

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA SPEZIA

AValiação DOS PARâMETROS HEMATOLÓGICOS E ALARMES LIBERADOS
PELO ANALISADOR HEMATOLÓGICO SYSMEX XE-5000

CURITIBA

2019

JULIANA SPEZIA

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E ALARMES LIBERADOS
PELO ANALISADOR HEMATOLÓGICO SYSMEX XE-5000

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Shirley Ramos da Rosa Utiyama

Co-Orientador: Prof. Dr. Railson Henneberg

CURITIBA

2019

Spezia, Juliana

Avaliação dos parâmetros hematológicos e alarmes liberados pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 [recurso eletrônico] / Juliana Spezia – Curitiba, 2018.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, 2018.

Orientadora: Professora Dra. Shirley Ramos da Rosa Utiyama
Coorientador: Professor Dr. Railson Henneberg

1. Sysmex XE-5000. 2. Alarmes clínicos. 3. Contagem diferencial de leucócitos. 4. Plaquetas. I. Utiyama, Shirley Ramos da Rosa. II. Henneberg, Railson. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.150758



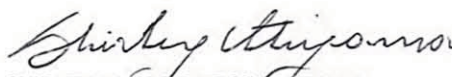
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS

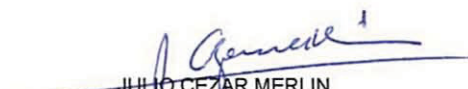
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de JULIANA SPEZIA intitulada: **AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E ALARMES LIBERADOS PELO ANALISADOR HEMATOLÓGICO SYSMEX XE-5000**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Novembro de 2018.


SHIRLEY RAMOS DA ROSA UTIYAMA
Presidente da Banca Examinadora


JULIO CEZAR MERLIN
Avaliador Externo (PUC/PR)


PAULO HENRIQUE DA SILVA
Avaliador Externo (UFPR)


ALINE BORSATO HAUSER
Avaliador Externo (UFPR)


SERGIO LUIZ BACH
Avaliador Externo (UTP)

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Vitor Hugo, que sempre esteve do meu lado...

AGRADECIMENTO

Agradeço à Deus e Nossa Senhora Aparecida, por sempre me conceder força para não desistir e proteção para me amparar.

Agradeço à minha família, aos mestres e amigos que me apoiaram e me incentivaram nos momentos difíceis e felizes dessa jornada, em especial:

Ao meu esposo Vitor Hugo, pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão e apoio, pelo incentivo e motivação incondicional em meus momentos de desânimo. Essa conquista é nossa!

À minha mãe e ao meu pai, Alzira e Artur, por uma vida de amor, dedicação e exemplo, por tudo que me ensinaram.

À minha sogra Maria das Graças e ao meu sogro José Carlos, pela motivação, amizade, confiança e apoio em todos os momentos.

Às minhas irmãs, cunhados e amigas, que sempre me incentivaram e torceram pelas minhas conquistas, não importa a que distância, estavam sempre comigo.

Ao meu sobrinho Pedro, pela alegria e distração que me proporcionou em tantos momentos difíceis, sem ao menos entender o porquê.

À mais nova integrante da família: minha filha linda, Julia! Que chegou para completar a minha vida e me ensinar que amar não tem limites.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Shirley Ramos da Rosa Utiyama, por me receber como aluna de doutorado, pelos ensinamentos, pela compreensão e toda ajuda dedicada à elaboração desta tese.

Ao meu querido co-orientador Prof. Dr. Railson Henneberg, pela confiança, paciência, dedicação, carinho, amizade e pelos sábios conselhos que foram fundamentais para percorrer essa importante etapa da minha vida.

Aos colegas do Laboratório Escola da UFPR, que dia a dia acompanharam meu trabalho, dividindo comigo muitos momentos de angústias, risadas, cafezinhos e descontração.

Ao professor Samuel Ricardo Comar, pelas suas considerações e generosas sugestões de aprimoramento, pela dedicação e suporte na obtenção das amostras.

Aos funcionários do Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da UFPR pela colaboração na obtenção das amostras.

Ao professor Geraldo Picheth, pelo suporte nas análises estatísticas.

Aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade.

Aos membros do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo suporte, em especial aos professores do programa. Seus ensinamentos certamente contribuíram para a minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante parte do meu doutorado.

À todos vocês, que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração dessa tese e que permitiram que, simples parcerias se tornassem grandes amizades!

“N3o tente ser uma pessoa de sucesso.
Em vez disso, seja uma pessoa de valor.”

Albert Einstein

RESUMO

Os novos analisadores hematológicos incorporaram avanços tecnológicos que permitem contagens celulares cada vez mais rápidas e precisas, além de alertar ao usuário os resultados que não podem ser validados e que necessitam de revisão microscópica. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as contagens celulares e os novos parâmetros hematológicos liberados pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 através da análise das lâminas de extensão sanguínea pela microscopia ótica, a fim de determinar o desempenho analítico dos alarmes (*flags*) emitidos e a correlação entre os métodos manual e automatizado. Foram avaliados 1296 hemogramas obtidos na Unidade de Apoio Diagnóstico (UAD) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) que apresentaram alarmes quantitativos e qualitativos emitidos pelo XE-5000. Os critérios utilizados para sinalizar os hemogramas foram definidos pela UAD do HC-UFPR, juntamente com os valores pré-definidos pelo fabricante do equipamento. A análise microscópica da extensão sanguínea foi realizada seguindo um protocolo de leitura e critérios de positividade da lâmina. Os resultados das contagens diferenciais de leucócitos, granulócitos imaturos (IG), eritroblastos e plaquetas revelaram forte correlação entre os métodos ($r \geq 0,9$), exceto para os basófilos ($r = 0,5$). A especificidade dos alarmes de blastos, IG, bastonetes, linfócitos atípicos e anormais, fragmentos eritrocitários e grumos plaquetários foram superiores a 91%. A sensibilidade desses alarmes variou entre 23,7% a 100%. Os parâmetros de pesquisa NEUT-X, NEUT-Y, HFLC e FRC não apresentaram boa correlação com o método manual, porém foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controle (amostras negativas) e o grupo das amostras com alarmes ($p < 0,05$). Através dos resultados obtidos pode-se concluir que: (1) as contagens diferenciais de leucócitos em geral, apresentam boa correlação com as contagens realizadas pela microscopia ótica; (2) os alarmes "*Blast?*", "*Immat Gran?*", "*Left Shift?*", "*Atypical Lymph?*", "*NRBC?*", "*Fragments?*" e "*Plaq Clumps?*" apresentaram alta especificidade e baixa sensibilidade na detecção destas anormalidades e; (3) a associação de alarmes aumenta a sensibilidade destes *flags*, principalmente o alarme "*Atypical Lymph?*". É importante salientar que os resultados do presente estudo devem ser analisados de forma individualizada, respeitando a característica amostral e a tecnologia utilizada no equipamento estudado.

Palavras-chave: Sysmex XE-5000. Alarmes. Contagem diferencial de leucócitos. Blastos. Granulócitos imaturos. Linfócitos variantes. Plaquetas.

ABSTRACT

The new hematology analyzers have incorporated technological advances that allow for faster and more accurate blood counts, and flag the user to results that cannot be validated and require a slide review. The objective of the present study was to evaluate the blood counts and the new hematological parameters released by the Sysmex XE-5000 hematological analyzer through the analysis of the blood smear by microscopy, in order to determine the analytical performance of the emitted flags and the correlation between manual and automated methods. A total of 1296 complete blood count (CBC) were obtained from the Hematology Section of the Unidade de Apoio Diagnóstico (UAD) of Clinic's Hospital of the Federal University of Paraná (HC-UFPR), which presented quantitative and qualitative flags (positive samples) emitted by the XE-5000. The criteria used to signal the CBC were defined by the UAD/HC-UFPR, together with the values pre-defined by the manufacturer. Microscopic analysis of the blood smear was performed following a protocol and positivity criteria for review of blood smear. The results of differential leucocytes count, and, immature granulocytes (IG), NRBC, platelets, showed an excellent correlation between methods ($r \geq 0.9$), except for basophils ($r = 0.5$). The specificity of the flags of blasts, IG, bands, atypical and abnormal lymphocytes, fragments and platelet clumps were superior to 91%. The sensitivity of these flags ranged from 23.7% to 100%. The NEUT-X and NEUT-Y, HFLC, FRC parameters did not present a good correlation with the manual method, but significant differences were found between the control group (negative samples) and the group of samples with alarms ($p < 0.05$). From the obtained results, it can be concluded that: (1) the leukocyte differential counts in general, present good correlation with the counts performed by microscopy; (2) the flags "Blast?" and, "Immat Gran?", "Left Shift?", "Atypical Lymph?", "NRBC?", "Fragments?", "Plaq Clumps?" presented high specificity and low sensitivity in the detection of these abnormalities; (3) the association of flags increases the sensitivity of these flags, especially the "Atypical Lymph?". It is important to note that the results of the present study should be analyzed in an individualized way, according the sampling characteristic and the technology used in the equipment studied.

