Metamielócitos	10 a 20%	-	% ± 20
Metamielócitos	≤ 10%	-	% ± 10
Mielócitos	5 a 20%	-	% ± 10
Mielócitos	≤ 5%	-	% ± 5
Promielócitos	3 a 10%	-	% ± 10
Promielócitos	≤ 3%	-	% ± 4
Blastos	10 a 20%	-	% ± 20
Blastos	5 a 10%	-	% ± 10
Blastos	≤ 5%	-	% ± 5
Eritroblasto/100 leucócitos	75 a 100%	-	% ± 50
Eritroblasto/100 leucócitos	50 a 75%	-	% ± 25
Eritroblasto/100 leucócitos	25 a 50%	-	% ± 20
Eritroblasto/100 leucócitos	≤ 25%	-	% ± 15

QUADRO 3 – EXEMPLOS DE CRITÉRIOS DE AUTOVERIFICAÇÃO DE RESULTADOS DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS (*DELTA CHECK*)

FONTE: Adaptado de DAVIS (1994a, 1994b); GULATI *et al.* (2002); BUTTARELLO (2004)

## 2.8 CRITÉRIOS DE REVISÃO MICROSCÓPICA DE HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS

O hemograma é um dos exames laboratoriais mais comumente solicitado no laboratório de análises clínicas e, atualmente, muitos analisadores hematológicos são capazes de fornecer o hemograma de maneira bastante confiável e eficiente. Entretanto, o exame microscópio de uma lâmina de sangue periférico por um

profissional experiente é clinicamente útil em uma série de circunstâncias e por uma variedade de razões (BAIN, 2005).

Como já dito anteriormente, na hematologia laboratorial dos dias atuais, há um grande interesse em encontrar maneiras de diminuir o número de resultados de hemograma que devem ser revisados por meio do preparo e exame de uma lâmina de sangue periférico. É reconhecido que os sistemas automatizados são superiores aos manuais para contar leucócitos, eritrócitos e plaquetas, assim como para realizar a contagem diferencial de leucócitos em amostras contendo tipos celulares bem caracterizados, ou seja, células maduras. Já a microscopia visual é superior à automatizada para proceder à diferenciação de células baseada em nuances dos aspectos citológicos, especialmente nas células imaturas (GULATI *et al.*, 2002; PIERRE, 2002a).

Em muitas amostras, em virtude da confiabilidade dos analisadores, já não é necessário realizar a revisão microscópica ou a contagem diferencial de leucócitos. Tudo isso, juntamente com a necessidade de redução de custos, assim como a falta de pessoal habilmente treinado, tem aumentado a necessidade de reduzir o número de procedimentos manuais sem sacrificar a qualidade dos resultados (GULATI *et al.*, 2002; PIERRE, 2002a).

Visto que o principal procedimento manual é a revisão microscópica da lâmina, o fato de decidir se uma lâmina será ou não revisada desempenha um papel fundamental nos custos, na produtividade e na rapidez de liberação dos resultados em um laboratório de hematologia. As revisões microscópicas das lâminas devem ocorrer nos casos em que haja necessidade de confirmação dos resultados ou para fornecer informações adicionais àquelas geradas pelos analisadores hematológicos (BARNES *et al.*, 2005).

Por intermédio da utilização dos analisadores hematológicos modernos, ocorreu um grande aumento na exatidão e na precisão dos parâmetros para todos os tipos celulares presentes no sangue, fato esse que, aliado à capacidade desses analisadores em fornecer alertas suspeitos que indicam tipos celulares anormais, tem aumentado a confiança no fato de que amostras com resultados dentro de certos limites numéricos e sem a presença de certos alertas suspeitos não necessitam de revisão microscópica. Com isso, uma significativa redução no número de revisões microscópicas pode ocorrer sem comprometer o diagnóstico do

paciente, podendo, ainda, diminuir os custos para o laboratório (PIERRE, 2002a; GULATI *et al.*, 2002; BARNES *et al.*, 2005).

Em 2005, o Grupo de Consenso Internacional para Revisões Hematológicas da ISLH (BARNES *et al.*, 2005), formado por 20 *experts*, estabeleceu diretrizes para implantação de critérios de revisão microscópica de hemogramas automatizados, e propuseram um passo a passo para a validação dos critérios de revisão de lâminas nas rotinas laboratoriais. Esse grupo estabeleceu o grau quantitativo em que as alterações morfológicas são relevantes para serem descritas nos laudos de hemogramas, e a isso denominou de critérios de positividade em lâmina (CPL) (ex.: alterações de série vermelha 2+/moderado ou maior; granulações tóxicas 2+/moderado ou maior; linfócitos atípicos > 5%). Também estabeleceu critérios de triagem (CT), no intuito de capturar a maioria das amostras com alterações morfológicas relevantes ou CPL. Portanto, CRMHA compreendem a elaboração de CT para capturar amostras com CPL.

Os CT propostos por Barnes *et al.* (2005) basearam-se no estabelecimento de limites de variação dos parâmetros hematológicos quantitativos para distinção entre amostras normais e anormais (ex.: revisar a lâmina se plaquetas forem < 100.000/ $\mu$ l ou > 1000.000/ $\mu$ l) e na utilização dos alertas suspeitos (*flags*) emitidos pelos analisadores, que sugerem anormalidades morfológicas (ex.: revisar a lâmina na presença do alerta suspeito de blastos).

Embora CRMHA tenham sido propostos na literatura, dificilmente eles se enquadram em todos os laboratórios de hematologia em razão de fatores como: tipo de população atendida, tipo de analisadores hematológicos utilizados, volume de trabalho, quantidade de profissionais disponíveis, restrições do sistema de informação hospitalar e de interfaceamento dos resultados laboratoriais.

O objetivo principal da formulação de CRMHA é reduzir ao máximo a quantidade de procedimentos manuais de revisão microscópica sem prejudicar os pacientes com relatórios falsos e resultados equivocados, sobretudo os resultados falsos negativos, os quais possuem alterações morfológicas relevantes e que não são capturados e enviados para a revisão microscópica da lâmina.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Propor e estabelecer critérios para revisão microscópica de hemogramas automatizados no Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, considerando suas necessidades em relação à segurança e eficiência e suas peculiaridades em relação à população atendida.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a implantação dos critérios para revisão microscópica de hemogramas automatizados propostos pelo grupo internacional de consenso em revisões hematológicas da ISLH no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR.
- 2) Verificar a necessidade de estabelecer novos critérios para revisão microscópica de hemogramas automatizados no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR.
- 3) Introduzir e avaliar novos critérios para revisão microscópica de hemogramas automatizados no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR.
- 4) Demonstrar a importância de harmonizar os CRMHA de acordo com o perfil da população atendida pelo laboratório.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DA PESQUISA

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Hematologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. O HC-UFPR é um hospital geral de Porte IV, segundo sistema de classificação hospitalar do Sistema Único de Saúde (SUS) e é o maior prestador de serviços do SUS no Estado do Paraná. Realiza procedimentos de média e alta complexidade e consiste de 59 especialidades e 406 leitos para internamento. Cerca de 61.000 atendimentos em média são realizados mensalmente. O Laboratório de Hematologia está inserido na Unidade de Apoio Diagnóstico e quando esse estudo foi realizado, nele havia dois tipos de analisadores hematológicos, o Sysmex XE-2100D e o XT-2000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japão). O volume diário de amostras para realização de hemogramas varia de 450 a 500. Anteriormente à implantação dos CRMHA, todos os hemogramas eram revisados microscopicamente, fato este que promovia atrasos na liberação dos resultados, mesmo contando com profissionais experientes. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR. O Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) possui o número 0194.0.208.000-10, e o Registro no CEP possui o número 2286.180/2010-07, conforme ANEXO 1. Foi solicitada a isenção do Termo de Consentimento, a qual foi atendida pelo CEP-HC-UFPR.

### 4.2 AMOSTRAS E PACIENTES

As diversas etapas que compreenderam a realização dos hemogramas foram realizadas pelos técnicos de laboratório e pelos farmacêuticos bioquímicos do Laboratório de Hematologia do HC-UFPR. Um total de 1.977 resultados de amostras, oriundos de 1.615 pacientes, foi recolhido da rotina laboratorial durante sete dias consecutivos, no período de 26/11/2008 a 02/12/2008, após a liberação

dos resultados no sistema de informação hospitalar. As amostras foram de sangue total colhido em EDTA-K<sub>2</sub> (1,8 mg/ml), das quais 669 eram do sexo masculino e 946 do sexo feminino. As amostras foram analisadas dentro de três horas após a coleta e atenderam os critérios de aceitação de amostras conforme procedimento operacional padrão do Laboratório de Hematologia do HC-UFPR. No QUADRO 4 são apresentadas algumas características dos pacientes e das amostras estudadas na avaliação de CRMHA.

<b>CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES</b>	
<b>Total de pacientes</b>	<b>1.615</b>
Sexo masculino	669
Sexo feminino	946
Média de idade ± Desvio padrão	39,7 ± 22,7 anos
Mediana	43 anos
Quartil 1 (25%)	20 anos
Quartil 3 (75%)	57 anos
Intervalo de idade	1 dia – 96 anos
<b>Pacientes ambulatoriais</b>	<b>1.238 (76,70%)</b>
<b>Pacientes internados</b>	<b>377 (23,30%)</b>
<b>ORIGEM DAS AMOSTRAS</b>	
<b>Total de amostras</b>	<b>1.977</b>
Amostras de pacientes do sexo masculino	867
Amostras de pacientes do sexo feminino	1.110
Amostras do serviço de hematologia	410
Amostras do serviço de emergência	232
Amostras da unidade de terapia intensiva (UTI) adulto	94
Amostras da UTI pediátrica e neonatal	27
Amostras do serviço de transplante hepático	21
Amostras do serviço de transplante renal	2
Amostras do serviço de transplante de medula óssea	37
Amostras do serviço de neurologia (adulto e pediátrico)	45
Amostras do serviço de clínica médica (masculina e feminina)	154
Amostras do serviço de infectologia	27
Amostras de recém-natos	36
Amostras de crianças de 31 dias – 1 ano	45
Amostras de crianças < 12 anos	329
<b>Amostras de pacientes ambulatoriais</b>	<b>1.320 (66,76%)</b>
<b>Amostras de pacientes internados</b>	<b>657 (33,24%)</b>

QUADRO 4 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PACIENTES E DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DE CRMHA

FONTE: O autor (2015)

Do total de amostras, 1.573 foram analisadas no analisador hematológico Sysmex XE-2100D e 404 no Sysmex XT-2000i (ambos da Sysmex Corporation, Kobe, Japão). Todos os dados numéricos fornecidos pelos analisadores, os resultados das contagens diferenciais manuais de leucócitos (CDML), bem como as informações dos alertas suspeitos e das alterações morfológicas observadas na RMLH foram gravados em uma planilha. Dos 1.615 pacientes, 1.412 realizaram apenas um único hemograma durante o período de seleção das amostras e 203 realizaram hemogramas de acompanhamento (117 pacientes realizaram 2 hemogramas; 30 pacientes realizaram 3 hemogramas; 40 pacientes realizaram 4 hemogramas; 15 pacientes realizaram 5 hemogramas e 1 paciente realizou 6 hemogramas de acompanhamento). Os pacientes internados foram oriundos dos serviços de hematologia, quimioterapia, infectologia, neurologia, unidades de terapia intensiva adulta e pediátrica, pronto-atendimento, cardiologia, clínica médica, ginecologia, cirurgia geral, cirurgia vascular, transplante hepático e renal dentre outros. Os pacientes não internados (ambulatoriais) foram atendidos nos ambulatórios de alergia, imunologia, clínica médica, anestesiologia, anticoncepção, reumatologia, coloproctologia, cardiologia, células-tronco, cirurgia bariátrica, cirurgia geral, cirurgia plástica, dermatologia, endocrinologia, gastroenterologia, ginecologia, hematologia, hepatologia, homeopatia, infectologia, nefrologia, neurologia, odontologia, oftalmologia, otorrinolaringologia, ortopedia, patologia, pneumologia, psiquiatria, saúde ocupacional e urologia.

### 4.3 ANÁLISE DOS HEMOGRAMAS

#### 4.3.1 Analisadores hematológicos

Neste estudo foram utilizados os analisadores hematológicos XE-2100D (Sysmex Corporation, Kobe, Japão), número de série A1164, versão do software 00-25 com IG MASTER versão 00-04, que analisa 150 amostras por hora e fornece 26 parâmetros hematológicos, e o XT-2000i, número de série 13155, versão do software 00-01, que analisa 80 amostras por hora e fornece 30 parâmetros. Em

ambos os equipamentos, a determinação da hemoglobina foi realizada em um canal específico, empregando-se lauril sulfato de sódio (LSS), um reagente livre de cianeto. Os eritrócitos e as plaquetas foram enumerados no canal de eritrócitos e plaquetas chamado RBC/PLT (Eritrócitos/Plaquetas), utilizando o método da impedância elétrica seguida de focalização hidrodinâmica. O hematócrito foi determinado simultaneamente usando-se o método de detecção da altura do pulso de número de eritrócitos (RBC), também chamado de empilhamento virtual (SYSMEX CORPORATION, 2003; 2006; 2011; BAIN, 2015).

A contagem diferencial de leucócitos foi determinada em dois canais, o 4-DIFF (contagem diferencial em quatro partes) e o WBC/BASO (contagem global de leucócitos e contagem diferencial de basófilos). O canal 4-DIFF (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e granulócitos imaturos, esse último apenas no XE-2100D com IG MASTER) utiliza citometria de fluxo acoplada a um laser diodo vermelho e estável, que produz um feixe de luz de 633 nm de comprimento de onda e que utiliza um corante fluorescente chamado polimetina. Quando o feixe de luz colide com as células coradas, três sinais são produzidos: *forward-scattered light* (luz dispersa frontalmente), que fornece informações sobre o tamanho das células; *side-scattered light* (luz dispersa lateralmente), que fornece informações sobre a estrutura interna das células; e *side fluorescence* (emissão de luz fluorescente e detectada lateralmente), que informa sobre o conteúdo de DNA e RNA das células. No canal WBC/BASO (leucócitos e basófilos), os basófilos são resistentes ao tratamento ácido do sistema de reagentes e mantêm seu tamanho e forma, formando um aglomerado de células grandes que se diferenciam das outras células nucleadas menores, nas quais as membranas são perfuradas e o conteúdo citoplasmático é extravasado (SYSMEX CORPORATION, 2003; 2006; 2011; BAIN, 2015).

Os seguintes parâmetros são obtidos por meio de cálculo em ambos os analisadores empregados neste estudo: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), *red cell distribution width* desvio padrão (RDW-SD), *red cell distribution width* coeficiente de variação (RDW-CV), *platelet distribution width* (PDW), volume plaquetário médio (VPM) e *platelet large cell ratio* (P-LCR). O XT-2000i é o único entre esses equipamentos que realiza a contagem de reticulócitos, obtida por citometria de fluxo após interação com o corante fluorescente *Polymethine*. Os seguintes parâmetros reticulocitários são calculados: fração de

reticulócitos imaturos (IRF), fração de reticulócitos de baixa fluorescência (LFR), fração de reticulócitos de média fluorescência (MFR) e fração de reticulócitos de alta fluorescência (HFR). No mesmo canal em que os reticulócitos são enumerados, as plaquetas também são contadas por método ótico. Portanto, o XT-2000i conta plaquetas usando dois métodos, ótico e impedância (SYSMEX CORPORATION, 2003; 2006; 2011; BAIN, 2015).

As informações técnicas mais importantes e a tecnologia empregada nos analisadores hematológicos empregados neste estudo estão resumidas na TABELA 1.

TABELA 1 – INFORMAÇÕES TÉCNICAS DOS ANALISADORES HEMATOLÓGICOS EMPREGADOS NESSE ESTUDO

	<b>Sysmex XT-2000i</b>	<b>Sysmex XE-2100D</b>
<b>Origem</b>	Kobe - Japão	Kobe - Japão
<b>Capacidade de processamento (testes/hora)</b>	80	150
<b>Leucócitos</b>	Dispersão da luz	Dispersão da luz
<b>Eritrócitos</b>	Impedância e ótico	Impedância
<b>Hemoglobina</b>	Livre de cianeto com Lauril sulfato de sódio	Livre de cianeto com Lauril sulfato de sódio
<b>Volume globular</b>	Medição direta pela soma dos pulsos de RBC	Medição direta pela soma dos pulsos de RBC
<b>VCM</b>	(Volume globular/eritrócitos) x 10	(Volume globular/eritrócitos) x 10
<b>HCM</b>	(Hemoglobina/eritrócitos) x 10	(Hemoglobina/eritrócitos) x 10
<b>CHCM</b>	(Hemoglobina/volume globular) x 100	(Hemoglobina/volume globular) x 100
<b>RDW</b>	Coefficiente de variação (RDW-CV) e desvio padrão (RDW-SD) do histograma de eritrócitos	Coefficiente de variação e desvio padrão do histograma de eritrócitos
<b>Plaquetas</b>	Impedância e ótico	Impedância
<b>VPM</b>	(Plaquetócrito/plaquetas x 10 <sup>3</sup> /μL) x 10.000	(Plaquetócrito/plaquetas x 10 <sup>3</sup> /μL) x 10.000
<b>Reticulócitos</b>	Detecção da fluorescência em canal ótico	Não realiza a contagem de reticulócitos
<b>Neutrófilos Linfócitos Monócitos Eosinófilos</b>	Método ótico e coloração fluorescente	Método ótico e coloração fluorescente
<b>Basófilos</b>	Lise diferencial + método ótico	Lise diferencial + método ótico

FONTE: SYSMEX CORPORATION (2003; 2006; 2011)

NOTA: VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW-CV: *red cell distribution width* (índice de distribuição dos volumes eritrocitários) expresso em coeficiente de variação; RDW-SD: *red cell distribution width* expresso em desvio padrão; VPM: volume plaquetário médio.

Os resultados fornecidos pelos analisadores hematológicos foram reportados para o laboratório por meio de contagens numéricas, histogramas e citogramas.

#### 4.3.2 Geração dos alertas suspeitos

Os alertas suspeitos foram gerados quando os analisadores detectaram a nuvem de uma determinada população de células como tendo tamanho e forma anormais e quando detectou eventos fora das áreas de populações celulares normais (SYSMEX, 2011). As FIGURAS 3 e 4 mostram os alertas suspeitos que são gerados a partir dos canais 4-DIFF e RBC/PLT, respectivamente.

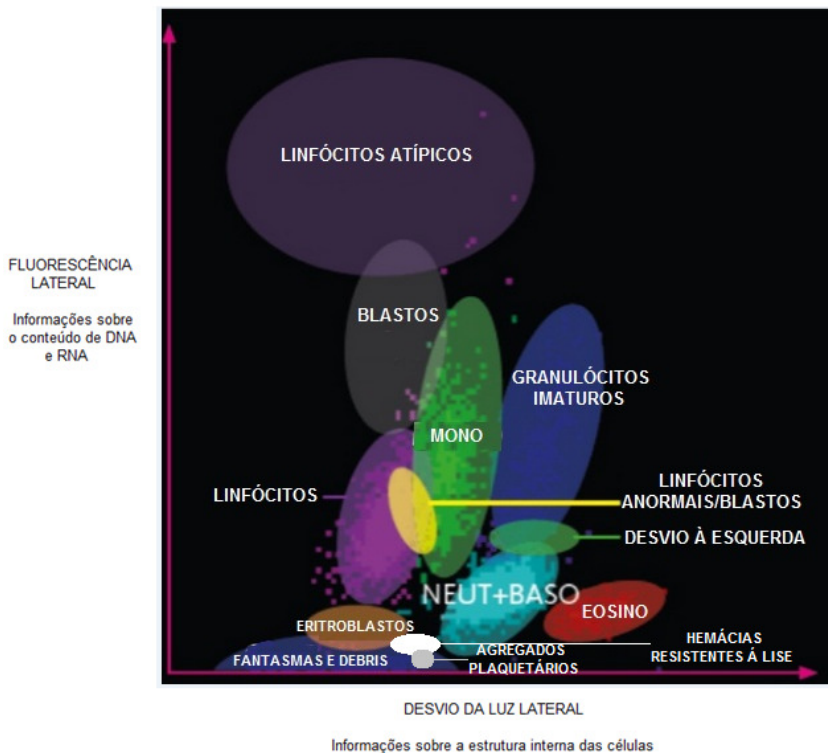


FIGURA 3 – GRÁFICO DE DISPERSÃO DO CANAL 4-DIFF DO XE-2100D MOSTRANDO A POSIÇÃO EM QUE SÃO ENCONTRADOS TIPOS CELULARES ANORMAIS

FONTE: Adaptado de CIMENTI *et al.* (2013)

LEGENDA: Mono: monócitos; Neut: neutrófilos; Eosino: eosinófilos; Baso: basófilos

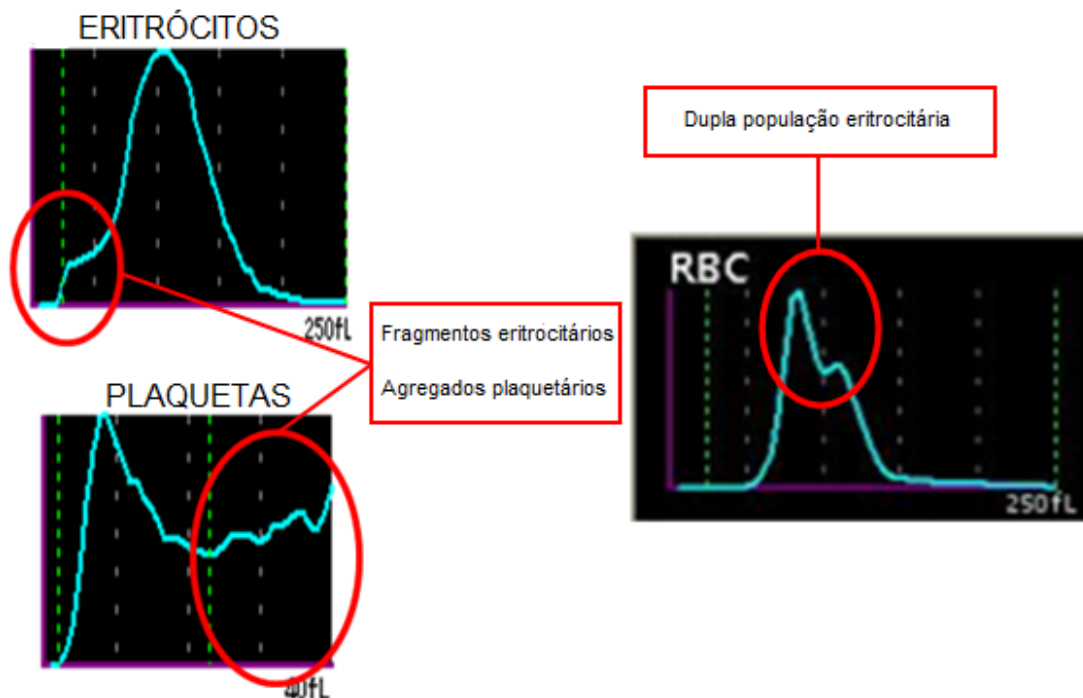


FIGURA 4 – HISTOGRAMAS DERIVADOS DO CANAL RBC/PLT DO XE-2100D MOSTRANDO A POSIÇÃO EM QUE SÃO ENCONTRADAS ANORMALIDADES

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: RBC: *red blood cells* (eritrócitos).

Os alertas suspeitos gerados sugeriram a presença dos seguintes achados hematológicos: blastos, granulócitos imaturos, desvio nuclear à esquerda, linfócitos atípicos, linfócitos anormais, linfoblastos, eritroblastos, fragmentos eritrocitários, população de eritrócitos com tamanho heterogêneo, eritrócitos resistentes à lise, agregados plaquetários, aglutinação de eritrócitos, interferência na dosagem de hemoglobina pela turbidez da amostra e gráficos de dispersão de luz (*scattergrams*) anormais de plaquetas, leucócitos e eritrócitos.

Nos analisadores hematológicos empregados nesse estudo, os alertas morfológicos foram expressos como valores de *Q-flags*, que consistem em uma escala de unidades arbitrárias que varia de 0 a 300. Os equipamentos saem de fábrica com valores de *Q-flag* iguais a 100 para cada alerta suspeito fornecido pelo equipamento, contudo, alguns *Q-flags* foram ajustados pela assessoria científica do distribuidor dos equipamentos após validação local com amostras de pacientes atendidos no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR, conforme TABELA 2.



TABELA 2 – NÍVEL DE AJUSTE DOS PRINCIPAIS Q-FLAGS DOS ANALISADORES HEMATOLÓGICOS DESTE ESTUDO

<b>Q-FLAG / mensagem reportada pelos analisadores</b>	<b>ESCALA PADRÃO DO FABRICANTE</b>	<b>ESCALA AJUSTADA (XE-2100D)</b>	<b>ESCALA AJUSTADA (XT-2000i)</b>
Agregados plaquetários – canal de impedância	100	100	100
Agregados plaquetários – canal ótico 4-DIFF	100	100	100
Blastos	100	200	180
Eritroblastos	100	140	150
Eritrócitos resistentes à lise	100	100	100
Fragmentos eritrocitários	100	100	100
Granulócitos imaturos	100	150	180
Linfócitos anormais/blastos	100	100	100
Linfócitos atípicos	100	150	150
Desvio à esquerda dos neutrófilos	100	30	100
População de hemácias dimórficas	100	100	100

FONTE: O autor (2015)

#### 4.3.3 Preparo das extensões sanguíneas

Para cada amostra, uma extensão sanguínea foi preparada e corada por meio do equipamento extensor/corador automatizado de lâminas Sysmex SP-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japão) no prazo máximo de até três horas após a coleta. Amostras que continham pouco volume de sangue total foram preparadas manualmente pelo método *wedge-spread film* (extensão do sangue em forma de cunha). A coloração empregada no método automatizado e no manual foi a de May-Grünwald & Giemsa (BAIN; LEWIS, 2012; HOUWEN, 2002).

#### 4.3.4 Contagem diferencial manual de leucócitos e revisão microscópica da lâmina de hemograma

A contagem diferencial manual de leucócitos e a revisão microscópica da lâmina de hemograma foram realizadas em todas as amostras utilizadas neste estudo de acordo com as recomendações de Barnes *et al.* (2005) relativas ao passo a passo para a validação de CRMHA. Na maioria dos casos foram contados 100

leucócitos por um único observador, em um total de 6 observadores com grande experiência na leitura de lâminas de hemogramas (10 a 30 anos de experiência). Em alguns casos, com contagens de leucócitos abaixo de  $0,03 \times 10^3/\mu\text{l}$ , leucócitos não foram visualizados e somente pôde ser realizada a RMLH, e em outros casos com contagens de leucócitos acima de  $50,0 \times 10^3/\mu\text{l}$  a CDML foi estendida para 200 leucócitos. A contagem de 100 ou 200 células em uma única lâmina por amostra e por um único observador foi considerada adequada como método de referência para os propósitos de comparação deste trabalho (BARNES *et al.*, 2005; COMAR; MALVEZZI; PASQUINI, 2015).

A RMLH foi realizada em todas as amostras no intuito de procurar, identificar e quantificar qualquer alteração das séries eritrocitária, leucocitária e plaquetária. Definiu-se como RMLH a minuciosa e cuidadosa análise microscópica de uma extensão sanguínea devidamente bem confeccionada e corada, com o objetivo de procurar alterações hematológicas, bem como comparar e averiguar os valores quali-quantitativos fornecidos pelos analisadores hematológicos.

A maneira de quantificar as alterações morfológicas e de descrever critérios morfológicos de tipos celulares específicos, como bastões e linfócitos atípicos, seguiu as recomendações que constavam na Instrução de Trabalho do Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da UFPR (HC-UFPR, ITR 005, 2008), conforme APÊNDICE 1.

#### 4.4 FORMULAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE REVISÃO MICROSCÓPICA DE HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS

A formulação dos critérios de revisão e liberação de hemogramas automatizados baseou-se no protocolo sugerido pelo Grupo de Consenso Internacional para Revisões Hematológicas (BARNES *et al.*, 2005). Contudo, as adaptações necessárias no decorrer desse estudo foram fruto do consenso e troca de experiências entre o autor, orientador, co-orientadora e profissionais do laboratório, além de pesquisas em outras fontes sobre o assunto (CORBERAND; LAHARRAGUE; FILLOLA, 1992; CHAPMAN, 1997; GULATI *et al.*, 2002; LANTIS *et*

*al.*, 2003; BUTTARELLO, 2004; FAILACE; PRANKE, 2004; GALLOWAY; OSGERBY, 2006; BURGESS *et al.*, 2009; CLSI, 2010; GALLOWAY *et al.*, 2010).

#### 4.5 DESENHO DO ESTUDO DE AVALIAÇÃO DE CRMHA

Em uma primeira etapa, 1.977 amostras foram utilizadas para avaliar os CRMHA da ISLH (critérios de triagem + critérios de positividade em lâmina) no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR, em relação à segurança e eficiência da aplicação prática desses critérios. Na sequência foi verificada a necessidade de estabelecer novos CRMHA no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR.

Na segunda etapa, a fim de atender o consenso dos autores sobre quais alterações morfológicas são relevantes e o grau em que as mesmas são observadas na microscopia, novos critérios de positividade em lâmina foram estabelecidos como o padrão ouro do HC-UFPR. Na sequência, para identificar esses novos CPL, foram avaliados os seguintes critérios de triagem estabelecidos: os adaptados da ISLH, Estudo 1 (limites estreitos), Estudo 2 (limites intermediários) e Estudo 3 (limites amplos). Esses três últimos foram estabelecidos nesse estudo através de ajustes e seleção de limites para cada parâmetro hematológico a fim de alcançar máxima eficiência (taxa de revisões microscópicas < 50%) e segurança (taxa de falso-negativos  $\leq$  3%). Já os CT adaptados da ISLH foram avaliados novamente nessa etapa de modo a possibilitar a verificação de seu desempenho em identificar amostras com os novos CPL elaborados localmente. Em seguida, todos os conjuntos de critérios de triagem estabelecidos foram avaliados e comparados.

A utilização de taxas de revisões microscópicas menores que 50% como indicadores de desempenho da aplicação de CRMHA baseou-se no estudo de Novis *et al.* (2006), nas limitações do sistema de informação hospitalar e de interfaceamento de resultados do HC-UFPR no que diz respeito à implantação das regras de *delta check*, no volume de trabalho do Laboratório de Hematologia do HC-UFPR e na quantidade de profissionais disponíveis para realizar a RMLH. Apesar de Barnes *et al.* (2005) recomendarem como limite de segurança para os pacientes

uma taxa de resultados falso-negativos < 5%, definiu-se para esse estudo os resultados falso-negativos iguais ou menores que 3%, segundo Cui *et al.* (2010).

Em relação ainda à revisão microscópica das lâminas de hemograma, esse estudo não foi cego, uma vez que os observadores tiveram acesso aos relatórios dos equipamentos no momento de realizar a RMLH, nos quais estavam descritos os valores dos parâmetros hematológicos e os alertas suspeitos presentes. Apesar disso, os observadores não tiveram conhecimento prévio dos limites de corte dos critérios de triagem e nem conhecimento dos critérios de positividade em lâmina descritos nesse estudo.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DOS CRMHA PROPOSTOS PELO GRUPO INTERNACIONAL DE CONSENSO EM REVISÕES HEMATOLÓGICAS DA ISLH NO LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA DO HC-UFPR

Com o propósito de verificar se o desempenho dos CRMHA sugeridos pela ISLH (BARNES *et al.*, 2005) poderia atender às necessidades locais ou indicar a necessidade de desenvolver CRMHA próprios, foram avaliados, inicialmente, os critérios de triagem aplicados às amostras passadas no aparelho e formulados para capturar amostras suspeitas, com os critérios de positividade em lâmina, ambos recomendados por Barnes *et al.* (2005). Contudo, foram realizadas alterações nesses critérios de triagem a fim de adaptá-los aos analisadores hematológicos empregados neste estudo e, sobretudo, aos sistemas de interfaceamento e de informação hospitalar. Dentre as principais adaptações uma diz respeito às regras de *delta check*, cuja implantação não foi possível por causa de limitações dos sistemas de informação hospitalar e de interfaceamento do Laboratório de Hematologia do HC-UFPR. Dentre as regras de *delta check* que não foram implantadas, 1 envolvia a contagem global de leucócitos, 1 envolvia a contagem de plaquetas, 1 envolvia o VCM e 4 envolviam alertas suspeitos e leucócitos. Também não foi feita distinção entre a idade dos pacientes, com excessão da contagem absoluta de linfócitos e monócitos, e se os hemogramas eram ou não o primeiro a ser realizado para cada paciente. Os analisadores hematológicos empregados

nesse estudo não realizavam a contagem automatizada de eritroblastos, portanto essa regra de triagem da ISLH não foi incluída nos critérios de triagem ajustados para esse estudo. Foi incluído um critério de triagem quantitativo para o VPM a fim de aperfeiçoar a identificação de amostras com presença de agregados plaquetários e plaquetas gigantes, ambos considerados como critérios de positividade em lâmina. Após a análise e adaptação dos critérios de triagem da ISLH em relação às necessidades e possibilidades de implantação locais, foram estabelecidos os critérios de triagem adaptados da ISLH, mostrados na TABELA 3.

TABELA 3 – CRITÉRIOS DE TRIAGEM ADAPTADOS DA ISLH EMPREGADOS NESSE TRABALHO

CRITÉRIO	PARÂMETRO	ADAPTAÇÃO DA ISLH	AÇÕES PROPOSTAS
1	Hemoglobina	< 7,0 g/dl ou > 18,5 g/dl	RMLH e checar morfologia da série vermelha.
2	VCM	< 75 fl ou > 105 fl (adultos e crianças)	RMLH e checar microcitose e macrocitose. No critério original da ISLH essa regra é aplicada apenas para adultos.
3	CHCM	< 30,0 g/dl	RMLH, checar hipocromia, verificar tempo decorrido após coleta e investigar possível contaminação da amostra.
4	CHCM	> 36,5 g/dl	RMLH, checar lipemia, hemólise, hiperleucocitose, aglutinação das hemácias, relação sangue/anticoagulante e presença de esferócitos.
5	RDW-CV	> 22,0 %	RMLH e checar anisocitose.
6	Reticulócitos	> 0,100 x 10 <sup>6</sup> /μl	RMLH e checar policromatofilia.
7	Leucócitos	< 4,0 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 30,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	RMLH e confirmar leucopenia ou leucocitose por meio de estimativa em lâmina.
8	Neutrófilos #	< 1,0 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 20,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	RMLH e, se necessário, CDML.
9	Linfócitos #	> 5,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos) e > 7,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (crianças ≤ 12 anos)	
10	Monócitos #	> 1,5 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos) e > 3,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (crianças ≤ 12 anos)	
11	Eosinófilos #	> 2,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	
12	Basófilos #	> 0,5 x 10 <sup>3</sup> /μl	
13	Plaquetas	< 100 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 1.000 x 10 <sup>3</sup> /μl	RMLH e estimar contagem de plaquetas na lâmina por método indireto para confirmar trombocitopenia ou trombocitose.
14	VPM	≥ 12,5 fl	RMLH e checar tamanho e morfologia plaquetária. A inclusão do VPM foi uma modificação em relação aos critérios de triagem originais da ISLH.

continua

TABELA 3 – CRITÉRIOS DE TRIAGEM ADAPTADOS DA ISLH EMPREGADOS NESTE TRABALHO  
conclusão

CRITÉRIO	PARÂMETRO	AÇÕES PROPOSTAS	
15 Alertas suspeitos	Granulócitos imaturos	RMLH e, se necessário, CDML.	
	Desvio à esquerda dos neutrófilos		
	Linfócitos atípicos		
	Linfócitos anormais/blastos		
	Blastos		
	Eritroblastos	RMLH e, caso seja positivo, contar eritroblastos/100 leucócitos. Se $\geq 10\%$ , corrigir contagem global de leucócitos.	
	Fragmentos eritrocitários	RMLH e checar presença de fragmentos eritrocitários.	
	População eritrocitária dimórfica	Checar gráfico de distribuição de volume eritrocitário, observar valor de RDW e verificar anisocitose na lâmina.	
	Eritrócitos resistentes à lise	Passar novamente a amostra e, caso seja positivo, RMLH e checar se há morfologia eritrocitária anormal.	
	Agregados plaquetários	Checar presença de coágulos na amostra e agregados plaquetários na lâmina.	
	Problemas na dosagem de hemoglobina.	Checar lipemia na amostra. Se a amostra for lipêmica, retirar o plasma e substituí-lo por igual parte de salina ou diluente do analisador e passá-la novamente, considerar apenas a hemoglobina e refazer o cálculo das constantes hematimétricas.	
16	TODOS	Se for recém-nato.	
17	(*) e (----)	Esses sinais ao lado das contagens indicam que a contagem automatizada não é confiável ou não disponível para a amostra em questão, respectivamente.	Fazer CDML e RMLH.

FONTE: Adaptado de BARNES *et al.* (2005)

LEGENDA: RMLH: revisão microscópica de lâminas de hemograma; CDML: contagem diferencial manual de leucócitos; #: contagem absoluta; %: contagem relativa; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW-CV: *red cell distribution width* – coeficiente de variação; RBC: eritrócitos; HGB: dosagem de hemoglobina; PLT: plaquetas; VPM: volume plaquetário médio.

As 41 regras de triagem descritas pela ISLH (BARNES *et al.*, 2005) foram utilizadas como diretriz inicial, contudo tais critérios de triagem foram ajustados e adaptados para o Laboratório de Hematologia do HC-UFPR, resultando em um conjunto de critérios adaptados com 17 regras (TABELA 3). Desse total, 6 critérios de triagem foram relacionados aos parâmetros de série vermelha, incluindo hemoglobina, VCM, CHCM, RDW-CV e reticulócitos; 6 foram relacionadas aos parâmetros da série branca, incluindo contagem global de leucócitos e contagem diferencial absoluta de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos; 1 regra foi relacionada à ocorrência de 14 alertas suspeitos; 1 regra foi relacionada à ocorrência de contagens não confiáveis, não disponibilizadas ou parcialmente

disponibilizadas pelos analisadores em decorrência de algum tipo de interferência; 2 regras foram relacionadas com as plaquetas, incluindo a contagem de plaquetas e o volume plaquetário médio; e 1 regra foi relacionada a amostras de recém-natos.