Palavras-chave: Sysmex XE-5000. Flags. WBC differential count. Blasts. Immature granulocytes. Lymphocytes variants. Platelets.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS OBTIDOS NO SYSMEX XE-5000	63
TABELA 2 - TRIAGEM DAS EXTENSÕES SANGUÍNEAS.....	64
TABELA 3 - IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA SÉRIE VERMELHA ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS ANALISADAS.....	64
TABELA 4 - CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS MANUAL E AUTOMATIZADA.....	66
TABELA 5 - ALARMES QUANTITATIVOS LIBERADOS PELO SYSMEX XE-5000 DE ACORDO COM O CRITÉRIO DE POSITIVIDADE DEFINIDOS PELA UAD DO HC-UFPR	68
TABELA 6 - ALARMES QUALITATIVOS E AS ANORMALIDADES CORRESPONDENTES	68
TABELA 7 - TIPOS DE ALARMES QUE SUGEREM INTERFERENCIA ANALÍTICA PELO ANALISADOR HEMATOLÓGICO SYSMEX XE-5000	69
TABELA 8 - DESEMPENHO ANALÍTICO DO SYSMEX XE-5000	70
TABELA 9 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE NEUT-X E NEUT-Y	75
TABELA 10 - CORRELAÇÃO ENTRE NEUT-X E NEUT-Y E OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	75
TABELA 11 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE GRANULÓCITOS IMATUROS.....	76
TABELA 12 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE HFLC.....	76
TABELA 13 - CORRELAÇÃO ENTRE HFLC E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	76
TABELA 14 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE HEMOGRAMAS COM FRC	77

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CRITÉRIOS PARA A LÂMINA POSITIVA	28
QUADRO 2 - VALORES NORMAIS DE FRAGMENTOS ERITROCITÁRIOS.....	47
QUADRO 3 - SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E INCLUSÕES CITOPLASMÁTICAS DA SÉRIE VERMELHA.....	54
QUADRO 4 - SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PLAQUETAS GIGANTES	55
QUADRO 5 - ALARMES QUALITATIVOS LIBERADOS PELO SYSMEX XE-5000 QUE INDICAM ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS.....	57
QUADRO 6 - CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS PARA CLASSIFICAÇÃO DE LÂMINA POSITIVA.	58
QUADRO 7 - MATRIZ PARA ANÁLISE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ..	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PREPARAÇÃO DA EXTENSÃO SANGUÍNEA.....	21
FIGURA 2 - ÁREAS DA EXTENSÃO SANGUÍNEA	23
FIGURA 3 - DIAGRAMA DE DISPERSÃO DO CANAL DIFF	37
FIGURA 4 - DIAGRAMA DE DISPERSÃO DO CANAL IMI	37
FIGURA 5 - CAPTURA DE TELA DOS Q-FLAGS DO SYSMEX XE-5000	40
FIGURA 6 - ALARME DE GRANULÓCITOS IMATUROS DO SYSMEX XE-5000	41
FIGURA 7 - ALARME DE BLASTOS NO SYSMEX XE-5000	42
FIGURA 8 - ALARME DE LINFÓCITOS VARIANTES OU LINFOBLASTOS DO SYSMEX XE-5000	43
FIGURA 9 – DIAGRAMA DE DISPERSÃO DIFF E NRBC	44
FIGURA 10 - CANAL DIFF: DETECÇÃO DO NEUT-X E NEUT-Y	45
FIGURA 11 - CONTAGEM DE HFLC.....	46
FIGURA 12 - CANAL RET: CONTAGEM DE FRAGMENTOS ERITROCITÁRIOS	48
FIGURA 13 - DADOS FORNECIDOS PARA LEITURA DA EXTENSÃO SANGUÍNEA	51
FIGURA 14 - ÁREAS DA EXTENSÃO SANGUÍNEA PARA TRIAGEM.....	52
FIGURA 15 - PLANILHA DE REGISTRO DOS RESULTADOS DA TRIAGEM	53
FIGURA 16 - MORFOLOGIA DOS ESQUIZÓCITOS.....	54
FIGURA 17 - PLANILHA DE REGISTRO DOS RESULTADOS DOS ERITRÓCITOS E PLAQUETAS DAS LÂMINAS DE EXTENSÃO SANGUÍNEA.....	55
FIGURA 18 - MÉTODO DE RASTREAMENTO PARA CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS	56
FIGURA 19 - COMPARAÇÃO ENTRE A CONTAGEM MANUAL E AUTOMATIZADA DE PLAQUETAS.	65
FIGURA 20 – TAXAS DE VP, FP, VN E FN DO ALARME DE GRANULÓCITOS IMATUROS.....	71
FIGURA 21 - TAXAS DE VP, FP, VN E FN DO ALARME DESVIO A ESQUERDA	72
FIGURA 22 - TAXAS DE VP, FP, VN E FN DO ALARME DE BLASTOS.....	73

LISTA DE SIGLAS, SINAIS E ABREVIATURAS

CDL	- Contagem Diferencial de Leucócitos
CHCM	- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DIFF	- <i>Differentiation channel</i> ; canal de diferenciação dos leucócitos
DP	- Desvio Padrão
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetraacético
fL	- Fentolitros
FN	- Falso Negativo
FP	- Falso Positivo
FRC	- " <i>Fragmented red cell</i> "; Fragmentos eritrocitários ou esquizócitos
Hb	- Hemoglobina
HCM	- Hemoglobina Corpuscular Média
Hct	- Hematócrito
HFLC	- <i>High-fluorescing Lymphocyte Cells</i> ; Linfócitos de alta fluorescência
HPC	- <i>Hematopoetic Progenitor Cells</i> ; Célula Progenitora Hematopoiética
IG	- <i>Immature Granulocytes</i> ; Granulócitos Imaturos
IMI	- <i>Immature Myeloid Information</i> ; Canal de células mielóides imaturas
IPF	- <i>Immature Platelet Fraction</i> ; Fração de Plaquetas Imaturas
NEUT-X	- <i>Neutrophil scattering in X-axis</i>
NEUT-Y	- <i>Neutrophil scattering in Y-axis</i>
NRBC	- <i>Nucleated Red Blood Cell</i> ; Eritroblasto
Pg	- Picogramas
PLT	- Plaquetas
RBC	- <i>Red Blood Cell</i> ; Eritrócitos
RDW	- <i>Red Cell Distribution Width</i> ; índice de Anisocitose;
RET	- Reticulócitos
RF	- Radiofrequência
UAD	- Unidade de Apoio Diagnóstico
VCM	- Volume Corpuscular Médio
VN	- Verdadeiro Negativo
VP	- Verdadeiro Positivo
VPM	- Volume Plaquetário Médio

VPN - Valor Preditivo Negativo
VPP - Valor Preditivo Positivo
WBC - *White Blood Cell* - Leucócitos
% - Percentual
- Contagem absoluta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	HEMOGRAMA.....	19
3.2	ANÁLISE DA LÂMINA DE EXTENSÃO SANGUÍNEA.....	19
3.2.1	Preparação da Extensão Sanguínea.....	20
3.2.2	Coloração da extensão sanguínea	21
3.2.3	Análise da extensão sanguínea.....	22
3.2.4	Contagem Diferencial de Leucócitos	23
3.2.5	Limitações da Contagem Diferencial de Leucócitos	24
3.2.6	Padronização.....	25
3.3	REVISÃO DAS LÂMINAS.....	25
3.3.1	Critérios de revisão de lâmina	27
3.4	ANALISADORES HEMATOLÓGICOS	29
3.4.1	Desempenho analítico dos analisadores hematológicos.....	30
3.4.2	Alarmes	31
3.4.3	Novos parâmetros	33
3.4.4	Sysmex XE-5000	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL	49
4.2	ANÁLISE DAS LÂMINAS DE HEMOGRAMA.....	51
4.2.1	Triagem	52
4.2.2	Eritrograma e Plaquetas	53
4.2.3	Leucócitos e eritroblastos	55
4.3	TIPOS DE ALARMES.....	57
4.4	CRITÉRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DE LÂMINAS POSITIVAS	58
4.5	DESEMPENHO ANALÍTICO E DESENHO DO ESTUDO	58
4.6	PARÂMETROS DE PESQUISA	60
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5	RESULTADOS	63

5.1	ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	63
5.2	RESULTADO DA REVISÃO DAS LÂMINAS	63
5.2.1	Triagem	63
5.2.2	Eritrograma e Plaquetas	64
5.2.3	Leucócitos e eritroblastos	66
5.3	FREQUÊNCIAS DE AMOSTRAS COM SINALIZAÇÃO DE ALARMES	67
5.4	DESEMPENHO ANALÍTICO DO SYSMEX XE-5000	69
5.4.1	Alarmes de Granulócitos Imaturos.....	70
5.4.2	Alarme de Desvio a Esquerda	71
5.4.3	Alarme de Blastos.....	72
5.4.4	Alarme de Linfócitos Variantes	73
5.4.5	Alarme de Eritroblastos, agregados plaquetários e esquizócitos	74
5.5	PARÂMETROS DE PESQUISA	74
6	DISCUSSÃO	78
6.1	CORRELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS MANUAL E AUTOMATIZADA	79
6.2	DESEMPENHO ANALÍTICO DOS ALARMES	81
6.2.2	Desvio a esquerda.....	86
6.2.3	Blastos.....	87
6.2.4	Linfócitos variantes	90
6.2.5	Eritroblastos.....	93
6.2.6	Plaquetas e agregados plaquetários	95
6.2.7	Esquizócitos	96
6.3	PARÂMETROS DE PESQUISA	98
6.3.1	NEUT-X e NEUT-Y	98
6.3.2	HFLC	100
7	CONCLUSÃO.....	103
	REFERÊNCIAS.....	105
	APÊNDICE 1 - RESULTADOS DO DESEMPENHO DOS ALARMES	114
	ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	116
	ANEXO 2 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP - HC-UFPR	120
	ANEXO 3 – INSTRUÇÃO DE TRABALHO - ITR - UAD - HEM – Nº 004.....	125

1 INTRODUÇÃO

O hemograma é um dos exames mais requeridos nas consultas médicas, sendo utilizado na prática clínica como um exame de triagem geral do paciente permitindo uma análise global do sangue periférico e da medula óssea. O exame constitui um conjunto de testes laboratoriais que determinam os parâmetros quantitativos e qualitativos das células sanguíneas, obtidos por métodos manuais e/ou automatizados (PIERRE, 2002; PERKINS, 2003; RYAN, 2006; GROTTTO, 2009).