A TABELA 4 mostra os critérios de positividade em lâmina recomendados pela ISLH (BARNES *et al.*, 2005). Esses critérios de positividade em lâmina foram considerados como o padrão ouro para classificar uma amostra como positiva ou negativa na avaliação dos CRMHA propostos pela ISLH (BARNES *et al.*, 2005).

TABELA 4 – CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA RECOMENDADOS PELA ISLH

<b>MORFOLOGIA</b>	
<b>Série vermelha:</b>	2+/moderado ou maior. A única exceção é a malária, para a qual qualquer achado será considerado como CPL.
<b>Plaquetas:</b>	Plaquetas gigantes 2+/moderado ou maior.
	Agregados plaquetários > raros ou ocasionais.
<b>Série branca:</b>	Corpúsculos de Döhle 2+/moderado ou maior.
	Granulações tóxicas 2+/moderado ou maior.
	Vacúolos citoplasmáticos 2+/moderado ou maior.
<b>TIPOS CELULARES ANORMAIS</b>	
	Blastos $\geq 1\%$
	Metamielócitos > 2%
	Mielócitos/promielócitos $\geq 1\%$
	Linfócitos atípicos > 5%
	Eritroblastos $\geq 1\%$
	Plasmócitos $\geq 1\%$

FONTE: BARNES *et al.* (2005)

Barnes *et al.* (2005) recomendam que a utilização do alerta suspeito de desvio nuclear à esquerda deve ser de acordo com o POP do laboratório. Dessa forma, o alerta suspeito de desvio nuclear à esquerda foi considerado como alerta suspeito relevante e foi utilizado como critério de triagem nesse estudo. Em função disso, a contagem de bastões foi considerada como critério de positividade em lâmina quando foi > 8%. Os critérios de positividade em lâmina mostrados na TABELA 4, juntamente com a inclusão da contagem de bastões > 8% como CPL, foram considerados como os CPL adaptados da ISLH (padrão ouro) e foram utilizados para classificar uma amostra como positiva ou negativa na avaliação inicial dos critérios de triagem adaptados da ISLH.

#### 4.6.1 Classificação das amostras para posterior análise com os critérios de triagem adaptados da ISLH

Para a análise dos CRMHA sugeridos pela ISLH, primeiramente as amostras foram analisadas comparando-se as regras pelas quais elas foram selecionadas para revisão com os achados na lâmina de sangue periférico. Se uma amostra foi positiva para um determinado critério de triagem (TABELA 3) e na análise microscópica continha algum critério de positividade em lâmina (padrão ouro) (TABELA 4 + bastões > 8% como CPL), a amostra foi classificada como verdadeiro-positivo (VP). Se uma amostra foi positiva para algum critério de triagem e não foi encontrado nenhum critério de positividade em lâmina na microscopia, a amostra foi classificada como falso-positivo (FP). Se uma amostra foi negativa para todos os critérios de triagem e continha algum critério de positividade em lâmina na análise microscópica, a amostra foi classificada como falso-negativo (FN). Por fim, se uma amostra foi negativa para todos os critérios de triagem e não apresentou qualquer critério de positividade em lâmina, a amostra foi classificada como verdadeiro-negativo (VN) (BARNES *et al.*, 2005; RUZICKA *et al.*, 2001).

#### 4.7 ESTABELECIMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM E DE NOVOS CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA PRÓPRIOS PARA O LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA DO HC-UFPR

Em uma segunda etapa desse estudo foram avaliados quatro conjuntos de critérios de triagem, os quais foram estabelecidos a fim de identificar amostras com presença dos critérios de positividade em lâmina definidos para o HC-UFPR (novo padrão ouro), discriminados na TABELA 5.



TABELA 5 – CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA DO HC-UFPR

SÉRIE VERMELHA		
Anisocitose $\geq 2+$ Poiquilocitose $\geq 2+$ Codócitos $\geq 2+$ Acantócitos $\geq 2+$ Howell-Jolly: presença <i>Rouleaux</i> $\geq 2+$ Aglutinação eritrocitária: presença	Micrócitos $\geq 2+$ Eliptócitos $\geq 2+$ Dacriócitos $\geq 1+$ Drepanócitos: presença Anel de Cabot: presença Hipocromia $\geq 2+$ Equinócitos $\geq 2+$ Cristais de Hb C: presença	Macrócitos $\geq 2+$ Estomatócitos $\geq 2+$ Esquistócitos $\geq 1+$ Esferócitos $\geq 1+$ Ponteados basófilos $\geq 1+$ Policromatofilia $\geq 2+$ Outras formas eritrocitárias $\geq 2+$ Hematozoários: presença
A soma das seguintes alterações: (Anisocitose $\geq 1+$ ) + (Poiquilocitose $\geq 1+$ ) + (Forma eritrocitária $\geq 1+$ ) + (Alteração de cor $\geq 1+$ )		
SÉRIE BRANCA		
Corpúsculos de Döhle $\geq 1+$ Polilobócitos $\geq 1+$ Bastonete de Auer: presença	Granulações tóxicas $\geq 2+$ Neutrófilos hipossegmentados: presença Pseudo Pelger Huët: presença	Vacúolos citoplasmáticos $\geq 1+$ Hipo/degranulação dos neutrófilos: presença Células displásicas: presença
PLAQUETAS		
Plaquetas gigantes $\geq 2+$ Anisocitose plaquetária $\geq 2+$	Microplaquetas $\geq 2+$ Plaquetas degranuladas: presença	Agregados plaquetários: > raros/ocasionais Plaquetas cinzentas: presença
TIPOS CELULARES ANORMAIS		
Blastos $\geq 1\%$ Metamielócitos $\geq 3\%$ Plasmócitos $\geq 1\%$	Promielócitos $\geq 1\%$ Bastões $\geq 15\%$ Prolinfócitos $\geq 1\%$	Mielócitos $\geq 1\%$ Eritroblastos $\geq 1/100$ leucócitos Linfócitos atípicos $\geq 5\%$
Outras células hematológicas imaturas $\geq 1\%$		

FONTE: O autor (2015)

Os critérios de positividade em lâmina do HC-UFPR foram diferentes dos recomendados pela ISLH (TABELA 4), numa tentativa de atender o consenso dos autores sobre o grau de quantificação que tornava uma alteração morfológica relevante para ser descrita nos laudos de hemograma.

Os conjuntos de critérios de triagem, assim como as ações necessárias em cada caso são mostrados na TABELA 6.

TABELA 6 – CRITÉRIOS DE TRIAGEM PARA REVISÃO MICROSCÓPICA DE HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS DESSE TRABALHO

CRITÉRIO	PARÂMETRO	ADAPTAÇÃO DA ISLH	ESTUDO 1	ESTUDO 2	ESTUDO 3	AÇÕES PROPOSTAS
1	Hemoglobina	< 7,0 g/dl ou > 18,5 g/dl	< 9,5 g/dl ou > 18,0 g/dl	< 8,0 g/dl ou > 19,0 g/dl	< 7,5 g/dl ou > 20,0 g/dl	RMLH e checar morfologia da série vermelha.
2	VCM	< 75 fl ou > 105 fl (adultos e crianças)	< 77 fl (adultos) e < 74 fl (crianças ≤ 12 anos) ou > 100 fl	< 75 fl ou > 105 fl (adultos e crianças)	< 74 fl ou > 105 fl (adultos e crianças)	RMLH e checar microcitose e macrocitose.
3	CHCM	< 30 g/dl	< 31,5 g/dl	< 31,0 g/dl	< 30,0 g/dl	RMLH, checar hipocromia, verificar tempo decorrido após coleta e investigar possível contaminação da amostra.
4	CHCM	> 36,5 g/dl	> 36,5 g/dl	> 36,5 g/dl	> 36,5 g/dl	RMLH, checar lipemia, hemólise, hiperleucocitose, aglutinação das hemácias, relação sangue: anticoagulante e presença de esferócitos.
5	RDW-CV	> 22,0 %	> 17,0 %	> 18,0 %	> 19,0 %	RMLH e checar anisocitose.
6	RDW-SD	-	> 60 fl	> 65 fl	> 70 fl	
7	Reticulócitos	> 0,100 x 10 <sup>6</sup> /μl	> 0,150 x 10 <sup>6</sup> /μl ou > 2,5 %	> 0,150 x 10 <sup>6</sup> /μl ou > 2,5 %	> 0,150 x 10 <sup>6</sup> /μl ou > 2,5 %	RMLH e checar policromatofilia.
8	Leucócitos	< 4,0 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 30,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	< 4,0 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 12,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	< 3,5 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 15,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	< 3,2 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 20,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	RMLH e confirmar leucopenia ou leucocitose por meio de estimativa em lâmina.

continua

TABELA 6 – CRITÉRIOS DE TRIAGEM PARA REVISÃO MICROSCÓPICA DE RESULTADOS DE HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS DESSE TRABALHO

						continuação	
CRITÉRIO	PARÂMETRO	ADAPTAÇÃO DA ISLH	ESTUDO 1	ESTUDO 2	ESTUDO 3	AÇÕES PROPOSTAS	
9	Neutrófilos #	$< 1,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ ou $> 20,0 \times 10^3/\mu\text{l}$	$< 1,8 \times 10^3/\mu\text{l}$ ou $> 7,0 \times 10^3/\mu\text{l}$	$< 1,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ou $> 11,0 \times 10^3/\mu\text{l}$	$< 1,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ ou $> 15,0 \times 10^3/\mu\text{l}$	RMLH e, se necessário, CDML.	
10	Neutrófilos %	-	$< 38\%$ ou $> 70\%$	$< 35\%$ ou $> 80\%$	$< 25\%$ ou $> 85\%$		
11	Linfócitos #	$> 5,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (adultos) e $> 7,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (crianças $\leq 12$ anos)	$< 0,8 \times 10^3/\mu\text{l}$ ou $> 5,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (adultos) e $> 7,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (crianças $\leq 12$ anos)	$< 0,8 \times 10^3/\mu\text{l}$ ou $> 5,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (adultos) e $> 7,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (crianças $\leq 12$ anos)	$< 0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ou $> 5,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (adultos) e $> 7,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (crianças $\leq 12$ anos)		
12	Linfócitos %	-	$< 20\%$ ou $> 50\%$	$< 12\%$ ou $> 60\%$	$< 8\%$ ou $> 70\%$		
13	Monócitos #	$> 1,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ (adultos) e $> 3,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (crianças $\leq 12$ anos)	$< 0,1 \times 10^3/\mu\text{l}$ ou $> 1,3 \times 10^3/\mu\text{l}$ (adultos) e $> 2,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (crianças $\leq 12$ anos)	$< 0,1 \times 10^3/\mu\text{l}$ ou $> 1,3 \times 10^3/\mu\text{l}$ (adultos) e $> 2,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (crianças $\leq 12$ anos)	$< 0,1 \times 10^3/\mu\text{l}$ ou $> 1,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ (adultos) e $> 2,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (crianças $\leq 12$ anos)		
14	Monócitos %	-	$< 1\%$ ou $> 12\%$	$< 1\%$ ou $> 16\%$	$< 1\%$ ou $> 20\%$		
15	Eosinófilos #	$> 2,0 \times 10^3/\mu\text{l}$	$> 2,0 \times 10^3/\mu\text{l}$	$> 2,5 \times 10^3/\mu\text{l}$	$> 2,5 \times 10^3/\mu\text{l}$		
16	Eosinófilos %	-	$> 20\%$	$> 25\%$	$> 30\%$		
17	Basófilos #	$> 0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$	$> 0,3 \times 10^3/\mu\text{l}$	$> 0,3 \times 10^3/\mu\text{l}$	$> 0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$		
18	Basófilos %	-	$> 2\%$	$> 2\%$	$\geq 3\%$		
19	Plaquetas	$< 100 \times 10^3/\mu\text{l}$ ou $> 1.000 \times 10^3/\mu\text{l}$	$< 100 \times 10^3/\mu\text{l}$ ou $> 600 \times 10^3/\mu\text{l}$	$< 100 \times 10^3/\mu\text{l}$ ou $> 800 \times 10^3/\mu\text{l}$	$< 90 \times 10^3/\mu\text{l}$ ou $> 1.000 \times 10^3/\mu\text{l}$		RMLH e estimar contagem de plaquetas na lâmina por método indireto para confirmar trombocitopenia ou trombocitose.
20	VPM	$\geq 12,5$ fl	$> 12,0$ fl	$> 12,5$ fl	$\geq 13,0$ fl		RMLH e checar tamanho e morfologia plaquetária.

continua

TABELA 6 – CRITÉRIOS DE TRIAGEM PARA REVISÃO MICROSCÓPICA DE RESULTADOS DE HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS DESSE TRABALHO

		conclusão	
CRITÉRIO	COMUM A TODOS OS ESTUDOS	AÇÕES PROPOSTAS	
<b>21</b> Alertas suspeitos	Granulócitos imaturos.	RMLH e, se necessário, CDML.	
	Desvio à esquerda dos neutrófilos.		
	Linfócitos atípicos.		
	Linfócitos anormais/blastos.		
	Blastos		
	Eritroblastos.	RMLH e, caso seja positivo, contar eritroblastos/100 leucócitos. Se $\geq 10\%$ , corrigir contagem global de leucócitos.	
	Fragmentos eritrocitários.	RMLH e checar presença de fragmentos eritrocitários.	
	População eritrocitária dimórfica.	Checar gráfico de distribuição de volume eritrocitário, observar valor de RDW e verificar anisocitose na lâmina.	
	Eritrócitos resistentes à lise.	Passar novamente a amostra e, caso seja positivo, RMLH e checar se há morfologia eritrocitária anormal.	
	Agregados plaquetários.	Checar presença de coágulos na amostra e agregados plaquetários na lâmina.	
Problemas na dosagem de hemoglobina.	Checar lipemia na amostra. Se amostra for lipêmica, retirar o plasma e substituí-lo por igual parte de salina ou diluente do analisador e passá-la novamente, considerar apenas a hemoglobina e refazer o cálculo das constantes eritrocitárias.		
<b>22</b>	TODOS	Se for recém-nato.	
<b>23</b>	(*) e (----)	Esses sinais ao lado das contagens indicam que a contagem automatizada não é confiável ou não disponível para a amostra em questão, respectivamente.	Fazer CDML e RMLH.

FONTE: O autor (2015); BARNES *et al.* (2005)

LEGENDA: RMLH: revisão microscópica de lâminas de hemograma; CDML: contagem diferencial manual de leucócitos; #: contagem absoluta; %: contagem relativa; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW-CV: *red cell distribution width* – coeficiente de variação; RDW-SD: *red cell distribution width* – desvio padrão; RBC: eritrócitos; HGB: dosagem de hemoglobina; PLT: plaquetas; VPM: volume plaquetário médio.

O primeiro conjunto de CT foi adaptado da ISLH, e foram incluídos nessa etapa a fim de verificar a capacidade desse conjunto de CT em capturar amostras com os novos CPL definidos para o HC-UFPR. Já os critérios dos Estudos 1 (variações quantitativas estreitas para os parâmetros hematológicos), 2 (variações quantitativas intermediárias) e 3 (variações quantitativas largas) foram formulados e ajustados para este trabalho por meio de revisão de literatura e levando-se em conta

aspectos clínicos, técnicos e conhecimentos derivados de experiências cotidianas no Laboratório de Hematologia.

Os critérios de triagem dos Estudos 1, 2 e 3 adaptados da ISLH foram propostos para o Laboratório de Hematologia do HC-UFPR, resultando em um conjunto de 23 regras de triagem (TABELA 6). Desse total, 7 critérios de triagem foram relacionados aos parâmetros de série vermelha, incluindo hemoglobina, VCM, CHCM, RDW-CV, RDW-SD e reticulócitos; 11 foram relacionadas aos parâmetros da série branca, incluindo contagem global de leucócitos e contagem diferencial absoluta e relativa de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos; 1 regra foi relacionada à ocorrência de 14 alertas suspeitos; 1 regra foi relacionada à ocorrência de contagens não confiáveis, não disponibilizadas ou parcialmente disponibilizadas pelos analisadores em decorrência de algum tipo de interferência; 2 regras foram relacionadas com as plaquetas, incluindo a contagem de plaquetas e o volume plaquetário médio; e 1 regra foi relacionada a amostras de recém-natos.

#### 4.7.1 Classificação das amostras para posterior análise com os novos critérios de triagem

As amostras foram analisadas novamente comparando-se as novas regras pelas quais elas foram selecionadas para revisão, com as novas regras de achados na lâmina de sangue periférico, e seguiram a mesma classificação anterior. Se uma amostra foi positiva para um determinado critério de triagem (TABELA 6) e na análise microscópica continha algum achado relevante ou critério de positividade em lâmina (TABELA 5), a amostra foi classificada como VP. Se uma amostra foi positiva para algum critério de triagem e não foi encontrado nenhum achado relevante na microscopia, a amostra foi classificada como falso FP. Se uma amostra foi negativa para todos os critérios de triagem e continha algum achado relevante na análise microscópica, a amostra foi classificada como FN. Por fim, se uma amostra foi negativa para todos os critérios de triagem e não apresentou na lâmina qualquer achado relevante, a amostra foi classificada como VN (BARNES *et al.*, 2005; RUZICKA *et al.*, 2001).

#### 4.8 CONTROLE DE QUALIDADE

Foram seguidos procedimentos de garantia de qualidade e de controle de qualidade interno e externo para monitorar o desempenho e assegurar boas condições de funcionamento dos analisadores hematológicos e conferir credibilidade aos resultados fornecidos. Todos os ajustes e configurações dos analisadores hematológicos foram realizados pela assessoria técnica e científica do fabricante. Os controles internos utilizados durante o período de coleta das amostras foram da mesma marca do fabricante (e-Check Sysmex 3 níveis) e foram analisados conjuntamente com as amostras dos pacientes. Os parâmetros analisados pelos analisadores hematológicos empregados neste estudo demonstraram, em média, os seguintes coeficientes de variação analítica ( $CV_A$ ): eritrócitos ( $CV_A = 0,69\%$ ); hemoglobina ( $CV_A = 0,78\%$ ); volume globular ( $CV_A = 1,06\%$ ); VCM ( $CV_A = 0,67\%$ ); HCM ( $CV_A = 0,74\%$ ); CHCM ( $CV_A = 0,96\%$ ); RDW-CV ( $CV_A = 0,71\%$ ); RDW-SD ( $CV_A = 0,83\%$ ); leucócitos ( $CV_A = 1,86\%$ ); neutrófilos % ( $CV_A = 2,11\%$ ); linfócitos % ( $CV_A = 3,35\%$ ); monócitos % ( $CV_A = 8,27\%$ ); eosinófilos % ( $CV_A = 6,87\%$ ); basófilos % ( $CV_A = 1,16\%$ ); plaquetas ( $CV_A = 3,47\%$ ); VPM ( $CV_A = 1,67\%$ ) e reticulócitos ( $CV_A = 5,35\%$ ).

A exatidão da contagem diferencial de leucócitos manual foi indicada como correlação da contagem diferencial automatizada dos analisadores hematológicos XE-2100D e XT-2000i com o método manual de referência utilizado neste trabalho. Os valores do coeficiente de correlação encontrados para o analisador XE-2100D na análise de 1.167 amostras normais foram: neutrófilos ( $r = 0,970$ ); linfócitos ( $r = 0,964$ ); monócitos ( $r = 0,788$ ); eosinófilos ( $r = 0,890$ ); basófilos ( $r = 0,550$ ). Granulócitos imaturos (promielócitos + mielócitos + metamielócitos) em 166 amostras ( $r = 0,863$ ). Os valores do coeficiente de correlação encontrados para o analisador XT-2000i na análise de 190 amostras normais foram: neutrófilos ( $r = 0,975$ ); linfócitos ( $r = 0,973$ ); monócitos ( $r = 0,755$ ); eosinófilos ( $r = 0,919$ ); basófilos ( $r = 0,505$ ). Todas as correlações foram de acordo com as especificações do fabricante: neutrófilos ( $r \geq 0,90$ ); linfócitos ( $r \geq 0,90$ ); monócitos ( $r \geq 0,75$ ); eosinófilos ( $r \geq 0,80$ ); basófilos ( $r \geq 0,50$ ); granulócitos imaturos ( $r \geq 0,83$ ) (SYSMEX CORPORATION, 2003; 2006).

#### 4.9 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo negativo, o valor preditivo positivo, a eficiência, a taxa de revisões microscópicas e os intervalos de confiança referentes à análise dos critérios para revisão microscópica de hemogramas automatizados foram obtidos com a utilização do programa Cálculos Estatísticos for Windows V.1.8 (BRAILE; GODOY, 1999). São eles calculados da seguinte forma: Sensibilidade (%) =  $(VP/VP + FN) \times 100$ ; Especificidade (%) =  $(VN/VN + FP) \times 100$ , Valor Preditivo Negativo (%) =  $(VN/VN + FN) \times 100$ , Valor Preditivo Positivo (%) =  $(VP/VP + FP) \times 100$ , Taxa de revisões microscópicas (%) =  $(VP + FP/VP + FP + FN + VN)$ , Eficiência (%) =  $(VP + VN/VP + FP + FN + VN) \times 100$ . Foi considerada eficiência a capacidade de um conjunto de critérios de triagem classificar corretamente os resultados verdadeiros, ou seja, os verdadeiro-positivos e os verdadeiro-negativos. O índice de Youden (Y) foi calculado pela seguinte fórmula:  $Y = \text{sensibilidade} + (\text{especificidade} - 1)$  (YOU DEN, 1950; SIRECI; SCHLABERG; KRATZ, 2010).

#### 4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A estatística descritiva das amostras foi realizada no programa Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, E.U.A). O teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e o teste exato de Fisher foram utilizados para comparar sensibilidade, especificidade, eficiência, taxa de revisões microscópicas e as taxas de falso-negativos, falso-positivos, verdadeiro-negativos e verdadeiro-positivos entre os diferentes conjuntos de critérios de triagem. Um valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Curvas de Características de Operação do Receptor (curvas ROC – *Receiver Operating Characteristic*) foram utilizadas para indicar o desempenho dos CRMHA estabelecidos e avaliados neste estudo, por permitirem verificar a variação da sensibilidade e especificidade para diferentes valores de corte (CLSI, 2011; AULESA *et al.*, 2004). As curvas ROC, bem como as comparações estatísticas entre

elas, foram realizadas no programa MEDCALC<sup>®</sup> versão 7.3.0.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).



## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS PARÂMETROS OBTIDOS PELA AUTOMAÇÃO

A TABELA 7 resume os resultados dos principais parâmetros hematológicos obtidos por meio da análise automatizada das amostras utilizadas nesse estudo. Esses parâmetros fizeram parte dos critérios de triagem quantitativos dos conjuntos de critérios de triagem avaliados nesse estudo.

TABELA 7 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ANALISADOS NESSE ESTUDO

PARÂMETRO	MÉDIA	DP	PERCENTIS		INTERVALO	N válido
			2,5%	97,5%		
Hemoglobina (g/dl)	12,15	2,4	7,1	16,3	2,5 – 20,0	1.977
VCM (fl)	89,27	8,27	72,1	106,7	44,4 – 127,5	1.977
CHCM (g/dl)	33,35	1,47	30,3	36,0	23,8 – 39,0	1.977
RDW-CV (%)	14,93	2,5	12,2	22,0	11,5 – 33,5	1.972
RDW-SD (fl)	47,9	8,58	37,3	69,2	32,3 – 112,7	1.970
Reticulócitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	77,86	92,39	4,0	411,9	2,4 – 536,9	191
Reticulócitos (%)	2,20	3,38	0,12	12,0	0,09 – 25,63	191
Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	8,66	6,34	1,44	22,4	0,01 – 107,8	1.977
Neutrófilos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	5,40	4,5	0,49	16,08	0 – 96,78	1.926
Neutrófilos (%)	60,12	17,56	16,3	89,9	0 – 96,6	1.926
Linfócitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	2,12	1,93	0,43	5,58	0,08 – 52,11	1.930
Linfócitos (%)	28,67	15,77	5,1	70,0	1,6 - 100	1.930
Monócitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0,61	0,41	0,11	1,62	0 – 5,49	1.935
Monócitos (%)	7,91	4,05	2,3	19,3	0 – 53,1	1.935
Eosinófilos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0,22	0,34	0,0	1,06	0 – 4,86	1.948
Eosinófilos (%)	2,76	3,34	0,0	12,3	0 - 28,4	1.948
Basófilos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0,03	0,08	0,0	0,15	0 – 1,96	1.945
Basófilos (%)	0,45	0,55	0,0	1,8	0 – 9,9	1.945
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	252	148	22,0	608	1 – 2.110	1.977
VPM (fl)	10,43	1,01	8,7	12,6	8,0 – 14,4	1.846

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: DP: Desvio padrão; N: número de amostras.

A partir desses dados foram avaliados todos os conjuntos de critérios de triagem e positividade em lâmina aplicados nesse estudo - CRMHA, sejam eles os adaptados da ISLH, sejam os propostos para o Laboratório como o Estudo 1 (limites estreitos), Estudo 2 (limites intermediários) e Estudo 3 (limites amplos).

As amostras analisadas nesse estudo mostraram grande amplitude nos intervalos de todos os parâmetros hematológicos utilizados como critérios de triagem quantitativos, refletindo a realidade de trabalho do Laboratório de Hematologia do HC-UFPR. Como exemplo, considerando os percentis de 2,5% e de 97,5%, constatou-se que do total de 1.977 amostras analisadas, 2,5% delas apresentaram dosagem de hemoglobina de 2,5 g/dl a 7,1 g/dl e outros 2,5% apresentaram dosagem de hemoglobina de 16,3 g/dl a 20,0 g/dl. Para a contagem de leucócitos 2,5% das amostras mostraram contagens de  $0,01 \times 10^3/\mu\text{l}$  a  $1,44 \times 10^3/\mu\text{l}$  e outros 2,5% mostraram contagens de  $22,4 \times 10^3/\mu\text{l}$  a  $107,8 \times 10^3/\mu\text{l}$  e para a contagem de plaquetas, 2,5% do total de amostras mostraram contagem de  $1 \times 10^3/\mu\text{l}$  a  $22,0 \times 10^3/\mu\text{l}$  e em outros 2,5% foram verificadas contagens de  $608 \times 10^3/\mu\text{l}$  a  $2.110 \times 10^3/\mu\text{l}$ .

## 5.2 AVALIAÇÃO DA IMPLANTAÇÃO DOS CRMHA PROPOSTOS PELO GRUPO INTERNACIONAL DE CONSENSO EM REVISÕES HEMATOLÓGICAS DA ISLH NO LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA DO HC-UFPR

### 5.2.1 Análise dos achados morfológicos encontrados na revisão das lâminas conforme critérios de positividade em lâmina da ISLH

Dentre as 1.977 amostras utilizadas na avaliação inicial dos critérios de triagem adaptados da ISLH, 583 (29,49%) foram consideradas positivas e 1.394 (70,51%) foram consideradas negativas para achados relevantes na microscopia, considerando os critérios de positividade em lâmina da ISLH, expostos na TABELA 4.

A TABELA 8 mostra a ocorrência das alterações morfológicas das séries vermelha, branca e de plaquetas, conforme os critérios de positividade em lâmina da ISLH.

Dentre as 583 amostras consideradas positivas, 121 (20,75%) tinham alterações morfológicas da série vermelha, 376 (64,49%) tinham alterações morfológicas de série branca, 8 (1,37%) tinham alterações morfológicas de

plaquetas, 2 (0,34%) tinham alterações de série vermelha e plaquetas, 72 (12,34%) tinham alterações das séries vermelha e branca, 3 (0,51%) tinham alterações morfológicas de série branca e de plaquetas e 1 (0,17%) tinham alterações das séries vermelha, branca e de plaquetas.

A contagem automatizada e a contagem diferencial de leucócitos manual foram realizadas em todas as 1977 amostras. Os três achados anormais mais comuns de série vermelha foram anisocitose  $\geq 2+$  (123 ocorrências), eritroblastos  $\geq 1/100$  leucócitos (56 ocorrências) e hipocromia  $\geq 2+$  (38 ocorrências). Para a série branca os três achados mais comuns foram bastão  $> 8\%$  (396 ocorrências), mielócitos  $\geq 1\%$  (115 ocorrências) e metamielócitos  $> 2$  (35 ocorrências). Ressalta-se que em 16 amostras foram encontrados blastos. Agregados plaquetários  $>$  raros/ocasionais (10 ocorrências) foram encontrados mais frequentemente que plaquetas gigantes (4 ocorrências).

TABELA 8 – OCORRÊNCIA DE CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA ADAPTADOS ISLH

<b>Critério de positividade em lâmina</b>	<b>Ocorrência (n)</b>	<b>Intervalos observados (%)</b>	<b>Proporção em relação às amostras positivas (%)</b>	<b>Proporção em relação ao total de amostra (%)</b>
Agregados plaquetários > raros/ocasionais	10	-	1,71	0,50
Anisocitose $\geq 2+$	123	-	21,09	6,22
Bastão > 8%	396	15 – 74	67,92	20,03
Blastos $\geq 1\%$	16	1 – 96	2,74	0,80
Codócitos $\geq 2+$	3	-	0,51	0,15
Dacriócitos $\geq 2+$	1	-	0,17	0,05
Corpúsculos de Döhle $\geq 2+$	5	-	0,85	0,25
Drepanócitos $\geq 2+$	6	-	1,02	0,30
Eliptócitos $\geq 2+$	3	-	0,51	0,15
Eritroblastos $\geq 1/100$ leucócitos	56	1 - 75	9,60	2,83
Esferócitos $\geq 2+$	3	-	0,51	0,15
Esquistócitos $\geq 2+$	2	-	0,34	0,10
Granulações tóxicas $\geq 2+$	13	-	2,22	0,65
Hipocromia $\geq 2$	38	-	6,51	1,92
Howell-Jolly $\geq 2+$	4	-	0,68	0,20
Linfócitos atípicos > 5%	8	5 - 20	1,37	0,40
Macrócitos $\geq 2+$	26	-	4,45	1,31
Metamielócitos > 2	35	3 - 15	6,00	1,77
Mielócitos $\geq 1$	115	1 - 24	19,72	5,81
Micrócitos $\geq 2+$	37	-	6,34	1,87
Plaquetas gigantes $\geq 2+$	4	-	0,68	0,20
Plasmócitos $\geq 1\%$	3	6 - 16	0,51	0,15
Poiquilocitose $\geq 2+$	25	-	4,28	1,26
Policromatofilia $\geq 2+$	24	-	4,11	1,21
Ponteados basófilos $\geq 2+$	1	-	0,17	0,05
Prolinfócitos $\geq 1\%$	1	6	0,17	0,05
<i>Rouleaux</i> $\geq 2+$	7	-	1,20	0,35
Vacúolos citoplasmáticos $\geq 2+$	2	-	0,34	0,10

FONTE: O autor (2015)

### 5.2.2 Avaliação da taxa de indicação para a RMLH de acordo com os critérios de triagem adaptados da ISLH

A indicação para a RMLH foi determinada pelas diretrizes do conjunto de critérios de triagem adaptados da ISLH para esse estudo (TABELA 3) e são mostradas na TABELA 9.

TABELA 9 – TAXAS DE INDICAÇÃO PARA A RMLH DE ACORDO COM OS CRITÉRIOS DE TRIAGEM ADAPTADOS DA ISLH

PARÂMETRO		CRITÉRIO DE TRIAGEM QUANTITATIVO	TAXA DE INDICAÇÃO N (%)
Hemoglobina		< 7,0 g/dl ou > 18,5 g/dl	47 (2,4)
VCM		< 75 fl ou >105 fl (adultos e crianças)	137 (6,9)
CHCM		< 30 g/dl	42 (2,1)
CHCM		> 36,5 g/dl	16 (0,80)
RDW-CV		> 22%	49 (2,5)
Reticulócitos		> 100 x 10 <sup>3</sup> /μl	34 (1,7)
Leucócitos		< 4,0 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 30,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	270 (13,7)
Neutrófilos		< 1,0 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 20,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	103 (5,2)
Linfócitos		> 5,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos) ou > 7,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (crianças ≤ 12 anos)	42 (2,1)
Monócitos		> 1,5 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos) ou > 3,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (crianças ≤ 12 anos)	39 (1,9)
Eosinófilos		> 2,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	13 (0,7)
Basófilos		> 0,5 x 10 <sup>3</sup> /μl	10 (0,5)
Plaquetas		< 100 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 1.000 x 10 <sup>3</sup> /μl	247 (12,5)
VPM		≥ 12,5	62 (3,1)
PARÂMETRO		CRITÉRIO DE TRIAGEM QUALITATIVO	TAXA DE INDICAÇÃO N (%)
Alertas suspeitos	Granulócitos imaturos	Amostras sinalizadas com alertas suspeitos relevantes	171 (8,6)
	Desvio nuclear à esquerda		267 (13,5)
	Linfócitos atípicos		120 (6,0)
	Linfócitos anormais/blastos		106 (5,4)
	Blastos		40 (2,0)
	Eritroblastos		127 (6,4)
	Fragmentos eritrocitários		14 (0,70)
	População eritrocitária dimórfica		5 (0,3)
	Hemácias resistentes à lise		3 (0,2)
	Agregados plaquetários		134 (6,8)
	Problemas na dosagem de hemoglobina		7 (0,4)
Outros alertas suspeitos	Gráfico de dispersão de leucócitos anormal	56 (2,8)	
Outros alertas suspeitos	Gráfico de dispersão de plaquetas anormal	2 (0,1)	
Recém-natos	Todos	36 (1,8)	
Contagem diferencial de leucócitos	Contagem diferencial de leucócitos não disponível ou incompleta (----)	50 (2,5)	

continua

TABELA 9 – TAXAS DE INDICAÇÃO PARA A RMLH DE ACORDO COM OS CRITÉRIOS DE TRIAGEM ADAPTADOS DA ISLH

PARÂMETRO	CRITÉRIO DE TRIAGEM QUALITATIVO	conclusão
		TAXA DE INDICAÇÃO N (%)
RDW-CV	RDW-CV não disponível (----)	6 (0,3)
VPM	VPM não disponível (----)	128 (6,5)
Contagem de leucócitos	Contagem de leucócitos não confiável (*)	225 (11,4)
Contagem diferencial de leucócitos	Contagem diferencial de leucócitos não confiável (*)	521 (26,4)
Contagens de série vermelha	Contagens de série vermelha não confiáveis (*)	23 (1,2)
Contagem de plaquetas	Contagem de plaquetas não confiável (*)	210 (10,6)
VPM	VPM não confiável (*)	85 (4,3)
<b>TOTAL</b>	<b>910 amostras (46,03% de revisões microscópicas)</b>	

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: N: número de amostras; (\*): contagens não confiáveis; (----): contagens não disponíveis.

### 5.2.3 Avaliação das características de desempenho da implantação dos CRMHA adaptados da ISLH

Os resultados obtidos na avaliação dos critérios de triagem adaptados da ISLH, considerando os critérios de positividade em lâmina da ISLH, são mostrados na TABELA 10.

TABELA 10 – AVALIAÇÃO DA IMPLANTAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE REVISÃO DE HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS. CRITÉRIOS DE TRIAGEM X CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA, AMBOS ADAPTADOS DA ISLH

Classificação (%)	XE-2100D (n = 1573)	XT-2000i (n = 404)	TOTAL (n = 1977)
Verdadeiro-positivo	21,93	25,99	22,76
Falso-positivo	21,93	28,46	23,27
Verdadeiro-negativo	48,77	41,34	47,24
Falso-negativo	7,37	4,21	6,73
Parâmetros analisados	%	%	% (IC 95%)
Especificidade	68,97	59,22	67,00 (64,5 – 69,5)
Sensibilidade	74,84	86,06	77,19 (73,8 – 80,6)
Valor preditivo positivo	50,00	47,73	49,45 (46,2 – 52,7)
Valor preditivo negativo	86,86	90,76	87,54 (85,6 – 89,5)
Eficiência	70,69	67,32	70,00 (68,0 – 72,0)
	%	%	%
Taxa de revisões microscópicas	43,86	54,45	46,03

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

A taxa total de revisões microscópicas, a eficiência e a taxa de falso-negativos observadas na avaliação inicial dos CRMHA adaptados da ISLH (TABELA

10) e conforme o padrão ouro de revisão microscópica da própria ISLH (TABELA 4), foram de 46,03%, 70,0% e 6,73%, respectivamente. A especificidade observada indicou que 67,0% das amostras negativas foram classificadas corretamente e a sensibilidade observada indicou que 77,19% das amostras positivas, foram classificadas corretamente. O valor preditivo negativo observado indicou que 87,54% das amostras verdadeiramente negativas, foram classificadas corretamente. O valor preditivo positivo observado indicou que apenas 49,45% das amostras positivas para achados morfológicos, foram classificadas corretamente.

Quando foram separadas as amostras de pacientes internados e ambulatoriais, a taxa de falso-negativos das amostras de pacientes internados (9,43%) foi significativamente maior quando comparada com a taxa total de falso-negativos (6,73%,  $p = 0,0405$ ). Já a taxa de falso-negativos das amostras dos pacientes ambulatoriais (5,22%) não foi diferente da taxa total de falso-negativos ( $p = 0,1033$ ). As taxas de falso-positivos das amostras de pacientes internados (25,41%) e ambulatoriais (22,87%) não foram diferentes quando comparadas com o total de amostras (23,27%,  $p = 0,5083$  e  $p = 0,6829$ , respectivamente). As taxas de revisões microscópicas nas amostras de pacientes internados e ambulatoriais foram de 62,55% e 39,24%, respectivamente. A primeira foi estatisticamente superior ( $p < 0,0001$ ) e a segunda foi estatisticamente inferior ( $p = 0,0148$ ) à taxa total de revisões microscópicas de 46,03%.

#### 5.2.4 Análise dos falso-negativos e dos falso-positivos após aplicação dos CRMHA adaptados da ISLH

Na avaliação inicial dos CRMHA adaptados da ISLH foram observadas 133 amostras falso-negativas (TABELA 11), das quais 114 casos foram de desvio nuclear à esquerda  $> 8\%$  de bastões, 13 de mielócitos  $\geq 1\%$ , 13 de alterações de série vermelha e um de alterações nas plaquetas. Dentre as alterações de série vermelha, observou-se um falso-negativo para *rouleaux* eritrocitário.

TABELA 11 – OCORRÊNCIA DE FALSO-NEGATIVOS APÓS A APLICAÇÃO DOS CRMHA ADAPTADOS DA ISLH

Ocorrência de falso-negativos	n	%
Bastões > 8%	114	5,76
Morfologia série vermelha $\geq 2+$	13	0,65
Mielócitos $\geq 1\%$	13	0,65
Plaquetas gigantes $\geq 2+$	1	0,05
<b>TOTAL DE OCORRÊNCIAS</b>	<b>141*</b>	<b>6,73%</b>
<b>TOTAL DE AMOSTRAS FALSO-NEGATIVAS</b>	<b>133</b>	

FONTE: O autor (2015)

\*Algumas amostras apresentaram mais de um critério de positividade em lâmina.

A TABELA 12 mostra as taxas de falso-positivos observadas para cada critério quantitativo e qualitativo de triagem da ISLH empregados nesse estudo. Os principais critérios de triagem que geraram resultados falso-positivos na avaliação inicial dos CRMHA da ISLH foram: contagem diferencial de leucócitos não confiável (9,96% do total de amostras), leucócitos  $< 4,0 \times 10^3/\mu\text{l}$  (8,34%), plaquetas  $< 100 \times 10^3/\mu\text{l}$  (6,62%) e os alertas suspeitos de desvio nuclear à esquerda (3,38%) e de agregados plaquetários (3,03%). Contagens não confiáveis de plaquetas, que geraram gráficos de dispersão e de distribuição anormais nos analisadores hematológicos representaram 4,75% do total de amostras. Contagens não confiáveis de leucócitos representaram 4,5% do total de amostras.



TABELA 12 – CAUSAS DE FALSO-POSITIVOS NA AVALIAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM ADAPTADOS DA ISLH

<b>CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUANTITATIVOS</b>	
<b>CRITÉRIO</b>	<b>TAXA DE FALSO-POSITIVOS (N (%))</b>
Hemoglobina < 7,0 g/dl	15 (0,75%)
Hemoglobina < 18,5 g/dl	5 (0,25%)
VCM < 75 fl	23 (1,16%)
VCM > 105 fl	20 (1,01%)
CHCM < 30 g/dl	8 (0,4%)
CHCM > 36,5 g/dl	8 (0,4%)
RDW-CV > 22%	3 (0,15%)
Reticulócitos > 100 x 10 <sup>3</sup> /μl	8 (0,4%)
Leucócitos < 4,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	165 (8,34%)
Leucócitos > 30,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	5 (0,25%)
Neutrófilos < 1,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	70 (3,54%)
Neutrófilos > 20,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	4 (0,2%)
Linfócitos > 5,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos)	14 (0,71%)
Linfócitos > 7,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (criança ≤ 12 anos)	19 (0,96%)
Monócitos > 1,5 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos)	10 (0,5%)
Monócitos > 3,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (criança ≤ 12 anos)	0
Eosinófilos > 2,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	5 (0,25%)
Basófilos > 0,5 x 10 <sup>3</sup> /μl	1 (0,05%)
Plaquetas < 100 x 10 <sup>3</sup> /μl	131 (6,62%)
Plaquetas > 1000 x 10 <sup>3</sup> /μl	2 (0,1%)
VPM ≥ 12,5 fl	39 (1,97%)
<b>CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUALITATIVOS</b>	
<b>CRITÉRIO</b>	<b>TAXA DE FALSO-POSITIVOS (N (%))</b>
Recém-nato	12 (0,6%)
Todos os alertas suspeitos	204 (10,31%)
Granulócitos imaturos	34 (1,72%)
Desvio à esquerda	67 (3,38%)
Linfócitos atípicos	40 (2,02%)
Linfócitos anormais/blastos	36 (1,82%)
Blastos	6 (0,3%)
Eritroblastos	35 (1,77%)
Fragmentos eritrocitários	3 (0,15%)
Hemácias resistentes à lise	1 (0,05%)
Agregados plaquetários	60 (3,03%)
Defeito na dosagem de hemoglobina	5 (0,25%)
População de hemácias dimórficas	1 (0,05%)
Contagens não confiáveis indicadas por (*)	236 (11,93%)
Leucócitos	89 (4,5%)
Contagem diferencial de leucócitos	197 (9,96%)
Série vermelha	7 (0,35%)
Plaquetas	94 (4,75%)
VPM	45 (2,27%)
Contagens não disponíveis indicadas por (----)	72 (3,64%)
RDW	1 (0,05%)
Contagem diferencial de leucócitos	25 (1,26%)
VPM	48 (2,42%)

FONTE: O autor (2015)

NOTA: O percentual de falso-positivos foi calculado em relação ao total de amostras

### 5.3 ESTABELECIMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM E DE NOVOS CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA PRÓPRIOS PARA O LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA DO HC-UFPR

#### 5.3.1 Análise dos achados morfológicos encontrados na revisão das lâminas conforme critérios de positividade em lâmina do HC-UFPR

Dentre as 1.977 amostras utilizadas neste trabalho, 491 (24,84%) foram consideradas positivas, considerando os critérios de positividade em lâmina do HC-UFPR (TABELA 5), e 1.486 (75,16%) foram consideradas negativas para achados relevantes na microscopia. Dentre as 461 amostras consideradas positivas, 195 (39,71%) tinham alterações morfológicas da série vermelha, 217 (44,19%) tinham alterações morfológicas de série branca, 7 (1,42%) tinham alterações morfológicas de plaquetas, 4 (0,81%) tinham alterações de série vermelha e plaquetas, 64 (13,03%) tinham alterações de série vermelha e de série branca, 2 (0,41%) tinham alterações morfológicas de série branca e de plaquetas e 2 (0,41%) tinham alterações de série vermelha, de série branca e de plaquetas. A contagem automatizada e a contagem diferencial de leucócitos manual foram realizadas em todas as 1977. A contagem automatizada de reticulócitos foi realizada apenas nas amostras em que as mesmas haviam sido solicitadas pelos médicos, totalizando, desta forma, 191 amostras.

A TABELA 13 mostra a ocorrência das alterações morfológicas das séries vermelha e branca e de plaquetas, conforme critérios de positividade em lâmina do HC-UFPR (TABELA 5).

TABELA 13 – OCORRÊNCIA DOS CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA DO HC-UFPR

Critério de positividade em lâmina	Ocorrência (n)	Intervalos observados (%)	Proporção em relação às amostras positivas (%)	Proporção em relação ao total de amostra (%)
Agregados plaquetários > raros/ocasionais	10	-	2,03	0,50
Anisocitose $\geq 2+$	123	-	24,03	5,96
(Anisocitose $\geq 1+$ ) + (Poiquilocitose $\geq 1+$ ) + (Forma eritrocitária $\geq 1+$ ) + (Alteração de cor $\geq 1+$ )	102	-	20,57	5,10
Bastão $\geq 15\%$	188	15 – 74	38,28	9,50
Blastos $\geq 1\%$	16	1 – 96	0,32	0,80
Anel de Cabot: presença	1	-	0,20	0,05
Codócitos $\geq 2+$	3	-	0,61	0,15
Dacriócitos $\geq 1+$	66	-	13,23	3,28
Corpúsculos de Döhle $\geq 1+$	74	-	15,07	3,74
Drepanócitos: presença	8	-	1,62	0,40
Eliptócitos $\geq 2+$	3	-	0,61	0,15
Eritroblastos $\geq 1/$ 100 leucócitos	56	1 - 75	10,99	2,73
Esferócitos $\geq 1+$	4	-	0,81	0,20
Esquistócitos $\geq 1+$	27	-	5,49	1,36
Granulações tóxicas $\geq 2+$	13	-	2,64	0,65
Hipocromia $\geq 2$	38	-	7,73	1,92
Howell-Jolly: presença	31	-	6,31	1,56
Linfócitos atípicos $\geq 5\%$	10	5 - 20	2,03	0,50
Macrócitos $\geq 2+$	26	-	5,29	1,31
Metamielócitos $\geq 3$	35	3 - 15	7,12	1,77
Mielócitos $\geq 1$	115	1 - 24	23,42	5,81
Micrócitos $\geq 2+$	37	-	7,53	1,87
Plaquetas gigantes $\geq 2+$	4	-	0,81	0,20
Plasmócitos $\geq 1\%$	3	6 - 16	0,61	0,15
Poiquilocitose $\geq 2+$	25	-	5,09	1,26
Policromatofilia $\geq 2+$	24	-	4,88	1,21
Polilobócitos $\geq 1+$	4	-	0,81	0,20
Ponteadado basófilo $\geq 1+$	19	-	3,86	0,96
Prolinfócitos $\geq 1\%$	1	6	0,20	0,05
Pseudo Pelger Huët: presença	2	-	0,41	0,10
<i>Rouleaux</i> $\geq 2+$	7	-	1,42	0,35
Vacúolos citoplasmáticos $\geq 1+$	9	-	1,83	0,45

FONTE: O autor (2015)

Os três achados anormais mais comuns de série vermelha foram anisocitose  $\geq 2+$  (123 ocorrências), a soma de alterações [(Anisocitose  $\geq 1+$ ) + (Poiquilocitose  $\geq 1+$ ) + (Forma eritrocitária  $\geq 1+$ ) + (Alteração de cor  $\geq 1+$ )] (102 ocorrências) e dacriócitos  $\geq 1+$  (66 ocorrências). Para a série branca os três achados mais comuns foram bastão  $\geq 15\%$  (188 ocorrências), mielócitos  $\geq 1\%$  (115 ocorrências) e corpúsculo de Döhle (74 ocorrências). Ressalta-se que em 16 amostras foram

encontrados blastos. Agregados plaquetários (10) ocorrências foram encontrados mais frequentemente que plaquetas gigantes (4 ocorrências).

### 5.3.2 Avaliação da taxa de indicação para a RMLH de acordo com os critérios de triagem dos Estudos 1, 2 e 3

A indicação para a RMLH foi determinada pelas diretrizes do conjunto de critérios de triagem dos Estudos 1, 2 e 3 (TABELA 6) e são mostradas na TABELA 14. Ressalta-se que os critérios de triagem adaptados da ISLH utilizados nessa etapa do estudo foram os mesmos que foram avaliados na etapa inicial. Portanto, as taxas de indicação para RMLH de acordo com os critérios de triagem quantitativos e qualitativos da ISLH nessa etapa foram as mesmas apresentadas na TABELA 9. Além disso, cabe salientar que as taxas de indicação para a RMLH conforme os critérios de triagem qualitativos, comum a todos os Estudos e apresentados na TABELA 9, foram as mesmas para todos os Estudos.

TABELA 14 – TAXAS DE INDICAÇÃO PARA A RMLH DE ACORDO COM OS CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUANTITATIVOS DOS ESTUDOS 1, 2 E 3

PARÂMETRO	CRITÉRIO DE TRIAGEM QUANTITATIVO (ESTUDO 1)	TAXA DE INDICAÇÃO N (%)
Hemoglobina	< 9,5 g/dl ou > 18,0 g/dl	300 (15,17)
VCM	< 77 fl (adultos) e < 74 fl (crianças ≤ 12 anos) ou > 100 fl (adultos e crianças)	234 (11,83)
CHCM	< 31,5 g/dl	174 (8,8)
CHCM	> 36,5 g/dl	16 (0,80)
RDW-CV	> 17%	303 (15,32)
RDW-SD	> 60 fl	165 (8,34)
Reticulócitos	> 150 x 10 <sup>3</sup> /μl	19 (0,96)
Reticulócitos	> 2,5%	41 (2,07)
Leucócitos	< 4,0 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 12,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	573 (28,98)
Neutrófilos	< 1,8 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 7,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	671 (33,94)
Neutrófilos	< 38% ou > 70%	755 (38,18)
Linfócitos	< 0,8 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 5,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos) e > 7,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (crianças ≤ 12 anos)	225 (11,38)
Linfócitos	< 20% ou > 50%	769 (38,89)
Monócitos	< 0,1 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 1,3 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos) e > 2,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (crianças ≤ 12 anos)	113 (5,71)
Monócitos	< 1% ou > 12%	212 (10,72)
Eosinófilos	> 2,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	13 (0,7)
Eosinófilos	> 20%	13 (0,7)
Basófilos	> 0,3 x 10 <sup>3</sup> /μl	15 (0,75)
Basófilos	> 2%	38 (1,92)
Plaquetas	< 100 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 600 x 10 <sup>3</sup> /μl	296 (14,97)
VPM	> 12,0 fl	128 (6,47)
PARÂMETRO	CRITÉRIO DE TRIAGEM QUANTITATIVO (ESTUDO 2)	TAXA DE INDICAÇÃO N (%)
Hemoglobina	< 8,0 g/dl ou > 19,0 g/dl	98 (4,95)
VCM	< 75 fl ou > 105 fl (adultos e crianças)	137 (6,92)
CHCM	< 31,0 g/dl	102 (5,15)
CHCM	> 36,5 g/dl	16 (0,80)
RDW-CV	> 18%	201 (10,16)
RDW-SD	> 65 fl	95 (4,8)
Reticulócitos	> 150 x 10 <sup>3</sup> /μl	19 (0,96)
Reticulócitos	> 2,5%	41 (2,07)
Leucócitos	< 3,5 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 15,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	352 (17,8)
Neutrófilos	< 1,5 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 11,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	316 (15,98)
Neutrófilos	< 35% ou > 80%	394 (19,92)
Linfócitos	< 0,8 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 5,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos) e > 7,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (crianças ≤ 12 anos)	225 (11,38)
Linfócitos	< 12% ou > 60%	327 (16,54)
Monócitos	< 0,1 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 1,3 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos) e > 2,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (crianças ≤ 12 anos)	113 (5,71)
Monócitos	< 1% ou > 16%	92 (4,65)
Eosinófilos	> 2,5 x 10 <sup>3</sup> /μl	7 (0,35)
Eosinófilos	> 25%	4 (0,2)
Basófilos	> 0,3 x 10 <sup>3</sup> /μl	15 (0,75)
Basófilos	> 2%	38 (1,92)
Plaquetas	< 100 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 800 x 10 <sup>3</sup> /μl	252 (12,74)
VPM	> 12,5 fl	49 (2,47)

continua

TABELA 14 – TAXAS DE INDICAÇÃO PARA A RMLH DE ACORDO COM OS CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUANTITATIVOS DOS ESTUDOS 1, 2 E 3

PARÂMETRO	CRITÉRIO DE TRIAGEM QUANTITATIVO (ESTUDO 3)	conclusão
		TAXA DE INDICAÇÃO N (%)
Hemoglobina	< 7,5 g/dl ou > 20,0 g/dl	65 (3,28)
VCM	< 74 fl ou >105 fl (adultos e crianças)	127 (6,42)
CHCM	< 30,0 g/dl	42 (2,12)
CHCM	> 36,5 g/dl	16 (0,80)
RDW-CV	> 19%	144 (7,28)
RDW-SD	> 70 fl	44 (2,22)
Reticulócitos	> 150 x 10 <sup>3</sup> /μl	19 (0,96)
Reticulócitos	> 2,5%	41 (2,07)
Leucócitos	< 3,2 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 20,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	231 (11,68)
Neutrófilos	< 1,0 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 15,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	155 (7,84)
Neutrófilos	< 25% ou > 85%	215 (10,87)
Linfócitos	< 0,5 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 5,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos) e > 7,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (crianças ≤ 12 anos)	111 (5,61)
Linfócitos	< 8% ou > 70%	159 (8,04)
Monócitos	< 0,1 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 1,5 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos) e > 2,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (crianças ≤ 12 anos)	93 (4,7)
Monócitos	< 1% ou > 20%	55 (2,78)
Eosinófilos	> 2,5 x 10 <sup>3</sup> /μl	7 (0,35)
Eosinófilos	> 30%	0
Basófilos	> 0,5 x 10 <sup>3</sup> /μl	10 (0,50)
Basófilos	≥ 3%	11 (0,55)
Plaquetas	< 90 x 10 <sup>3</sup> /μl ou > 1.000 x 10 <sup>3</sup> /μl	229 (11,58)
VPM	≥ 13,0 fl	17 (0,85)

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: N: número de amostras.

Os critérios de triagem quantitativos que mostraram as maiores taxas de indicação para a RMLH observadas nos Estudos 1, 2 e 3 foram, respectivamente, linfócitos < 20% ou > 50% (38,89%), neutrófilos < 35% ou > 80% (19,92%) e leucócitos < 3,2 x 10<sup>3</sup>/μl ou > 20,0 x 10<sup>3</sup>/μl (11,68%).

### 5.3.3 Avaliação das características de desempenho da implantação dos novos CRMHA no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR

Os critérios de triagem do Estudo 1 foram estabelecidos com limites estreitos para os parâmetros hematológicos, os critérios de triagem do Estudo 2 foram estabelecidos com limites intermediários e os do Estudo 3 com limites mais amplos para alguns parâmetros hematológicos. No Estudo 3 foi utilizado o menor limite de triagem para leucócitos (< 3,2 x 10<sup>3</sup>/μl) e plaquetas (< 90,0 x 10<sup>3</sup>/μl). Diferentemente

dos critérios de triagem da ISLH, nos Estudos 1, 2 e 3 foram utilizadas as contagens relativas de leucócitos e o RDW-SD como critérios de triagem. Os limites de corte superiores para plaquetas variaram de  $> 600 \times 10^3/\mu\text{l}$  (Estudo 1) até  $> 1.000 \times 10^3/\mu\text{l}$  (Estudo 3 e adaptados da ISLH).

Os resultados obtidos na avaliação dos critérios de triagem adaptados da ISLH, Estudos 1, 2 e 3, considerando os critérios de positividade em lâmina do HC-UFPR são mostrados nas TABELAS 15 e 16.

TABELA 15 – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES CONJUNTOS DE CRITÉRIOS DE TRIAGEM

<b>Crítérios de triagem avaliados</b>	<b>XE-2100D (n = 1.573)</b>	<b>XT-2000i (n = 404)</b>	<b>TOTAL (n = 1.977)</b>
<b>Adaptados da ISLH</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Verdadeiro-positivo	19,58	25,99	<b>20,89</b>
Falso-positivo	24,85	27,97	<b>25,49</b>
Verdadeiro-negativo	51,18	43,81	<b>49,67</b>
Falso-negativo	4,39	2,23	<b>3,95</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>% (IC 95%)</b>
Especificidade	67,30	61,03	<b>66,08 (63,7 – 68,5)</b>
Sensibilidade	81,70	92,11	<b>84,11 (80,9 – 87,3)</b>
Valor preditivo positivo	44,06	48,17	<b>45,03 (41,8 – 48,3)</b>
Valor preditivo negativo	92,10	95,16	<b>92,64 (91,1 – 94,2)</b>
Eficiência	70,76	69,80	<b>70,56 (68,6 – 72,6)</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Taxa de revisões microscópicas	44,43	53,96	<b>46,38</b>
<b>Estudo 1</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Verdadeiro-positivo	23,39	27,97	<b>24,33</b>
Falso-positivo	47,36	57,92	<b>49,52</b>
Verdadeiro-negativo	28,68	13,87	<b>25,65</b>
Falso-negativo	0,57	0,24	<b>0,50</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>% (IC 95%)</b>
Especificidade	37,70	19,31	<b>34,11 (31,7 – 36,5)</b>
Sensibilidade	97,61	99,12	<b>97,96 (96,7 – 99,2)</b>
Valor preditivo positivo	33,06	32,56	<b>32,95 (30,5 – 35,4)</b>
Valor preditivo negativo	98,04	98,24	<b>98,06 (96,9 – 99,3)</b>
Eficiência	52,06	41,83	<b>49,97 (47,8 – 52,2)</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Taxa de revisões microscópicas	70,75	85,89	<b>73,85</b>
<b>Estudo 2</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Verdadeiro-positivo	21,68	27,48	<b>22,86</b>
Falso-positivo	30,77	35,15	<b>31,66</b>
Verdadeiro-negativo	45,26	36,63	<b>43,51</b>
Falso-negativo	2,29	0,74	<b>1,97</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>% (IC 95%)</b>
Especificidade	59,53	51,03	<b>57,87 (55,4 – 60,4)</b>
Sensibilidade	90,45	97,36	<b>92,05 (89,7 – 94,4)</b>
Valor preditivo positivo	41,33	43,87	<b>41,93 (39,0 – 44,9)</b>
Valor preditivo negativo	95,19	98,01	<b>95,66 (94,3 – 97,0)</b>
Eficiência	66,94	64,10	<b>66,36 (64,3 – 68,4)</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Taxa de revisões microscópicas	52,45	62,63	<b>54,52</b>
<b>Estudo 3</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Verdadeiro-positivo	20,85	26,98	<b>22,10</b>
Falso-positivo	23,52	26,98	<b>24,23</b>
Verdadeiro-negativo	52,52	44,80	<b>50,94</b>
Falso-negativo	3,11	1,24	<b>2,73</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>% (IC 95%)</b>
Especificidade	69,06	62,41	<b>67,77 (65,4 – 70,1)</b>
Sensibilidade	87,00	95,61	<b>89,00 (86,2 – 91,8)</b>
Valor preditivo positivo	46,99	50,00	<b>47,70 (44,5 – 50,9)</b>
Valor preditivo negativo	94,40	97,31	<b>94,91 (93,6 – 96,2)</b>
Eficiência	73,36	71,78	<b>73,04 (71,1 – 75,0)</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Taxa de revisões microscópicas	44,37	53,96	<b>46,33</b>

FONTE: O autor (2015). LEGENDA: IC 95%: intervalo de confiança de 95%. NOTA: Essa tabela mostra os resultados da avaliação dos conjuntos de CT (adaptados da ISLH, Estudos 1, 2 e 3), considerando os novos CPL definidos para o HC-UFPR.



TABELA 16 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DIFERENTES CONJUNTOS DE CRITÉRIOS DE TRIAGEM

Características de desempenho	Critérios de triagem					
	Estudo 1 e Estudo 2	Estudo 1 e Estudo 3	Estudo 1 e ISLH	Estudo 2 e Estudo 3	Estudo 2 e ISLH	Estudo 3 e ISLH
<b>Verdadeiro-positivo</b>	$p = 0,2943$	$p = 0,1053$	$p = 0,0118$	$p = 0,5938$	$p = 0,1438$	$p = 0,3733$
<b>Falso-positivo</b>	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,3772$
<b>Verdadeiro-negativo</b>	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,4453$
<b>Falso-negativo</b>	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,1414$	$p = 0,0003$	$p = 0,0414$
<b>Sensibilidade</b>	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,127$	$p < 0,001$	$p = 0,031$
<b>Especificidade</b>	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,349$
<b>Taxa de revisões</b>	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 1$
<b>Eficiência</b>	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,005$	$p = 0,09$

FONTE: O autor (2015)

NOTA 1: Primeiramente foi feito o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para verificar se havia diferença para cada característica de desempenho avaliada entre todos os conjuntos de triagem e todas as características de desempenho mostraram  $p \leq 0,001$ . Na sequência foi feito o teste exato de Fisher em tabelas 2 x 2 para comparar verdadeiro-positivos, falso-positivos, verdadeiro-negativos, falso-negativos, sensibilidade, especificidade, taxas de revisões microscópicas e eficiência entre os diferentes conjuntos de triagem. Um valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

NOTA 2: Os valores de  $p$  mostrados nessa tabela correspondem aos valores encontrados na análise das características de desempenho em tabelas 2 x 2 pelo teste exato de Fisher.

NOTA 3: Essa tabela mostra os resultados da avaliação dos conjuntos de critérios de triagem (adaptados da ISLH, Estudos 1, 2 e 3), considerando os novos critérios de positividade em lâmina definidos para o HC-UFPR.

Os critérios de triagem avaliados (TABELA 15 e TABELA 16) foram diferentes em várias características de desempenho. A eficiência dos critérios de triagem adaptados da ISLH e do Estudo 3 foi de 70,56% e 73,04, respectivamente, e elas não mostraram diferenças estatísticas entre si ( $p = 0,09$ ). Contudo, ambos os critérios de triagem foram estatisticamente mais eficientes que os critérios de triagem dos Estudos 1 e 2 ( $p < 0,05$ ). A taxa de falso-negativos foi de 2,73% para o Estudo 3 e de 3,95% para os critérios de triagem adaptados da ISLH ( $p < 0,05$ ), sendo que esse último ultrapassou o limite de segurança de 3% de falso-negativos estabelecido nesse estudo. A taxa de revisões microscópicas dos critérios de triagem adaptados da ISLH (46,38%) foi maior que a taxa de revisões do Estudo 3 (46,33%), apesar de não serem estatisticamente significativas. O Estudo 1 mostrou sensibilidade de 97,96% e o maior valor preditivo negativo (98,06%) e ambos foram estatisticamente maiores que os valores observados nos demais critérios de triagem ( $p < 0,001$ ). O Estudo 3 mostrou a maior especificidade (67,77%), classificando mais corretamente as amostras verdadeiro-negativas nas amostras analisadas. Também mostrou o maior valor preditivo positivo (46,99%), classificando mais corretamente as amostras

verdadeiro-positivas dentre as amostras que o conjunto de critérios de triagem do Estudo 3 indicou como possuindo critérios de positividade em lâmina do HC-UFPR.

Quando as amostras do Estudo 1, do Estudo 2, do Estudo 3 e dos critérios de triagem adaptados da ISLH foram divididas em amostras de pacientes internados e ambulatoriais, as taxas de falso-negativos das amostras de pacientes internados (0,30%; 1,97%; 3,19% e 5,63%, respectivamente) não foram diferentes quando comparadas com as taxas totais de falso-negativos (0,50%,  $p = 0,7413$ ; 1,97%,  $p = 1,0000$ ; 2,73%,  $p = 0,5885$  e 3,95%,  $p = 0,1011$ , respectivamente). Da mesma forma, as taxas de falso-negativos das amostras dos pacientes ambulatoriais (0,60%; 1,96%; 2,50% e 3,18%, respectivamente) não foram diferentes das taxas totais de falso-negativos (0,50%,  $p = 0,8104$ ; 1,97%,  $p = 1,0000$ ; 2,73%,  $p = 0,7402$  e 3,95%,  $p = 0,2575$ , respectivamente). Contudo, a taxa de falso-negativos de pacientes internados utilizando os critérios adaptados da ISLH (5,63%) foi a única, entre todos os conjuntos de critérios, que apresentou aumento significativo em relação à taxa de falso-negativos de pacientes ambulatoriais (3,18%,  $p = 0,0150$ ).

As taxas de falso-positivos das amostras de pacientes internados do Estudo 2 e do Estudo 3 (38,05%; 30,13%, respectivamente) foram maiores que as taxas totais de falso-positivos (31,66%,  $p = 0,0361$  e 24,23%,  $p = 0,0308$ , respectivamente). Já as taxas de falso-positivos das amostras de pacientes internados do Estudo 1 e adaptados da ISLH (52,66% e 29,68%, respectivamente) não foram estatisticamente maiores que as respectivas taxas totais de falso-positivos (49,52%,  $p = 0,3126$  e 25,49%,  $p = 0,1443$ ). Com exceção do Estudo 1, no Estudo 2, Estudo 3 e adaptados da ISLH, as taxas de falso-positivos em pacientes internados (38,05%; 30,13% e 29,68%, respectivamente) foram maiores que as taxas de falso-positivos observadas nas amostras de pacientes ambulatoriais (28,33%,  $p = 0,0020$ ; 21,66%,  $p = 0,0017$  e 23,78%,  $p = 0,0320$ , respectivamente).

As taxas de revisões microscópicas nas amostras de pacientes internados do Estudo 1, do Estudo 2, do Estudo 3 e dos critérios de triagem adaptados da ISLH (90,25%; 73,97%; 64,84% e 61,94%, respectivamente) foram muito superiores às encontradas nas amostras de pacientes ambulatoriais (63,86%,  $p < 0,0001$ ; 44,46%,  $p < 0,0001$ ; 37,27%,  $p < 0,0001$  e 38,78%,  $p < 0,0001$ , respectivamente).

A eficiência nas amostras de pacientes internados do Estudo 1, do Estudo 2, do Estudo 3 e dos critérios de triagem adaptados da ISLH (47,03%; 59,96%; 66,66% e 64,68%, respectivamente) não foi significativamente diferente da eficiência da

aplicação desses diferentes conjuntos de critérios de triagem em classificar corretamente as amostras de pacientes ambulatoriais (52,80%,  $p = 0,1721$ ; 69,69%,  $p = 0,0516$ ; 75,83%,  $p = 0,087$  e 73,03%,  $p = 0,1154$ , respectivamente).

As taxas de revisão microscópicas diminuíram no Estudo 2 (54,52%) e no Estudo 3 (46,33), e a taxa de falso-negativos foi  $\leq 3\%$  em ambos (TABELA 14).

Com exceção dos critérios adaptados da ISLH, os demais mostraram taxas de falso-negativos inferiores a 3% e estatisticamente diferentes da encontrada para os critérios de triagem adaptados da ISLH, com  $p < 0,05$  (TABELA 16). Todavia, somente os critérios do Estudo 1 foram capazes de triar uma amostra com presença de 2% de plasmócitos de um paciente com mieloma múltiplo previamente diagnosticado.

A FIGURA 5 mostra a comparação das curvas ROC para verificação do desempenho da aplicação dos critérios de triagem dos Estudos 1, 2, 3 e adaptados da ISLH em função do par [sensibilidade / (100 – especificidade)] ou (fração de verdadeiro-positivos / fração de falso-positivos).

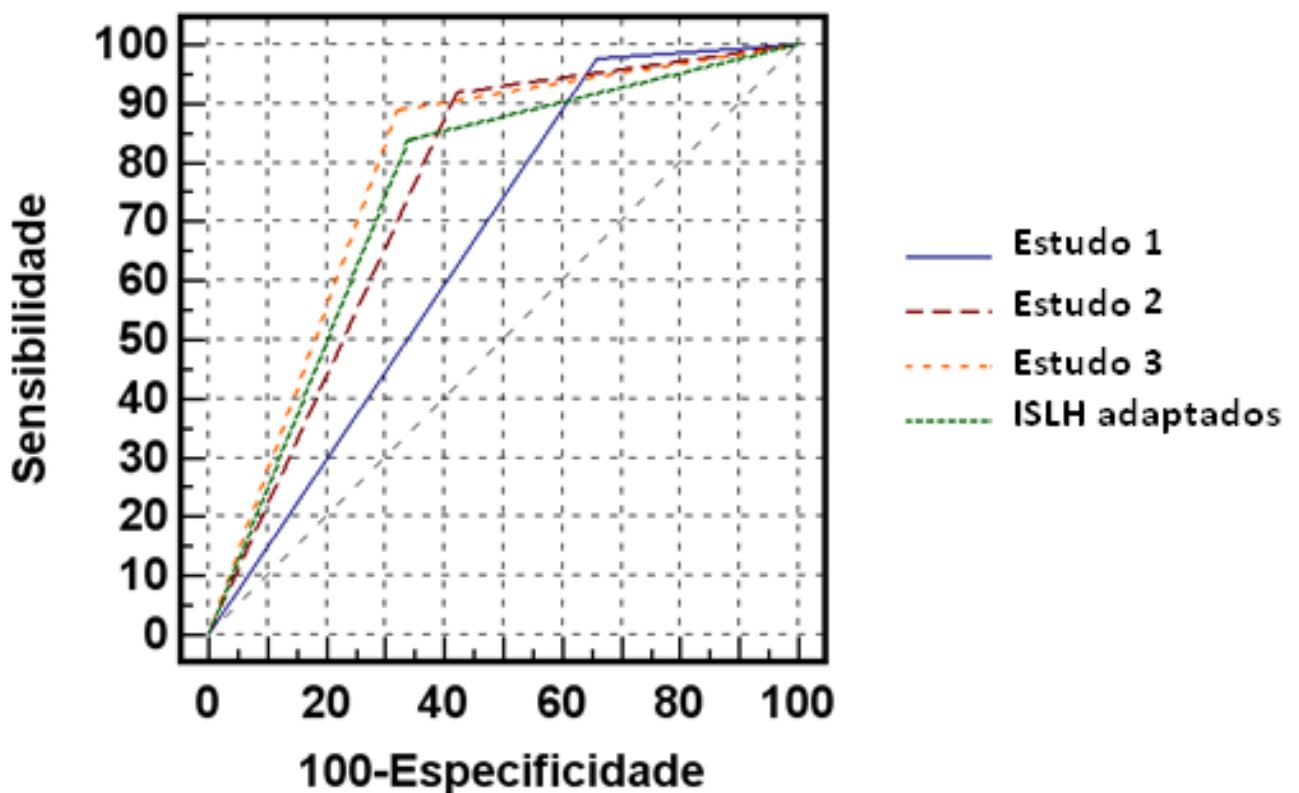


FIGURA 5 – COMPARAÇÃO DE CURVAS ROC DOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM DOS ESTUDOS 1, 2, 3 E ADAPTADOS DA ISLH X CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA DO HC-UFPR

FONTE: O autor (2015)

A TABELA 17 mostra as análises estatísticas entre as curvas ROC dos Estudos 1, 2, 3 e adaptados da ISLH.

TABELA 17 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS ENTRE AS CURVAS ROC PARA VERIFICAÇÃO DO DESEMPENHO DA APLICAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM DOS ESTUDOS 1, 2, 3 E ADAPTADOS DA ISLH

	Área sob a curva ROC	Intervalo de confiança 95%	Erro padrão	Nível de significância relativo à área = 0,5 (sem discriminação)	Índice de Youden
<b>Estudo 1</b>	0,659	0,638 a 0,680	0,015	$p < 0,001$	0,3207
<b>Estudo 2</b>	0,750	0,730 a 0,769	0,014	$p < 0,001$	0,4992
<b>Estudo 3</b>	0,784	0,765 a 0,802	0,013	$p < 0,001$	0,5677
<b>ISLH</b>	0,751	0,731 a 0,770	0,014	$p < 0,001$	0,5019

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE AS CURVAS ROC

Índices	Estudo 1 e Estudo 2	Estudo 1 e Estudo 3	Estudo 1 e ISLH	Estudo 2 e Estudo 3	Estudo 2 e ISLH	Estudo 3 e ISLH
<b>Diferença entre as áreas</b>	0,090	0,124	0,092	0,034	0,001	0,033
<b>Erro padrão</b>	0,014	0,015	0,016	0,009	0,010	0,007
<b>Intervalo de confiança 95%</b>	0,063 a 0,117	0,095 a 0,154	0,061 a 0,122	0,017 a 0,051	- 0,019 a 0,022	0,019 a 0,047
<b>Significância</b>	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,897$	$p < 0,001$

FONTE: O autor (2015)

NOTA: Prevalência de amostras positivas: 491 (24,84%; n = 1977).

O Estudo 3 obteve a maior área sob a curva (0,784), e o Estudo 1 a menor (0,659). O Estudo 2 e ISLH adaptados apresentaram áreas muito semelhantes, 0,750 e 0,751, respectivamente. A maior diferença entre áreas sob a curva ROC foi observada entre os Estudos 1 e 3 (0,124), e a menor entre o Estudo 2 e ISLH adaptados (0,001), suportando a hipótese de que não há diferença estatística entre a aplicação desses dois últimos critérios de triagem ( $p = 0,897$ ). O índice de Youden é uma função de ambas, sensibilidade e especificidade, e assume um valor entre 0 e 1, sendo que 1 representa os limites de corte mais efetivos, indicando que não há falso-positivos ou falso-negativos, ou seja, o teste é perfeito, e zero os menos efetivos na classificação das amostras, indicando que o teste não tem utilidade. O índice de Youden dá um peso igual a valores falso-positivos e falso-negativos, por isso, todos os testes com o mesmo valor do índice, produzem a mesma proporção do total de resultados classificados incorretamente. O Estudo 3 apresentou o maior índice de Youden, 0,5677, e o Estudo 1 o menor, 0,3207.

O desempenho geral de todos os alertas suspeitos relevantes utilizados conjuntamente como critérios de triagem qualitativos nesse estudo é mostrado na

TABELA 18. A sensibilidade, especificidade e eficiência foram de 63,1%, 84,3% e 79,0%, respectivamente.

TABELA 18 – AVALIAÇÃO GERAL DO DESEMPENHO DOS ALERTAS SUSPEITOS UTILIZADOS NESSE ESTUDO

PARÂMETRO	INTERNADOS N (%)	AMBULATORIAIS N (%)	TOTAL N (%)
Verdadeiro-positivos	181 (27,5)	129 (9,8)	310 (15,7)
Verdadeiro-negativos	287 (43,7)	965 (73,1)	1.252 (63,3)
Falso-positivos	120 (18,3)	114 (8,6)	234 (11,8)
Falso-negativos	69 (10,5)	112 (8,5)	181 (9,2)
<b>CARACTERÍSTICA DE DESEMPENHO</b>	<b>% (IC 95%)</b>	<b>% (IC 95%)</b>	<b>% (IC 95%)</b>
Sensibilidade	72,4 (66,9 – 77,9)	53,5 (47,2 – 59,8)	63,1 (58,9 – 67,4)
Especificidade	70,5 (66,1 – 74,9)	89,4 (87,9 – 91,3)	84,3 (82,4 – 86,1)
Valor preditivo positivo	60,1 (54,6 – 65,7)	53,1 (46,8 – 59,4)	57,0 (52,8 – 61,1)
Valor preditivo negativo	80,6 (76,5 – 84,7)	89,6 (87,8 – 91,4)	87,4 (85,6 – 89,1)
Eficiência	71,2 (67,8 – 74,7)	82,9 (80,8 – 84,9)	79,0 (77,2 – 80,8)
<b>CARACTERÍSTICA DE DESEMPENHO</b>	<b>Valor absoluto</b>	<b>Valor absoluto</b>	<b>Valor absoluto</b>
Razão de probabilidade positiva	2,5	5,1	4,0
Razão de probabilidade negativa	0,4	0,5	0,4
<i>Kappa</i> de Cohen	0,41	0,43	0,46

FONTE: O autor (2015)

NOTA 1: Os alertas suspeitos foram analisados em conjunto em relação à capacidade de alertar amostras com critérios de positividade em lâmina.