Durante as últimas décadas, com o advento dos analisadores hematológicos, houve uma grande evolução nas metodologias para realização do hemograma e gradualmente as técnicas manuais foram substituídas pelos sistemas automatizados. Os analisadores hematológicos automatizados ocupam um lugar chave nos laboratórios de análises clínicas, devido ao seu alto desempenho na contagem de células sanguíneas e na sua capacidade de detectar células anormais, sinalizadas através dos alarmes (WARD, 2000; LEHNER; GREVE; CASSENS, 2007; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008). Atualmente, os laboratórios estabelecem procedimentos padronizados baseados nos alarmes liberados pelo equipamento para avaliar a necessidade de uma revisão da lâmina de extensão sanguínea (BARNES et al., 2005; LECOMPTE; BERNIMOULIN, 2015).

O desempenho analítico dos analisadores hematológicos é obtido através da avaliação da sensibilidade, especificidade e dos valores preditivos dos alarmes emitidos pelo equipamento através da análise microscópica da extensão sanguínea (BUTTARELLO, 2004; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; BRIGGS et al., 2014). Apesar de ser considerado o método de referência, a contagem diferencial das células sanguíneas pela microscopia ótica requer profissionais experientes, o que representa um processo demorado para os laboratórios de análises clínicas, aumentando a carga de trabalho para equipes de profissionais cada vez menores (BENATTAR; FLANDRIN, 1999; HOUWEN, 2001; BAIN, 2005; BARNES et al., 2005).

O Sysmex XE-5000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japão) é um analisador hematológico totalmente automatizado que utiliza a tecnologia da citometria de fluxo fluorescente para realizar a contagem completa das células sanguíneas e uma contagem diferencial de leucócitos de seis partes. O equipamento gera alarmes específicos relacionados a possível presença de células patológicas como blastos, granulócitos imaturos e linfócitos variantes, indicando que um exame microscópico da

extensão sanguínea deve ser realizado. Além disso, o equipamento fornece parâmetros adicionais que não são usualmente liberados na rotina laboratorial, mas que tem grande potencial de aplicação clínica (LEHNER et al., 2007; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; PEKELHARING et al., 2010; BRIGGS et al., 2011; LECOMPTE; BERNIMOULIN, 2015; BAIN, 2016).

Nesta pesquisa, considerou-se relevante avaliar as informações fornecidas pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000, através da análise da extensão sanguínea pela microscopia ótica, a fim de verificar a confiabilidade dos alarmes emitidos e a qualidade dos critérios pré-estabelecidos pelo fabricante, visando otimizar o trabalho na rotina laboratorial do setor de hematologia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho analítico dos alarmes liberados pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 através da análise pela microscopia ótica de lâminas de extensão sanguínea coradas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade, especificidade e os valores preditivos dos alarmes liberados pelo Sysmex XE-5000 através da comparação com as contagens obtidas pela microscopia ótica;
- Correlacionar os parâmetros hematológicos liberados pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 e as contagens celulares realizadas pela microscopia ótica de acordo com os critérios de positividade definidos neste estudo;
- Avaliar a aplicabilidade dos parâmetros de pesquisa NEUT-X, NEUT-Y, HFLC e FRC como ferramenta diagnóstica na rotina laboratorial;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HEMOGRAMA

O hemograma é uma importante ferramenta diagnóstica utilizada na prática clínica pois fornece informações importantes sobre as alterações quantitativas e morfológicas dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, assim como a presença de precursores hematopoiéticos, células malignas ou parasitas intracelulares (PIERRE, 2002; RYAN, 2006; LEHNER et al., 2007)

As alterações nos parâmetros hematológicos representam um dos mais sensíveis indicadores de saúde do paciente, auxiliando na caracterização da gravidade de uma doença ou na investigação de uma anormalidade hematológica primária ou secundária, permitindo ao clínico a percepção da necessidade de outros exames laboratoriais ou clínicos. Desta forma, o hemograma contribui de forma indispensável no diagnóstico, avaliação e tratamento de um amplo espectro de doenças, desde estados inflamatórios até malignidades sanguíneas (PERKINS, 2003; GROTTTO, 2009; DENICOLA, 2011; ROUSSEL et al., 2012).

A quantificação das células sanguíneas é realizada rotineiramente pelos analisadores hematológicos automatizados e a classificação morfológica dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, incluindo a contagem diferencial de leucócitos, são realizados em parte pelos analisadores hematológicos e em parte, pela análise microscópica da lâmina de extensão sanguínea (PERKINS, 2003; LEHNER et al., 2007; GROTTTO, 2009; BAIN, 2016).

3.2 ANÁLISE DA LÂMINA DE EXTENSÃO SANGUÍNEA

A análise da lâmina de extensão sanguínea pela microscopia ótica é rotineiramente utilizada nos laboratórios de análises clínicas para identificar as células sanguíneas de acordo com suas características morfológicas, a fim de avaliar as variações no tamanho, cor, forma e a presença de inclusões citoplasmáticas, além da diferenciação das populações leucocitárias, que normalmente inclui uma contagem de 100 células (HOUWEN, 2000; PERKINS, 2003; GULATI et al., 2013). Os achados morfológicos observados na lâmina são avaliados junto com os valores fornecidos pelos analisadores hematológicos, além da verificação dos alarmes liberados pelo

equipamento, a fim de confirmar os resultados automatizados e fornecer informações adicionais, geralmente não discriminadas pelos analisadores hematológicos (PIERRE, 2002; BARNES et al., 2005; GULATI et al., 2013).

A avaliação cuidadosa de uma extensão sanguínea bem preparada, fornece uma riqueza de informações para o clínico e permite confirmar inúmeras patologias que podem ser diagnosticadas pela presença de determinadas anormalidades, como a presença de inclusões citoplasmáticas nos eritrócitos, que são fundamentais no diagnóstico diferencial de anemias, assim como a presença ou não de células imaturas e inclusões celulares, tais como grânulos tóxicos nos neutrófilos, que são importantes para o diagnóstico diferencial de processos infecciosos e malignos (PERKINS, 2003; RYAN, 2006). Dentro da avaliação da extensão sanguínea são realizadas também, uma revisão da contagem de plaquetas utilizando, por exemplo, o método de Fônio ou de Barbara O'Connor e a observação de alterações, como agregados plaquetários e macroplaquetas (GULATI et al., 2013; SILVA et al., 2016).

As qualidades desejáveis para a análise microscópica de uma extensão sanguínea dependem da qualidade da coloração e do preparo da extensão (BENATTAR; FLANDRIN, 1999; HOUWEN, 2000; CAPPELLETTI, 2005). Além disso, a análise microscópica exige tempo e elevada competência técnica dos profissionais envolvidos para sua realização (GULATI et al., 2002; PIERRE, 2002; BAIN, 2005).

3.2.1 Preparação da Extensão Sanguínea

O método de cunha é frequentemente utilizado para a preparação da lâmina de extensão sanguínea, também conhecido como “esfregaço”. A Figura 1 mostra o procedimento de preparo da extensão sanguínea.

Normalmente usa-se amostras de sangue venoso com anticoagulante K2 ou K3-EDTA, a partir da liberação do tubo pelo analisador hematológico automatizado. A extensão sanguínea ideal, que proporciona uma melhor análise morfológica das células sanguíneas, é preparada com sangue que não sofre a ação do EDTA, o que infelizmente, não é uma metodologia possível na rotina laboratorial (NCCLS, 2003; PERKINS, 2003).

FIGURA 1 - PREPARAÇÃO DA EXTENSÃO SANGUÍNEA



FONTE: PERKINS, (2003).

NOTA: Para preparar uma extensão sanguínea em lâmina de vidro pelo método de cunha, uma gota de sangue (aproximadamente 0,05 mL) é colocada no meio da lâmina de 25 x 75 mm a aproximadamente 1 a 2 cm de uma extremidade. Uma lâmina extensora é colocada sobre a lâmina de vidro em um ângulo de 30 a 45 graus e puxada para trás até fazer contato com a gota de sangue e permitir que o sangue se espalhe por capilaridade por toda a superfície de contato da extensora. Em seguida, a extensora é deslizada para a extremidade oposta da lâmina em um movimento contínuo e suave, fazendo com que o sangue seja puxado por trás dela. Esta técnica cria uma película de sangue de 3 a 4 cm de comprimento (CLSI, 2007; PERKINS, 2003).

Técnicas automatizadas para preparação e coloração das extensões sanguíneas foram desenvolvidas para produzir extensões mais uniformes. Extensores mecânicos imitam a técnica manual e são úteis quando uma grande quantidade de extensões sanguíneas precisa ser preparada. Estes equipamentos ajudam a eliminar algumas das variáveis associadas ao procedimento manual, possibilitando a padronização do processo e a preparação das extensões de acordo com as preferências do laboratório (BENATTAR; FLANDRIN, 1999; PERKINS, 2003; CLSI, 2007; SIMSON; GASCON-LEMA; BROWN, 2010).

Alguns equipamentos preparam e coram as extensões sanguíneas automaticamente quando programados em sincronização com o analisador hematológico. As lâminas são preparadas quando o analisador hematológico detecta anormalidades na amostra sanguínea de acordo com os parâmetros programados no equipamento pelo laboratório. Estas melhorias diminuíram o trabalho manual e consequentemente, otimizou o rendimento técnico e o tempo de liberação das amostras (CHABOT-RICHARDS; GEORGE, 2014)

3.2.2 Coloração da extensão sanguínea

A coloração da extensão sanguínea é um dos passos mais importantes na identificação dos componentes celulares. A finalidade da coloração é facilitar a

observação microscópica das células sanguíneas e diferenciá-las de acordo com suas características tintoriais.

As extensões sanguíneas são geralmente coradas com May-Grunwald-Giemsa, o qual é uma modificação do procedimento de Romanowsky, baseado na combinação de sais ácidos (eosina) e sais básicos (azul de metileno e produtos derivados da oxidação do azul de metileno).

A coloração ideal confere cores características de certos componentes da célula que são produzidos pela ação combinada dos corantes e do pH apropriado (6,4 a 7,0), permitindo, por exemplo a observação do núcleo dos leucócitos, de grânulos específicos de neutrófilos e de inclusões contendo RNA dispersas no citoplasma dos eritrócitos (PERKINS, 2003; CLSI, 2007).

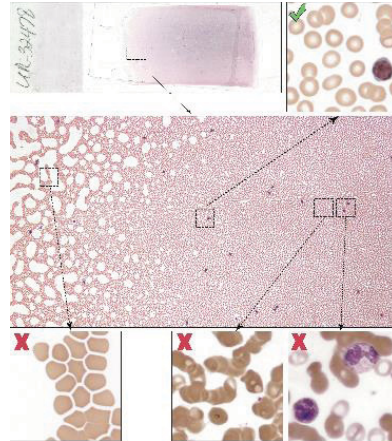
3.2.3 Análise da extensão sanguínea

Um exame completo da extensão sanguínea começa com uma inspeção visual no aumento de 1000x para avaliar a distribuição celular e a coloração (PERKINS, 2003; GULATI et al., 2013). Uma avaliação da presença de microrganismos e agregados plaquetários também é importante para confirmar a contagem de plaquetas realizada pelo equipamento (BOWEN et al., 1998; GULATI et al., 2013). A agregação plaquetária é provavelmente a causa mais comum da contagem automatizada de plaquetas erroneamente baixas (BRIGGS; HARRISON; MACHIN, 2007; BRUEGEL et al., 2015). Porém, a determinação de agregados plaquetários na extensão sanguínea depende de sua correta definição (GULATI et al., 2013). Existem poucas informações a respeito da quantidade e do método ideal para avaliação dos agregados plaquetários. Um agregado plaquetário pode ser definido como um conjunto de plaquetas agrupadas, mas esta definição é bastante subjetiva. O critério para detecção de agregados plaquetários descrito por Bowen e colaboradores (1998) considera a presença de no mínimo 5 agregados plaquetários com 5 ou mais plaquetas observadas no exame de extensão sanguínea. Em um outro estudo realizado por Gulati e colaboradores (2009), o critério de positividade considerado foi a presença de um ou mais agregados plaquetários observados no exame de extensão sanguínea.

No aumento de 400x se faz a seleção da área de trabalho, sendo o local onde a extensão sanguínea deve ser examinada. A área adequada para a análise da

morfologia celular é onde os eritrócitos estão em contato uns com os outros, não muito afastados, nem sobrepostos uns aos outros, sendo importante evitar a área em que a extensão é muito fina ou muito grossa, pois nessas áreas o erro é mais frequente conforme ilustrado na Figura 2 (PERKINS, 2003; RYAN, 2006; TKACHUK; HIRSCHMANN, 2007).

FIGURA 2 - ÁREAS DA EXTENSÃO SANGUÍNEA



FONTE: TKACHUK; HIRSCHMANN (2007)

NOTA: Regiões onde os eritrócitos estão bem espaçados uns dos outros ou quase se tocando são as áreas ideais para a análise morfológica das células sanguíneas (seta verde no painel acima). Deve-se evitar as áreas em que os eritrócitos são analisados muito perto da borda da extensão ("X" em vermelho à esquerda do painel abaixo) ou quando estão sobrepostos ou em aglomerados ("X" em vermelho à direita do painel abaixo).

Neste aumento pode-se também fazer uma estimativa da contagem dos leucócitos e sua morfologia e comparar com o resultado do equipamento.

No aumento de 1000x, com óleo de imersão, realiza-se a contagem diferencial de leucócitos, a avaliação da morfologia eritrocitária, como anisocitose, policromasia e inclusões celulares, a estimativa da quantidade de plaquetas e sua morfologia e a quantificação de eritroblastos (HOUWEN, 2000; PERKINS, 2003; RYAN, 2006).

3.2.4 Contagem Diferencial de Leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos consiste na quantificação percentual das populações de leucócitos presentes no sangue periférico (HOUWEN, 2001; PIERRE, 2002; PERKINS, 2003; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008).

Ao percorrer a área de exame da extensão sanguínea, conforme os leucócitos são encontrados, faz-se a identificação de suas principais características

morfológicas e então, os leucócitos são classificados em categorias individuais do mesmo tipo celular, até que 100 células sejam contadas. Porém, é importante salientar, quanto maior o número de células contadas, maior a precisão da contagem diferencial (RUMKE; BEZEMER; KUIK, 1975; PIERRE, 2002; GULATI et al., 2013)

As células distorcidas que são claramente identificáveis são incluídas na classificação adequada. Os eritroblastos são contados juntamente com a contagem diferencial de leucócitos, mas não incluídos na fórmula leucocitária. Os resultados são reportados com seu número relativo a 100 leucócitos contados (CLSI, 2007; GULATI et al., 2013; BAIN, 2016).

3.2.5 Limitações da Contagem Diferencial de Leucócitos

O procedimento tradicional de contagem diferencial de leucócitos é um paradigma discutido intermitentemente por apresentar limitações estatísticas inerentes a natureza do método, que levam a imprecisão e a inexatidão dos resultados e redução da sensibilidade clínica. As inúmeras limitações relatadas afetam a tomada de decisão clínica e estão associadas ao pequeno número de células contadas, a ampla variabilidade inter-observador e aos problemas de preparação da extensão sanguínea. O mais importante é o erro estatístico, porque está invariavelmente associado ao número total de células analisadas (RUMKE et al., 1975; HOUWEN, 2001; CORNBLEET, 2002; PIERRE, 2002; PERKINS, 2003; CLSI, 2007; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008)

Outros fatores que contribuem com a imprecisão da técnica manual incluem a distribuição das células sobre a lâmina e qualidade da coloração que são influenciadas pelas muitas variáveis do método de preparação da extensão sanguínea, incluindo o volume da gota de sangue, o ângulo da extensora em relação à superfície de apoio, a velocidade e a pressão do esfregaço sobre a lâmina (BENATTAR; FLANDRIN, 1999; PERKINS, 2003).

A subjetividade do observador é particularmente relevante para diferenciação das populações celulares. Apesar das tentativas de fornecer definições morfológicas viáveis para alguns tipos celulares, tais como bastonetes e linfócitos variantes, a divergência inter, e também intra-observador na identificação das células sanguíneas, pode resultar em diferenças significativas na quantificação das células, o que refletirá consequentemente no resultado do hemograma e no diagnóstico do paciente

(HOUWEN, 2001; CORNBLEET, 2002; VAN DER MEER et al., 2006; CLSI, 2007; VAN DER MEER et al., 2007).

3.2.6 Padronização

Para avaliar qualquer método de contagem diferencial de leucócitos, é necessário definir um método comparativo ou de referência. Barnes e colaboradores (2005) salientaram a importância de padronizar o método para leitura das lâminas para que haja uniformidade entre os profissionais que realizam a contagem diferencial de leucócitos.

Em 1992, o NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) publicou um documento (H20-A), atualizado posteriormente pelo documento H20-A2, publicado em 2007 pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), em que se estabelece normas para avaliação da contagem diferencial de leucócitos automatizada, com base na contagem diferencial pela microscopia ótica. Uma contagem de 400 células (200 por cada examinador) é atualmente reconhecida pelo CLSI como meio de gerar uma contagem diferencial de leucócitos de referência na comparação de métodos ou validações (CLSI, 2007; ALLOU et al., 2015).

Mesmo assim, esse método apresenta pouca precisão para tipos celulares que apresentam problemas de distribuição, como os monócitos, ou de baixa frequência, como os basófilos. A exatidão e precisão estatística do método é agravada pela subjetividade inerente a distinção de alguns tipos de celulares (HOUWEN, 2001; CAPPELLETTI, 2005; ROUSSEL et al., 2012).

A examinação da extensão sanguínea, embora muito trabalhosa, continua sendo utilizada como uma importante ferramenta diagnóstica e como método de referência para identificar com precisão células anormais que não são identificadas pelos analisadores hematológicos (BENATTAR; FLANDRIN, 1999; STAMMINGER et al., 2002; BAIN, 2005).

3.3 REVISÃO DAS LÂMINAS

Antes da introdução de equipamentos automatizados, era comum a prática de preparar, corar, examinar a lâmina de extensão sanguínea e realizar a contagem diferencial de leucócitos de 100 ou 200 células em todos os hemogramas, sejam eles

feitos por meio de técnicas manuais ultrapassadas ou modernos analisadores hematológicos automatizados. Esta ideia ocorreu devido a uma crença generalizada de que era necessário evitar erros significativos causados por resultados falso-negativos por parte dos equipamentos (PIERRE, 2002).

O aperfeiçoamento da análise e identificação das células sanguíneas aplicados nos novos analisadores hematológicos possibilitou a liberação direta do hemograma sem a necessidade da revisão da extensão sanguínea pela microscopia ótica (PIERRE, 2002; FERNANDES; HAMAGUCHI, 2007; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; PRATUMVINIT et al., 2013).

Os avanços tecnológicos aumentaram a precisão e a acurácia dos analisadores hematológicos e proporcionaram maior sensibilidade para a detecção de anormalidades sanguíneas, restringindo a revisão da lâmina apenas para amostras sinalizadas pelos equipamentos. Desta forma, houve uma considerável redução na taxa de revisões de lâmina e conseqüentemente uma melhora significativa no fluxo de trabalho dos laboratórios (PIERRE, 2002; BAIN, 2005)

Hoje, a prática comum de muitos laboratórios é realizar a revisão microscópica da lâmina somente em casos selecionados: (a) quando os parâmetros ultrapassam os limites definidos pelo laboratório ou (b) quando anormalidades morfológicas são detectadas pelo equipamento, as quais são sinalizadas através dos alarmes (PIERRE, 2002; BAIN, 2005; GULATI et al., 2013).