NOTA 2: Razão de probabilidade positiva = Sensibilidade / (1 – Especificidade) e Razão de probabilidade negativa = (1 – Sensibilidade) / Especificidade. Considerou-se que valores de razão de probabilidade positiva e razão de probabilidade negativa de >10 e < 0,3, respectivamente, indicaram que os alertas suspeitos avaliados geraram importantes mudanças nas razões de probabilidade (RUZICKA *et al.*, 2001; CORNBLEET, 2002). O índice *Kappa* foi obtido com a utilização do programa Cálculos Estatísticos for Windows V.1.8 (BRAILE; GODOY, 1999) e sua interpretação se deu por comparação do valor obtido com as faixas de valores para verificação da concordância. A diretriz utilizada foi: < 0,20 = pobre; 0,21 – 0,40 = fraca; 0,41 – 0,60 = moderada; 0,61 – 0,80 = boa; > 0,80 = muito boa.

A razão de probabilidade positiva total observada (4,0) expressou que qualquer alerta suspeito, quando sinalizado nas amostras, indicou quatro vezes mais a presença de critérios de positividade em lâmina em relação a amostras sem anormalidades morfológicas. Já a razão de probabilidade negativa total demonstrou que amostras não sinalizadas e que continham CPL ocorreram 0,4 vezes mais quando comparado com amostras não sinalizadas e que não continham CPL. Os alertas suspeitos foram mais sensíveis em detectar amostras com CPL em pacientes internados do que em pacientes ambulatoriais.

Na análise dos casos positivos (verdadeiro-positivos e falso-positivos), TABELA 19, critérios de triagem relacionados com alertas suspeitos mostraram bom valor preditivo positivo. O RDW-CV e o RDW-SD mostraram elevação do valor preditivo positivo conforme foram aumentados os limites de corte. Os limites de corte para a contagem de leucócitos dos critérios de triagem do Estudo 1 mostrou o menor

valor preditivo positivo e os do Estudo 2 mostrou o maior valor preditivo positivo. Os critérios de triagem do Estudo 3 identificaram melhor as amostras verdadeiro-positivas dentre as positivas.

TABELA 19 – ANÁLISE DOS CASOS POSITIVOS OBSERVADOS NOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM DOS ESTUDOS 1, 2, 3 E ADAPTADOS DA ISLH

Parâmetro (valores abaixo e/ou acima dos limites de corte dos critérios de triagem)	Estudo 1			Estudo 2			Estudo 3			Adaptados da ISLH		
	VP (n)	FP (n)	VPP (%)	VP (n)	FP (n)	VPP (%)	VP (n)	FP (n)	VPP (%)	VP (n)	FP (n)	VPP (%)
Leucócitos (limites superior e inferior)	228	345	38,8	153	199	43,46	98	133	42,42	96	174	35,5
Plaquetas (limites superior e inferior)	130	164	44,21	113	137	45,2	111	134	45,3	111	134	45,3
Hemoglobina (limites superior e inferior)	160	140	53,3	48	50	48,97	34	31	52,30	22	25	46,8
VCM (limites superior e inferior, adultos e crianças)	133	101	56,8	98	39	71,5	93	34	73,2	98	39	71,5
RDW-CV (limite superior)	188	115	62,0	148	53	73,6	120	24	83,3	47	2	95,9
RDW-SD (limite superior)	112	53	67,9	73	22	76,8	41	3	93,1	Não aplicável*		
CHCMC (limites superior e inferior)	108	82	56,8	75	43	63,5	41	17	70,7	41	17	70,7
Contagem absoluta de neutrófilos (limites superior e inferior)	240	431	35,76	128	188	40,5	71	84	45,8	49	71	40,83
Contagem absoluta de neutrófilos + contagem relativa de neutrófilos (limite superior)	132	227	36,8	58	50	53,7	23	12	65,7	Não aplicável*		
Contagem absoluta de neutrófilos + contagem relativa de neutrófilos (limite inferior)	35	96	26,7	31	71	30,4	20	42	32,3	Não aplicável*		
VPM (limite superior)	35	93	27,3	14	35	28,6	8	9	47,0	18	44	29
Alertas suspeitos (todos)	210	234	56,6	310	234	57,0	310	234	57,0	310	234	57,0
<b>Total</b>			<b>32,95</b>			<b>41,93</b>			<b>47,7</b>			<b>45,03</b>

FONTE: O autor (2015).

NOTA: \* Os critérios de triagem adaptados da ISLH não incluem RDW-SD e contagem relativa de neutrófilos.

### 5.3.4 Análise dos falso-negativos e dos falso-positivos dos novos CRMHA

A TABELA 20 discrimina os resultados falso-negativos encontrados nos Estudos 1, 2, 3 e adaptado da ISLH. A alteração morfológica que provocou o maior número de casos falso-negativos entre todos os critérios de triagem avaliados foi bastão  $\geq 15\%$  e a segunda maior causa foi mielócitos  $\geq 1\%$ . No Estudo 3, o valor preditivo negativo encontrado para bastões  $\geq 15\%$ , mostrou que em 97,4% das vezes em que os critérios de triagem do Estudo 3 não indicaram a presença dessa alteração morfológica, as amostras realmente não continham bastões  $\geq 15\%$ .

TABELA 20 – FALSO-NEGATIVOS E VALORES PREDITIVOS NEGATIVOS OBSERVADOS NOS ESTUDOS 1, 2, 3 E ADAPTADO DA ISLH

CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE EM LÂMINA	ESTUDO 1	VPN (%)	ESTUDO 2	VPN (%)	ESTUDO 3	VPN (%)	ADAPTADOS DA ISLH	VPN (%)
Bastões $\geq 15\%$	6	98,8	18	97,9	27	97,4	35	96,6
(Anisocitose $\geq 1+$ ) + (poiilocitose $\geq 1+$ ) + (forma eritrocitária $\geq 1+$ ) + (alteração de cor $\geq 1+$ )	-	100	5	99,4	6	99,4	8	99,4
Eritroblastos $\geq 1/100$ leucócitos	-	100	1	99,9	1	99,9	1	99,9
Anisocitose $\geq 2+$	-	100	-	100	-	100	9	99,1
Poiilocitose $\geq 2+$	-	100	1	99,9	1	99,9	1	99,9
Policromatofilia $\geq 2+$	-	100	1	99,9	2	99,8	2	99,8
Esquistócitos $\geq 1+$	-	100	1	99,9	1	99,9	2	99,8
Dacriócitos $\geq 1+$	2	99,6	7	99,2	9	99,1	10	99,0
Codócitos $\geq 2+$	-	100	1	99,9	1	99,9	1	99,9
Ponteados basófilos $\geq 1+$	1	99,8	2	99,7	2	99,8	2	99,8
Howell-Jolly presença	-	100	1	99,9	1	99,9	2	99,8
<i>Rouleaux</i> eritrocitário $\geq 2+$	1	99,8	1	99,9	1	99,9	1	99,9
Mielócitos $\geq 1\%$	2	99,6	9	98,8	10	99,0	13	98,7
Corpúsculos de Döhle $\geq 1+$	-	100	-	100	3	99,7	3	99,7
Polilobócitos $\geq 1+$	-	100	-	100	-	100	1	99,9
Plasmócitos $\geq 1\%$	-	100	1	99,9	1	99,9	1	99,9
<b>TOTAL (n)</b>	<b>12*</b>	<b>98,06</b>	<b>49*</b>	<b>95,66</b>	<b>66*</b>	<b>94,91</b>	<b>92*</b>	<b>92,64</b>
<b>% de amostras falso-negativas</b>	<b>0,50</b>		<b>1,97</b>		<b>2,73</b>		<b>3,95</b>	

FONTE: O autor (2015)

\*Algumas amostras apresentaram mais de um critério de positividade em lâmina.

LEGENDA: VPN: valor preditivo negativo.

No Estudo 3, de 54 amostras com resultados falso-negativos, observou-se 27 casos de desvio nuclear à esquerda  $\geq 15\%$  de bastões, dez de mielócitos  $\geq 1\%$ , 25 de alterações de série vermelha, três casos com presença de corpúsculos de Döhle e um caso com plasmócitos  $\geq 1\%$ . Foram observadas 54 amostras com eritroblastos  $\geq 1/100$  leucócitos em 1.977 amostras, e desse total, apenas uma única amostra não foi capturada pelos critérios de triagem dos Estudos 2, 3 e adaptado da ISLH. Não foram observados resultados falso-negativos para alterações morfológicas das plaquetas. Nenhum caso de blastos foi perdido pelos critérios de triagem avaliados nos quatro estudos.

De modo a diminuir a elevada taxa de falso-positivos (49,52%) e a taxa de revisões microscópicas (73,85%) observadas no Estudo 1 (limites de triagem estreitos), ajustou-se os limites de triagem dos parâmetros hematológicos nos Estudos 2 e 3, com base na análise dos principais CT que geraram resultados falso-positivos no Estudo 1. Os principais CT foram: linfócitos  $< 20\%$  (19,27% do total de amostras); neutrófilos  $> 70$  (18,61%); neutrófilos  $> 7,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ ; leucócitos  $< 4,0 \times 10^3/\mu\text{l}$  (8,49%); leucócitos  $> 12,0 \times 10^3/\mu\text{l}$  (8,9%); alertas suspeitos (11,93%) e contagens diferenciais de leucócitos não confiáveis (11,63% do total de amostras), conforme TABELA 21. Alertas suspeitos como os de granulócitos imaturos, blastos, eritroblastos e linfócitos anormais não foram excluídos dos critérios de triagem qualitativos em razão do risco de se obter resultados falso-negativos para doenças graves. A TABELA 21 também mostra os 15 principais critérios de triagem que geraram resultados falso-positivos nos Estudos 2, 3 e adaptado da ISLH. A análise completa dos CT que geraram resultados falso-positivos nos Estudos 1, 2, 3 e adaptado da ISLH é mostrada no APÊNDICE 2.



TABELA 21 – DISCRIMINAÇÃO DOS 15 PRINCIPAIS CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUE CAUSARAM RESULTADOS FALSO-POSITIVOS NOS ESTUDOS 1, 2, 3 E ADAPTADO DA ISLH

<b>ESTUDO 1</b>	
<b>CRITÉRIO</b>	<b>TAXA DE FALSO-POSITIVOS (N (%))</b>
Linfócitos < 20 %	381 (19,27%)
Neutrófilos > 70 %	368 (18,61%)
Neutrófilos > 7,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	280 (14,16%)
Contagem diferencial de leucócitos não confiável (*)	227 (11,48%)
Leucócitos > 12,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	176 (8,9%)
Leucócitos < 4,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	168 (8,49%)
Neutrófilos < 38 %	141 (7,13%)
Plaquetas < 100 x 10 <sup>3</sup> /μl	135 (6,82%)
Linfócitos > 50 %	126 (6,37%)
RDW-CV > 17%	117 (5,91%)
Monócitos > 12 %	108 (5,46%)
Linfócitos < 0,8 x 10 <sup>3</sup> /μl	92 (4,65%)
Contagem de plaquetas não confiável (*)	95 (4,8%)
Contagem de leucócitos não confiável (*)	94 (4,75%)
Alerta suspeito de desvio à esquerda	91 (4,6%)
<b>ESTUDO 2</b>	
<b>CRITÉRIO</b>	<b>TAXA DE FALSO-POSITIVOS (N (%))</b>
Contagem diferencial de leucócitos não confiável (*)	227 (11,48%)
Plaquetas < 100 x 10 <sup>3</sup> /μl	134 (6,77%)
Leucócitos < 3,5 x 10 <sup>3</sup> /μl	126 (6,37%)
Linfócitos < 12%	121 (6,12%)
Neutrófilos > 80%	120 (6,06%)
Neutrófilos < 35%	115 (5,81%)
Neutrófilos < 1,5 x 10 <sup>3</sup> /μl	113 (5,71%)
Contagem de plaquetas não confiável (*)	95 (4,8%)
Contagem de leucócitos não confiável (*)	94 (4,75%)
Alerta suspeito de desvio à esquerda	91 (4,6%)
Linfócitos < 0,8 x 10 <sup>3</sup> /μl	89 (4,5%)
Leucócitos > 15,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	71 (3,59%)
Alerta suspeito de agregados plaquetários	63 (3,18%)
RDW-CV > 18%	53 (2,68%)
Alerta suspeito de granulócitos imaturos	48 (2,42%)
<b>ESTUDO 3</b>	
<b>CRITÉRIO</b>	<b>TAXA DE FALSO-POSITIVOS (N (%))</b>
Contagem diferencial de leucócitos não confiável (*)	227 (11,48%)
Plaquetas < 90 x 10 <sup>3</sup> /μl	117 (5,91%)
Leucócitos < 3,2 x 10 <sup>3</sup> /μl	110 (5,56%)
Contagem de plaquetas não confiável (*)	95 (4,8%)
Contagem de leucócitos não confiável (*)	94 (4,75%)
Alerta suspeito de desvio à esquerda	91 (4,6%)
Neutrófilos < 25%	63 (3,18%)
Alerta suspeito de agregados plaquetários	63 (3,18%)
Neutrófilos > 85%	57 (2,88%)
Alerta suspeito de granulócitos imaturos	48 (2,42%)
VPM não confiável (*)	48 (2,42%)
VPM não disponível (----)	46 (2,32%)
Linfócitos < 8%	45 (2,27%)
Alerta suspeito de linfócitos atípicos	44 (2,22%)
Alertas suspeitos de linfócitos anormais/blastos	37 (1,87%)
Alertas suspeitos de eritroblastos	37 (1,87%)

continua

TABELA 21 – DISCRIMINAÇÃO DOS 15 PRINCIPAIS CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUE CAUSARAM RESULTADOS FALSO-POSITIVOS NOS ESTUDOS 1, 2, 3 E ADAPTADOS DA ISLH

ADAPTADOS DA ISLH		conclusão
CRITÉRIO	TAXA DE FALSO-POSITIVOS (N (%))	
Contagem diferencial de leucócitos não confiável (*)	227 (11,48%)	
Leucócitos < 4,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	169 (8,54%)	
Plaquetas < 100 x 10 <sup>3</sup> /μl	131 (6,62%)	
Contagem de plaquetas não confiável (*)	95 (4,8%)	
Contagem de leucócitos não confiável (*)	94 (4,75%)	
Alerta suspeito de desvio à esquerda	91 (4,6%)	
Neutrófilos < 1,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	66 (3,33%)	
Alerta suspeito de agregados plaquetários	63 (3,18%)	
Alerta suspeito de granulócitos imaturos	48 (2,42%)	
VPM não confiável (*)	48 (2,42%)	
VPM não disponível (----)	46 (2,32%)	
Alerta suspeito de linfócitos atípicos	44 (2,22%)	
Alerta suspeito de linfócitos anormais/blastos	37 (1,87%)	
Alerta suspeito de eritroblastos	37 (1,87%)	
Contagem diferencial de leucócitos não disponível (--)	23 (1,16%)	

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: RDW-CV: *red cell distribution width* – coeficiente de variação; VPM: volume plaquetário médio.

Após a análise dos falso-positivos, os dados indicaram que o critério de triagem que mais causou resultados falso-positivos nos Estudos 2 e 3 e adaptado da ISLH foi a contagem de leucócitos não confiável (227 ocorrências), indicado pelo sinal (\*) ao lado das contagens automatizadas. A segunda maior causa de falso-positivos nos Estudo 2, 3 e adaptado da ISLH foi a contagem de plaquetas < 100 x 10<sup>3</sup>/μl, a contagem de plaquetas < 90 x 10<sup>3</sup>/μl e a contagem de leucócitos < 4,0 x 10<sup>3</sup>/μl, respectivamente.

No Estudo 3 foi utilizado um limite de corte menor para os critérios de triagem de leucócitos e plaquetas em relação aos limites dos critérios de triagem da ISLH. A redução do limite de corte de leucócitos levou a uma diminuição da quantidade de revisões microscópicas e não comprometeu a segurança dos pacientes. A redução do limite de corte de plaquetas não modificou significativamente a taxa de revisões e nem a taxa de falso-negativos. Também no Estudo 3 foi utilizado um limite de corte menor para o RDW-CV em relação à ISLH e apesar de não ter promovido redução significativa na taxa de revisões microscópicas, reduziu significativamente a taxa de falso-negativos (TABELA 22). Foram comparadas, na TABELA 22, as taxas de FP e FN apenas em amostras entre os limites de corte dos CT adaptados da ISLH e dos CT do Estudo 3 em virtude dos primeiros serem o padrão internacional e os CT do Estudo 3 terem sido os que

mostraram a melhor relação entre segurança (taxa de FN) e eficiência dentre os CT propostos e avaliados nesse estudo.

TABELA 22 – TAXAS DE FALSO-POSITIVOS E FALSO-NEGATIVOS EM AMOSTRAS ENTRE OS LIMITES DE CORTE DOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM DA ISLH E DO ESTUDO 3

Parâmetro	Limites de corte**	No. de casos entre os dois limites de corte	FP (%)	Valor de p	FN (%)	Valor de p
Limite inferior de leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	< 4,0	88	68,6	0,0011	0,0	0,1188
	< 3,2		26,7		6,97	
Limite superior de leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	> 30	47	34,0	0,8425	2,12	1
	> 20		38,3		0,0	
Limite superior de neutrófilos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	> 20	35	25,71	0,4760	14,28	0,0569
	> 15		37,14		0,0	
Limite inferior de hemoglobina (g/dl)	< 7,0	30	40,0	0,6511	0,0	1
	< 7,5		50,0		0,0	
Limite superior de RDW-CV (%)	> 22	102	17,64	0,4981	11,76	0,0004
	> 19		23,52		0,0	
Limite inferior de plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	< 100	23	65,21	0,4488	0,0	1
	< 90		39,13		0,0	
Limite superior de VPM (fl)	$\geq 12,5$	48	72,91	0,0036	0,0	1
	$\geq 13,0$		22,91		2,08	

FONTE: O autor (2015)

LEGENDA: RDW-CV: *red cell distribution width* – coeficiente de variação; VPM: volume plaquetário médio; FP: falso-positivos; FN: falso-negativos.

\*\* Limites de corte entre os critérios de triagem da ISLH (superior) e Estudo 3 (inferior)

## 6 DISCUSSÃO

Atualmente, muitos laboratórios utilizam analisadores hematológicos multiparamétricos de última geração, os quais, além de melhorarem o desempenho analítico das contagens de células sanguíneas, também disponibilizam novos parâmetros hematológicos adicionais à tradicional contagem diferencial de leucócitos em cinco partes (SULLIVAN, 2006; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; BRIGGS, 2009; LISSEN; JENNISSSEN, 2009; BRIGGS *et al.*, 2011; COMAR; PASQUINI, 2013). Contudo, apesar dessas aptidões expandidas dos analisadores hematológicos, que permitem em alguns casos, que a contagem diferencial de leucócitos automatizada seja liberada em caso de leucemia (GULATI *et al.*, 2011), a observação microscópica de uma lâmina de sangue periférico ainda desempenha um papel importante nos laboratórios de hematologia. A utilização de CRMHA, que possibilitaria a liberação das contagens automatizadas sem a RMLH, ainda não é um procedimento amplamente difundido e padronizado. Na prática, muitos laboratórios apenas copiam critérios publicados sem qualquer alteração ou alteram algumas regras sem qualquer comprovação (CUI *et al.*, 2010).

Anteriormente à implantação de CRMHA no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR, a RMLH era realizada em todos os hemogramas, fato que consumia muito tempo dos profissionais, além de atrasos na liberação dos resultados. A partir de certa época a liberação direta dos resultados começou a ser realizada em alguns casos de hemogramas com valores próximos à média dos valores de referência, porém sem que houvesse uma validação adequada desse procedimento. O desenvolvimento desse estudo vem na esteira da necessidade do Laboratório de Hematologia do HC-UFPR em executar os hemogramas com qualidade e baixo custo, e liberá-los no menor tempo possível para que as condutas possam ser tomadas rapidamente, trazendo dessa forma benefícios para os pacientes, médicos e para o próprio laboratório.

Ao estabelecer e avaliar CRMHA específicos em um determinado laboratório, o grupo internacional de consenso em revisões hematológicas da ISLH sugere que os critérios de triagem e de positividade em lâmina da ISLH sejam validados primeiramente, antes de serem implementados, sobretudo pelo fato de tais critérios serem uma referência internacional (BARNES *et al.*, 2005). A partir dos

resultados dessa validação inicial, define-se a necessidade de otimizar tais regras em cada laboratório. Tudo isso porque dificilmente os CRMHA da ISLH podem ser utilizados universalmente e, ainda, serem economicamente viáveis nos mais variados contextos onde se realizam determinações hematimétricas (PETERSON, 2002). Desta forma, no início desse estudo foi realizada a introdução, adaptação e avaliação dos CRMHA sugeridos pelo Grupo Internacional de Consenso em Revisões Hematológicas da ISLH para verificar se o desempenho desses critérios poderia satisfazer as necessidades do Laboratório de Hematologia do HC-UFPR no que diz respeito à segurança e à eficiência na liberação de resultados de hemogramas.

As 1.977 amostras recolhidas para realização deste trabalho foram representativas do trabalho rotineiro da seção de hematologia, de modo que as inferências sobre os resultados das características de desempenho pudessem ser aplicadas no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR. Os resultados de hemogramas foram coletados ao longo de sete dias de trabalho para eliminar qualquer variação dos analisadores hematológicos, assim como para capturar o máximo possível de alterações morfológicas na população de pacientes atendidos. Barnes *et al.* (2005) propuseram que 80% do universo amostral para esse tipo de estudo deve ser de amostras testadas pela primeira vez, e que 20% deve ser de amostras já analisadas anteriormente de modo a poder testar as regras de *delta check*. Neste estudo, 76,70% das amostras testadas foram de pacientes ambulatoriais, muitos dos quais estavam realizando o primeiro hemograma, e 23,30% foram de pacientes internados, muitos dos quais estavam realizando hemogramas diários de acompanhamento.

Após a avaliação inicial dos CRMHA adaptados da ISLH (BARNES *et al.*, 2005), verificou-se uma taxa de 6,73% de resultados falso-negativos, 23,27% de resultados falso-positivos, taxa de revisões microscópicas de 46,03% e eficiência de 70,0%. A taxa de revisões microscópicas foi maior com o emprego do analisador Sysmex XT-2000i (54,45%) do que com o XE-2100D (43,86%), devido ao fato daquele analisador ser utilizado na rotina para analisar amostras de pacientes da hematologia com pedidos de contagem de reticulócitos e pela equipe do plantão, que atende apenas pacientes internados e da emergência, os quais, em grande parte, possuem hemogramas com resultados alterados. Cui *et al.* (2010) quando validou os CRMHA da ISLH no analisador Sysmex XE-2100, observaram taxa de

falso-negativos de 2,45% e taxa de revisões microscópicas de 37,94%. Já Pratumvinit *et al.* (2013) demonstraram taxa de falso-negativos de 2,22% e taxa de revisões microscópicas de 29,33%. Em ambas as situações os pesquisadores decidiram desenvolver critérios otimizados no intuito de diminuir as taxas de revisões microscópicas, em virtude das mesmas terem ficado acima da capacidade de trabalho de ambos laboratórios. Tanto Cui *et al.* (2010) como Pratumvinit *et al.* (2013) não consideraram a contagem de bastões como critério de positividade em lâmina, como nesse estudo, e isso certamente explica a maior taxa de falso-negativos por nos observada na avaliação inicial dos CRMHA adaptados da ISLH. A contagem de bastões > 8% foi a principal responsável pela taxa de falso-negativos ter ultrapassado o limite de segurança de 3%.

Em estudo realizado por Xing *et al.* (2010), no qual foram analisadas 2.400 amostras no analisador hematológico Advia 120/2120 e, na sequência, avaliadas de acordo com os critérios de triagem de Barnes *et al.* (2005), porém com critérios de positividade em lâmina próprios, a taxa de resultados falso-negativos foi de 5,5% e a taxa de revisões microscópicas foi de 50,2%, concluindo que deveriam estabelecer novos critérios de triagem por meio de alterações e adaptações dos critérios de triagem da ISLH (BARNES *et al.*, 2005). Da mesma forma, Comar, Malvezzi e Pasquini (2014a) avaliaram 180 amostras no analisador hematológico Sysmex XT-2000i considerando os critérios de triagem da ISLH perante critérios de positividade em lâmina próprios e obtiveram uma taxa de falso-negativos de 15,5%, com perda de uma amostra com blastos, e taxa de revisões microscópicas de 37,2%. Kim *et al.* (2012) fizeram uma comparação entre três analisadores hematológicos, Unicel DxH 800, Advia 2120i e o XE-2100, usando as diretrizes de Barnes *et al.* (2005) e, mostraram, respectivamente, 14,3%, 14,3% e 9,7% de falso-negativos e 22,8%, 20,2% e 28,6% de taxa de revisões microscópicas. Esse estudo concluiu que cada laboratório deve fazer a escolha do analisador hematológico mais apropriado de acordo com características clínicas dos pacientes e das especialidades médicas atendidas, uma vez que analisadores hematológicos com alta sensibilidade podem ser vantajosos em perfis ambulatoriais, para detectar anormalidades morfológicas, enquanto que analisadores com alta especificidade podem trazer benefícios para pacientes internados, diminuindo o tempo de liberação dos resultados e viabilizando condutas médicas mais rápidas.

Em contrapartida, Sun, Weng e Li (2010), analisando 1.700 amostras no analisador hematológico Sysmex KX21 e aplicando os CT e os CPL da ISLH (BARNES *et al.*, 2005), verificaram uma taxa de falso-negativos de 1,94% e consideraram os CRMHA da ISLH aceitáveis para serem utilizados nesse laboratório. Da mesma forma, Li, Wu e Qiu (2010) aplicaram os CRMHA da ISLH (BARNES *et al.*, 2005) em 300 amostras analisadas no analisador hematológico Sysmex XE-2100 e a taxa de falso-negativos encontrada foi de 2%.

Em nosso estudo, a taxa de 6,73% de resultados falso-negativos mostrou-se inferior ao estudo de Kim *et al.* (2012), porém mostrou-se superior aos outros estudos. Mesmo reconhecendo que os analisadores utilizados e as populações estudadas nestas várias pesquisas são diferentes entre si, essa taxa é considerada alta para a liberação de resultados seguros de hemograma.

A taxa de revisões microscópicas observada na avaliação inicial dos CRMHA adaptados da ISLH (46,03%) ficou acima da mediana de 26,8% encontrada pelo Colégio Americano de Patologistas no programa de comparação interlaboratorial chamado Q-Probes, em que foi avaliada a taxa média de revisões microscópicas observadas em 263 instituições, incluindo 12 hospitais universitários. Contudo, cabe salientar que em 10% dessas instituições (90.º percentil), as taxas de revisões foram de 50% ou mais (NOVIS *et al.*, 2006). A taxa elevada de revisões microscópicas observada nesse estudo foi devida, em parte, ao perfil das amostras analisadas (hospital quaternário) e pela impossibilidade de implantação das regras de *delta check*, não sendo possível a comparação de resultados atuais com resultados anteriores do mesmo paciente. Com isso, amostras positivas do mesmo paciente, porém com pequenas variações dos parâmetros hematológicos tiveram de ser consecutivamente revisadas.

Apesar das regras de *delta check* desempenharem papel relevante na eficiência e segurança dos resultados de hemograma que são liberados diretamente e sem a RMLH, muitos laboratórios clínicos são incapazes de implantá-las em seus sistemas de informação e de interfaceamento, em razão dos altos custos. Mesmo em países desenvolvidos ainda existem laboratórios incapazes de modificar seus sistemas de informação para incluir tais regras (GALLOWAY *et al.*, 2010). Nesse estudo inicial, portanto, os critérios de triagem foram aplicados sem a comparação dos resultados atuais com resultados anteriores e, por esse motivo, dentre outros, os

critérios de triagem da ISLH (BARNES *et al.*, 2005) são chamados, nesse trabalho, de critérios adaptados da ISLH.

Outro fator não menos importante, é a falta de familiarização de tais regras pelos profissionais do laboratório, o que torna difícil a sua divulgação e implantação. Barnes *et al.* (2005) não sugerem limites específicos de *delta check*, apenas ações específicas para quando os limites delta ou limites da diferença estabelecidos individualmente por cada laboratório são excedidos.

Como 10,31% do total de amostras utilizadas na avaliação inicial dos CRMHA adaptados da ISLH foi de falso-positivos devido à sinalização por alertas suspeitos com a contrapartida microscópica inexistente, demonstrou-se que os analisadores hematológicos empregados fizeram “*over flagging*”, ou seja, alertaram acima do normal. É sugerido que cada laboratório avalie a eficiência de todo alerta suspeito fornecido pelos analisadores hematológicos e, com isso, faça os ajustes necessários na sensibilidade do aparelho, ou então defina se determinado alerta suspeito é realmente útil para ser utilizado como critério de triagem (BARNES *et al.*, 2005). Apesar dos ajustes da sensibilidade dos alertas suspeitos terem sido feitos pela assessoria técnica e científica do distribuidor dos analisadores hematológicos empregados, acreditamos que as taxas de falso-positivos observadas ocorreram, em parte, pelo perfil das amostras analisadas e não em razão da marca ou tipo de analisador hematológico empregado.

Amostras falso-positivas com contagens de plaquetas menores que 100.000 por microlitro representaram 6,52% do total de amostras analisadas na avaliação inicial com os CRMHA adaptados da ISLH. Independente desse resultado, em contagens baixas de plaquetas a estimativa microscópica da contagem de plaquetas deve ser sempre realizada a fim de verificar a concordância com a contagem automatizada, bem como inspecionar quanto à presença de agregados plaquetários e plaquetas gigantes, fatores esses que geram resultados falsamente diminuídos (KOEPEKE *et al.*, 1985; COMAR; DANCHURA; SILVA, 2009).

Apesar de alguns trabalhos sugerirem a perda da utilidade clínica da contagem de bastões (WENZ *et al.*, 1986; CORNBLEET, 2002; VAN DER MEER *et al.*, 2006; WARD *et al.*, 2012), optou-se, nesse trabalho, por adicionar a contagem de bastões > 8% como um dos critérios de positividade em lâmina, sobretudo por estudos indicarem o seu uso (BONADIO; SMITH; CARMODY, 1992; JASKIEWICZ *et al.*, 1994; GREER *et al.*, 2009). Contudo, a elevada incidência de falso-negativos



com presença de desvio nuclear à esquerda > 8% deve ser interpretada com cautela, sobretudo devido às limitações técnicas da CDML e, até mesmo, variações que ocorrem em função da idade, sexo, gravidez e exercícios físicos (CORNBLEET, 2002; RÜEMKE, 1960).

Em conclusão dessa primeira etapa, a avaliação inicial dos CRMHA da ISLH não demonstrou ser segura por apresentar taxa de resultados falso-negativos acima de 3%, valor estabelecido para o Laboratório de Hematologia do HC-UFPR e até mesmo acima de 5%, limites de segurança recomendado pela ISLH. A taxa de revisões microscópicas chegou próxima do limite estipulado de 50% e não deixa de ser um problema tanto para a diminuição do tempo de liberação dos resultados como para eventuais situações com falta de profissionais experientes para realizar a RMLH. Portanto, concluiu-se que os critérios de triagem adaptados da ISLH não capturaram adequadamente as amostras com critérios de positividade em lâmina e que novos critérios deveriam ser elaborados e avaliados de acordo com as necessidades locais de eficiência e segurança. Nesse sentido, novos estudos começaram a ser realizados pelos autores para desenvolver um método que auxiliasse no estabelecimento e avaliação da eficiência de conjuntos de critérios de revisão de hemogramas automatizados (COMAR; MALVEZZI; PASQUINI, 2013).

Para reduzir ao máximo a carga de trabalho por meio de RMLH, procedimento esse trabalhoso e muitas vezes desnecessário, cada laboratório de hematologia, levando em conta as suas necessidades, possibilidades, o conhecimento e a experiência da equipe médico-laboratorial, deve estabelecer seus próprios CRMHA a partir da recomendação internacional da ISLH (BARNES *et al.*, 2005) e otimizá-los para uma máxima eficiência (HYUN; GULATI; ASHTON, 1991; GULATI *et al.*, 2002; FRIIS-HANSEN *et al.*, 2008; CUI *et al.*, 2010; HUR *et al.*, 2011; PRATUMVINIT *et al.*, 2013; COMAR; MALVEZZI; PASQUINI, 2013; FROOM; ISAKOV; BARAK, 2014).

O presente estudo estabeleceu e avaliou, em uma segunda etapa, CRMHA próprios para o Laboratório de Hematologia do HC-UFPR utilizando analisadores hematológicos da marca Sysmex®. Desenvolveu critérios de triagem adequados através da análise criteriosa de quais alterações morfológicas observadas na lâmina seriam críticas para serem consideradas como critérios de positividade em lâmina. Nesse sentido, foram estabelecidos os critérios de positividade em lâmina do HC-

UFPR, que foram diferentes dos critérios de positividade em lâmina recomendados pela ISLH (BARNES *et al.*, 2005).

Sabe-se que nem todas as anormalidades morfológicas vistas microscopicamente são clinicamente relevantes, portanto, não foram consideradas importantes algumas anormalidades como, por exemplo, anisocitose 1+ e presença de raros eliptócitos. Os critérios de positividade em lâmina do HC-UFPR foram elaborados por meio de consenso entre profissionais do HC-UFPR e são, de um modo geral, considerados relevantes em limiares menores que os da ISLH. Os achados microscópicos selecionados tiveram por objetivo certificar que anormalidades clinicamente significativas não fossem omitidas dos resultados, estabelecendo dessa forma um limite mínimo de informações que devem ser descritas nos laudos de hemograma.

As principais mudanças entre os critérios de positividade em lâmina da ISLH e os do HC-UFPR foram a ampliação do valor máximo permitido da contagem relativa de bastões de  $> 8\%$  para  $\geq 15\%$ ; inclusão do somatório de alterações eritrocitárias de tamanho, forma e cor; a diminuição de esquistócitos e dacriócitos de  $\geq 2+$  para  $\geq 1+$ , esse último por se tratar de uma alteração morfológica relevante nos pacientes com mielofibrose e o primeiro por se tratar de uma alteração morfológica relevantes em pacientes com anemia hemolítica microangiopática como a púrpura trombocitopênica trombótica.

Embora o termo “critérios de positividade em lâmina” seja amplamente debatido, ainda não há consenso sobre a significância clínica de muitos achados individuais das análises morfológicas das séries branca, vermelha e das plaquetas. Dessa forma, cada instituição, baseada nos dados disponíveis na literatura e na experiência dos seus profissionais, deve desenvolver uma lista de achados microscópicos anormais e clinicamente significativos (HYUN; GULATI; ASHTON, 1991). Como não há diretrizes baseadas em evidências a respeito do nível em que a presença de granulócitos imaturos (metamielócitos, mielócitos e promielócitos) torna-se clinicamente significativa (HOUWEN, 2001), o limite arbitrário de  $\geq 3\%$  de metamielócitos,  $\geq 1\%$  de promielócito e de mielócitos observados na varredura microscópica foi escolhido para compor os critérios de positividade em lâmina do HC-UFPR. Lantis *et al.* (2003) recomendam que se forem encontrados na RMLH critérios de positividade como presença de blastos,  $> 2\%$  de granulócitos imaturos,

linfócitos atípicos, > 2 eritroblastos em 100 leucócitos, a contagem diferencial automatizada deve ser substituída pela CDML.

Como a validação dos critérios de triagem e positividade em lâmina do grupo de consenso em revisões hematológicas da ISLH não demonstrou ser segura, por apresentar taxa de resultados falso-negativos acima de 3%, foram elaborados novos critérios de triagem que determinaram quais lâminas seriam ou não revisadas e a eles foram dados os nomes de Estudos 1, 2, 3 e adaptado da ISLH, de modo a ajustá-los à realidade do serviço, com o objetivo de não deixar passar as amostras que pudessem conter alterações morfológicas relevantes descritas nos critérios de positividade em lâmina do HC-UFPR.

Três princípios básicos devem ser seguidos quando se desenvolve CRMHA, o primeiro é reduzir a taxa de resultados falso-negativos para um valor aceitável. Os Estudos 1, 2 e 3 obtiveram taxas totais de falso-negativos de 0,50%, 1,97% e 2,73%, respectivamente, todos abaixo do limite preconizado de 3%, acrescentando-se que o Estudo 3 mostrou a maior especificidade (67,77%), o que implica em dizer que resultou em uma maior porcentagem de amostras sem CPL e que foram corretamente classificadas como verdadeiro-negativas. O Estudo 3 mostrou eficiência ligeiramente superior à do Estudo adaptado da ISLH, e ambos foram mais eficientes que os Estudos 1 e 2. Contudo, a taxa de falso-negativos encontrada no Estudo 3 foi significativamente menor que a encontrada com a utilização dos CT adaptados da ISLH ( $p = 0,0414$ ), a qual foi de 3,95% e ultrapassou o limite de segurança preestabelecido de 3%. Kim *et al.* (2012), utilizando o analisador Sysmex XE-2100, encontraram taxa de falso-negativos e especificidade de 9,7% e 77,1%, respectivamente, na avaliação da implantação dos CRMHA da ISLH.