Alguns elementos celulares patológicos são registrados pelo equipamento, porém, o sistema automatizado não é capaz de classificá-lo com precisão sob o ponto de vista morfológico, o que só pode ser realizado por um analista clínico, com conhecimento e experiência, o qual correlaciona os dados fornecidos pelo analisador, com os achados morfológicos observados no exame da extensão sanguínea (GULATI et al., 2002; BAIN, 2005; BARNES et al., 2005; LECOMPTE; BERNIMOULIN, 2015).

Muitos laboratórios utilizam o alarme como um gatilho para avaliação morfológica da extensão sanguínea, independentemente da utilidade clínica do alarme. Essa prática pode proporcionar o uso inadequado de informações clínicas, além de indicar o uso ineficiente dos recursos valiosos fornecidos pelos equipamentos (BAIN, 2005; SIRECI et al., 2010a; COMAR; MALVEZZI; PASQUINI, 2017).

As taxas de revisão variam de 10% a 50% em diferentes laboratórios (BARNES et al., 2005). Os fatores que influenciam na taxa de revisão incluem (1) o tipo de população atendida, (2) o modelo do analisador hematológico e (3) o conjunto de

critérios estabelecidos para sinalização de anormalidades pelos analisadores hematológicos (PETERSON et al., 2001; GULATI et al., 2002; SIRECI; SCHLABERG; KRATZ, 2010b).

3.3.1 Critérios de revisão de lâmina

Os critérios de revisão de lâmina devem ser definidos pelos laboratórios, na tentativa de reduzir a quantidade de revisão das extensões sanguíneas e ao mesmo tempo, de minimizar a liberação de resultados errados (BAIN, 2005; SIRECI et al., 2010a; COMAR et al., 2017).

Diversos fatores influenciam o processo de elaboração dos critérios de revisão, tais como a população atendida, o significado clínico das anormalidades detectadas no hemograma, o volume de trabalho, a quantidade e a capacidade da equipe técnica e os sistemas automatizados (PETERSON et al., 2001; GULATI et al., 2002; BAIN, 2005; BARNES et al., 2005; GULATI et al., 2013).

A sensibilidade e a precisão na detecção e quantificação de células sanguíneas dependem da tecnologia utilizada em cada equipamento. Por isso os critérios devem ser estabelecidos de acordo com cada tipo de analisador, conhecendo os níveis de confiabilidade do sistema de sinalização utilizado, porque diferentes analisadores podem fornecer parâmetros que não são encontrados em outros equipamentos (PIERRE, 2002; GROTTTO, 2009; COMAR et al., 2017).

Além disso, o conjunto de critérios de revisão desenvolvido por um laboratório, com valores acima ou abaixo do intervalo especificado, devem ser estabelecidos para cada tipo celular (COMAR et al., 2017). A escolha de critérios muito amplos para selecionar as extensões sanguíneas que serão revisadas, diminui a quantidade de revisões e aumenta a velocidade de trabalho, porém, amplia a possibilidade de resultados liberados incorretamente, os quais poderiam ter relevância clínica. Por outro lado, critérios muito restritos, não contribuem satisfatoriamente com a carga de trabalho do laboratório (LANTIS et al., 2003; BARNES et al., 2005; GROTTTO, 2009; SIRECI et al., 2010b).

Alguns equipamentos possuem sistemas que permitem a programação de critérios, com valores de corte que servem como uma triagem para selecionar as amostras que devem ser revisadas, direcionando a amostra para um sistema

automatizado que realiza a confecção de extensão sanguínea, ou para a realização de nova contagem (CHAPMAN, 2000; COMAR et al., 2017)

Os critérios de revisão de lâmina devem, portanto, conduzir a revisão microscópica somente para os casos em que seja necessário a confirmação dos resultados ou para fornecer informações clínicas relevantes, adicionais àquelas geradas pelos analisadores hematológicos, otimizando assim, a produtividade do laboratório (GULATI et al., 2002; LANTIS et al., 2003; BARNES et al., 2005; PRATUMVINIT et al., 2013).

Devido à pouca uniformidade dos critérios existentes entre os diferentes laboratórios, em 2002, o Grupo de Consenso Internacional de Hematologia da *International Society for Laboratory Hematology* (ISLH), estabeleceu um conjunto de critérios que ajudaram a definir os resultados anormais (positivo) de acordo com a importância clínica dos resultados da extensão sanguínea (BARNES et al., 2005). Os critérios utilizados pelo Grupo de Consenso para definir uma lâmina positiva estão demonstrados no Quadro 1.

QUADRO 1 - CRITÉRIOS PARA A LÂMINA POSITIVA

<p>1. Morfologia</p> <p>a) Morfologia dos eritrócitos de 2 + / moderado ou superior. A única exceção é a malária, onde qualquer achado será considerado um resultado positivo.</p> <p>b) Morfologia das plaquetas (plaquetas gigantes) de 2 + / moderada ou superior.</p> <p>c) Agregados de plaquetas de > raro / ocasional.</p> <p>d) Corpúsculos de Döhle de 2 + / moderada ou superior.</p> <p>e) Granulações tóxicas de 2 + / moderada ou superior.</p> <p>f) Vacúolos de 2 + / moderada ou superior.</p> <p>2. Tipos celulares anormais</p> <p>a) Blastos \geq 1</p> <p>b) Meta > 2</p> <p>c) Mielo / promielócito \geq 1</p> <p>d) Linfócitos atípicos > 5</p> <p>e) Eritroblasto \geq 1</p> <p>f) Células plasmáticas \geq 1</p>

FONTE: Barnes et al., (2005).

NOTA: O sinal "+" significa o sistema de quantificação em cruces.

O objetivo do Grupo de Consenso foi reduzir o número de amostras que requeriam procedimentos manuais, sugerindo aos laboratórios, que ao desenvolver seu próprio conjunto de critérios para revisão das lâminas, considerem as orientações

propostas pelo Grupo, que incluem 41 regras para tomada de ação após análises automatizadas do hemograma (BAIN, 2005; BARNES et al., 2005).

As definições morfológicas dos tipos celulares e os valores de corte para considerar uma extensão sanguínea como positiva não são plenamente abordadas pelo Grupo de Consenso, como agregados plaquetários e fragmentos eritrocitários, sendo necessário informações adicionais para estabelecer critérios bem definidos pelos laboratórios para considerar uma extensão sanguínea como positiva (BOWEN et al., 1998; GULATI et al., 2002; GULATI et al., 2009; ZINI et al., 2012).

3.4 ANALISADORES HEMATOLÓGICOS

Nas últimas décadas houve uma grande evolução das tecnologias empregadas nos analisadores hematológicos. A introdução de novos princípios físicos para análise celular, o uso combinado de tecnologias e o desenvolvimento de softwares para a interpretação e processamento dos dados gerados pelos equipamentos, conduziu a uma melhora significativa nas contagens das células sanguíneas e na emissão de alarmes, permitindo a liberação de resultados cada vez mais confiáveis (FUJIMOTO et al., 2000; STAMMINGER et al., 2002; ARROYO et al., 2005; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; KANG et al., 2008).

Os laboratórios clínicos que antes geravam toda a quantidade de dados fornecidos no hemograma por técnicas manuais, tem agora os dados gerados em grande parte por sistemas automatizados. A delegação dessas atividades para os equipamentos deixou os profissionais dos laboratórios livres para dirigir sua atenção para mais atividades, como a supervisão do sistema de análise e a interpretação dos resultados (BENTLEY, 1990).

A maioria dos analisadores hematológicos automatizados aspiram o sangue previamente coletado e realizam automaticamente todas as determinações quantitativas, como a dosagem da hemoglobina, hematócrito, a contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas e a diferenciação celular, utilizando múltiplos canais. Os vários parâmetros liberados, são executados em menos de um minuto, com um pequeno volume de amostra e com grande precisão nos resultados (CHAPMAN, 2000; PERKINS, 2003; LEHNER et al., 2007; BAIN, 2016).

Diferentes métodos, baseados nos princípios elétricos e óticos ou a associação dos dois, podem ser utilizados para a determinação dos parâmetros

hematológicos do hemograma, como, condutividade por radiofrequência, corrente direta e métodos de dispersão, absorção da luz e a emissão de fluorescência, precedida de reações citoquímicas (WARD, 2000; LEHNER et al., 2007; BAIN, 2016).

Modelos mais recentes de analisadores hematológicos têm melhorado a identificação dos estágios de maturação das células pela associação da citometria de fluxo com a coloração fluorescente, sendo uma alternativa para a contagem diferencial de leucócitos, devido à sensibilidade proporcionada pelas milhares de células analisadas de forma padronizada em cada corrida e à especificidade da linhagem de anticorpos monoclonais, que permitem detectar e quantificar as populações de leucócitos normais e anormais. Esta tecnologia está atualmente integrada nos analisadores hematológicos de vários fabricantes, incluindo a Sysmex Corporation (Kobe, Japão) (FUJIMOTO, 1999; FERNANDES; HAMAGUCHI, 2007; ALLOU et al., 2015; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015).

As vantagens dos métodos automatizados em relação aos métodos manuais incluem a contagem de um grande número de células, melhor reprodutibilidade e resultados com maior validade estatística, pela redução do coeficiente de variação, causado principalmente por erros na medição da amostra, diluição ou enumeração das células. Além disso, o tempo de liberação dos resultados pelo método automatizado é mais rápido, pois elimina as preparações manuais da amostra e a análise do hemograma pela microscopia ótica. Os custos laboratoriais são significativamente mais baixos, pois a técnica manual requer pessoas qualificadas e com experiência em morfologia celular para realização deste exame, além da maior precisão nos resultados, pois elimina a subjetividade de critérios de reconhecimento celular, diminuindo a variabilidade inter-observador, que ocorre no método manual (BAIN, 2005; SIRECI et al., 2010b; DENICOLA, 2011; PRATUMVINIT et al., 2013).

3.4.1 Desempenho analítico dos analisadores hematológicos

O desempenho analítico dos analisadores hematológicos pode ser avaliado por meio de testes de precisão, exatidão e sensibilidade clínica. Para esta avaliação, a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e a eficiência global dos alarmes são obtidos a partir da correlação dos achados observados pela microscopia ótica com o alarme sinalizado pelo equipamento (ICSH, 1994; CLSI, 2007; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; BRIGGS et al., 2014).