Nos Estudos 1, 2 e 3 as taxas de falso-negativos em pacientes internados não foram significativamente diferentes das observadas nos pacientes ambulatoriais, indicando que esses Estudos podem ser utilizados nos dois segmentos. No entanto, como desvantagem houve uma alta taxa de falso-positivos em pacientes internados, o que levou a um aumento das RMLH. A taxa de falso-negativos da aplicação dos CT adaptados da ISLH em pacientes internados (5,63%) foi significativamente maior que a observada nos pacientes ambulatoriais (3,18%) e constitui uma desvantagem para a segurança dos pacientes internados. Pratumvinit *et al.* (2013) avaliaram CT otimizados próprios perante os CPL da ISLH e verificaram que a taxa de falso-negativos em pacientes internados e ambulatoriais não foi diferente da taxa total de

falso-negativos. Também demonstraram que a taxa de falso-positivos foi maior nos pacientes internados quando comparados com os ambulatoriais, assim como nesse estudo.

Outro fator importante é encontrar critérios que classifiquem menos amostras como falso-positivas, o que vem de encontro ao segundo princípio, que é reduzir a taxa de revisões microscópicas para um valor aceitável. Nos Estudos 1, 2, 3 e adaptados da ISLH, as taxas totais de revisões microscópicas foram de 73,85%, 54,52%, 46,33% e 46,38%, respectivamente, sendo diretamente influenciadas pelos limites de triagem estabelecidos. A taxa total de revisões microscópicas encontrada no Estudo 1 foi a mais elevada e a taxa de falso-negativos a mais baixa (0,5% e  $p < 0,001$  em relação aos demais critérios de triagem). Apesar de ser um critério de triagem seguro, pode ser um problema tanto na diminuição do tempo de liberação dos resultados como para laboratórios que não tem quantidade suficiente de profissionais experientes para realizar a RMLH. O Estudo 1 constitui um bom exemplo para demonstrar como a falta de otimização de critérios de triagem pode resultar em trabalho intensivo e, na maioria das vezes, desnecessário para o laboratório, devido à elevada taxa de revisões microscópicas.

Apenas a utilização dos CT do Estudo 3 e dos CT adaptados da ISLH não fez com que o limite preestabelecido para a taxa de revisões microscópicas (< 50%) fosse ultrapassado e praticamente não houve diferença nas taxas de revisões microscópicas na avaliação desses CT. Contudo a maior eficiência e segurança do Estudo 3 tornou este conjunto de critérios de triagem mais satisfatório. A taxa total de falso-positivos do Estudo 3 foi estatisticamente menor que as encontradas nos Estudos 1 e 2, fato que auxiliou na redução da taxa de revisões microscópicas. Cui *et al.* (2010), utilizando o analisador Sysmex XE-2100, encontraram taxa de revisões microscópicas de 37,94% na avaliação da implantação dos CRMHA da ISLH e de 30,0% na avaliação de CT próprios perante os CPL da ISLH. Já Pratumvinit *et al.* (2013), utilizando os analisadores Sysmex XE-5000 e Coulter LH 750, encontraram taxa de revisões microscópicas de 29,33% na avaliação da implantação dos CRMHA da ISLH e de 24,22% na avaliação de CT próprios perante os CPL da ISLH. Ambos autores demonstraram a obtenção de taxas de revisões microscópicas menores que as encontradas no Estudo 3, o qual obteve a menor taxa de revisões dentre os CT avaliados nesse estudo. Uma vez que a taxa de falso-negativos do Estudo 3 ficou muito próxima do limite de segurança, optou-se em não realizar ajustes adicionais

nos CT do Estudo 3 no intuito de diminuir as taxas de revisões microscópicas, uma vez que isso poderia provocar aumento na taxa de falso-negativos para valores acima do limite de segurança. Desta forma, conclui-se que os CT do Estudo 3 constituem o limite da automação para indicar a liberação direta de resultados de hemogramas de maneira eficiente e segura na população atendida no Hospital de Clínicas da UFPR.

Por intermédio da análise dos resultados falso-positivos pode-se alterar ou eliminar alguns CT para reduzir a taxa de revisões. Uma taxa elevada de revisões microscópica, acima da capacidade do laboratório, sobrecarrega o serviço dos profissionais e provoca atrasos na liberação dos resultados. Nos Estudos 1, 2, 3 e adaptado da ISLH, as taxas totais de resultados falso-positivos foram de 49,52%, 31,66%, 24,23% e 25,49%, respectivamente. O Estudo 3 obteve as menores taxas totais de revisão microscópica, de falso-positivos e a melhor eficiência (73,04%) quando comparado como os demais. A taxa de revisões microscópicas de 46,33% obtida no Estudo 3 encontra-se dentro da capacidade de trabalho do Laboratório de Hematologia do HC-UFPR. Essa taxa de revisões foi considerada satisfatória em virtude da taxa de falso-positivos (24,23%) ter sido, dentre as observadas para os CT avaliados nesse estudo, a mais próxima da encontrada por Barnes *et al.* (2005), 18,6% e Kim *et al.* (2012), 17,3%, quando avaliaram a implantação dos CRMHA da ISLH e da encontrada por Cui *et al.* (2010), 16,43% e Pratumvinit *et al.* (2013), 9,89% quando avaliaram CT otimizados para o analisador hematológico Sysmex XE-2100.

Nesse estudo, critérios de triagem utilizando parâmetros como VCM, RDW-CV, RDW-SD, CHCM, contagem diferencial de neutrófilos e alertas suspeitos mostraram os maiores valores preditivos positivos. Esse fato claramente sugere que ajustes adequados nos limites de corte desses parâmetros pode acentuar a capacidade de detectar amostras anormais. Por outro lado, critérios de triagem que utilizam contagens baixas de leucócitos e plaquetas e o VPM, capturam muitas amostras sem anormalidades morfológicas, produzindo os menores valores preditivos positivos. Cabe salientar que esses resultados refletem o perfil dos pacientes analisados rotineiramente nesse Laboratório de Hematologia (hospital quaternário). Kim *et al.* (2012) demonstraram em um hospital terciário da Coreia que os CT que forneceram os melhores valores preditivos positivos foram: hemoglobina, VCM, RDW e alertas suspeitos.

O limite de corte inferior da contagem de leucócitos estabelecido no Estudo 3 reduziu a taxa de revisões microscópicas sem aumentar a taxa de falso-negativos quando comparado com o limite de corte inferior da contagem de leucócitos dos critérios de triagem adaptados da ISLH. Resultado semelhante foi encontrado por Pratumvinit *et al.* (2013). A redução do limite de corte superior do RDW-CV no Estudo 3 em relação aos critérios de triagem adaptados da ISLH aumentou ligeiramente a taxa de revisões microscópicas, contudo diminuiu significativamente a taxa de falso-negativos. Conclui-se que tal fato aumentou a segurança sem comprometer demasiadamente a eficiência.

Por fim, o terceiro princípio é a não ocorrência de resultados falso-negativos com presença de doenças hematológicas graves e não diagnosticadas previamente, embora uma taxa de falso-negativos de até 3% (CUI *et al.*, 2010) e de até 5% (BARNES *et al.*, 2005) sejam aceitáveis. Não é aceitável perder casos de doenças hematológicas ainda não diagnosticadas, portanto, cada instituição deve avaliar a necessidade de realizar RMLH em todos os pacientes da unidade de hematologia, mesmo à custa de um aumento na taxa de revisões microscópicas. Nesse estudo, os critérios de triagem não deixaram de identificar qualquer caso com alterações morfológicas relevantes em doenças graves não previamente diagnosticadas.

Entre os parâmetros estendidos e alertas suspeitos relatados pelos analisadores hematológicos, os alertas suspeitos de granulócitos imaturos, blastos e eritroblastos estão intimamente relacionados com estados leucêmicos e não devem ser excluídos dos critérios de triagem, mesmo que possam causar uma série de RMLH desnecessárias. Cabe salientar que avaliar e documentar o desempenho de alertas suspeitos é de extrema importância para o laboratório, pois auxilia o profissional que analisa microscopicamente as extensões sanguíneas (RUZICKA *et al.*, 2001; STAMMINGER *et al.*, 2002; BRIGGS *et al.*, 2011; BRIGGS *et al.*, 2012; EILERTSEN; VØLLESTAD; HAGVE, 2013; COMAR; MALVEZZI; PASQUINI, 2014b). Esse estudo mostrou que os alertas suspeitos gerados por ambos analisadores Sysmex, quando avaliados em conjunto, desempenham satisfatoriamente a função de indicar as amostras que necessitam ou não de RMLH, sejam elas de pacientes internados ou ambulatoriais.

O desejo de todos os fabricantes de analisadores hematológicos é aumentar a especificidade dos alertas suspeitos, sem perder a sensibilidade. Contudo, na prática, muitos casos de falso-positivos são observados. É preferível trabalhar com

certas taxas de resultados falso-positivos, que impactam apenas na rotina do laboratório, do que possibilitar a ocorrência de elevadas taxas de resultados falso-negativos, que podem causar danos aos pacientes. A sensibilidade de um alerta suspeito também é um requisito importante pelo fato de serem destinados principalmente para o rastreamento de anormalidades e não para uma classificação precisa de células anormais. Dessa forma, os alertas suspeitos devem ser utilizados em conjunto com critérios de triagem quantitativos na revisão de hemogramas automatizados, a fim de se obter mais confiança na liberação dos resultados (HOFFMANN; HOEDEMAKERS, 2004; BARNES *et al.*, 2005; COMAR; MALVEZZI; PASQUINI, 2013). Apesar de ter sido observada uma especificidade relativamente elevada para o conjunto de alertas suspeitos avaliados nesse estudo, não há total garantia de que as lâminas não revisadas realmente não contenham alterações morfológicas.

Os CRMHA dos Estudos 1, 2 e 3 e adaptados da ISLH podem ser utilizados nas rotinas dos laboratórios de hematologia, pois são seguros para os pacientes, contudo, a escolha de qual deles utilizar dependerá da maior ou menor necessidade de elevar a eficiência na liberação dos resultados e a segurança dos pacientes, assim como disponibilidade de pessoal habilmente treinado para realizar as RMLH.

Neste trabalho, a análise de curvas ROC foi utilizada pela primeira vez na literatura na avaliação da efetividade de conjuntos de CRMHA. Analisando-se a FIGURA 6 percebe-se o comportamento dos conjuntos de critérios em função do par sensibilidade e fração de falso-positivos (100 – especificidade). O Estudo 3, em comparação aos demais, não obteve a maior sensibilidade, porém, foi o que mais classificou corretamente as amostras, com eficiência de 73,04% e índice de Youden de 0,5677. O índice de Youden é bom para escolher o teste que erra menos nas classificações (falso-positivos + falso-negativos), contudo, em determinadas ocasiões, nas quais devem ser tomadas medidas de proteção, pode ser mais importante escolher o teste que resulte em menos resultados falso-negativos, ou seja, o mais sensível. A maior sensibilidade ocorre em função do maior número de revisões microscópicas, o que pode não ser interessante para o serviço em questão, pois diminui a quantidade de amostras classificadas corretamente (eficiência).

Ressalta-se que a eficiência do Estudo 3 foi obtida à custa de uma taxa de falso-negativos de 2,73%, menor que os valores sugeridos por Barnes *et al.* (2005) (< 5%) e por Cui *et al.* (2010) (< 3%), o que confere, dessa forma, mais segurança

nos resultados de hemogramas liberados diretamente após a aplicação desses critérios de triagem.

CRMHA com alta sensibilidade podem ser mais vantajosos em laboratórios que atendem, em grande parte, pacientes ambulatoriais para propósito de *screening*, enquanto que CRMHA com alta especificidade podem ser mais proveitosos em laboratórios que atendem pacientes internados, de modo a proporcionar aos pacientes um cuidado mais rápido e eficiente. O Estudo 3 demonstrou a maior especificidade (67,77%), o que pode resultar em maior diminuição de tempo de liberação dos resultados para os pacientes atendidos no HC-UFPR, uma vez que possibilita melhor classificação dos verdadeiro-negativos (50,94%). No Estudo 1, por exemplo, foi observada uma sensibilidade de 97,96% à custa de 49,52% de resultados falso-positivos e especificidade de 34,11%. Já o Estudo 3 obteve a menor fração de falso-positivos.

Os critérios de triagem dos Estudos 1, 2, 3 e ISLH adaptados obtiveram eficiências de 49,97%, 66,36%, 73,04% e 70,56%, respectivamente, demonstrando que quanto mais estreitos foram os limites de triagem, maior foi a taxa de revisões microscópicas e menor a porcentagem de classificações corretas. O ponto positivo é que quanto mais estreitos foram os limites de triagem, menor foi a taxa de falso-negativos. No entanto, essa baixa taxa de falso-negativos é obtida à custa de uma elevada taxa de falso-positivos e, conseqüentemente, revisões microscópicas, fatores esses que não são interessantes por gerarem custos, sobrecarga de trabalho e aumento do tempo de liberação dos resultados.

Ressalta-se que, para a avaliação do desempenho de CRMHA, não basta apenas buscar a maior sensibilidade, especificidade e eficiência possíveis, pois isso pode resultar em uma elevada taxa de resultados falso-negativos. Requer-se um equilíbrio a fim de não provocar sobrecarga com RMLH desnecessárias e também não deixar de revisar microscopicamente amostras que contenham alterações morfológicas relevantes para a conduta clínica. Portanto, para que haja viabilidade na aplicação de CRMHA, a taxa de falso-negativos deve estar sempre dentro do limite preconizado pelo laboratório. Da mesma forma, é importante salientar que a aplicação de CRMHA não é totalmente confiável, pois sempre haverá, por menor que seja, a ocorrência de resultados falso-negativos. A ordem de desempenho dos estudos realizados, de acordo com a avaliação do índice de Youden e área sob a Curva ROC, foi Estudo 3 > ISLH adaptados > Estudo 2 > Estudo 1.



Em estudo realizado por Xing *et al.* (2010), após reformularem os critérios de triagem, tendo em vista a elevada taxa de falso-negativos encontrada com a aplicação dos critérios de triagem da ISLH (BARNES *et al.*, 2005), as novas taxas de falso-negativos e de revisões microscópicas observadas foram de 4,2% e 34,2%, respectivamente.

Apesar das taxas de revisão microscópicas observadas para o Estudo 3 e adaptados da ISLH serem muito próximas, a taxa de falso-negativos observada no Estudo 3 (2,73%) foi estatisticamente menor que a observada nos critérios de triagem adaptados da ISLH (3,95%). Sugere-se que tal fato possa ser explicado em virtude de, no Estudo 3, muitas amostras terem sido consideradas verdadeiro-positivas e não falso-negativas por extrapolarem apenas os limites estabelecidos para a contagem relativa, principalmente de neutrófilos e linfócitos, e não os limites das contagens absolutas. Como os critérios adaptados da ISLH não estipulam limites para as contagens relativas de leucócitos, isso pode ter provocado um maior número de amostras falso-negativas. Contudo, para confirmar essa hipótese, estudos posteriores devem ser realizados avaliando as taxas de falso-negativos entre limites de corte de ambos os critérios de triagem.

Como a análise dos resultados falso-negativos obtidos na avaliação inicial dos CRMHA da ISLH (BARNES *et al.*, 2005) revelou elevada ocorrência de desvio nuclear à esquerda  $> 8\%$ , optou-se em manter a contagem de bastões como critério de positividade em lâmina do HC-UFPR, porém, sendo significativa quando bastões  $\geq 15\%$ , sobretudo, por alguns trabalhos suportarem seu uso (BONADIO; SMITH; CARMODY, 1992; JASKIEWICZ *et al.*, 1994; GREER *et al.*, 2009).

A análise dos resultados falso-negativos obtidos em todos os Estudos revelou ainda uma elevada ocorrência de desvio nuclear à esquerda, dessa vez  $\geq 15\%$ . Todavia, cabe salientar novamente que a interpretação desses resultados deve levar em consideração as limitações mencionadas anteriormente. Hyun, Gulati e Ashton (1991) consideram, diferentemente deste estudo, um valor de contagem relativa de bastões de  $\geq 20\%$  como sendo clinicamente significativo, assim como promielócitos  $\geq 3\%$ , mielócitos  $\geq 5\%$ , metamielócitos  $\geq 10\%$ , linfócitos atípicos  $\geq 7\%$  e eritroblastos  $\geq 2$  ou  $3/100$  leucócitos. Já Jones *et al.* (1998) consideram bastões  $\geq 20\%$ , granulócitos imaturos  $\geq 3\%$ , linfócitos atípicos  $\geq 10\%$  e eritroblastos  $\geq 2/100$  leucócitos.

Na tentativa de reduzir as revisões microscópicas encontradas neste estudo, algumas ações podem ser adotadas para estudos posteriores, como, por exemplo, alterar o critério de positividade em lâmina de bastões de  $\geq 15\%$  para  $\geq 20\%$  ou até mesmo retirá-lo dos critérios de positividade em lâmina, uma vez que o ICSH, por meio do trabalho de Palmer *et al.* (2015), recomenda que os neutrófilos bastões sejam contados como segmentados na CDML devido à ampla variação inter-observadores observada na classificação desse tipo celular. Tal fato permitiria a elevação dos valores de leucócitos e neutrófilos nos critérios de triagem. Também, poderiam ser implantadas melhorias nos sistema de informação laboratorial para possibilitar a implantação das regras de *delta check*, visando aumentar a qualidade, a segurança e a produtividade dos resultados. Semelhante a Froom, Isakov e Barak (2014), também poderiam ser estabelecidos CT específicos para crianças com idade abaixo de 15 meses, uma vez que esses autores, assim como nesse estudo, observaram uma elevada taxa de falso-positivos devido à ocorrência de amostras com contagens absolutas de linfócitos acima de  $7,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Assim como demonstrado por Tseng *et al.* (2014), também poderiam ser realizados estudos, através de curva ROC, para definir os melhores limites de corte para cada tipo específico de critério de triagem em identificar critérios de positividade em lâmina.

Hoffmann (2011) sugere que parâmetros de volume eritrocitário sejam omitidos dos critérios de triagem, uma vez que a informação sobre o volume dos eritrócitos já está clara e disponível a partir do próprio volume corpuscular médio (VCM) e do índice de distribuição dos volumes eritrocitários (RDW). A não ser que o laboratório conte com sistema de *delta check*, sugere-se manter tais critérios de triagem, já que alterações morfológicas relevantes podem estar associadas à variação desses parâmetros, como, por exemplo, presença de pseudo Pelger-Huët, neutrófilos displásicos e VCM elevado em pacientes com mielodisplasias.

Froom, Havis e Barak (2009) verificaram uma diminuição na taxa de revisões microscópicas em pacientes ambulatoriais em Nesher, Israel, quando além da aplicação de CRMHA, analisaram o histórico de resultados anteriores. Demonstraram que as taxas de revisão microscópica diminuíram de 10,7% para 2,6% com a análise histórica dos resultados dos pacientes.

Os CRMHA devem ser melhorados continuamente, dependendo, sobretudo, de mudanças no perfil dos pacientes e no tipo de analisador hematológico empregado. Para isso, sugere-se que amostras sejam periodicamente recolhidas e

analisadas para ser realizado um controle de qualidade interno dos critérios de triagem utilizados naquele momento, de modo a acompanhar eventuais mudanças no perfil dos pacientes atendidos e que poderiam indicar a necessidade de ajustes nos critérios de triagem.

Boas condutas relacionadas à garantia da qualidade dos analisadores hematológicos são indispensáveis, pois agregam confiabilidade aos resultados automatizados que são liberados sem a revisão da lâmina. Já o devido controle interno de qualidade da microscopia interobservadores pode agregar mais qualidade aos resultados que são liberados com a revisão da lâmina.

Enquanto muitos laboratórios tentam aumentar a eficiência com a redução do número de RMLH, torna-se essencial que a atenção aos pacientes, sejam hospitalizados ou não, nunca seja comprometida por informações falsas ou resultados enganadores, especialmente os resultados falso-negativos (PETERSON *et al.*, 2001; MCFADDEN, 2002). Nesse trabalho, o Estudo 3 mostrou a melhor relação entre eficiência e segurança.

Galloway e Osgerby (2006) demonstraram variação prática da utilização dos CRMHA, sugerindo que ela é dependente do tipo de hospital, do analisador hematológico utilizado e da localização geográfica do laboratório. Como exemplo desse último, no sul do Brasil há muitas pessoas com o trato talassêmico, as quais podem ter hemoglobina discretamente diminuída e VCM diminuído, mas com alterações do hemograma discretamente anormais (menor que 2+) e, com isso, aumentar os resultados falso-positivos. Já um estudo do programa Q-Probe, do Colégio Americano de Patologistas, relatou que quanto maior for um hospital, maior será o percentual de lâminas com necessidade de revisões microscópicas (NOVIS *et al.*, 2006). Esse estudo foi realizado em um hospital quaternário e em função disso, as amostras utilizadas, que refletem o perfil dos pacientes, tiveram grande impacto sobre as taxas de revisões microscópicas. O Estudo 3 foi o que melhor identificou as amostras com os critérios de positividade em lâmina do HC-UFPR.

É importante notar que a implantação de critérios não é introduzida em uma rotina laboratorial apenas por uma questão de oportunidade, pretendendo-se trabalhar menos, mas sim para garantir um desempenho satisfatório na produtividade para trazer benefícios aos pacientes, médicos e laboratório por meio da diminuição de custos e aumento da qualidade dos exames. Para exemplificar o impacto da aplicação de CRMHA no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR, se

os critérios de triagem do Estudo 3 fossem utilizados atualmente, dos cerca de 120.000 hemogramas realizados anualmente, cerca de 64.400 (100% menos a taxa de revisões microscópicas do Estudo 3) poderiam ser liberados diretamente. Tudo isso acarretaria em diminuição de custos e aumento da qualidade dos exames clinicamente significativos, visto que aumentaria o tempo que cada profissional poderia gastar na análise microscópica de tais casos.

Não há valor intrínseco acrescentado à assistência ao paciente pela realização de CDML. Pelo contrário, o lançamento de uma CDML que é relativamente imprecisa e inexata, em detrimento à contagem automatizada, quando não forem revelados achados microscópicos relevantes pela revisão manual, pode ser considerado potencialmente prejudicial à assistência ao paciente (LANTIS *et al.*, 2003).

Barnes *et al.* (2005) encontraram, dentre os resultados falso-negativos, cinco casos com presença de blastos em 13.298 amostras analisadas. Nos Estudos 1, 2, 3 e ISLH adaptados, não foi relatado nenhum resultado falso-negativo com presença de blastos. Todavia, como dito anteriormente, somente os critérios do Estudo 1 foram capazes de triar uma amostra com presença de 2% de plasmócitos de um paciente com mieloma múltiplo previamente diagnosticado.

Limitações no presente estudo devem ser consideradas: (i) esse estudo não foi cego, os observadores tiveram acesso aos relatórios dos analisadores hematológicos, o que pode ter induzido ao relato de certas alterações morfológicas, especialmente as sinalizadas por alertas suspeitos. (ii) as RMLH e as CDML foram realizadas por apenas um observador. Se por um lado a revisão por dois observadores em duplo cego pudesse dar mais credibilidade aos resultados, por outro diminuiria a praticidade de implantação e avaliações periódicas dos CRMHA. Ressalta-se que Barnes *et al.* (2005) aceita e até mesmo recomenda que a RMLH possa ser realizada por um único observador experiente, de modo a fornecer consistência aos resultados. Nesse estudo a RMLH foi realizada por observadores com ampla experiência em revisões morfológicas no laboratório de hematologia, com 10 a 30 anos de experiência. (iii) os dados apresentados foram gerados a partir de uma simples população, com determinado perfil de pacientes, que foi atendida em um hospital universitário, numa determinada época do ano e que utiliza certo tipo de analisador hematológico. Por conta desses fatores locais, os CRMHA que provaram ser mais eficientes no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR, podem

não ser os mais adequados para serem utilizadas em outros laboratórios. (iv) as amostras foram coletadas consecutivamente durante sete dias de trabalho e algumas alterações incomuns que compõe os critérios de positividade em lâmina não foram observadas durante esse estudo. Como resultado, a capacidade dos CRMHA estabelecidos nesse estudo em identificar e indicar a RMLH em amostras com esses achados positivos não pôde ser avaliada, indicando a necessidade de estudos posteriores com amostras positivas selecionadas.

A automação no setor de hematologia vem crescendo substancialmente nos últimos anos e os fabricantes oferecem cada vez mais funções em seus analisadores hematológicos, tais como auto verificação de resultados, facilidade de manutenção e protocolos de interfaceamento simplificados. Essas funções contribuem para diminuir a interação humana com os analisadores, de modo a facilitar o fluxo de trabalho e diminuir o tempo de liberação dos resultados. Desse modo, a interferência humana pode ser direcionada para a verificação dos resultados gerados pelos analisadores hematológicos, para a RMLH dos casos mais difíceis, para a verificação e análise das características de desempenho analítico dos analisadores hematológicos e para o estabelecimento e avaliação de CRMHA por meio de pesquisas e da interação diária entre os profissionais do laboratório, a equipe médica e os analisadores hematológicos. Todos esses fatores têm por objetivo garantir resultados pertinentes, relevantes, com alta qualidade e liberados em um tempo adequado para as tomadas de decisão e condutas médicas apropriadas.

## 7 CONCLUSÕES

Na avaliação de critérios para revisão microscópica de hemogramas automatizados no Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da UFPR, concluiu-se que:

- 1) A validação dos CRMHA adaptados da ISLH, na primeira e na segunda etapa, foi insuficiente para possibilitar a liberação direta dos resultados de hemogramas automatizados, considerando os limites de segurança preestabelecidos (falso-negativos  $\leq 3\%$ ) neste trabalho, tornando-se necessário introduzir e avaliar novos CRMHA no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR.
- 2) A segurança procurada na liberação direta de resultados de hemogramas automatizados foi alcançada através dos ajustes inseridos nos critérios de triagem dos Estudos 1, 2 e 3, tornando esses critérios de triagem aplicáveis na rotina do Laboratório de Hematologia do HC-UFPR.
- 3) O Estudo 3 culminou com a melhor relação entre segurança e eficiência para estimar os limites da automação na liberação direta de resultados de hemogramas automatizados no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR.
- 4) As taxas de falso-negativos em pacientes internados dos Estudos 1, 2 e 3 foram semelhantes às observadas nos pacientes ambulatoriais, tornando segura a aplicação desses conjuntos de critérios de triagem em ambos os perfis de pacientes.
- 5) O estabelecimento e a avaliação de CRMHA no Laboratório de Hematologia do HC-UFPR demonstrou ser uma estratégia adequada para aumentar a produtividade laboratorial de forma segura e eficiente.
- 6) Os resultados obtidos fortalecem a necessidade de respeitar a heterogeneidade da população que utiliza o laboratório de modo que os CRMHA utilizados sejam os mais apropriados e atendam às características

de diferentes contextos nos quais se realizam determinações hematimétricas.

## REFERÊNCIAS

AULESA, C.; PASTOR, I.; NARANJO, D.; GALIMANY, R. Application of receiver operating characteristics curve (ROC) analysis when definitive and suspect morphologic flags appear in the new Coulter LH 750 analyzer. **Laboratory Hematology**, Charlottesville, v. 10, n. 1, p. 14-23, 2004.

BAIN, B. J.; BATES, I.; LAFFAN, M. A.; LEWIS, S. M. **Dacie and Lewis practical haematology**. 11. ed. China: Churchill Livingstone, 2012.

BAIN, B. J. **Blood cells**. A practical guide. 5. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2015.

BAIN, B. J. Diagnosis from the blood smear. **The New England Journal of Medicine**, Royston, v. 353, n. 5, p. 498-507, 2005.

BAIN, B. J.; LEWIS, S. M. Preparation and staining methods for blood and bone marrow films. In: BAIN, B. J.; BATES, I.; LAFFAN, M. A.; LEWIS, S. M. (Ed.). **Dacie and Lewis practical haematology**. 11. ed. China: Elsevier Churchill Livingstone, 2012. p. 57-68.

BARNES, P. W.; MCFADDEN, S. L.; MACHIN, S. J.; SIMSON, E. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. **Laboratory Hematology**, Charlottesville, v. 11, n. 2, p. 83-90, 2005.

BARTH, D. Approach to peripheral blood film assessment for pathologists. **Seminars in Diagnostic Pathology**, Orlando, v. 29, n. 1, p. 31-48, 2012.

BONADIO, W. A.; SMITH, D.; CARMODY, J. Correlating CBC profile and infectious outcome. A study of febrile infants evaluated for sepsis. **Clinical Pediatrics**, Philadelphia, v. 31, n. 10, p. 578-582, 1992.

BOWLES, K. M.; COOKE, L. J.; RICHARDS, E. M.; BAGLIN, T. P. Platelet size has diagnostic predictive value in patients with thrombocytopenia. **Clinical and Laboratory Haematology**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 370-373, 2005.

BRAILE, D. M.; GODOY, M. F. **Programa cálculos estatísticos for Windows V.1.8**. 1999.



BRIGGS, C. Evaluation of hematology analyzers. In: KOTTKE-MARCHANT, K.; DAVIS, B. H. (Ed.). **Laboratory hematology practice**. Singapore: Wiley-Blackwell, 2012. p. 96-102.

BRIGGS, C.; BAIN, B. J. Basic haematological techniques. In: BAIN, B. J.; BATES, I.; LAFFAN, M. A.; LEWIS, S. M. (Ed.). **Dacie and Lewis practical haematology**. 11. ed. China: Churchill Livingstone, 2012. p. 23-56.

BRIGGS, C.; LINSSEN, J.; LONGAIR, I.; MACHIN, S. J. Improved flagging rates on the Sysmex XE-5000 compared with the XE-2100 reduce the number of manual film reviews and increase laboratory productivity. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 136, n. 2, p. 309-316, 2011.

BRIGGS, C.; LONGAIR, I.; KUMAR, P.; SINGH, D.; MACHIN, S. J. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 65, n. 11, p. 1024-1030, 2012.

BRIGGS, C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 277-297, 2009.

BROWN, B. A. **Hematology**. Principles and procedures. 6. ed. Malvern: Lea & Febiger, 1993.

BURGESS, P.; ROBIN, H.; LANGSHAW, M.; KERSHAW, G.; PATHIRAJA, R.; YUEN, S.; COAD, C.; XIROS, N.; MANSY, G.; COLEMAN, R.; BROWN, R.; GIBSON, J.; HOLMAN, R.; HUBBARD, J.; WICK, V.; LAMMERS, M.; JOHNSON, R.; HUFFMAN, K.; BELL, J.; IBRAHIM, A.; ESTEPA, F.; LOVERGROVE, J.; JOSHUA, D. Rule based processing of the CD4000, CD3200 and CD Sapphire analyser output using the cerner discern expert module. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 603-614, 2009.

BUTTARELLO, M.; PLEBANI, M. Automated blood cell counts: state of the art. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 130, n. 1, p. 104-116, 2008.

BUTTARELLO, M. Quality specification in haematology: the automated blood cell count. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 346, n. 1, p. 45-54, 2004.

CAMARINHA, G. C.; MEDEIROS JUNIOR, N.; LOPES, R. M. Controle interno. In: OLIVEIRA, C. A.; MENDES, M. E. (Ed.). **Gestão da fase analítica do laboratório**:

como assegurar a qualidade na prática. Volume II. Rio de Janeiro: Controllab, 2011. p. 97-126.

CAPORAL, F. A.; COMAR, S. R. Evaluation of RDW-CV, RDW-SD, and MATH-1SD for the detection of erythrocyte anisocytosis observed by optical microscopy. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 5, p. 324-331, 2013.

CARTWRIGHT, G. E. **Diagnostic laboratory hematology**. 3. ed. New York: Grune & Stratton, 1963.

CEMBROWSKI, G. S.; CAREY, R. N. Quality control in hematology. In: CEMBROWSKI, G. S.; CAREY, R. N. **Laboratory quality management: QC  $\rightleftharpoons$  QA**. Chicago: ASCP Press, 1989. p. 186-212.

CEMBROWSKI, G. S.; CLARKE, G. Quality control of automated cell counter. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 35, n. 1, p. 59-71, 2015.

CEMBROWSKI, G. S.; SMITH, B.; TUNG, D. Rationale for using insensitive control rules for today's hematology analyzers. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 32, n. 6p2, p. 606-615, 2010.

CEMBROWSKI, G. S. Thoughts on quality-control systems: a laboratorians perspective. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 43, n. 5, p. 886-892, 1997.

CHANDRA, H.; CHANDRA, S.; RAWAT, A.; VERMA, S.; K. Role of mean platelet volume as discriminating guide for bone marrow disease in patients with thrombocytopenia. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 498-505, 2010.

CHAPMAN, M. Hematology review criteria and its impact on workflow and productivity. **Laboratory Hematology**, Charlottesville, v. 3, p. 48-52, 1997.

CHAPMAN, M. Hematology analyzers offer new technology and user-friendliness. **Laboratory Medicine**, Chicago, v. 31, n. 3, p. 146-150, 2000.

CIMENTI, C.; ERWA, W.; MÜLLER, W.; RESCH, B. (2013). The role of immature granulocyte count and immature myeloid information in the diagnosis of neonatal sepsis, neonatal bacterial infection, **InTech**, DOI: 10.5772/54531. Disponível em:

<http://www.intechopen.com/books/neonatal-bacterial-infection/the-role-of-immature-granulocyte-count-and-immature-myeloid-information-in-the-diagnosis-of-neonatal>

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **CLSI Document EP24-A2**: assessment of the diagnostic accuracy of laboratory tests using receiver operating characteristic curves; approved guideline. 2. ed. Wayne, Pennsylvania: 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **CLSI Document H26-A2**: validation, verification, and quality assurance of automated hematology analyzers; approved standard. 2. ed. Wayne, Pennsylvania: 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **CLSI Document H20-A2**: reference leukocyte (WBC) differential count (proportional) and evaluation of instrument methods; approved standard. 2. ed. Wayne, Pennsylvania: 2007.

COMAR, S. R.; DANCHURA, H. S. M.; SILVA, P. H. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 6, p. 431-436, 2009.

COMAR, S. R. Existe mais de um tipo de RDW e quais as diferenças? In: MARTINHO, M. S. C. (Ed.). **Hematologia em laboratório clínico**. São Paulo: Sarvier, 2012. p. 216-218. (Coleção 156 perguntas e respostas).

COMAR, S. R.; MALVEZZI, M.; PASQUINI, R. Are the review criteria for automated complete blood counts of the International Society of Laboratory Hematology suitable for all hematology laboratories? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 3, p. 219-225, 2014a.

COMAR, S. R.; MALVEZZI, M.; PASQUINI, R. Establishment and evaluation of review criteria of automated complete blood counts applying receiver operating characteristics (ROC) curve analysis. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 35, n. s1, p. 44-45, 2013.

COMAR, S. R.; MALVEZZI, M.; PASQUINI, R. The usefulness of suspect flags on the Sysmex XE-2100D hematology analyzer. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 36, n. s1, p. 110, 2014b.

COMAR, S. R.; MALVEZZI, M.; PASQUINI, R. To follow or not to follow the recommendations regarding microscopic analysis of the Clinical and Laboratory

Standards Institute H20-A2 to validate the criteria for blood smear review? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 69-70, 2015.

COMAR, S. R.; PASQUINI, R. Bases técnicas do hemograma e suas aplicações. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. (Ed.). **Tratado de hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 817-831.

COMAR, S. R.; SILVA, P. H. Determinação laboratorial e aplicação clínica dos parâmetros de volume plaquetário. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 257-265, 2009.

CORBERAND, J. X.; LAHARRAGUE, P. F.; FILLOLA, G. M. Validation criteria of the Sysmex NE-8000™ results. Personal experience in the computerized haematology laboratory of a French teaching hospital. **Sysmex Journal International**, Kobe, v. 2, n. 2, p. 103-110, 1992.

CORNBLEET, P. J. Clinical utility of the band cell. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 101-136, 2002.

CORNBLEET, P. J.; MYRICK, D.; JUDKINS, S.; LEVY, R. Evaluation of the Cell-Dyn 3000 differential. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 98, n. 6, p. 603-614, 1992.

COULTER, W. H. High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. **Proceedings of the National Electronics Conference**, Chicago, v. 12, p. 1034-1042, 1956.

COULTER, W. H. **Means for counting particles suspended in a fluid**. U. S. Patent n. 2656508, Oct. 20, 1953.

CROSLAND-TAYLOR, P. J. A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. **Nature**, London, v. 171, n. 4340, p. 37-38, 1953.

CUI, W.; WU, W.; WANG, X.; WANG, G.; HAO, Y.; CHEN, Y.; LUO, D.; SHOU, W.; ZHANG, S.; XIANG, X.; SI, Y.; CHEN, Q.; CAI, H.; LI, T.; SHEN, H.; SHANG, K.; ZHANG, Y. Development of the personalized criteria for microscopic review following four different series of hematology analyzer in a Chinese large scale hospital. **Chinese Medical Journal**, Beijing, v. 123, n. 22, p. 3231-3237, 2010.

DAVIS, G. M. A ruled-based system for cost savings in hematology. **MLO: Medical Laboratory Observer**, Oradell, v. 26, n. 9, p. 44-46, 1994a.

DAVIS, G. M. Autoverification of the peripheral blood count. **Laboratory Medicine**, Chicago, v. 25, p. 528-531, 1994b.

DAVIS, D. H.; BARNES, P. W. Automated cell analysis. In: KOTTKE-MARCHANT, K.; DAVIS, B. H. (Ed.). **Laboratory hematology practice**. Singapore: Wiley-Blackwell, 2012. p. 26-32.

DOW, R. B. The clinical and laboratory utility of platelet volume parameters. **Australian Journal of Medical Science**, Milton, v. 15, p. 1-8, 1994.

DRABKIN, D. L. Structural interpretation of the spectra of cyanide, pyridine and carbonmonoxide derivatives of cytochrome C and hemoglobin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 146, p. 605-617, 1942.

DUDLEY, J. M.; MESSINEZY, S.; ERIDANI, L.; LARIE, A.; NUNAN, T. O.; SAWYER, B.; SAVIDGE, G. F.; PEARSON, T. C. Primary thrombocythaemia: diagnostic criteria and a simple scoring system for positive diagnosis. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 71, n. 3, p. 331-335, 1989.

EILERTSEN, H.; VØLLESTAD, N. K.; HAGVE, T. A. The usefulness of the blast flags on the Sysmex XE-5000 is questionable. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 139, n. 5, p. 633-640, 2013.

ENGLAND, J. M. Blood cell sizing. In: KOEPKE, J. A. (Ed.). **Practical laboratory hematology**. New York: Churchill Livingstone, 1991. p. 109-130.

ESCOBAR, M.; RAPPAPORT, E.; TIPTON, P.; BALENTINE, P.; RIGGS, M. Reticulocyte estimate from peripheral blood smear: a simple, fast, and economical method for evaluation of anemia. **Laboratory Medicine**, Chicago, v. 33, n. 9, p. 703-705, 2002.

FAILACE, R. **Hemograma**: manual de interpretação. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

FAILACE, R.; PRANKE, P. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de hemogramas através de contadores eletrônicos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 3, p. 159-166, 2004.

FORD, J. Red blood cell morphology. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 351-357, 2013.

FRASER, C. G.; STEVENSON, H. P.; KENNEDY, I. M. G. Biological variation data are necessary prerequisites for objective autoverification of clinical laboratory data. **Accreditation and Quality Assurance**, New York, v. 7, n. 11, p. 455-460, 2002.

FRASER, C. G. Quality specifications. In: FRASER, C. G. **Biological variation: from principles to practice**. Washington: AACCC Press, 2001. p. 29-66.

FRIIS-HANSEN, L.; SÆLSEN, L.; ABILDSTRØM, S. Z.; GØTZE, J. P.; HILSTED, L. An algorithm for applying flagged Sysmex XE-2100 absolute neutrophil counts in clinical practice. **European Journal of Haematology**, Copenhagen, v. 81, n. 2, p. 140-153, 2008.

FROOM, P.; HAVIS, R.; BARAK, M. The rate of manual peripheral blood smear reviews in outpatients. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 47, n. 11, p. 1401-1405, 2009.

FROOM, P.; ISAKOV, E.; BARAK, M. Criteria for reflex peripheral smear review in infants. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Oslo, v. 74, n. 4, p. 366-368, 2014.

FUJIMOTO, K. Principles of measurement in hematology analyzers manufactured by Sysmex Corporation. **Sysmex Journal International**, Kobe, v. 9, n. 1, p. 31-44, 1999.

GALLOWAY, M. J.; CHARLTON, A.; HOLLAND, D.; TRIGG, G.; GIBSON, R. An audit of the implementation of the international consensus group's guidelines on reporting of blood films. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 63, n. 4, p. 351-354, 2010.

GALLOWAY, M. J.; OSGERBY, J. C. An audit of the indications for the reporting of blood films: results from the National Pathology Benchmarking Study. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 59, n. 5, p. 479-481, 2006.

GOOSSENS, W.; VAN DEN DRIESSCHE, M.; BRUSSELMANN, C.; VANDEKERCKHOVE, P. Optimization of the flagging criteria on the Sysmex SE-9500. **Sysmex Journal International**, Kobe, v. 10, n. 1, p. 18-20, 2000.

GREER, J. P.; FOERSTER, J.; RODGERS, G. M.; PARASKEVAS, F.; GLADER, B.; ARBER, D.; MEANS, R. T. **Wintrobe's clinical hematology**. 12. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2009.

GRONER, W.; KANTER, R. Optical technology in blood cell counting. **Sysmex Journal International**, Kobe, v. 9, n. 1, p. 21-30, 1999.

GRONER, W.; SIMSON, E. **Practical guide to modern hematology analyzers**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1995.

GULATI, G. L.; ALOMARI, M.; KOCHER, W.; SCHWARTING, R. Criteria for blood smear review. **Laboratory Medicine**, Chicago, v. 33, n. 5, p. 374-377, 2002.

GULATI, G. L.; BOURNE, S, EL JAMAL, S. M.; FLOREA, A. D.; GONG, J. Automated lymphocyte counts vs. manual lymphocyte counts in chronic lymphocytic leukemia patients. **Laboratory Medicine**, Chicago, v. 42, n. 9, p. 545-548, 2011.

GULATI, G. L.; HYUN, B. H. Quality control in hematology. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 6, n. 4, p. 675-678, 1986.

GULATI, G. L.; SONG, J.; FLOREA, A. D.; GONG, J. Purpose and criteria for blood smear scan, blood smear examination, and blood smear review. **Annals of Laboratory Medicine**, Seoul, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2013.

HAWKER, C. D. Laboratory automation: total and subtotal. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 27, n. 4, p. 749-770, 2007.

HILLMAN R. Blood smear interpretation: how about the "by whom". **Laboratory Hematology**, Charlottesville, v. 7, n. 4, p. 174, 2001.

HOFFMANN, J. J. Criteria for microscopic review following automated hematology analysis. **Chinese Medical Journal**, Beijing, v. 124, n. 7, p. 1119, 2011.

HOFFMANN, J. J.; HOEDEMAKERS, R. M. Diagnostic performance of the variant lymphocyte flag of the Abbott Cell-Dyn 4000 haematology analyzer. **Clinical and Laboratory Haematology**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 9-13, 2004.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (HC-UFPR). **HC-UFPR** -Instrução de Trabalho - Unidade de Apoio Diagnóstico - Seção de Hematologia n. 005 (ITR-UAD-HEM N. 005): padronização da leitura de lâminas de hemograma. Curitiba, Paraná, 2008.

HOUWEN, B. Blood film preparation and staining procedures. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 1-14, 2002.

HOUWEN, B. The differential cell count. **Laboratory Hematology**, Charlottesville, v. 7, p. 89-100, 2001.

HUR, M.; CHO, J. H.; KIM, H.; HONG, M. H.; MOON, H. W.; YUN, Y. M.; KIM, J. Q. Optimization of laboratory workflow in clinical hematology laboratory with reduced manual slide review: comparison between Sysmex XE-2100 and ABX Pentra DX120. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 434-440, 2011.

HYUN, B. H.; GULATI, G. L.; ASHTON, J. K. Differential leukocyte count: manual or automated, what should it be? **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v. 32, n. 4, p. 283-291, 1991.

INTERNATIONAL SOCIETY FOR LABORATORY HEMATOLOGY (ISLH) [Internet]. Disponível em: <[www.islh.org](http://www.islh.org)>. Acesso em: 29/05/14.

JACKSON, S. R.; CARTER, J. M. Platelet volume: laboratory measurement and clinical application. **Blood Reviews**, London, v. 7, n. 2, p. 104-113, 1993.

JASKIEWICZ, J. A.; MCCARTHY, C. A.; RICHARDSON, A. C.; WHITE, K. C.; FISHER, D. J.; DAGAN, R.; POWELL, K. R. Febrile infants at low risk for serious bacterial infection – an appraisal of the Rochester criteria and implications for management. Febrile Infants Collaborative Study Group. **Pediatrics**, Springfield, v. 94, n. 3, p. 390-396, 1994.

JONES, R. G.; FAUST, A.; GLAZIER, J.; MATTHEWS, R.; POTTER, B. CELL-DYN<sup>®</sup> 4000: Utility within the core laboratory structure and preliminary comparison of its expanded differential with the 400-cell manual differential count. **Laboratory Hematology**, Charlottesville, v. 4, p. 34-44, 1998.

KANG, S. H.; KIM, H. K.; HAM, C. K.; LEE, D. S.; CHO, H. I. Comparison of four hematology analyzers, CELL-DYN Sapphire, ADVIA 120, Coulter LH 750, and



Sysmex SE-2100, in terms of clinical usefulness. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 30, n. 6, p. 480-486, 2008.

KIM, S. J.; KIM, Y.; SHIN, S.; SONG, J.; CHOI, J. R. Comparison study of the rates of manual peripheral blood smear review from 3 automated hematology analyzers, Unicel DxH 800, ADVIA 2120i, and XE 2100, using international consensus group guidelines. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 136, n. 11, p. 1408-1413, 2012.

KOEPKE, J. A.; DOTSON, M. A.; SHIFMAN, M. A.; BOYARSKY, M. W. A flagging system for multichannel hematology analyzers. **Blood Cells**, New York, v. 11, n. 1, p. 113-125, 1985.

KOEPKE, J. A. Quantitative blood cell counting. In: KOEPKE, J. A. (Ed.). **Practical laboratory hematology**. USA: Churchill Livingstone, 1991. p. 43-60.

KOTTKE-MARCHANT, K.; DAVIS, B. H. **Laboratory hematology practice**. Singapore: Wiley-Blackwell, 2012.

KUNISHI, H.; SUYAMA, T.; KODAMA, R.; SHIBATA, H.; MASUDA, J. On our experience of using HS transportation system XE-Alpha™. **Sysmex Journal International**, Kobe, v. 9, n. 2, p. 139-143, 1999.

LADENSON, J. H. Patients as their own controls: use of the computer to identify "laboratory error". **Clinical Chemistry**, Baltimore, n. 21, n. 11, p. 1648-1653, 1975.

LANTIS, K. L.; HARRIS, R. J.; DAVIS, G.; RENNER, N.; FINN, W. G. Elimination of instrument-driven reflex manual differential leukocyte counts. Optimization of manual blood smear review criteria in a high-volume automated hematology laboratory. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 119, n. 5, p. 656-662, 2003.

LEHNER, J.; GREVE, B.; CASSENS, U. Automation in hematology. **Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft Für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie**, Basel, v. 34, n. 5, p. 328-339, 2007.

LEVIN, J., BESSMAN, J. D. The inverse relation between platelet volume and platelet number. Abnormalities in hematologic disease and evidence that platelet size

does not correlate with platelet age. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 101, n. 2, p. 295-307, 1983.

LEWIS, S. M. Automation in haematology – present and future trends. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 54, n. 11, p. 2053-2058, 1982.

LEWIS, S. M. Blood film evaluations as a quality control activity. **Clinical and Laboratory Haematology**, Oxford, v. 12, suppl 1, p. 119-27, 1990.

LEWIS, S. M. Harmonization and standardization of the blood count: the role of the ICSH cytometry panel. **Sysmex Journal International**, Kobe, v. 9, n. 1, p. 1-7, 1999.

LI, X.; WU, Q.; QIU, Z. Evaluate the applicability of the international criteria for blood smear review on the hematology analyzer. **International Journal of Laboratory Medicine**, Beijing, v. 31, n. 5, p. 432-433, 2010.

LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; KIPPS, T. O. **Williams hematology**. 7. ed. Nova York: McGraw-Hill Medical, 2007.

LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J. R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

LISSEN, J.; JENNISSEN, V. Identification of high fluorescence lymphocytes (HFL) count on the XE-5000 with efficient multi-channel messaging (eMM) as antibody synthesizing cells, c.q. plasma cells. **Sysmex Journal International**, Kobe, v. 19, n. 1, p. 19-25, 2009.

MACIEL, T. E. S.; COMAR, S. R.; BELTRAME, M. P. Performance evaluation of the Sysmex<sup>®</sup> XE-2100D automated hematology analyzer. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 1, p. 26-35, 2014.

MAEDEL, L. B.; DOIG, K. Examination of the peripheral blood film and correlation with the complete blood count. In: RODAK, B. F.; FRITSMA, G. A.; KEOHANE, E. M. (Ed.). **Hematology: clinical principles and applications**. 4. ed. China: Elsevier Saunders, 2012. p. 192-209.

MCFADDEN, S. Automating the review process to improve productivity in the hematology laboratory. **Laboratory Hematology**, Charlottesville, v. 8, n. 4, p. 225-229, 2002.

MOLDAVAN, A. Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. **Science**, New York, v. 80, n. 2069, p. 188-189, 1934.

MORI, Y.; MIZUKAMI, T.; HAMAGUCHI, Y.; TSURUDA, K.; AMADA, Y.; KAMIHIRA, S. Automation of bone marrow aspirate examination using the XE-2100 automated hematology analyzer. **Cytometry**. Part B, Clinical Cytometry, Hoboken, v. 58, n. 1, p. 25-31, 2003.

MURAT, S. N.; DURAN, M.; KALAY, N.; GUNEBAKMAZ, O.; AKPEK, M.; DOGER, C.; ELCIK, D.; OCAK, A.; VATANKULU, M. A.; TURFAN, M.; KASAPKARA, H. A.; AKIN, F.; SAHIN, M.; KAYA, M. G. Relation between mean platelet volume and severity of atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes. **Angiology**, New York, v. 64, n. 2, p. 131-136, 2013.

NOVIS, D. A.; WALSH, M.; WILKINSON, D.; LOUIS, M. S.; BEN-EZRA, J. Laboratory productivity and the rate of manual peripheral blood smear review: a college of American pathologists Q-probes study of 95,141 complete blood count determinations performed in 263 institutions. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 130, n. 5, p. 596-601, 2006.

OKADA, T. Development and problem of automated hematology analyzer. **Sysmex Journal International**, Kobe, v. 9, n. 1, p. 52-57, 1999.

OLIVEIRA, R. A. G. **Hemograma**: como fazer e interpretar. São Paulo: Livraria Médica Paulista LTDA., 2007.

OSSELAER, J. C.; JAMARI, J.; SCHEIFE, J. M. Platelet distribution width for differential diagnosis of thrombocytosis. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 43, n. 6p1, p. 1072-1076, 1997.

PALMER, L.; BRIGGS, C.; MCFADDEN, S.; ZINI, G.; BURTHEM, J.; ROZENBERG, G.; PROYTCHEVA, M.; MACHIN, S. J. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 287-303, 2015.

PARK, S. H.; KIM, S. Y.; LEE, W.; CHUN, S.; MIN, W. K. New decision criteria for selecting delta check methods based on the ratio of the delta difference to the width of the reference range can be generally applicable for each clinical chemistry test item. **Annals of Laboratory Medicine**, Seoul, v. 32, n. 5, p. 345-354, 2012.

PETERSON, P.; BLOMBERG, D. J.; RABINOVITCH, A.; CORNBLEET, P. J. Physician review of the peripheral blood smear: when and why. An opinion. **Laboratory Hematology**, Charlottesville, v. 7, n. 4, p. 175-179, 2001.

PETERSON, P.; MCNEILL, S.; GULATI, G. Celular morphologic analysis of peripheral blood. In: KOTTKE-MARCHANT, K.; DAVIS, B. H. (Ed.). **Laboratory hematology practice**. Singapore: Wiley-Blackwell, 2012. p. 10-25.

PETERSON, P. Standard criteria for smear review. **Laboratory Medicine**, Chicago, v. 33, n. 9, p. 671, 2002.

PIERRE, R. V. Peripheral blood film review: The demise of the eyecount leukocyte differential. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 279-297, 2002a.

PIERRE, R. V. Red cell morphology and the peripheral blood film. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 25-61, 2002b.

PRATUMVINIT, B.; WONGKRAJANG, P.; REESUKUMAL, K.; KLINBUA, C.; NIAMJOY, P. Validation and optimization of criteria for manual smear review following automated blood cell analysis in a large university hospital. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 137, n. 3, p. 408-14, 2013.

RIMINGTON, C. Haemoglobinometry. **British Medical Journal**, London, v. 1, n. 4231, p. 177-178, 1942.

ROMANOWSKY, D. L. Zur frage der parasitology und therapie der malaria. **St Petersburg Med Wochenschr**, v. 16, p. 297-302, 1891.

ROPER, P. R.; JOHNSTON, D.; AUSTIN, J.; AGARWAL, S. S.; DREWINKO, B. Profiles of platelet volume distributions in normal individuals and in patients with acute leukemia. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 68, n. 4, p. 449-457, 1977.

ROWAN, R. M.; ENGLAND, J. M. **Automation and quality assurance in haematology**. London: Blackwell Scientific, 1986.

RÜEMKE, C. L. Imprecision of ratio-derived differential leukocyte counts. **Blood Cells**, New York, v. 11, n. 2, p. 311-314, 1985.

RÜEMKE, C. L. Laboratory aids. Variability of results in differential cell counts on blood smears. **Triangle**; The Sandoz Journal of Medical Science, Basel, v. 4, p. 154-158, 1960.

RUZICKA, K.; VEITL, M.; THALHAMMER-SCHERRER, R.; SCHWARZINGER, I. The new hematology analyser Sysmex XE-2100: Performance evaluation of a novel white blood cell differential technology. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 125, n. 3, p. 391-396, 2001.

SALVAGNO, G. L.; SANCHIS-GOMAR, F.; PICANZA, A.; LIPPI, G. Red blood cell distribution width: a simple parameter with multiple clinical applications. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, Boca Raton, v. 23, p. 1-20, 2014.

SEVILLA, J. B.; CORRONS, J. L. V. Herramientas informáticas en el laboratorio de hematología. **Haematologica / edición española**, Barcelona, v. 94 (Extra 1), p. 126-146, 2009.

SIEBERS, R. W.; WAKEM, P. J.; CARTER, J. M. Long-term intra-individual variation of platelet parameters. **Medical Laboratory Sciences**, London, v. 46, n. 1, p. 77-78, 1989.

SILL, H.; NEUBAUER, M. Comment on: diagnosis from the blood smear. **The New England Journal of Medicine**, Royston, v. 353, n. 17, p. 1862, 2005.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y.; ALVES, H. B. **Hematologia laboratorial**. Rio de Janeiro: Revinter, 2009.

SIRECI, A.; SCHLABERG, R.; KRATZ, A. A method for optimizing and validating institution-specific flagging criteria for automated cell counters. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 134, n. 10, p. 1528-1533, 2010.

STAMMINGER, G.; AUCH, D.; DIEM, H.; SINHA, P. Performance of the XE-2100 leukocyte differential. **Clinical and Laboratory Haematology**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 271-280, 2002.

SULLIVAN, E. Hematology analyzer: from workhorse to thoroughbred. **Laboratory Medicine**, Chicago, v. 37, n. 5, p. 273-278, 2006.

SUN, S.; WENG, Y.; LI, G. Establishment and evaluation the review criteria for Sysmex KX21 blood cell analyzer. **International Journal of Laboratory Medicine**, Beijing, v. 31, n. 5, p. 436-437, 2010.

SYSMEX CORPORATION. **Instruções de utilização**. Analisador automático de hematologia XE-2100D. Kobe, Japan: 2003.

SYSMEX CORPORATION. **Instructions for use**. Automated hematology analyzer XT-2000i/ XT-1800i. North American edition. Kobe, Japan: 2006.

SYSMEX CORPORATION. **Operator's Manual**. Automated Hematology Analyzer XE-2100L/XE-2100D. Main Unit. North American edition. Kobe, Japan: 2011.

TATSUMI, N.; TSUDA, I.; FUROTA, A.; TAKUBO, T.; HAYASHI, M.; MATSUMOTO, H. Principle of blood cell counter – development of electrical impedance method. **Sysmex Journal International**, Kobe, v. 9, n. 1, p. 8-20, 1999.

TKACHUK, D. C.; HIRSCHMANN, J. V. Approach to the microscopic evaluation of blood and bone marrow. In: TKACHUK, D. C.; HIRSCHMANN, J. V. (Ed.). **Wintrobe's atlas of clinical hematology**. Marceline, Missouri: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 275-328.

TONG, M.; SETH, P.; PENINGTON, D. G. Proplatelets and stress platelets. **Blood**, New York, v. 69, n. 2, p. 522-528, 1987.

TSENG, V.; MORGAN, A. S.; LEITH, C. P.; YANG, D. T. Efficient assessment of peripheral blood lymphocytosis in adults: developing new thresholds for blood smear review by pathologists. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 52, n. 12, p. 1763-1770, 2014.

VAN DER LELIE, J.; VON DEM BORNE, A. K. Platelet volume analysis for differential diagnosis of thrombocytosis. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 39, n. 2, p. 129-133, 1986.

VAN DER MEER, W.; VAN GELDER W.; DE KEIJZER, R.; WILLEMS, H. Does the band cell survive de 21st century? **European Journal of Haematology**, Copenhagen, v. 76, n. 3, p. 251-254, 2006.

VIERORDT, K. V. Zählungen der blutkörperchen des menschen. **Archiv Für Physiologische Heilkunde**, Stuttgart, v. 11, p. 327-332, 1852.

VINHOLT, P. J.; HVAS, A. M.; NYBO, M. An overview of platelet indices and methods for evaluating platelet function in thrombocytopenic patients. **European Journal of Haematology**, Copenhagen, v. 92, n. 5, p. 367-376, 2014.

XING, Y.; WANG, J. Z.; PU, C. W.; SHANG, K.; YAN, Z. L.; BAI, W. S.; LI, T.; ZHANG, S. M. Establishment and evaluation of review criteria for ADVIA 120/2120 and different series of hematology analyzers. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, Beijing, v. 90, n. 22, p. 1526-1530, 2010.

YAMAMURA, R.; YAMANE, T.; HINO, M.; OHTA, K.; KOH, K.; TSUDA, I.; TAKUBO, T.; TATSUMI, N. Automated bone marrow analysis using the CD4000 automated haematology analyser. **Journal of Automated Methods & Management in Chemistry**, New York, v. 22, n. 3, p. 89-92, 2000.

YOU DEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, New York, v. 3, n. 1, p. 32-35, 1950.

WALTER, J. G.; GARRITY, P. RDW-SD and RDW-CV: their relationship to RBC distribution curves and anisocytosis. **Sysmex Journal International**, Kobe, v. 3, n. 1, p. 40-45, 1993.

WARD, M. J.; FERTEL, B. S.; BONOMO, J. B.; SMITH, C. L.; HART, K. W.; LINDSELL, C. J.; WRIGHT, S. W. The degree of bandemia in septic ED patients does not predict inpatient mortality. **The American Journal of Emergency Medicine**, Philadelphia, v. 30, n. 1, p. 181-183, 2012.

WARD, P. C. The CBC at the Turn of the Millennium: an Overview. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 46, n. 8p2, p. 1215-1220, 2000.

WENZ, B.; GENNIS, P.; CANOVA, C.; BURNS, E. R. The clinical utility of the leukocyte differential in emergency medicine. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 86, n. 3, p. 298-303, 1986.

WINTROBE, M. M. A simple and accurate hematocrit. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, v. 15, p. 287-289, 1929a.

WINTROBE, M. M. Classification of the anemias on the basis of differences in the size and hemoglobin content of the red corpuscles. **Proceedings of the Society of Experimental Biological Medicine**, v. 27, p. 1071-1072, 1930.

WINTROBE, M. M. The volume and hemoglobin content of the red blood corpuscle: simple method of calculation, normal findings, and value of such calculations in the anemias. **American Journal of Medical Sciences**, v. 177, p. 513-523, 1929b.

WOO, H. Y.; SHIN, S. Y.; PARK, H.; KIM, Y. J.; KIM, H. J.; LEE, Y. K.; CHAE, S. L.; CHANG, Y. H.; CHOI, J. R.; HAN, K.; CHO, S. R.; KWON, K. C. Current status and proposal of a guideline for manual slide review of automated complete blood cell count and white blood cell differential. **The Korean Journal of Laboratory Medicine**, Seoul, v. 30, n. 6, p. 559-566, 2010.

WORONZOFF-DASHKOFF, K. K. The Wright-Giemsa stain: secrets revealed. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 15-23, 2002.

WU, W.; GUO, Y.; ZHANG, L.; CUI, W.; LI, W.; ZHANG, S. Clinical utility of automated platelet clump count in the screening for ethylene diamine tetraacetic acid-dependent pseudothrombocytopenia. **Chinese Medical Journal**, Beijing, v. 124, n. 20, p. 3353-3357, 2011.



## **ANEXOS**

### **ANEXO 1 - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE)**

Curitiba, 02 de agosto de 2010.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Samuel Ricardo Comar**  
Neste

Prezado Pesquisador:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado: "DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE CRITÉRIOS PARA REVISÃO E LIBERAÇÃO DOS HEMOGRAMAS REALIZADOS NO LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ" foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 27 de julho de 2010. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

**CAAE: 0194.0.208.000-10**  
**Registro CEP: 2286.180/2010-07**

Conforme a Resolução 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 primeiro relatório: 02 de fevereiro de 2011.

Atenciosamente,



**Renato Tambara Filho**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

## **APÊNDICES**

**APÊNDICE 1 – Instrução de Trabalho ITR – UAD – HEM 005 – Padronização da leitura de lâminas de hemograma**

**INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**ITR - UAD - HEM – Nº 005**

**Página 137**

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA

**ELABORADO POR**

Samuel Ricardo Comar

**DATA**

14/10/2008

**APROVADO POR**

**DATA**

**RESPONSÁVEL PELA EXECUÇÃO DA INSTRUÇÃO**

Farmacêuticos bioquímicos da Seção de Hematologia.

REVISÕES	DATA	RESPONSÁVEL
1ª REVISÃO	10/11/2009	Samuel Ricardo Comar
2ª REVISÃO	15/10/2011	Samuel Ricardo Comar
3ª REVISÃO	27/10/2013	Samuel Ricardo Comar
4ª REVISÃO		

**REGISTRO DE PÁGINAS QUE FORAM ALTERADAS E SUBSTITUÍDAS**

1ª REVISÃO	
2ª REVISÃO	
3ª REVISÃO	
4ª REVISÃO	

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA

**Objetivo da Instrução de Trabalho**

Padronizar a leitura de lâminas de hemograma pelos farmacêuticos bioquímicos da Seção de Hematologia.

**1. METODOLOGIA:**

Determinação de critérios consensuais entre os farmacêuticos bioquímicos da Seção de Hematologia para a leitura de lâminas de hemograma. Esses critérios foram estabelecidos com base na experiência dos profissionais que trabalham no laboratório.

**2. PRINCÍPIO:**

Apesar dos avanços na tecnologia aplicada ao diagnóstico em hematologia, a avaliação de extensões sanguíneas do sangue periférico ainda permanece de forma manual e as terminologias usadas pelos farmacêuticos bioquímicos é raramente estudada e padronizada pelas equipes laboratoriais. Sugere-se, através deste procedimento, uma uniformização da utilização de termos quantitativos e qualitativos usados no hemograma para as diversas alterações que podem ser observadas na microscopia a fim de padronizar e melhorar a comunicação entre os profissionais do laboratório de hematologia da UAD-HC-UFPR e destes com a equipe médica.

**3. PROCEDIMENTO TÉCNICO:**

**3.1 Série vermelha**

**3.1.1 Anisocitose, microcitose e macrocitose**

A classificação microscópica da variação dos tamanhos dos eritrócitos é geralmente realizada em termos semiquantitativos como leve, moderada ou acentuada,

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

ou como de 1+ a 3+. Quando realizada apropriadamente, de forma consistente e sistemática, contribui para se chegar ao correto diagnóstico, pelo menos em alguns casos. Uma anisocitose significativa pode ser observada em várias condições clínicas, incluindo situações com intensa produção de reticulócitos, anemia megaloblástica, transfusões e anemia ferropriva grave. A avaliação microscópica da anisocitose pode ser afetada pelas limitações visuais do olho humano, como descrito pela lei de Weber-Fechner e pela possível ocorrência de diferentes concentrações de hemoglobina nos eritrócitos, as quais alteram o efeito de achatamento destas células no vidro das lâminas (WALTERS; GARRITY, 1993).

A variação do tamanho eritrocitário pode ser estimada quantitativamente com o uso do *Red Cell Distribution Width* (RDW) e pode ser graduada através da análise da série vermelha. O grau de variação da anisocitose pode ser determinado conforme TABELA 1.

TABELA 1 - GRAU DE VARIAÇÃO DA ANISOCITOSE EM FUNÇÃO DO RDW

<b>RDW-CV (%)</b>	<b>Quantificação</b>	<b>RDW-SD (fl)</b>	<b>Quantificação</b>
15,5 – 19,0	+	47 – 62	+
19,1 – 24,0	++	62,1 – 75	++
>24,0	+++	>75	+++

Alguns trabalhos sugerem que o RDW-CV é mais sensível em indicar anisocitose em VCM microcíticos e o RDW-SD é mais sensível em indicar anisocitose em VCM macrocíticos. Portanto, deve-se utilizá-los em conjunto a fim de aumentar a sensibilidade na detecção da anisocitose em lâmina. (COMAR; CAPORAL, 2013; WALTER; GARRITY, 1993). Para avaliar o tamanho eritrocitário e defini-lo como normocítico, microcítico ou macrocítico, primeiramente deve-se localizar um linfócito maduro, normal e não atípico, para fins de comparação e análise do esfregaço. Hemácias normais possuem entre 6 e 8

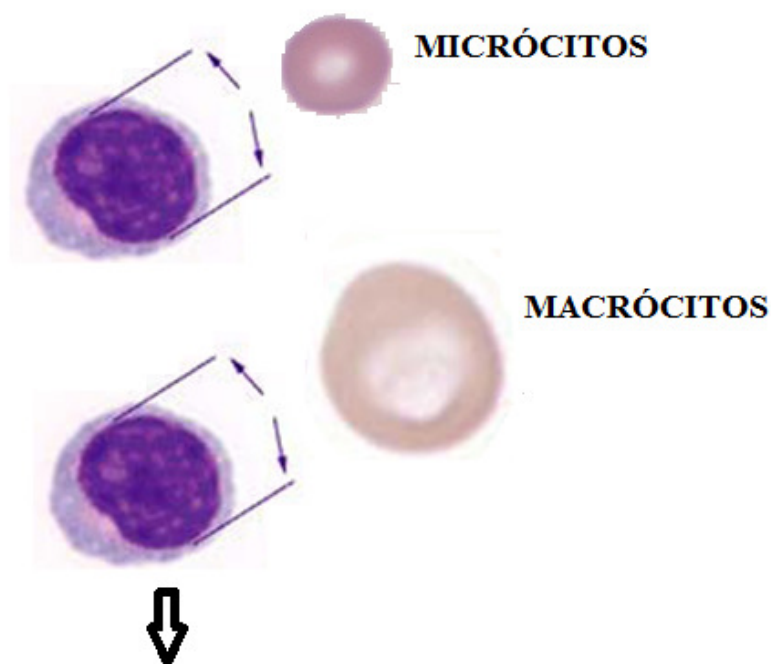
**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

micrômetros de diâmetro ou aproximadamente o mesmo tamanho que o núcleo de um linfócito normal. Portanto, os micrócitos são menores que o núcleo de um linfócito pequeno e os macrócitos são maiores (FIGURA 1), sendo estes mais evidentes quando possuem volumes superiores a 110 fl. Esse tipo de observação é muito importante no sentido de se fazer um controle de qualidade do VCM medido pelo analisador hematológico e deve ser sempre realizada nos casos em que ocorrer um VCM muito baixo ou muito alto.



**Para identificar microcitose e macrocitose,  
compara-se o tamanho dos eritrócitos com o  
tamanho do núcleo de um linfócito pequeno**

FIGURA 1 - MICROCITOSE E MACROCITOSE

Deve ser revisado um mínimo de 10 campos microscópicos empregando-se objetiva de 100x em óleo de imersão. Contam-se os eritrócitos com diâmetro menor

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

(micrócitos) e maior (macrócitos) que o do núcleo dos linfócitos pequenos em 10 campos microscópicos de 1000x e com distribuição uniforme dos eritrócitos. Em seguida, calcula-se a quantidade média de micrócitos e macrócitos por campo. Estes valores são somados e a anisocitose é quantificada. A TABELA 2 mostra como quantificar anisocitose, microcitose e macrocitose.

TABELA 2 - CRITÉRIOS DE QUANTIFICAÇÃO DA ANISOCITOSE, MICROCITOSE E MACROCITOSE ERITROCITÁRIA EM EXTENSÕES SANGUÍNEAS

	QUANTIFICAÇÃO		
	1+	2+	3+
<b>MICROCITOSE</b>	<b>5-25% de micrócitos</b>	<b>25,1-50% de micrócitos</b>	<b>&gt;50% de micrócitos</b>
<b>MACROCITOSE</b>	<b>5-25% de macrócitos</b>	<b>25,1-50% de macrócitos</b>	<b>&gt;50% de macrócitos</b>
<b>ANISOCITOSE</b>	<b>5-25% de micrócitos + macrócitos</b>	<b>25,1-50% de micrócitos + macrócitos</b>	<b>&gt;50% de micrócitos + macrócitos</b>
200 eritrócitos por campo	10 a 50 células	51 a 100 células	>100 células
150 eritrócitos por campo	8 a 37 células	39 a 75 células	>75 células
100 eritrócitos por campo	5 a 25 células	26 a 50 células	>50 células

FONTE: Adaptado de GULATI (2009); O'CONNOR (1984)

NOTA: 1+ = uma cruz (+); 2+ = duas cruzes (++); 3+ = três cruzes (+++)

A microcitose e a macrocitose também pode ser graduada empregando-se a TABELA 3. Esta tabela, de um modo geral, abrange a maioria dos casos e torna a tarefa mais fácil de ser realizada e padronizada pela equipe do laboratório, porém, cada caso deve ser analisado isoladamente, pois podem ocorrer variações. Por exemplo, nos casos que ocorrer RDW elevado com VCM normal, deve-se caracterizar a presença de micrócitos e/ou macrócitos a fim de justificar a variação de tamanho. Neste caso, a anisocitose é geralmente maior que a microcitose e a macrocitose isoladamente, pois corresponde ao somatório das duas.



**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

TABELA 3 - VARIACÃO DO TAMANHO ERITROCITÁRIO EM FUNÇÃO DO VCM

	Microcitose em cruces			VCM (fl)	Macrocitose em cruces		
	+++	++	+		+	++	+++
<b>01 dia</b>	<60	60-69,9	70-90	101-128	130-140	140,1-145	>145
<b>02 dias</b>	<60	60-69,9	70-90	101-122	125-130	130,1-140	>140
<b>03 dias</b>	<60	60-69,9	70-90	95-121	125-130	130,1-140	>140
<b>04 dias</b>	<60	60-69,9	70-90	95-121	125-130	130,1-140	>140
<b>05 dias</b>	<60	60-69,9	70-90	95-123	125-130	130,1-140	>140
<b>06 dias</b>	<60	60-69,9	70-90	96-123	125-130	130,1-140	>140
<b>07 dias</b>	<60	60-69,9	70-90	96-129	132-140	140,1-145	>145
<b>1 a 2 semanas</b>	<60	60-69,9	70-85	90-131	132-140	140,1-145	>145
<b>2 a 3 semanas</b>	<60	60-69,9	70-85	90-119	120-130	130,1-140	>140
<b>1 mês</b>	<60	60-69,9	70-79,9	85-119	115-125	125,1-135	>135
<b>2 a 6 meses</b>	<60	60-69,9	70-73,9	74-108	110-120	120,1-130	>130
<b>7 meses a 2 anos</b>	<60	60-64,9	65-69,9	70-90	95-105	105,1-120	>120
<b>2 a 6 anos</b>	<60	60-69,9	70-74,9	75-90	95-105	105,1-120	>120
<b>6 a 12 anos</b>	<60	60-69,9	70-76,9	77-95	99-105	105,1-120	>120
<b>♂ 12 a 18 anos (mas.)</b>	<60	60-69,9	70-79,9	80-99	100-110	110,1-125	>125
<b>♀ 12 a 18 anos (fem.)</b>	<60	60-69,9	70-79,9	80-99	100-110	110,1-125	>125
<b>♂ 18 ou mais (mas.)</b>	<60	60-69,9	70-79,9	80-99	100-110	110,1-129,9	>130
<b>♀ 18 ou mais (fem.)</b>	<60	60-69,9	70-79,9	80-99	100-110	110 1-129,9	>130
<b>Gestante 1<sup>o</sup> trim.</b>	<60	60-69,9	70-79,9	80-99	100-110	110,1-125	>125
<b>Gestante 2<sup>o</sup> trim.</b>	<60	60-69,9	70-79,9	80-99	100-110	110,1-125	>125
<b>Gestante 3<sup>o</sup> trim.</b>	<60	60-69,9	70-79,9	80-99	100-110	110,1-125	>125

A verificação do histograma de distribuição de RBC é muito importante, sobretudo nos casos com presença de dupla população, pois o gráfico pode mostrar a presença de dois picos de populações de eritrócitos.

O termo microcitose corresponde à quantidade e à intensidade de micrócitos na extensão sanguínea, ou seja, à quantidade de eritrócitos pequenos e à magnitude de sua pequenez. Ele é traduzido matematicamente pelo VCM, que expressa sua média. Já o termo macrocitose, inversamente, corresponde à quantidade e à intensidade de macrócitos na extensão sanguínea, ou seja, à quantidade de eritrócitos grandes e à

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

intensidade de seus grandes tamanhos. Igualmente, é traduzido matematicamente pelo VCM, que expressa sua média.

**3.1.2 Poiquilocitose**

Eritrócitos normais são redondos e possuem uma área de palidez central que ocupa um terço da célula. Poiquilocitose é o termo usado para descrever a variação na forma dos eritrócitos. Está geralmente associada com anemias graves com regeneração eritrocitária ativa ou hematopoiese extramedular. Muitos poiquilócitos possuem seus nomes baseados em suas características morfológicas individuais. Outros não possuem nomes em virtude da falta de características específicas e por isso são chamados apenas de poiquilócitos. A forma dos eritrócitos deve analisada em um mínimo de 10 campos contendo entre 100 e 200 células, usando a objetiva de 100x. Cada forma eritrocitária anormal deve ser avaliada individualmente. A média por campo microscópico de cada alteração de forma eritrocitária em particular deve ser determinada e o grau de cada alteração de forma em particular é definido conforme TABELA 4.

TABELA 4 - QUANTIFICAÇÃO DAS FORMAS ERITROCITÁRIAS

FORMA ERITROCITÁRIA	QUANTIFICAÇÃO: MÉDIA DE ALTERAÇÕES /10 CAMPOS DE 1000X			
	Raros	1+	2+	3+
Acantócitos	1	2 – 6	7 – 12	>12
Codócitos	1	2 – 6	7 – 12	>12
Dacriócitos	1	2 – 6	7 – 12	>12
Drepanócitos	1	2 – 6	7 – 12	>12
Eliptócitos/Ovalócitos	1	2 – 6	7 – 12	>12
Equinócitos	1	2 – 6	7 – 12	>12
Esferócitos	1	2 – 6	7 – 12	>12
Fragmentos eritrocitários	1	2 – 6	7 – 12	>12
Estomatócitos	1	2 – 6	7 – 12	>12
Queratócitos	1	2 – 6	7 – 12	>12
Cristais de hemoglobina C e SC	1	2 – 6	7 – 12	>12

A intensidade da poiquilocitose deve ser liberada pela soma de cada alteração de forma eritrocitária encontrada por campo de 1000x conforme TABELA 5.