A sensibilidade de um alarme se refere à capacidade do equipamento em detectar amostras com achados morfológicos relevantes na presença de determinada anormalidade, ou seja, com resultados verdadeiro-positivos. A especificidade de um alarme é a capacidade em detectar amostras verdadeira-negativas, ou seja, mostrar resultados negativos quando uma anormalidade não está presente. 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 (CLSI, 2007; BRIGGS et al., 2014).

Para os parâmetros tradicionais, o desempenho analítico dos analisadores hematológicos tem se mostrado eficiente (FUJIMOTO et al., 2000; BARNES et al., 2005; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008). O método automatizado é considerado superior ao método manual para a contagem diferencial de leucócitos com valores dentro do intervalo de referência e para amostras que exibem apenas anormalidades quantitativas. Por outro lado, para amostras que apresentam anormalidades morfológicas, a microscopia ótica é superior ao método automatizado (FUJIMOTO et al., 2000; PIERRE, 2002; PERKINS, 2003; FERNANDES; HAMAGUCHI, 2007; CUI et al., 2010; BRIGGS et al., 2012).

3.4.2 Alarmes

Um resultado sinalizado com um alarme (*flag*) é uma indicação do equipamento de que uma avaliação morfológica da extensão sanguínea é necessária para validar a contagem diferencial e ainda definir o tipo de anormalidade detectada. Os alarmes podem ser divididos em dois grupos: alarmes quantitativos e qualitativos.

Os alarmes quantitativos ou "definitivos" são desencadeados quando os resultados dos parâmetros hematológicos ultrapassaram determinados valores definidos pelo laboratório ou fabricante.

Os alarmes qualitativos ou "suspeitos", são incorporados a tecnologia do equipamento e disparados com base na detecção de alterações na distribuição de populações celulares ou na detecção de possíveis interferências dessas distribuições, indicando que os resultados do equipamento não são confiáveis (LANTIS et al., 2003;

FERNANDES; HAMAGUCHI, 2007; SIRECI et al., 2010b; CHHUY et al., 2013; EILERTSEN; VOLLESTAD; HAGVE, 2013; BRIGGS et al., 2014).

As células anormais possuem características peculiares, tais como tamanho celular, nuclear e conteúdo de grânulos citoplasmáticos, que as diferenciam das células normais, fazendo com que se localizem em determinadas áreas no diagrama de dispersão, diferentes das posições das células normais. Quando são detectados eventos nas áreas de células patológicas, um alarme suspeito é disparado, combinado com a utilização de vários algoritmos pelo software do equipamento (CHHUY et al., 2013; EILERTSEN et al., 2013; BAIN, 2016).

A presença de um ou mais alarmes não indica necessariamente que uma anormalidade específica esteja presente na amostra sanguínea. Esta sinalização apenas indica uma maior probabilidade da presença de uma anormalidade, com base no aumento do número de células em áreas definidas nos diagramas de dispersão, que só podem ser excluídas ou comprovadas pela avaliação da extensão sanguínea através da microscopia ótica (SIRECI et al., 2010b; EILERTSEN et al., 2013).

A utilidade dos alarmes para fins diagnósticos depende de sua sensibilidade e especificidade e resultam de ajustes na configuração do equipamento e nos limites definidos pelo usuário, baseados nos critérios de revisão de lâminas (BARNES et al., 2005; SIRECI et al., 2010b; CHABOT-RICHARDS; GEORGE, 2014).

Os fatores e algoritmos que determinam a liberação dos alarmes dependem da tecnologia do equipamento e variam de um fabricante para outro. Desta forma, o ajuste na sua configuração envolve um cuidadoso equilíbrio entre o potencial risco de perder quaisquer células anormais, com limiares fixados em valores muito baixos, e o aumento do tempo de liberação, do trabalho manual e dos custos causados por um aumento da taxa de revisão, com limiares definidos em valores elevados. Em muitos casos, os laboratórios utilizam as configurações recomendadas pelo fabricante ou fazem os ajustes por processos de tentativa e erro, sem uma compreensão clara das consequências exatas desses ajustes (SIRECI et al., 2010b; CHABOT-RICHARDS; GEORGE, 2014).

Diversos estudos buscam esclarecer ou determinar a concordância entre a emissão de alarmes liberados pelos equipamentos automatizados e sua comprovação na revisão das lâminas. Porém, uma grande quantidade de alarmes que o equipamento pode liberar, parecem anular as vantagens da automação, por culminar em um grande número de amostras que requerem uma revisão de lâmina sem

comprovar estas sinalizações (BRIGGS et al., 2000; WARD, 2000; LANTIS et al., 2003; FERNANDES; HAMAGUCHI, 2007; CUI et al., 2010; CHHUY et al., 2013; EILERTSEN et al., 2013; PRATUMVINIT et al., 2013; BRUEGEL et al., 2015). Cerca de 80% das revisões de lâmina são realizadas após a liberação de alarmes (NOVIS et al., 2006; BRIGGS et al., 2011).

O ideal é que um alarme apresente uma baixa taxa de resultados falso-positivos e falso-negativos, mostrando 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 (CLSI, 2007; BRIGGS et al., 2012; COMAR et al., 2017).

Os critérios definidos pelo laboratório são, portanto, importantes para a taxa de revisão e a carga de trabalho, devendo o laboratório fazer um cuidadoso ajuste nos valores de corte para alcançar um equilíbrio entre a redução no número de lâminas a serem revisadas sem aumentar o risco de não-detecção de células patológicas (BRIGGS et al., 2011; EILERTSEN et al., 2013).

3.4.3 Novos parâmetros

Os analisadores hematológicos tornaram-se cada vez mais sofisticados e a gama dos parâmetros disponíveis é cada vez maior. Atualmente, a maioria dos laboratórios dispõe de equipamentos que oferecem além dos parâmetros tradicionais como a contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, os parâmetros estendidos do hemograma, também chamados de novos parâmetros (BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; BRIGGS et al., 2011; LECOMPTE; BERNIMOULIN, 2015).

A contagem estendida é a contagem de outros tipos celulares, além das populações de células normalmente presentes no sangue periférico e incluem as células imaturas ou atípicas, como blastos, granulócitos imaturos, linfócitos atípicos, células progenitoras hematopoiéticas (HPCs), eritroblastos, fração de plaquetas imaturas, fração de reticulócitos imaturos, esquizócitos (FRC), entre outras (BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; CHABOT-RICHARDS; GEORGE, 2014; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015; LECOMPTE; BERNIMOULIN, 2015).

A validação e aplicação clínica dos novos parâmetros ainda é assunto controverso. Muitos dos tipos celulares representados na contagem diferencial

estendida estão muitas vezes presentes no sangue em número reduzido, não sendo possível utilizar a contagem manual de referência para sua validação, por causa da enorme imprecisão em contagens celulares muito baixas (RUMKE et al., 1975; FUJIMOTO et al., 2000; HOUWEN, 2001; BRIGGS et al., 2014; ALLOU et al., 2015; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015).

Nem todos os novos parâmetros já estão disponíveis para uso clínico; muitos são designados pelo fabricante apenas como "para uso em pesquisa", entre eles podemos citar os linfócitos altamente fluorescentes (HFLC), o NEUT-X e o NEUT-Y (BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; LECOMPTE; BERNIMOULIN, 2015).

Alguns destes parâmetros de pesquisa parecem ser importantes, mas sua utilidade clínica ainda é pouco fundamentada. O controle de qualidade externo e interno nem sempre é disponível e sua reprodutibilidade não é bem definida (BRIGGS, 2009; BRIGGS et al., 2014; LECOMPTE; BERNIMOULIN, 2015).

É importante lembrar que parâmetros com o mesmo nome ou com nomes diferentes, mas com a mesma aplicação clínica, muitas vezes não são intercambiáveis devido a diferenças acentuadas em princípios de medição, calibração e algoritmos. O exemplo mais conspícuo é o volume plaquetário médio (VPM), que apesar de disponível na maioria dos equipamentos tem seu uso clínico indefinido (BUTTARELLO, 2004; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; BRIGGS, 2009; BRIGGS et al., 2014; LECOMPTE; BERNIMOULIN, 2015).

3.4.4 Sysmex XE-5000

A Sysmex desenvolveu o sistema XE-5000, baseado no modelo XE-2100, que incorpora a citometria de fluxo com a fluorescência aos múltiplos canais para fornecer a contagem completa de leucócitos, eritrócitos e plaquetas usando o foco hidrodinâmico, com diferencial de leucócitos em 6 partes, que inclui a impedância e a corrente em radiofrequência para determinar a estrutura interna das células e classificar as células imaturas (RUZICKA et al., 2001; CHHUY et al., 2013; BAIN, 2016).

O equipamento tem uma capacidade de executar 150 amostras por hora, fornecendo 31 parâmetros, incluindo a proporção de eritroblastos, HPCs, blastos, agregados plaquetários, fração de reticulócitos e fragmentos eritrocitários (BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; SYSMEX, 2013). O equipamento é capaz de

detectar células progenitoras hematopoiéticas diretamente do tubo de EDTA sem qualquer preparação adicional da amostra (BRIGGS et al., 2011; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015). Alguns novos parâmetros foram introduzidos neste modelo, como a contagem de granulócitos imaturos (IG - *Immature Granulocytes*) e a contagem ótica de plaquetas (PLT-O), além da análise de líquidos biológicos (PEKELHARING et al., 2010; BRIGGS et al., 2011; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015).

O XE-5000 utiliza o método ótico baseado no princípio de dispersão de luz para identificar e enumerar os tipos celulares de acordo com o seu tamanho, complexidade interna e fluorescência, ou podem emitir sinais (*flags*) quando existe a suspeita da presença de células patológicas, indicando a necessidade de uma revisão manual da amostra (BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; BRIGGS et al., 2011).