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**



**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

TABELA 5 - QUANTIFICAÇÃO DA POIQUILOCITOSE

POIQUILOCITOS / CAMPO DE 1000x (100-200 CÉLULAS)	QUANTIFICAÇÃO DA POIQUILOCITOSE
1	Discreta
2 – 6	+
7 – 12	++
>12	+++

Por exemplo, codócitos (média de 3/campo = 1+), esferócitos (média de 3/campo = 1+), eliptócitos (média de 10/campo = 2+), resulta em uma poiquilocitose de (somadas médias = 16/campo = 3+). A TABELA 6 mostra os principais tipos de formas eritrocitárias e as condições clínicas associadas.

TABELA 6 - PRINCIPAIS FORMAS ERITROCITÁRIAS OBSERVADAS ROTINEIRAMENTE E CONDIÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS

FORMA ANORMAL	CONDIÇÃO CLÍNICA ASSOCIADA
<p>Acantócitos</p> 	<p>Acantocitose hereditária, doença hepática, hipoesplenismo, pós-esplenectomia, queimaduras graves, abetalipoproteinemia, anemias hemolíticas, doença renal e deficiências enzimáticas</p>
<p>Codócitos</p> 	<p>Codócitos microcíticos: talassemias, deficiência de ferro, presença de hemoglobina C e E. Codócitos normocíticos: anemia falciforme, Hemoglobinopatia SC, doença hepática, hipoesplenismo e pós-esplenectomia. Codócitos macrocíticos: doença hepática e pós-esplenectomia. Codócitos artefatuais: excesso de umidade na extensão e</p>









**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**




		excesso de EDTA
Dacriócitos		Mielofibrose, mielodisplasias, anemias hemolíticas adquiridas, anemia megaloblástica, talassemias, hiperesplenismo, infiltração medular de tumores hematológicos e não hematológicos.
Drepanócitos		Anemia falciforme e associações com talassemias e hemoglobinopatias
Eliptócitos/Ovalócitos		Eliptocitose hereditária, anemia megaloblástica, anemia de doença crônica, deficiência de ferro, mielodisplasias, trauma mecânico. Pode ocorrer artefactualmente
Equinócitos		Doença renal e hepática. Artefato de preparo da extensão (pH alcalino do vidro), excesso de EDTA e amostras envelhecidas (>12 horas). Como sua presença ocorre muito devido a artefato, a sua interpretação deve ser baseada no contexto clínico do paciente
Esferócitos		Esferocitose hereditária, anemia hemolítica autoimune e microangiopática, incompatibilidade ABO, hiperesplenismo, queimaduras graves, hemoglobinopatias, transfusão com eritrócitos velhos, malária, doença hepática. Pode se artefato da região mais fina da extensão
Esquistócitos ou esquizócitos ou fragmentos eritrocitários		Púrpura trombocitopênica trombótica, síndrome hemolítico urêmica, coagulação intravascular disseminada, queimaduras graves, traumas mecânicos, talassemia maior, anemia

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

		megaloblástica, síndrome HELLP, vasculite, pós-quimioterapia e anemias hemolíticas
Estomatócitos		Estomatocitose hereditária, alcoolismo, infecções graves. Artefato por exposição dos eritrócitos a pH ácido, substâncias catiônicas e drogas (fenotiazina e clorpromazina)
Queratócitos		Estresse oxidativo <i>in vivo</i> por uso certas drogas, deficiência de G6PD e presença de hemoglobinas instáveis (corpos de Heinz)
Cristais de hemoglobina C e SC		Hemoglobinopatias C e SC

FONTE: Adaptado de GULATI (2009); O'CONNOR (1984); PIERRE (2002b); SILVA *et al.* (2009).

**3.1.3 Policromatofilia**

Os eritrócitos policromáticos do hemograma correspondem aos reticulócitos corados pelo azul de cresil brilhante. Quanto mais imaturos forem os reticulócitos, mais intensa e de fácil distinção será sua tonalidade azul-acinzentada na lâmina (Figura 2).

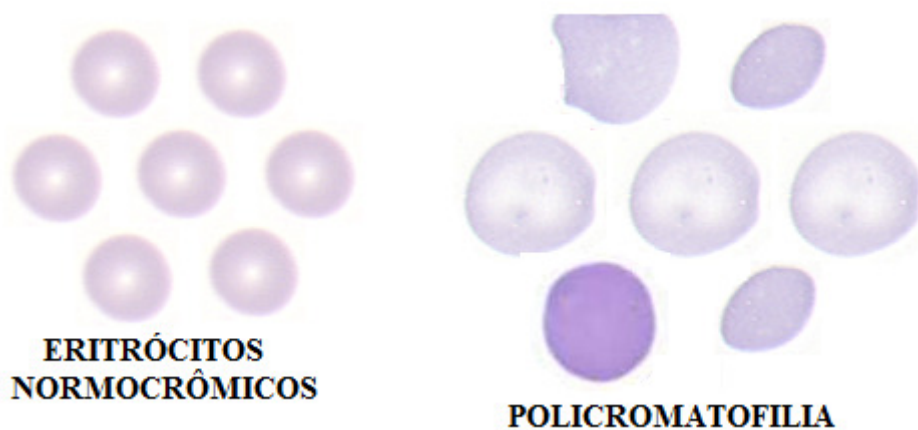


FIGURA 2 - POLICROMATOFILIA

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

Os reticulócitos quase maduros, com poucos grânulos de RNA, possuem aspecto policromático de difícil identificação e, às vezes, não são visíveis ao olho humano. Por isso, a contagem de reticulócitos é mais exata que a policromatofilia em lâmina. Aproximadamente 1% dos eritrócitos do sangue de uma pessoa normal são policromatófilos. A policromatofilia está associada com anemias hemolíticas, regeneração medular e resposta ao tratamento de anemias carenciais. A policromatofilia pode ser quantificada nas lâminas conforme TABELA 7.

TABELA 7 - QUANTIFICAÇÃO DA POLICROMATOFILIA

<b>POLICROMATÓFILOS / CAMPO DE 1000x (100-200 CÉLULAS)</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO</b>	<b>RETICULÓCIOS (%)</b>
1	Discreta	± 2,5 -3,0
2 – 6	+	± 3,0 – 6,0
7 – 12	++	± 6 – 11,0
>12	+++	± >11,0

**3.1.4 Hipocromia**

A hipocromia é definida morfológicamente quando os eritrócitos possuem halo central maior que 1/3 do seu volume (FIGURA 3). É traduzida físico-quimicamente pela concentração (relação soluto : solvente em g/dl) de hemoglobina intraeritrocitária, ou seja, pela CHCM e não simplesmente pelo seu conteúdo (valor absoluto do peso do soluto em picogramas) de hemoglobina, a HCM. A HCM reflete a concentração de hemoglobina de cada eritrócito, por isso, podemos dizer que um eritrócito de tamanho pequeno tem menos hemoglobina que um eritrócito grande, mas não quer dizer que ele seja hipocrômico por esta razão, pois a quantidade de hemoglobina em seu interior é proporcional ao seu tamanho.

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

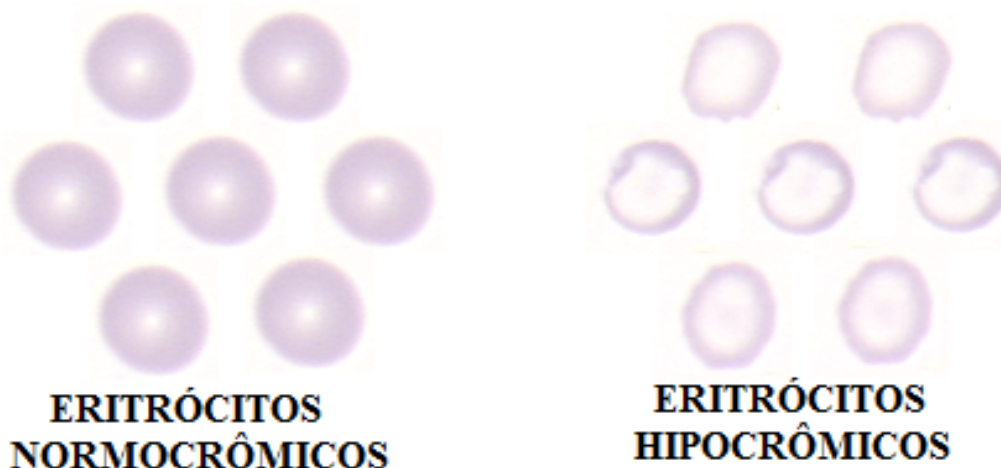


FIGURA 3 - ERITRÓCITOS NORMOCRÔMICOS E HIPOCRÔMICOS

A hipocromia pode ser quantificada conforme TABELA 8 e TABELA 9. Um mínimo de 10 campos microscópicos empregando-se objetiva de 100x em óleo de imersão deve ser revisado e os eritrócitos com coloração pálida e com halo central mais largo devem ser enumerados. Calcula-se o número médio de cada classificação por campo microscópico e reporta-se da seguinte maneira:

TABELA 8 – GRAU DE VARIAÇÃO HIPOCROMIA

QUANTIFICAÇÃO DA HIPOCROMIA	1+	2+	3+
CONDIÇÃO	5-25% de eritrócitos hipocrômicos	25,1-50% de eritrócitos hipocrômicos	>50% de eritrócitos hipocrômicos
200 eritrócitos por campo	10 a 50 células	51 a 100 células	>100 células
150 eritrócitos por campo	8 a 37 células	39 a 75 células	>75 células
100 eritrócitos por campo	5 a 25 células	26 a 50 células	>50 células



**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

**TABELA 9 – GRAU DE VARIAÇÃO DA HIPOCROMIA EM FUNÇÃO DO CHCM**

Idade	Hipocromia em cruces			CHCM (g/dl)
	+++	++	+	
01 dia	<28	28 -29	29-29,9	30-36
02 dias	<28	28 -29	29-29,9	30-36
03 dias	<28	28 -29	29-29,9	30-36
04 dias	<28	28 -29	29-29,9	30-36
05 dias	<28	28 -29	29-29,9	30-36
06 dias	<28	28 -29	29-29,9	30-36
07 dias	<28	28 -29	29-29,9	30-36
1 a 2 semanas	<28	28 -29	29-29,9	30-36
2 a 3 semanas	<28	28 -29	29-29,9	30-36
1 mês	<27	27,1-27,9	28-28,9	29-36
2 a 6 meses	<28	28 -29	29-29,9	30-36
7 meses a 2 anos	<28	28,1-29,4	29,5-30,9	31-36
2 a 6 anos	<28	28,1-29,4	29,5-30,9	31-36
6 a 12 anos	<28	28,1-29,4	29,5-30,9	31-36
♂ 12 a 18 anos (mas.)	<28	28,1-29,9	30-31,5	32-36
♀ 12 a 18 anos (fem.)	<28	28,1-29,9	30-31,5	32-36
♂ 18 ou mais (mas.)	<28	28,1-29,9	30-31,5	32,5-36
♀ 18 ou mais (fem.)	<28	28,1-29,9	30-31,5	32,2-36
Gestante 1º trim.	<28	28,1-29,9	30-31,5	32-36
Gestante 2º trim.	<28	28,1-29,9	30-31,5	32-36
Gestante 3º trim.	<28	28,1-29,9	30-31,5	32-36

**3.1.5 Inclusões eritrocitárias**

As inclusões eritrocitárias como ponteados basófilos, corpúsculos de Howell-Jolly, anéis de Cabot, corpúsculos de Pappenheimer (FIGURA 4) podem ser quantificadas conforme TABELA 10.



**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

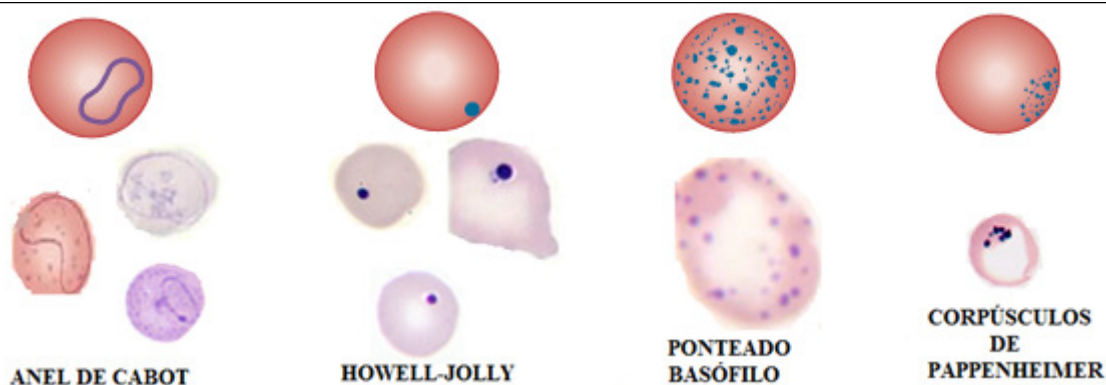


FIGURA 4 - INCLUSÕES ERITROCITÁRIAS

Os ponteados basófilos são formados por agregados ribossomais, na forma de partículas finas ou grossas, que preenchem quase todo o eritrócito. Estão associados à talassemias, hemoglobinopatias, envenenamento por chumbo, deficiência de pirimidina 5'nucleotidase e síndromes mielodisplásicas. Contudo, alguns autores têm relatado que os ponteados basófilos finos são apenas artefatos de coloração e que apenas os ponteados grosseiros têm importância clínica.

Os corpúsculos de Howell-Jolly são formados por fragmentos nucleares (restos de DNA) e aparecem como pequenos corpúsculos arredondados, de tamanho variável e de cor púrpura dentro dos eritrócitos. Estão associados à hipoesplenismo, pós esplenectomia, anemia falciforme, talassemia maior, anemia hemolítica grave, anemia megaloblástica e diseritropoiese congênita.

Os anéis de Cabot foram primeiramente descritos em 1903 pelo médico americano Richard Clarke Cabot como finos cordões na forma de laços ou anéis no interior dos eritrócitos. Acredita-se que sejam microtúbulos remanescentes do fuso mitótico. Estão associados à anemia megaloblástica, anemia hemolítica, envenenamento por chumbo, leucemias, icterícia alcoólica e também têm sido observados em pacientes que fazem uso de citostáticos.

Os corpúsculos de Pappenheimer são grânulos anormais de ferro dentro dos

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

eritrócitos. São formados por fagossomos que englobam quantidades excessivas de ferro. Aparecem como densos grânulos localizados na periferia dos eritrócitos. Estão associados à anemia sideroblástica e anemias hemolíticas de um modo geral. São visíveis nas colorações derivadas de Romanowsky, contudo a confirmação da existência de ferro nos grânulos é feita com a coloração de Pearls que utiliza azul da Prússia.

TABELA 10 – QUANTIFICAÇÃO DAS INCLUSÕES ERITROCITÁRIAS

<b>PONTEADOS BASÓFILOS</b> <b>CORPÚSCULO DE HOWELL-JOLY</b> <b>ANEL DE CABOT</b> <b>CORPÚSCULOS DE PAPPENHEIMER</b> <b>Valor médio por campo de 1000x em imersão</b>	
1 a cada 2 campos ou 1 / campo	Raros
1 – 3 por campo	+
4 - 6	++
>6	+++

**3.1.6 Rouleaux eritrocitário e aglutinação eritrocitária**

O *rouleaux* eritrocitário e a aglutinação eritrocitária podem ser quantificados conforme TABELA 11. O *rouleaux* é definido como o empilhamento de eritrócitos na forma de pilhas de moedas na parte fina da extensão. Ocorre como resultado da perda da carga negativa da superfície dos eritrócitos, os quais são revestidos com excesso de proteínas plasmáticas. Está associado com mieloma múltiplo e estados inflamatórios e infecciosos, ambos os quais podem estar associados com hiperproteinemia (globulinas e fibrinogênio).

A aglutinação eritrocitária é formada por agregados de eritrócitos resultantes da presença de um autoanticorpo frio, os quais podem atuar em quaisquer temperaturas abaixo de 37°C. O anticorpo é uma IgM e os agregados de eritrócitos geralmente se

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA

sobrepõem. As amostras contendo aglutinação eritrocitária precisam ser incubadas a 37°C durante 30 minutos previamente à reanálise de modo a se obter resultados mais confiáveis das contagens. Deve ser feita uma diferenciação entre aglutinação e *rouleaux* conforme FIGURA 5.

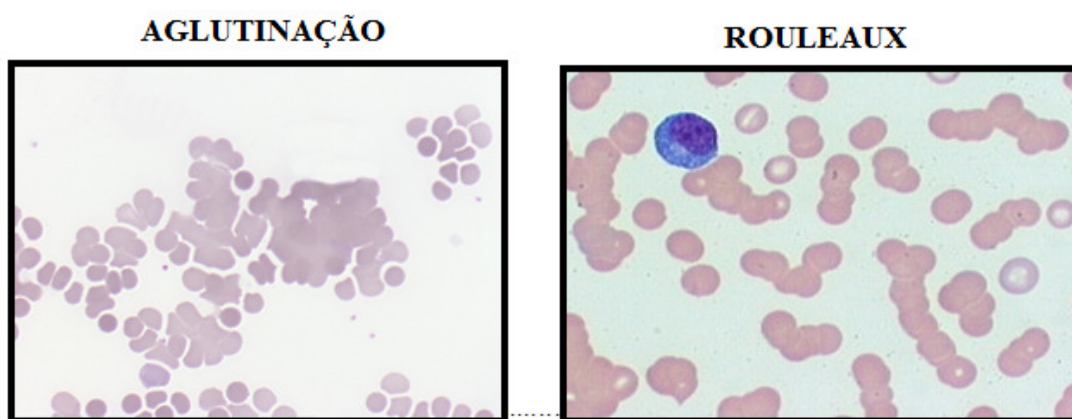


FIGURA 5 - DIFERENÇA ENTRE AGLUTINAÇÃO E *ROULEAUX* ERITROCITÁRIO

Em um campo microscópico com aumento de 1000x pode-se visualizar vários grupamentos de hemácias empilhadas ou aglutinadas. Para quantificar, deve-se observar a proporção de hemácias empilhadas ou aglutinadas por campo microscópico. Observar a cor da extensão pode ajudar, pois na maioria dos casos positivos para *rouleaux* eritrocitário ela possui tom azulado (FIGURA 6).

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

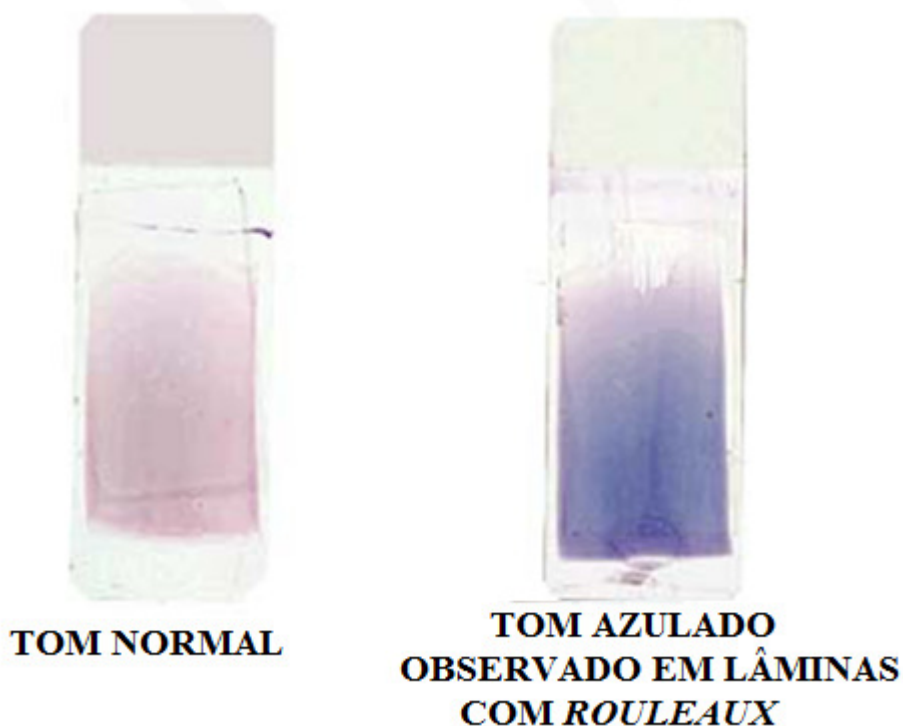


FIGURA 6 - DIFERENÇA DE TONALIDADE OBSERVADA NOS CASOS POSITIVOS PARA *ROULEAUX* ERITROCITÁRIO

Nos casos de aglutinação, pequenos grumos podem ser observados nas paredes do tubo de EDTA. Nos casos em que houver dúvidas quanto à presença de *rouleaux* eritrocitário na lâmina, pode-se fazer um VHS do paciente e caso o resultado seja alterado, confirma-se a formação de *rouleaux* na extensão.

TABELA 11 – QUANTIFICAÇÃO DE *ROULEAUX* E AGLUTINAÇÃO DOS ERITRÓCITOS

<b>% MÉDIA DE ERITRÓCITOS FORMANDO <i>ROULEAUX</i> OU AGLUTINAÇÃO POR CAMPO DE 1000x</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO</b>
10-25%	+
25-50%	++
Acima de 50%	+++

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

**3.2 Série branca**

**3.2.1 Granulações tóxicas, vacúolos citoplasmáticos e corpúsculos de Döhle**

A granulação tóxica representa a visualização das granulações primárias em metamielócitos e neutrófilos. Em situações fisiológicas estas células não possuem estas granulações reveladas. As granulações tóxicas aparecem em decorrência da abreviação da mitose no processo de proliferação dos neutrófilos, como observado nas septicemias. A septicemia é a designação para o conjunto de manifestações patológicas devidas a invasão, por via sanguínea, do organismo por germes patogênicos provenientes de um foco infeccioso.

Os vacúolos citoplasmáticos nos neutrófilos são observados em estados infecciosos e evidenciam fagocitose de bactérias na corrente sanguínea, ou seja, uma bacteremia, que é a passagem da bactéria pela circulação ou uma septicemia que é uma infecção sistêmica em que as bactérias colonizam o sangue.

Os corpúsculos de Döhle, que podem acompanhar as granulações tóxicas, são representados pelo retículo endoplasmático rugoso que fica alterado devido à grande proliferação celular. O aparecimento de granulações tóxicas e corpúsculos de Döhle podem ser correlacionados com infecções bacterianas severas. A quantificação de granulações tóxicas, vacuolização citoplasmática em neutrófilos e corpúsculos de Döhle podem ser realizadas com o auxílio da TABELA 12 e podem ser visualizados na FIGURA 7.

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

TABELA 12 – INCLUSÕES EM NEUTRÓFILOS

<b>GRANULAÇÕES TÓXICAS</b> <b>VACUOLIZAÇÃO CITOPLASMÁTICA</b> <b>CORPÚSCULOS DE DÖHLE</b> (Observar pelo menos 50 neutrófilos em campo de 1000x)	
Até 30 % de neutrófilos com granulações tóxicas	+
30 – 60 %	++
>60 %	+++



**CORPÚSCULO DE DOHLE**



**GRANULAÇÕES TÓXICAS**



**VACÚOLOS CITOPLASMÁTICOS**

FIGURA 7 - CORPÚSCULOS DE DÖHLE, GRANULAÇÕES TÓXICAS E VACÚOLOS CITOPLASMÁTICOS

**3.2.2 Anomalias hereditárias dos leucócitos**

A avaliação de inclusões leucocitárias é muito importante para se saber o tipo de alteração que o paciente apresenta. No caso da anomalia de Alder Reilly, liberar na observação do hemograma: presença de granulação azurrófila grosseira nos neutrófilos, sugestiva de anomalia de Alder Reilly.

No caso da anomalia de Pelger-Huët liberar na observação do hemograma: presença de neutrófilos hipossegmentados sugestivos de anomalia de Pelger-Huët.

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

No caso da anomalia de May Hegglin liberar na observação do hemograma: presença de neutrófilos com inclusões citoplasmáticas sugestivas de anomalia de May Hegglin.

No caso da anomalia de Chédiak-Higashi liberar na observação do hemograma: presença de granulócitos, monócitos, linfócitos e eosinófilos com grânulos grosseiros sugestivos de anomalia de Chédiak-Higashi.

### 3.2.3 Polilobócitos e hipossegmentação

O neutrófilo hiperssegmentado é por definição uma célula que apresenta 6 lóbulos ou mais e a sua quantidade passa a ser significativa quando se tem no sangue periférico  $\geq 5/100$  neutrófilos contados. O resultado é relatado em porcentagem, contudo tal contagem somente deverá ser realizada quando na avaliação da lâmina for constatado  $\geq 2+$ . Neste caso deve-se liberar em cruzes e em porcentagem na observação do hemograma. Os polilobócitos podem aparecer na anemia megaloblástica, no uso de corticoides, mielodisplasias, quimioterapia e muito raramente na anemia ferropriva e uremia.

A hipossegmentação indica a diminuição da segmentação ou a não segmentação do núcleo de granulócitos maduros. Pode ser vista primariamente em neutrófilos, mas pode também ser vista em eosinófilos e basófilos em determinadas situações. Neutrófilos bilobulados ou unilobulados são considerados hipossegmentados e estão associados à síndrome de Pelger-Huët ou pseudo Pelger-Huët. Esta última está associada com quimioterapia, doenças mieloproliferativas e mielodisplasias.

Os polilobócitos e os hipossegmentados podem ser quantificados com o auxílio da TABELA 13 e visualizados na FIGURA 8.



**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

TABELA 13 – QUANTIFICAÇÃO DE POLILOBÓCITOS E HIPOSEGMENTADOS

<b>POLILOBÓCITOS E HIPOSEGMENTADOS</b> (Observar pelo menos 50 neutrófilos em campo de 1000x)	
Até 30 % de polilobócitos ou hipossegmentados	+
30 – 50 %	++
>50 %	+++

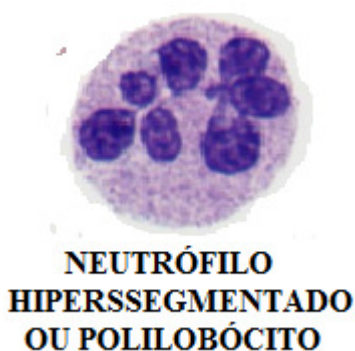


FIGURA 8 - NEUTRÓFILOS HIPERSSEGMENTADO E HIPOSEGMENTADO

**3.2.4 Granulócitos hipogranulares ou agranulares**

Granulócitos hipogranulares ou agranulares são, na maioria das vezes, granulócitos displásicos que perderam os grânulos citoplasmáticos. Esta alteração é muito evidente em segmentados e bastões, mas também pode ser observada em metamielócitos, mielócitos e promielócitos. Está associada com mielodisplasias. Os granulócitos hipogranulares ou agranulares podem ser quantificados com o auxílio da TABELA 14 e visualizados na FIGURA 9.



**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

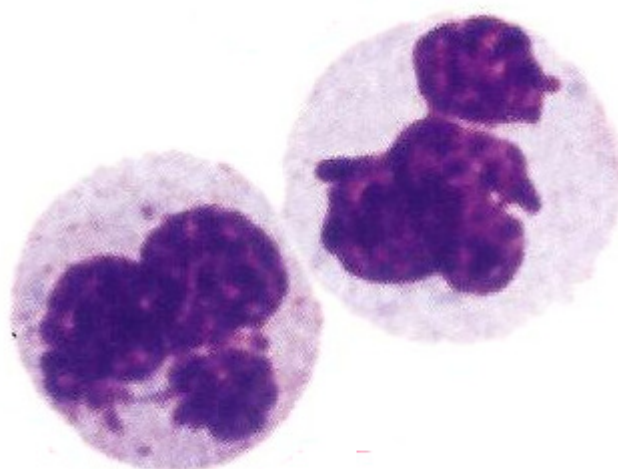
Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

TABELA 14 – QUANTIFICAÇÃO DE GRANULÓCITOS HIPOGRANULARES OU AGRANULARES

<b>GRANULÓCITOS HIPOGRANULARES OU AGRANULARES (Observar pelo menos 50 neutrófilos em campo de 1000x)</b>	
Até 30 % de granulócitos hipogranulares ou agranulares	+
30 – 50 %	++
>50 %	+++



**NEUTRÓFILOS HIPO / DEGRANULADOS**

FIGURA 9 - HIPO / DEGRANULAÇÃO DE NEUTRÓFILOS  
FONTE: Adaptado de GULATI (2009)

**3.2.5 Fragmentos de citoplasma de células leucêmicas/plaquetas hipogranulares ou agranulares**

Representam pedaços do citoplasma de células nucleadas, especialmente de células leucêmicas. É difícil distinguir fragmentos citoplasmáticos de células leucêmicas de plaquetas hipogranulares/agranulares. A cor do citoplasma e a natureza dos grânulos

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

podem, às vezes, ser útil na distinção. Geralmente, ambos são agrupados se os fatores de distinção não são convincentes. A contagem de plaquetas pode ser prejudicada, dependendo do tamanho e quantidade destes fragmentos. Podem ser quantificados com o auxílio da TABELA 15. Na FIGURA 10 podem ser vistos fragmentos de citoplasma de células leucêmicas.

TABELA 15 – QUANTIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE CITOPLASMA DE CÉLULAS LEUCÊMICAS/PLAQUETAS HIPOGRANULARES OU AGRANULARES

<b>FRAGMENTOS DE CITOPLASMA DE CÉLULAS LEUCÊMICAS/PLAQUETAS HIPOGRANULARES OU AGRANULARES</b> (Valor médio por campo de 1000x em imersão)	
2-3	+
4-5	++
>5	+++

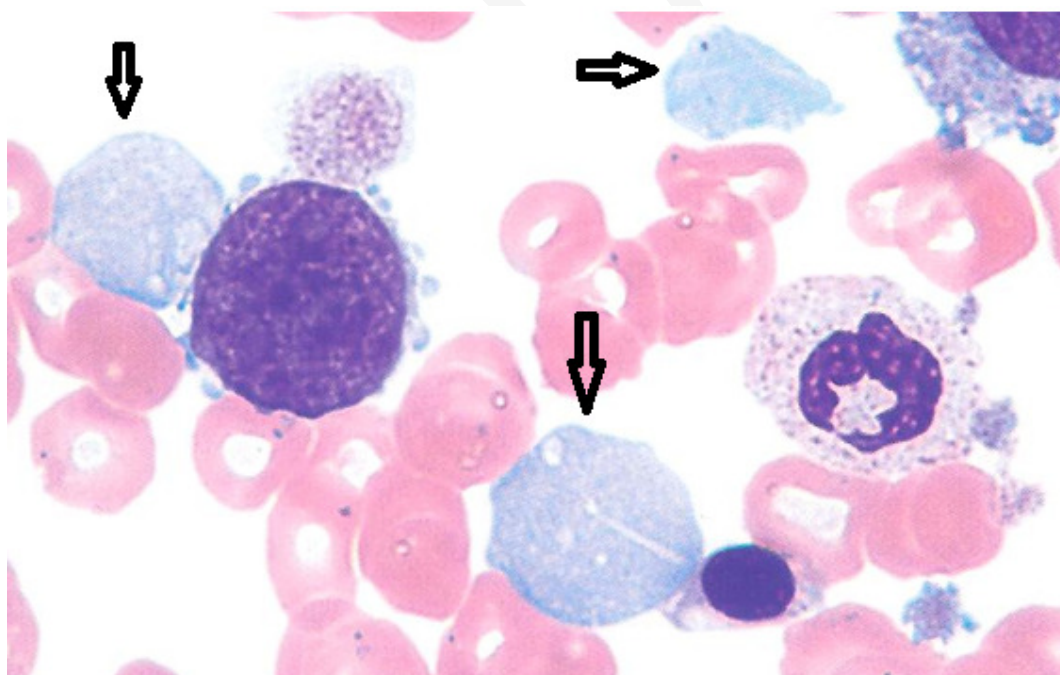


FIGURA 10 - FRAGMENTOS DE CITOPLASMA DE CÉLULAS LEUCÊMICAS  
FONTE: Adaptado de GULATI (2009)



**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA

3.2.6 Restos nucleares

Restos nucleares ou *smudge cells* são restos distorcidos de núcleos de células, especialmente as de origem linfóide. É um fenômeno que ocorre *in vitro* durante a confecção da extensão sanguínea, fazendo com que os as células se rompam e os núcleos se distorçam de maneira amórfica. Estão associados com neoplasias hematológicas, especialmente a leucemia linfocítica crônica. Os restos nucleares podem ser quantificados de acordo com a TABELA 16 e visualizados na FIGURA 11.

TABELA 16 – QUANTIFICAÇÃO RESTOS NUCLEARES

RESTOS NUCLEARES (Valor médio por campo de 1000x em imersão)	
2-3	+
4-5	++
>5	+++

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

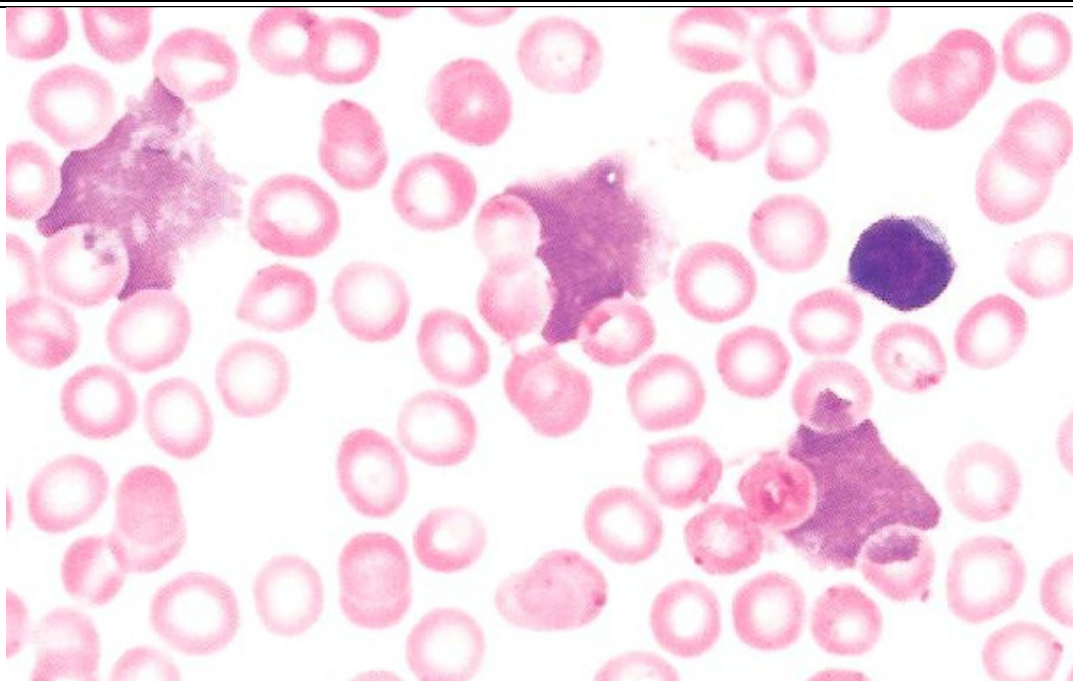


FIGURA 11 - RESTOS NUCLEARES  
FONTE: Adaptado de GULATI (2009)

### 3.3 Plaquetas

#### 3.3.1 Plaquetas gigantes

Plaquetas gigantes são observadas na síndrome de Bernard-Soulier, PTI, anomalia de May-Hegglin e em doenças mieloproliferativas. Nestas situações, o VPM é geralmente maior que 20 fl, ou seja, as plaquetas são praticamente do tamanho dos eritrócitos. Uma quantidade elevada de plaquetas gigantes podem indicar para uma possível mielofibrose.

Os analisadores hematológicos, que medem plaquetas pelo princípio da impedância, às vezes não conseguem contá-las e nem medir o seu volume, em virtude do volume plaquetário ultrapassar o limiar de diferenciação entre plaquetas e eritrócitos microcíticos. Para correção destes problemas, deve-se solicitar contagem de plaquetas

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

per método alternativo ao da impedância. É conveniente liberar presença de plaquetas gigantes no hemograma somente nos casos citados acima. Podem ser quantificadas conforme TABELA 17 e visualizadas na FIGURA 12.

TABELA 17 – QUANTIFICAÇÃO DE PLAQUETAS GIGANTES

<b>PLAQUETAS GIGANTES</b> (Como % média por campo em relação ao total de plaquetas por campo de 1000x)	
5-25%	+
25-50%	++
>50%	+++

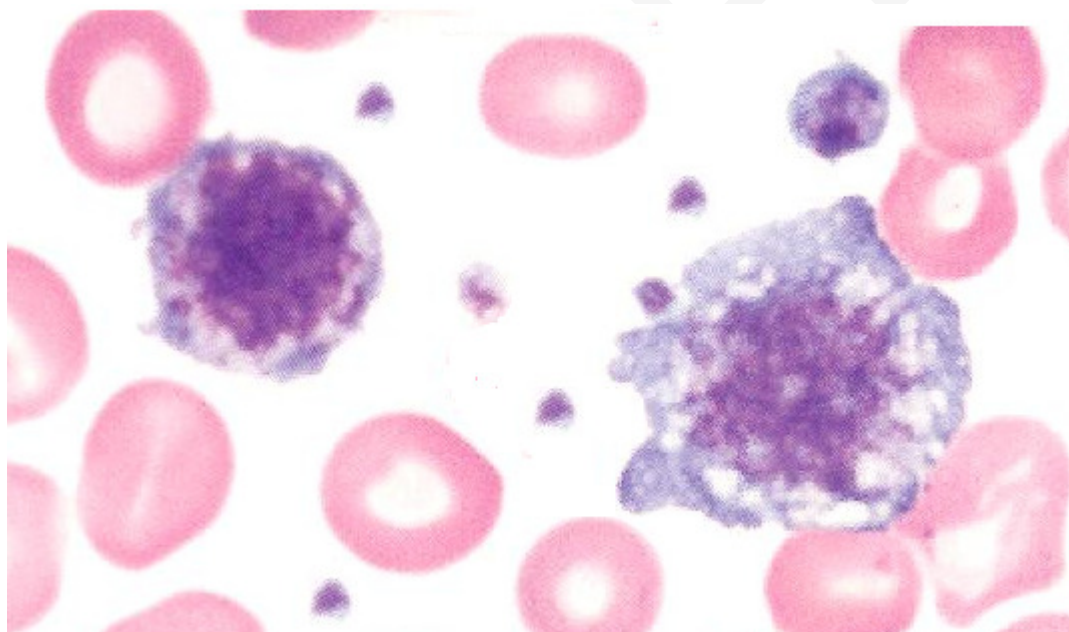


FIGURA 12 - PLAQUETAS GIGANTES

FONTE: Adaptado de GULATI (2009)

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

**3.3.2 Macroplaquetas e microplaquetas**

As macroplaquetas são plaquetas de tamanho aumentado que não chegam a ser do tamanho de plaquetas gigantes. A presença de macroplaquetas está correlacionada com patologias como, infarto do miocárdio, septicemia, gravidez, diabetes melito, hipertireoidismo, tuberculose, leucemia mielóide crônica, talassemia heterozigota dentre outras.

As microplaquetas são mais raras, porém podem aparecer, e nestes casos a citação de sua presença no hemograma é muito importante. Pode-se observar microplaquetas na síndrome de Wiskott-Aldrich, quimioterapia citotóxica, supressão da medula óssea devido à septicemia, pacientes HIV positivos, hipotireoidismo, insuficiência renal crônica dentre outras. A quantificação do tamanho plaquetário pode ser realizada com o auxílio conjunto das TABELAS 18 e 19.

TABELA 18 – QUANTIFICAÇÃO DO TAMANHO PLAQUETÁRIO

<b>Systemex Séries XT/XE (impedância)</b>				
<b>Quantificação</b>	<b>Valor de referência (fl)</b>	<b>Quantificação das macroplaquetas</b>		
Valores <5,0 liberar presença de microplaquetas	<b>9,4 - 12,6</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>
		12,7-13,9	14,0-15,0	>15,0
<b>Bayer Advia 120/2120 (ótico)</b>				
<b>Quantificação</b>	<b>Valor de referência (fl)</b>	<b>Quantificação das macroplaquetas</b>		
Valores <5,0 liberar presença de microplaquetas	<b>6,5 – 11,0</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>
		11,5-12,9	13,0-14,5	>14,5



**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA

TABELA 19 – QUANTIFICAÇÃO DE MACROPLAQUETAS E MICROPLAQUETAS

<b>MACROPLAQUETAS E MICROPLAQUETAS</b> (Como % média por campo em relação ao total de plaquetas por campo de 1000x)	
5-25%	+
25-50%	++
>50%	+++

A FIGURA 13 mostra macroplaquetas em sangue periférico.

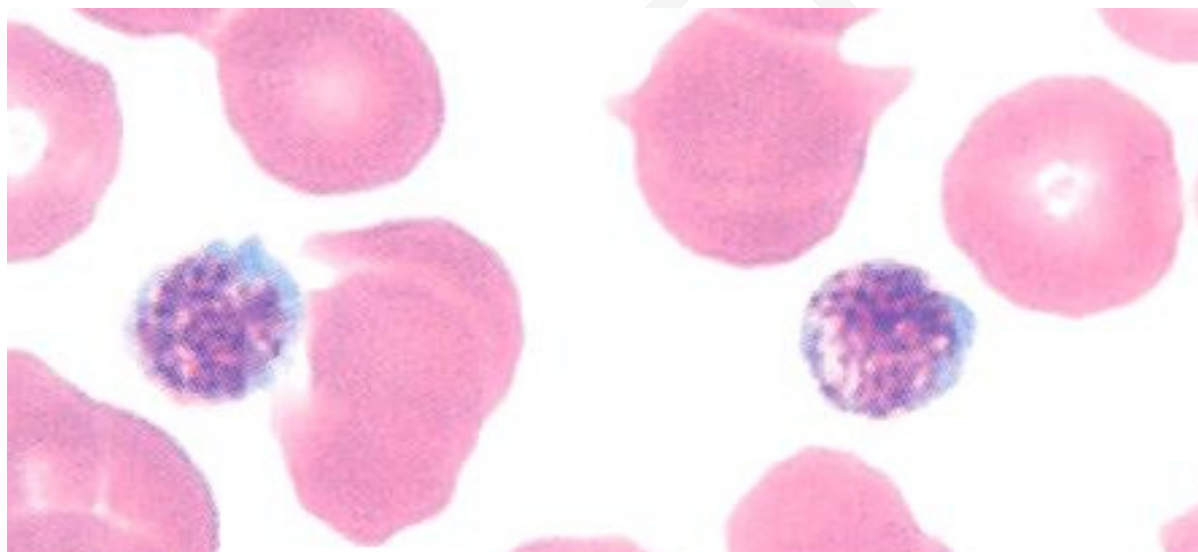


FIGURA 13 – MACROPLAQUETAS  
FONTE: Adaptado de GULATI (2009)

### 3.3.3 Anisocitose plaquetária

O PDW, *platelet distribution width*, é um índice que expressa a diferença de tamanho entre as plaquetas, ou seja, anisocitose plaquetária e pode estar aumentado em estados pré trombóticos, doenças coronarianas, leucemias mielóides agudas e crônicas,

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

anemia megaloblástica dentre outras. A presença de anisocitose plaquetária é sugerida com o apoio da TABELA 20.

TABELA 20 – ANISOCITOSE PLAQUETÁRIA

<b>Sysmex Séries XT/XE (impedância)</b>	<b>Quantificação</b>
PDW VR = 9,8 – 16,2 fl	>18,0 fl: citar na observação, caso a presença de anisocitose plaquetária seja confirmada na lâmina
<b>Bayer Advia 120/2120 (ótico)</b>	<b>Quantificação</b>
PDW VR = 25 – 65 %	>80,0 %: citar na observação, caso a presença de anisocitose plaquetária seja confirmada na lâmina

**3.3.4 Satelitismo plaquetário e agregados plaquetário**

As plaquetas podem se agregar ao redor de neutrófilos e monócitos em uma formação denominada de “roseta”. Tal formação é referenciada como satelitismo plaquetário. É tipicamente observada em extensões confeccionadas com sangue em EDTA. Os agregados plaquetários podem se formar em decorrência a uma punção difícil em que houve coagulação parcial da amostra e em amostra colhidas em EDTA. Satelitismo plaquetário e agregados plaquetário podem conduzir a resultados falsamente diminuídos da contagem automatizada de plaquetas e sua identificação e quantificação podem dar uma noção da extensão da interferência nas contagens de plaquetas. Podem ser quantificados conforme TABELA 21 e visualizados na FIGURA 14.



**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

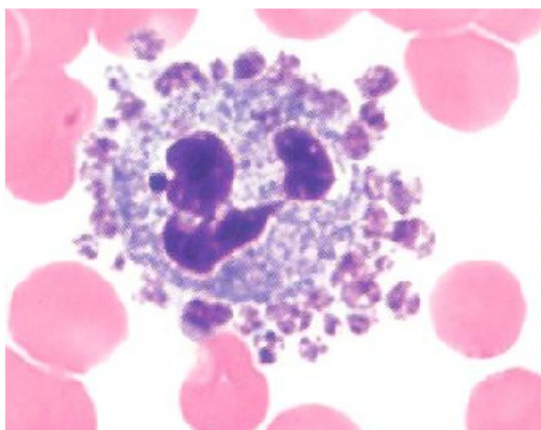
Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

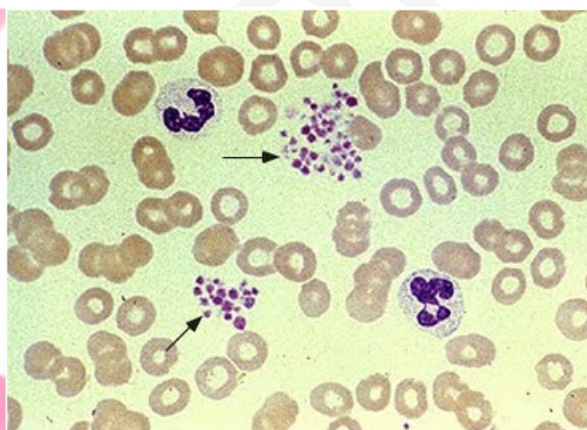
**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

TABELA 21 – QUANTIFICAÇÃO DE SATELITISMO PLAQUETÁRIO E AGREGADOS PLAQUETÁRIOS

<b>SATELITISMO PLAQUETÁRIO E AGREGADOS PLAQUETÁRIOS</b> (Valor médio por campo de 1000x em imersão)	
2-3	+
4-5	++
>5	+++



**SATELITISMO PLAQUETÁRIO**



**AGREGADOS PLAQUETÁRIOS**

FIGURA 14 - SATELITISMO PLAQUETÁRIO E AGREGADOS PLAQUETÁRIOS

FONTE: Adaptado de GULATI (2009)

### 3.4 Uniformização de critérios morfológicos para a classificação dos principais tipos de leucócitos

Existem situações que provocam controvérsias na contagem diferencial de leucócitos como a diferenciação entre neutrófilos e bastões, linfócitos e monócitos, linfócitos e linfócitos atípicos e etc.. Considerando que profissionais formados em épocas

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

diferentes e por universidades diversas podem trabalhar simultaneamente nos laboratórios de hematologia. Considerando ainda que estes profissionais aprenderam a morfologia das células do sangue com algumas pequenas variações regionais e conforme o professor que as ensinou, torna-se importante uniformizar os critérios morfológicos para a classificação dos principais tipos de células do sangue em cada laboratório de hematologia. Esta uniformização de critérios otimiza a reprodutibilidade e comparabilidade entre diferentes microscopistas. Os critérios morfológicos para cada tipo celular devem estar escritos em detalhes e devem ser seguidos à risca por todos os profissionais do laboratório de hematologia.

O bastonete é sem dúvida a célula que mais controvérsias provoca na contagem diferencial. De modo geral o número elevado de bastões no sangue periférico está correlacionado com processos infecciosos bacterianos agudos. Este fato gera uma expectativa em torno do número de bastões na contagem diferencial, a qual muitas vezes é levada ao microscópio quando do ato de realizar a contagem diferencial. A tênue diferença morfológica entre o bastão e o segmentado tem sido causa de grande confusão na diferenciação morfológica entre estas duas células. Muitas vezes critérios pessoais de diferenciação são utilizados, mas estes não encontram respaldo na literatura internacional.

Como exemplo de critério morfológico para bastões, temos o seguinte:

“O neutrófilo bastonete é uma célula madura da linhagem granulocítica, com a forma do núcleo curvada ou em bastão e que não desenvolveu um filamento de cromatina. Se a cromatina é vista na ponte que une os lóbulos, esta célula é um bastão, a não ser que o núcleo esteja sobreposto ou dobrado e que a constrição da parte mais estreita da ponte que une os lóbulos seja menor que  $\frac{2}{3}$  da parte mais larga do núcleo. Neste caso, o neutrófilo deve ser classificado como segmentado”.

Os linfócitos atípicos ou reativos também são células que geram controvérsias em relação à classificação morfológica, uma vez que os mesmos possuem grande

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

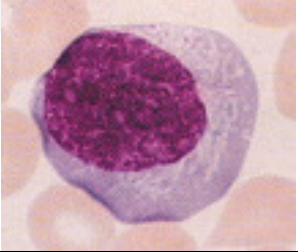
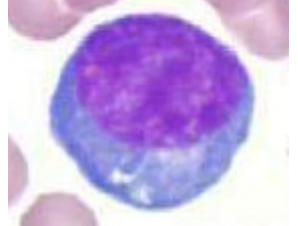
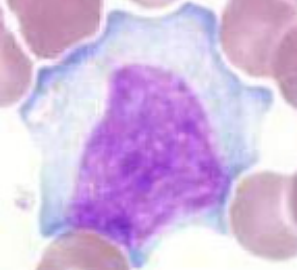
Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

variação de tamanhos, formas e intensidade da basofilia. A TABELA 22 resume as principais características dos linfócitos atípicos ou reativos.

TABELA 22 - VARIAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS LINFÓCITOS ATÍPICOS

VARIAÇÕES DE LINFÓCITOS ATÍPICOS	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	
<b>MONOCITÓIDE</b>	Célula grande, núcleo convoluto, citoplasma abundante com basofilia variável, podendo apresentar vacúolos e grânulos. Apresenta morfologia semelhante ao monócito	
<b>PLASMOCITÓIDE OU LINFOBLASTÓIDE</b>	Possuem citoplasma escasso com basofilia difusa e geralmente intensa. O núcleo pode apresentar nucléolos. O formato lembra um plasmócito ou um linfoblasto	
<b>AMEBOIDE</b>	Caracteriza-se por ter morfologia ameboide porque emite projeções citoplasmáticas irregulares que muitas vezes contornam os eritrócitos. O citoplasma apresenta-se basofílico, principalmente junto à membrana citoplasmática	

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) recomenda que os linfócitos sejam contados em qualquer quantidade e em todas as amostras. Dessa forma, o laudo do hemograma deve conter um campo específico para linfócitos atípicos.

3.5 Correção da contagem automatizada de leucócitos em função do número de eritroblastos e fragmentos de núcleo de megacariócitos

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

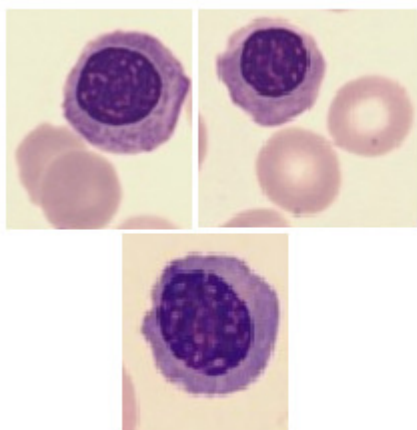
**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

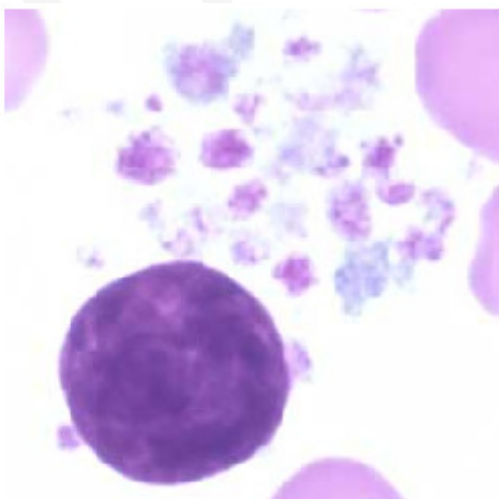
Sempre que a contagem de eritroblastos ou de fragmentos de núcleos de megacariócitos na lâmina for superior a 10 / 100 leucócitos contados, deve-se fazer a correção da contagem automatizada de leucócitos, uma vez que ambos são considerados como leucócitos na maioria dos analisadores hematológicos. A correção é realizada da seguinte forma:

$$\text{Leucócitos corrigidos} = \text{Leucometria Global} \times 100 / 100 + \text{número de eritroblastos e/ou fragmentos de núcleo de megacariócito}$$

No caso dos eritroblastos, tal procedimento não precisa ser realizado se o laboratório possuir analisadores hematológicos que contem eritroblastos nas amostras de sangue total. Nestes casos o analisador já fornece a contagem de leucócitos corrigida. A FIGURA 15 mostra eritroblastos e fragmentos de núcleo de megacariócitos.



**ERITROBLASTOS**



**FRAGMENTO DE NÚCLEO  
DE MEGACARIÓCITO**

FIGURA 15 - ERITROBLASTOS E FRAGMENTOS DE NÚCLEO DE MEGACARIÓCITOS  
FONTE: <http://image.bloodline.net> (2012); [www.laborlexikon.de](http://www.laborlexikon.de) (2012)

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

**3.6 Considerações sobre as revisões microscópicas**

Alguns cuidados devem ser tomados para se realizar as revisões microscópicas de modo a conferir mais qualidade nas leituras como, por exemplo, verificar se o relatório fornecido pelos analisadores hematológicos das contagens automatizadas confere com a identificação da extensão sanguínea. Com a objetiva de 10x examinar as bordas da extensão a fim de avaliar a adequação da extensão sanguínea. As bordas da mesma podem conter acúmulo de leucócitos, contudo, se houver um aumento do número de leucócitos nesta área, a contagem diferencial pode ser imprecisa.

Extensões sanguíneas preparadas incorretamente podem ter muitas células grandes nas bordas da extensão, deixando as células relativamente menores, como os linfócitos, no centro tornando os resultados da contagem diferencial manual imprecisos. A contagem de leucócitos, plaquetas e reticulócitos pode ser estimada conforme TABELA 23. A revisão microscópica deve ser realizada na área onde as hemácias estão uniformemente distribuídas. Deve-se selecionar a melhor área para avaliação morfológica detalhada e contagem diferencial. As hemácias, nestas áreas, estão distribuídas uniformemente e sem distorção. A avaliação da série vermelha deve ser realizada com a objetiva de 100x em óleo de imersão. Inicia-se o exame em uma área onde as hemácias se tocam, mas não se sobrepõem. Há cerca de 300 hemácias presentes nesta área em pacientes com um hematócrito normal.

Para se realizar a contagem diferencial de leucócitos uma área de contagem ideal deve ser selecionada, onde as hemácias são adjacentes, mas não se sobrepõem. Pode-se utilizar microscópio ótico com objetiva de 50x par se realizar a contagem diferencial, porém a objetiva de 100x, deve sempre ser utilizada para classificar as células imaturas e para incluir células mielóides mais imaturas do que os neutrófilos segmentados.



**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

TABELA 23 - PROCEDIMENTOS DE ESTIMATIVA MICROSCÓPICA DA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS, PLAQUETAS E RETICULÓCITOS

LEUCÓCITOS	PLAQUETAS	RETICULÓCITOS
Focalizar a área de trabalho adequada na extensão	Focalizar a área de trabalho adequada na extensão	Focalizar a área de trabalho adequada na extensão
Contar os leucócitos, incluindo os arrebitados, em pelo menos 10 campos de 100x ou 400x	Contar plaquetas em pelo menos 10 campos de 1000x em imersão	Contar policromatófilos em 5 campos com 200 eritrócitos em aumento de 1000x em imersão
Dividir o número total de leucócitos contados pelo total de campos observados	Dividir o número total de plaquetas contadas pelo total de campos observados	Dividir o número total de policromatófilos contados por 5 e em seguida multiplicar por 2
Multiplicar a média por 250* quando utilizar aumento de 100x e por 2000* utilizando aumento de 400x	Multiplicar a média por 13800*	2 é o fator de correção para corrigir o número de policromatófilos que podem ser subestimados devido ao pouco número de células contadas e à perda da tonalidade azul em reticulócitos mais maduros

FONTE: Adaptado de MAEDEL; DOIG (2012); COMAR *et al.* (2009); ESCOBAR *et al.* (2002)

NOTA: Estimativas de leucócitos e plaquetas podem variar cerca de 15-20% ao redor de uma contagem automatizada normal. Em contagens muito baixas ou muito elevadas de leucócitos e plaquetas, a precisão em comparação com o contador automático pode variar. Variações maiores que o sugerido devem ser seguidas de repetições das contagens automatizadas. \* Fator de correção

### 3.7 Correção da contagem de plaquetas em citrato de sódio

Quando for realizada contagem de plaquetas a partir de amostra colhida em citrato de sódio, deve-se fazer uma correção, pois o citrato é líquido e dilui a amostra. Para corrigir deve-se multiplicar o resultado da contagem por 1,1, que é o fator da diluição.

Quando for solicitada contagem de plaquetas em citrato, deve-se colher também em EDTA e realizar a contagem com os dois anticoagulantes. Em seguida realiza-se uma avaliação plaquetária em lâmina. Tanto o resultado com citrato como com EDTA são

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

liberados no laudo, colocando-se na observação o anticoagulante que é mais condizente com a estimativa plaquetária em lâmina.

**3.8 Casos em que se deve solicitar plaqueta ótica**

Deve-se solicitar a contagem de plaquetas por método ótico em duas situações. Primeiramente, quando na extensão sanguínea forem visualizadas muitas plaquetas gigantes, as quais são contadas, pelo método da impedância, como eritrócitos devido ao seu grande tamanho. A segunda situação é quando se observa na extensão sanguínea a presença de muitos esquistócitos, os quais são contados, pelo método da impedância, como plaquetas devido ao seu pequeno tamanho. Uma análise criteriosa das plaquetas na lâmina é necessária para que se consiga resolver estes casos.

**3.9 Pseudotrombocitopenia induzida pelo EDTA**

Consiste na contagem baixa de plaquetas em amostras de sangue colhidas com EDTA. Essa diminuição é subsequente à aglutinação das plaquetas ou, mais raramente, à formação de rosetas de plaquetas em torno dos neutrófilos, um fenômeno chamado satelitismo plaquetário.

<b>Observação 1</b>	<b>Observação 2</b>	<b>Ação</b>
Contagem de plaquetas do aparelho diminuída	Avaliação plaquetária em lâmina sem anticoagulante é normal	Contar plaquetas em citrato de sódio no aparelho
Contagem de plaquetas do aparelho diminuída	Presença de agregados plaquetários em lâmina feita a partir do EDTA	Contar plaquetas em citrato de sódio no aparelho

Se a contagem de plaquetas for corrigida com citrato, tem-se um caso de

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

pseudotrombocitopenia induzida pelo EDTA. Este fato deve ser liberado na observação do hemograma. A pseudotrombocitopenia também pode ser induzida por heparina e mais raramente pelo próprio citrato de sódio. Deve-se analisar criteriosamente cada situação para se resolver o problema.

**3.10 Número de células que devem ser contadas na diferencial**

<b>LEUCÓCITOS x 10<sup>3</sup>/μl</b>	<b>Número de células que devem ser contadas</b>
Até 50,0	100
> 50,0 e sem monotonia celular	200
>250 e sem monotonia celular	300

Obs.: Monotonia celular é a presença de apenas um único tipo específico de célula. Não há necessidade que mais de 100 células sejam contadas em contagens de leucócitos acima de 250,0 x 10<sup>3</sup>/μl e com monotonia celular.

**4. CONTROLE DE QUALIDADE:**

Periodicamente, pelo menos 4 vezes ao ano, os profissionais envolvidos com a leitura de lâminas de hemograma devem fazer a contagem diferencial e avaliação da série vermelha de uma mesma lâmina e os resultados devem ser comparados e discutidos, caso haja discrepâncias significativas entre as contagens, o conceito deve ser rediscutido. A variação permitida deve atender os requisitos da tabela de Ruëmke para 200 células contadas. Este procedimento fará com que os profissionais passem a realizar contagens com resultados semelhantes e que a comparação de hemogramas, lidos por diferentes profissionais, possa ser feita.





**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA

**5. REFERÊNCIAS:**

ADVIA 120 **Hematology System**. Manual do operador, 1999.

BAIN, B. J. **Blood cells. A practical guide**. 4. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006, 487p.

BAIN, B. J.; GUPTA, R. **A – Z of Haematology**. 1. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2003, 244p.

BROWN, B. A. **HEMATOLOGY: Principles and Procedures**. 6. ed., Malvern: Lea & Febiger, 1993.

CAPORAL, F. A.; COMAR, S. R. Evaluation of RDW-CV, RDW-SD, and MATH-1SD for the detection of erythrocyte anisocytosis observed by optical microscopy. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 5, p. 324-331, 2013.

CIESLA, B. **Hematology in practice**. 1. ed. Philadelphia: F. A. Davis Company, 2007, 368p.

*College of American Pathologists (CAP)*. <http://www.cap.org/apps/cap.portal>

COMAR, S. R.; SILVA, P. H. Determinação laboratorial e aplicação clínica dos parâmetros de volume plaquetário. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 257-265, 2009.

DACIE, S. J.; LEWIS, S. M. **Practical Haematology**. 8. ed., Hong Kong: Churchill Livingstone, 1995.

DOW, R. B. The clinical and laboratory utility of platelet volume parameters. **Australian journal of medical science**, Milton, v. 15, p. 1-8, 1994.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Pseudotrombocitopenia. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**. v. 40(5), p. 321-324, 2004.

ESCOBAR, M.; RAPPAPORT, E.; TIPTON, P.; BALENTINE, P.; RIGGS, M. Reticulocyte estimate from peripheral blood smear: a simple, fast, and economical method for evaluation of anemia. **Laboratory Medicine**, Chicago, v. 33, n. 9, p. 703-705, 2002.

GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 11. ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2003.

GULATI, G. L. **Blood cell morphology: grading guide**. Hong Kong: ASCP Press, 2009.

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19. ed. São Paulo: Manole, 1999, 1552p.

HOFFMAN, R. *et al.* **Hematology: Basic Principles and Practice**. 4. ed., Philadelphia: Elsevier, Churchill, Livingstone, 2005, 3581p.

HOOKEY, L.; DEXTER, D.; LEE, D. H. The use of interpretation of quantitative terminology in reporting of red blood cell morphology. **Laboratory hematology**. v. 7, p. 85-88, 2001.

HOUWEN, B. The differential cell count. **Laboratory hematology**. v. 7, p. 89-100, 2001.



**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA

JACKSON, S. R.; CARTER, J. M. Platelet volume: Laboratory measurement and clinical application. **Blood reviews**, Edinburgh, v. 7, n. 2, p. 104-113, 1993.

JANDL, J. H.; KAPFF, C. T. **Blood: Textbook of Hematology**. 2. ed., USA: Little, Brown and Company, 1996, 1510p.

LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 10. ed., Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2006.

LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. **Hematologia Prática de Dacie e Lewis**. 9. ed., São Paulo: Artmed Editora S.A., 2006, 571p.

LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E. *et al.* **Williams – Hematology**. 6. ed., Nova York: McGraw-Hill, 2000, 1370p.

LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J. R. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica: técnica e interpretação**. 8. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MAEDEL, L. B.; DOIG, K. Examination of the peripheral blood film and correlation with the complete blood count. In: RODAK, B. F.; FRITSMA, G. A.; KEOHANE, E. M. (Ed.). **Hematology: clinical principles and applications**. 4<sup>th</sup> ed. China: Elsevier Saunders, 2012. p. 192-209.

MALVEZZI, M. **Valores eritrocitários normais em população adulta de Curitiba, após exclusão dos indivíduos deficientes em ferro**. Curitiba, 1983, 133p. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) – Universidade Federal do Paraná.

MIALE, J. B. **Laboratory Hematology**. 6. ed., 1982.

*National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCSL)*. <http://nccls.org/>

O'CONNOR, B. H. **Color Atlas and Instruction Manual of Peripheral Blood Cell Morphology**. 1. ed. Pennsylvania: Williams & Wilkins, 1984.

OLIVEIRA, R. A. G. **Hemograma: como fazer e interpretar**. 1. ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista LTDA., 2007, 505p.

PIERRE, R. V. Red cell morphology and the peripheral blood film. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 25-61, 2002.

SEAN, C. *et al.* Nucleated red blood cell counts in term neonates with umbilical artery pH  $\leq 7,0$ . **American journal of perinatology**. v. 18(2), p. 93-98, 2001.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y.; ALVES, H. B. **Hematologia laboratorial**. Rio de Janeiro: Revinter, 2009.

SYSMEX XE-2100D **Automated Hematology Analyzer Guide**.

SYSMEX XT-2000i **Automated Hematology Analyzer Guide**.



**INSTRUÇÃO DE TRABALHO**  
**ITR - UAD - HEM – Nº 005**

**Página 176**

**UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO**

Unidade de Apoio Diagnóstica – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia

**NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO**

**PADRONIZAÇÃO DA LEITURA DE LÂMINAS DE HEMOGRAMA**

TKACHUK, D.; HIRSCHMANN, J. V. **Wintrobe's Atlas of Clinical Hematology**. 1. ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2007, 592p.

VAN DER MEER, W.; VAN GELDER W.; DE KEIJZER, R.; WILLEMS, H. Does the band cell survive de 21st century? **European journal of haematology** v. 76, p. 251-254, 2006.

WALTER, J. G.; GARRITY, P. RDW-SD and RDW-CV: their relationship to RBC distribution curves and anisocytosis. **Sysmex Journal International**, Kobe, v. 3, n. 1, p. 40-45, 1993.

## APÊNDICES

**APÊNDICE 2 – Análise completa das causas de resultados falso-positivos na avaliação dos critérios de triagem dos Estudos 1, 2, 3 e adaptados da ISLH**

TABELA 1 – ANÁLISE COMPLETA DAS CAUSAS DE FALSO-POSITIVOS NA AVALIAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUANTITATIVOS DO ESTUDO 1

<b>CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUANTITATIVOS</b>	
<b>CRITÉRIO</b>	<b>TAXA DE FALSO-POSITIVOS (N (%))</b>
Hemoglobina < 9,5 g/dl	135 (6,82%)
Hemoglobina > 18,0 g/dl	7 (0,35%)
VCM < 77 fl (adultos)	17 (0,85%)
VCM < 74 fl (criança ≤ 12 anos)	12 (0,60%)
VCM > 100 fl	74 (3,74%)
CHCM < 31,5 g/dl	75 (3,79%)
CHCM > 36,5 g/dl	9 (0,45%)
RDW-CV > 17%	117 (5,91%)
RDW-SD > 60 fl	53 (2,68%)
Reticulócitos > 150 x 10 <sup>3</sup> /μl	4 (0,20%)
Reticulócitos > 2,5%	9 (0,45%)
Leucócitos < 4,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	168 (8,49%)
Leucócitos > 12,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	176 (8,9%)
Neutrófilos < 1,8 x 10 <sup>3</sup> /μl	150 (7,58%)
Neutrófilos > 7,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	280 (14,16%)
Neutrófilos < 38 %	141 (7,13%)
Neutrófilos > 70 %	368 (18,61%)
Linfócitos > 5,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos)	13 (0,65%)
Linfócitos > 7,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (criança ≤ 12 anos)	20 (1,01%)
Linfócitos < 0,8 x 10 <sup>3</sup> /μl	92 (4,65%)
Linfócitos < 20 %	381 (19,27%)
Linfócitos > 50 %	126 (6,37%)
Monócitos > 1,3 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos)	23 (1,16%)
Monócitos > 2,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (criança ≤ 12 anos)	2 (0,10%)
Monócitos < 0,1 x 10 <sup>3</sup> /μl	32 (1,61%)
Monócitos < 1 %	10 (0,50%)
Monócitos > 12 %	108 (5,46%)
Eosinófilos > 2,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	7 (0,35%)
Eosinófilos > 20 %	9 (0,45%)
Basófilos > 0,3 x 10 <sup>3</sup> /μl	4 (0,20%)
Basófilos > 2 %	12 (0,60%)
Plaquetas < 100 x 10 <sup>3</sup> /μl	135 (6,82%)
Plaquetas > 600 x 10 <sup>3</sup> /μl	33 (1,66%)
VPM > 12,0 fl	85 (4,29%)

FONTE: O autor (2015)

TABELA 2 – ANÁLISE COMPLETA DAS CAUSAS DE FALSO-POSITIVOS NA AVALIAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUANTITATIVOS DO ESTUDO 2

<b>CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUANTITATIVOS</b>	
<b>CRITÉRIO</b>	<b>TAXA DE FALSO-POSITIVOS (N (%))</b>
Hemoglobina < 8,0 g/dl	44 (2,22%)
Hemoglobina > 19 g/dl	5 (0,25%)
VCM < 75 fl	20 (1,01%)
VCM > 105 fl	19 (0,96%)
CHCM < 31,0 g/dl	33 (1,66%)
CHCM > 36,5 g/dl	9 (0,45%)
RDW-CV > 18%	53 (2,68%)
RDW-SD > 65 fl	20 (1,01%)
Reticulócitos > 150 x 10 <sup>3</sup> /μl	4 (0,2%)
Reticulócitos > 2,5%	9 (0,45%)
Leucócitos < 3,5 x 10 <sup>3</sup> /μl	126 (6,37%)
Leucócitos > 15,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	71 (3,59%)
Neutrófilos < 1,5 x 10 <sup>3</sup> /μl	113 (5,71%)
Neutrófilos > 11,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	74 (0,91%)
Neutrófilos < 35%	115 (5,81%)
Neutrófilos > 80%	120 (6,06%)
Linfócitos > 5,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos)	13 (0,65%)
Linfócitos > 7,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (criança ≤ 12 anos)	19 (0,96%)
Linfócitos < 0,8 x 10 <sup>3</sup> /μl	89 (4,5%)
Linfócitos < 12%	121 (6,12%)
Linfócitos > 60	62 (1,82%)
Monócitos > 1,3 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos)	23 (1,16%)
Monócitos > 2,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (criança ≤ 12 anos)	2 (0,1%)
Monócitos < 0,1 x 10 <sup>3</sup> /μl	30 (1,51%)
Monócitos < 1%	9 (0,45%)
Monócitos > 16%	42 (2,12%)
Eosinófilos > 2,5 x 10 <sup>3</sup> /μl	5 (0,25%)
Eosinófilos > 25%	3 (0,15%)
Basófilos > 0,3 x 10 <sup>3</sup> /μl	4 (0,2%)
Basófilos > 2%	12 (0,6%)
Plaquetas < 100 x 10 <sup>3</sup> /μl	134 (6,77%)
Plaquetas > 800 x 10 <sup>3</sup> /μl	5 (0,25%)
VPM > 12,5 fl	35 (1,77%)

FONTE: O autor (2015)

TABELA 3 – ANÁLISE COMPLETA DAS CAUSAS DE FALSO-POSITIVOS NA AVALIAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUANTITATIVOS DO ESTUDO 3

CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUANTITATIVOS	
CRITÉRIO	TAXA DE FALSO-POSITIVOS (N (%))
Hemoglobina < 7,5 g/dl	31 (1,56%)
Hemoglobina > 20,0 g/dl	0
VCM < 74 fl	15 (0,75%)
VCM > 105 fl	19 (0,96%)
CHCM < 30,0 g/dl	8 (0,4%)
CHCM > 36,5 g/dl	9 (0,45%)
RDW-CV > 19%	24 (1,21%)
RDW-SD > 70 fl	3 (0,15%)
Reticulócitos > 150 x 10 <sup>3</sup> /μl	4 (0,2%)
Reticulócitos > 2,5%	9 (0,45%)
Leucócitos < 3,2 x 10 <sup>3</sup> /μl	110 (5,56%)
Leucócitos > 20,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	23 (1,16%)
Neutrófilos < 1,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	66 (3,33%)
Neutrófilos > 15,0 x 10 <sup>3</sup> /μl	18 (0,91%)
Neutrófilos < 25%	63 (3,18%)
Neutrófilos > 85%	57 (2,88%)
Linfócitos > 5,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos)	13 (0,65%)
Linfócitos > 7,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (criança ≤ 12 anos)	19 (0,96%)
Linfócitos < 0,5 x 10 <sup>3</sup> /μl	34 (1,71%)
Linfócitos < 8%	45 (2,27%)
Linfócitos > 70	36 (1,82%)
Monócitos > 1,5 x 10 <sup>3</sup> /μl (adultos)	11 (0,55%)
Monócitos > 2,0 x 10 <sup>3</sup> /μl (criança ≤ 12 anos)	2 (0,1%)
Monócitos < 0,1 x 10 <sup>3</sup> /μl	28 (1,41%)
Monócitos < 1%	9 (0,45%)
Monócitos > 20%	21 (1,06%)
Eosinófilos > 2,5 x 10 <sup>3</sup> /μl	5 (0,25%)
Eosinófilos > 30%	0
Basófilos > 0,5 x 10 <sup>3</sup> /μl	2 (0,1%)
Basófilos ≥ 3%	3 (0,15%)
Plaquetas < 90 x 10 <sup>3</sup> /μl	120 (6,06%)
Plaquetas > 1.000 x 10 <sup>3</sup> /μl	2 (0,1%)
VPM ≥ 13,0 fl	9 (0,45%)

FONTE: O autor (2015)

TABELA 4 – ANÁLISE COMPLETA DAS CAUSAS DE FALSO-POSITIVOS NA AVALIAÇÃO DOS CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUALITATIVOS DOS ESTUDOS 1, 2, 3 E ADAPTADOS DA ISLH

<b>CRITÉRIOS DE TRIAGEM QUALITATIVOS</b>	
<b>CRITÉRIO</b>	<b>TAXA DE FALSO-POSITIVOS (N (%))</b>
Recém-nato	14 (0,7%)
Todos os alertas suspeitos	234 (11,83%)
Granulócitos imaturos	48 (2,42%)
Desvio à esquerda	91 (4,6%)
Linfócitos atípicos	44 (2,22%)
Linfócitos anormais/blastos	37 (1,87%)
Blastos	6 (0,30%)
Eritroblastos	37 (1,87%)
Fragmentos eritrocitários	4 (0,2%)
Hemácias resistentes à lise	1 (0,05%)
Agregados plaquetários	63 (3,18%)
Defeito na dosagem de hemoglobina	6 (0,3%)
População de hemácias dimórficas	1 (0,05%)
Contagens não confiáveis indicadas por (*)	264 (13,35%)
Leucócitos	94 (4,75%)
Diferencial de leucócitos	227 (11,48%)
Série vermelha	8 (0,4%)
Plaquetas	95 (4,8%)
VPM	48 (2,42%)
Contagens não disponíveis indicadas por (----)	68 (3,43%)
RDW	1 (0,05%)
Contagem diferencial de leucócitos	23 (1,16%)
VPM	46 (2,32%)

FONTE: O autor (2015)

NOTA: As taxas de falso-positivos são iguais para todos os Estudos em virtude dos critérios de triagem qualitativos serem os mesmos para todos os Estudos.

LEGENDA: N: número de amostras.