Neste sistema, as células são direcionadas uma a uma por meio de uma câmara de fluxo, geralmente por focalização hidrodinâmica, por onde passa um feixe de laser monocromático. As células, ao incidirem sobre o laser provocam alterações no feixe de luz, o qual é captado por fotomultiplicadores ou fotodiodos, convertendo-se em impulsos elétricos. O número de vezes e a intensidade que a luz dispersa incide sobre os fotodetectores possibilita a numeração e a identificação das células (CHAPMAN, 2000; LEHNER et al., 2007).

A contagem diferencial de leucócitos é determinada em dois canais, o canal DIFF (contagem diferencial em cinco partes – neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e granulócitos imaturos) e o canal WBC/BASO (contagem global de leucócitos e contagem diferencial de basófilos). A diferenciação dos leucócitos consiste numa reação citoquímica das células, utilizando um marcador de fluorescência à base de polimetina que se liga aos ácidos nucleicos, seguida por uma análise de fluorescência por citometria de fluxo (BRIGGS et al., 2011; SYSMEX, 2011a; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015). Quando uma célula atravessa a câmara de fluxo e colide com um laser semiconductor, causa uma alteração mensurável no feixe de luz, com um comprimento de onda característico, que por sua vez pode ser detectado por sensores fotóticos dispostos em vários ângulos, gerando três sinais óticos que são utilizados para determinar o tamanho, o conteúdo interno, bem como informações sobre o conteúdo de DNA e RNA das células (BRIGGS et al., 2011; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015; BAIN, 2016; SYSMEX, 2018). Esses detectores fotodiodos medem a luz dispersa no ângulo frontal (chamado *forward-scattered light* -

FSC) e é usada como um indicador do tamanho da célula. Os sinais de medição da luz dispersa lateralmente (chamado *side-scattered light* - SSC) fornecem informações sobre a complexidade interna da célula e é proporcional à granularidade celular. A emissão de luz fluorescente detectada lateralmente (chamado *side fluorescence light* - SFL), corresponde à concentração de ácidos nucleicos, ou seja, a soma de DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico) dentro da célula. Os três sinais óticos são analisados e descritos em um diagrama de dispersão. As células com propriedades citoquímicas semelhantes caem dentro da mesma área do diagrama e podem ser separadas através de um algoritmo de software avançado chamado *Adaptive Cluster Analysis System* (ACAS) no lugar dos convencionais discriminadores de populações celulares (RUZICKA et al., 2001; CHHUY et al., 2013; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015; SYSMEX, 2018).

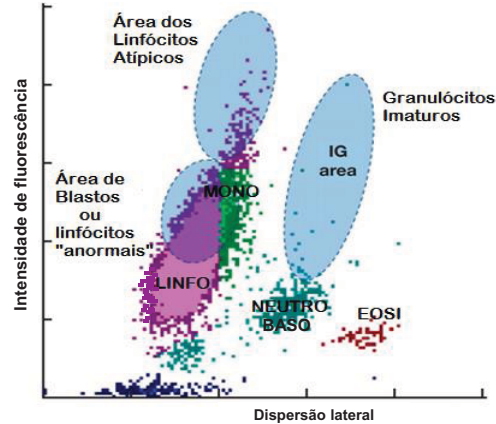
No canal DIFF, o diagrama de dispersão da fluorescência lateral é representado pelo eixo y e a luz de dispersão lateral pelo eixo x, permitindo que os analisadores da Série-XE diferenciem as populações leucocitárias. Leucócitos normais possuem diferentes localizações no diagrama de dispersão em relação às células patológicas, o que permite classificar as diferentes populações celulares. Os *flags* são gerados quando o analisador detecta eventos que se encontram fora das áreas de populações celulares normais. A Figura 3 mostra a localização das células normais e os alarmes suspeitos que são gerados a partir do canal DIFF em combinação com o canal IMI (do inglês "*Immature Myeloid Information*": Canal de células mielóides imaturas) (BRIGGS et al., 2011; EILERTSEN; HAGVE, 2014; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015; SYSMEX, 2018).

No canal WBC/BASO são detectados os basófilos. Um reagente específico lisa os eritrócitos e encolhe os leucócitos, nos quais as membranas são perfuradas e o conteúdo citoplasmático é extravasado, com a exceção dos basófilos, que são resistentes à lise. As diferenças resultantes entre os basófilos e outras células são analisadas e diferenciadas usando informações da luz frontal e lateral (tamanho e complexidade interna, respectivamente) (BRIGGS et al., 2011; SYSMEX, 2018).

O canal IMI detecta seletivamente as células imaturas da série mielóide. Após exposição das células a um reagente específico, as membranas dos eritrócitos e leucócitos maduros são rompidas devido ao alto teor de lipídios, enquanto que as células imaturas são menos afetadas pelo reagente. Depois dessa reação, as células são categorizadas em células maduras e imaturas através dos princípios de medição

de radiofrequência e corrente direta, para gerar informações sobre a composição interna da célula (núcleo, grânulos) e o volume celular (Figura 4) (BRIGGS et al., 2011; CIMENTI et al., 2012; EILERTSEN; HAGVE, 2014; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015; SYSMEX, 2018).

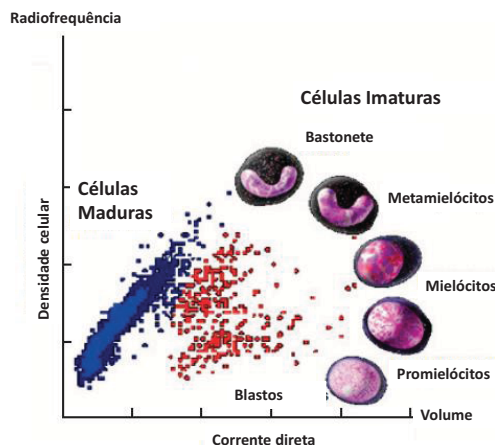
FIGURA 3 - DIAGRAMA DE DISPERSÃO DO CANAL DIFF



FONTE: Adaptado de BRIGGS et al., (2011).

NOTA: O canal DIFF utiliza a combinação dos sinais óticos da dispersão lateral (granularidade), representada no eixo x, e da intensidade de fluorescência (RNA e DNA celular), representada no eixo y, para contagem diferencial de leucócitos. Os leucócitos têm localizações diferentes no diagrama de dispersão em relação às células patológicas. Os pontos azuis próximos ao eixo x são células fantasmas; os aglomerados azul turquesa, neutrófilos e basófilos (NEUTRO e BASO); pontos rosas, linfócitos (LINFO); pontos verdes, monócitos (MONO); e pontos laranja, eosinófilos (EOSI). Os granulócitos imaturos apresentam maior fluorescência que os neutrófilos e aparecem acima dos neutrófilos no círculo azul descrito como IG área (BRIGGS et al., 2011).

FIGURA 4 - DIAGRAMA DE DISPERSÃO DO CANAL IMI



FONTE: Adaptado de BRIGGS et al., (2011).

NOTA: As informações sobre as células imaturas são derivadas do canal de células mielóides imaturas (IMI) que utiliza os princípios de medição de radiofrequência e corrente direta para gerar informações sobre a composição interna da célula (núcleo, grânulos) e o volume celular, respectivamente, e desta forma, o Sysmex XE-5000 é capaz de distinguir seletivamente as células imaturas das células maduras. As células mielóides imaturas não são modificadas em seu tamanho, estrutura e integridade pelo reagente Stromatolyser-IM, devido ao menor conteúdo de colesterol e a uma composição diferente de fosfolípidos na membrana celular (BRIGGS et al., 2011; CIMENTI et al., 2012; EILERTSEN; HAGVE, 2014).

Os eritrócitos e as plaquetas são enumerados no canal RBC/PLT, utilizando o método da impedância elétrica seguida de focalização hidrodinâmica (BAIN, 2016; SYSMEX, 2018). No princípio de impedância elétrica, os eritrócitos e plaquetas são medidos pelo número e pela intensidade de pulsos elétricos gerados quando as células passam por uma abertura em uma câmara de fluxo. Um gráfico conhecido com histograma é plotado de acordo com a quantidade de pulsos gerados e a intensidade de cada pulso, os quais correspondem ao número e ao volume dos eritrócitos e das plaquetas, respectivamente, sendo liberado com o resultado das contagens celulares (PERKINS, 2003; LEHNER et al., 2007; BAIN, 2016).

A partir dos dados gerados pelo histograma, o equipamento obtém o hematócrito (HCT) e o número total de eritrócitos para calcular os parâmetros VCM (Volume Corpuscular Médio), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e o RDW (*Red Cell Distribution Width*). O desvio padrão e o coeficiente de variação do RDW são liberados como RDW-SD (*Red Cell Distribution width Standard Deviation*) e RDW-CV (*Red Cell Distribution width Coefficient of Variation*). Desta forma, também são determinados o PCT (uma medida derivada da contagem de plaquetas e do volume médio de plaquetas), o VPM (*Mean Platelet Volume - MPV*) e o PDW (*Platelet Distribution Width*).

O XE-5000 realiza a determinação da hemoglobina por espectrofotometria utilizando o surfactante laurel sulfato de sódio (SLS), um reagente livre de cianeto, que apresenta uma excelente correlação com o método de referência. A hemoglobina é analisada em um canal separado, minimizando a interferência de concentrações elevadas de leucócitos (FUJIMOTO, 1999; SYSMEX, 2013;2018).

Com a obtenção do conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos, o equipamento calcula a HCM, a CHCM, a porcentagem de hipocromia (%Hypo-He) e de hiperchromia (%Hyper-He) dos eritrócitos e quantifica a proporção de eritrócitos microcíticos (%Micro R) e macrocíticos (%Macro R), sendo considerados ferramentas importantes no diagnóstico do metabolismo anormal do ferro e a resposta à suplementação de ferro ou folato (BORQUE; ESCANERO; URRECHAGA, 2009; BRIGGS et al., 2011).

A tecnologia de citometria de fluxo fluorescente também é utilizada para analisar de forma eficiente e reprodutível a contagem de reticulócitos, seus estágios de maturação, plaquetas imaturas e fragmentos de eritrócitos. No canal de RET/PLT-O, o surfactante em RET-SEARCH (II) perfura levemente as membranas celulares dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, permitindo que o marcador de fluorescência

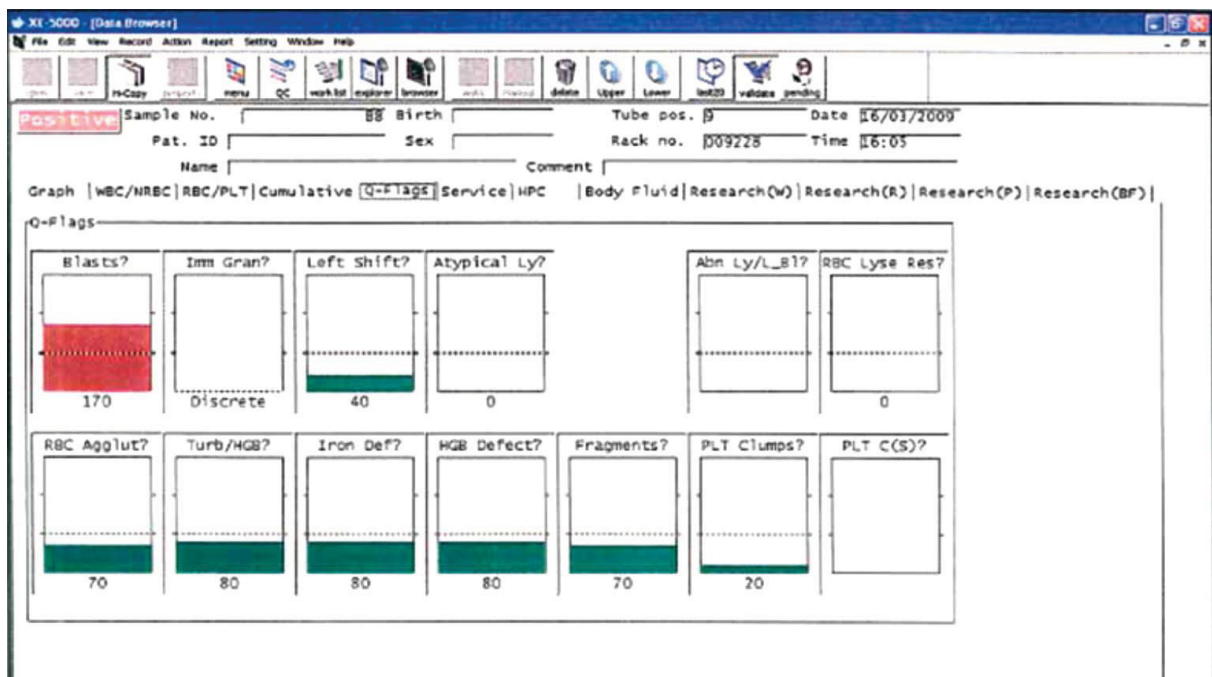
penetre na célula e, então, se liga aos ácidos nucleicos. Usando o sinal de dispersão da luz frontal e o sinal de fluorescência, os reticulócitos podem ser separados dos eritrócitos, leucócitos e eritroblastos, de acordo com a intensidade de fluorescência, quantificando a fração de reticulócitos com baixa (LFR - *Low Reticulocyte Fraction*), média (MFR - *Media Reticulocyte Fraction*) e alta fluorescência (HFR - *Hight Reticulocyte Fraction*). A contagem de plaquetas ótica é realizada pela detecção da intensidade de fluorescência do seu conteúdo de RNA. Essa análise permite uma contagem mais precisa das plaquetas quando o método de impedância apresenta interferências, nos casos de microcitose (BRIGGS et al., 2007; SYSMEX, 2011a; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015; SYSMEX, 2018).

Para a contagem dos eritroblastos ou células vermelhas nucleadas (do inglês: *Nuclead Red Blood Cell* - NRBC), um reagente específico lisa todos os eritrócitos, perfura a membrana dos leucócitos e cora o núcleo dos eritroblastos e os leucócitos. A intensidade da coloração dos eritroblastos é diferente dos leucócitos, permitindo a diferenciação destas células pelo laser semiconductor através da luz de dispersão frontal e a intensidade de fluorescência (BRIGGS et al., 2000; BRIGGS et al., 2011; PIPITONE et al., 2012). A contagem total dos leucócitos e a contagem de linfócitos é corrigida automaticamente de acordo com o resultado da contagem de eritroblastos realizada no canal NRBC, subtraindo a contagem de eritroblastos da contagem de leucócitos medida no canal WBC/BASO (RUZICKA et al., 2001; PIPITONE et al., 2012; HWANG et al., 2016).

O analisador hematológico XE-5000 foi projetado para auxiliar na separação de amostras em categorias “positivas” e “negativas” de acordo com critérios pré-definidos pelo usuário e pelo fabricante. O sistema libera os resultados com base em levantamentos abrangentes de dados numéricos, distribuições dos tamanhos das partículas e diagramas de dispersão para gerar os alarmes que indicam os achados do equipamento. Uma amostra é considerada “negativa” quando não há anormalidades predefinidas presentes. Os resultados são geralmente liberados sem a revisão das lâminas de extensão sanguínea. O XE-5000 irá gerar a mensagem “positiva” quando um alarme que indica que a amostra pode conter anormalidades morfológicas ou se interferentes na análise estiverem presente. Desta forma, um processo de revisão das lâminas de extensão sanguínea estabelecido pelo laboratório deve ser iniciado (CHHUY et al., 2013; EILERTSEN et al., 2013).

Os alarmes emitidos pelo equipamento também são classificados em alarmes quantitativos e qualitativos (SYSMEX, 2011). Os alarmes qualitativos são definidos por parâmetros internos do equipamento, denominados *Q-flag* e são acompanhados de um sinal de interrogação (?). Um valor de “*Q-flag*” fornece informações sobre o grau de positividade ou negatividade de um alarme em uma escala numérica de 0 a 300, com incrementos de 10 unidades arbitrárias (BRIGGS et al., 2011; EILERTSEN et al., 2013). O limite de ajuste de fábrica é pré-definido para um valor arbitrário de *Q-flag* de 100 (Figura 5). Desta forma, o equipamento irá disparar alarmes específicos quando os valores de *Q-flag* forem superiores a 100, indicando que determinada anormalidade pode estar presente na amostra, como por exemplo, “*Immat Gran?*”, “*Left Shift?*” e “*Blast?*”, relacionados à possível presença de granulócitos imaturos, desvio a esquerda e blastos, respectivamente. O usuário pode, no entanto, ajustar este limite de acordo com suas necessidades (SIRECI et al., 2010b; EILERTSEN et al., 2013).

FIGURA 5 - CAPTURA DE TELA DOS Q-FLAGS DO SYSMEX XE-5000



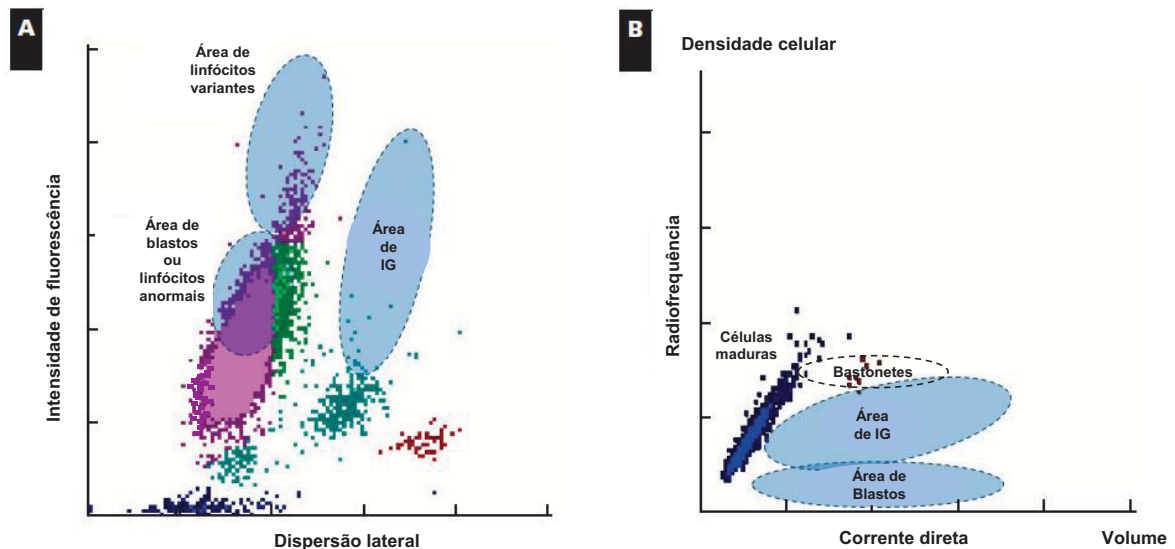
FONTE: EILERTSEN (2013).

NOTA: Um exemplo representativo de valores *Q-flag* discrepantes relatados pelo Sysmex XE-5000. Os nomes dos alarmes específicos são dados no topo das caixas. Os valores de *Q-flag*, que fornecem informações sobre o grau de positividade ou negatividade de um alarme, são mostrados abaixo das caixas. As linhas pontilhadas representam o limite pré-definido que aciona uma mensagem de sinalização, como no exemplo acima, em que foi acionado o alarme de “*Blast?*” quando ultrapassou o limite de *Q-flag* de 100 (EILERTSEN, 2013).

O Sysmex XE-5000 realiza a contagem de promielócitos, mielócitos e metamielócitos resumidos na “contagem de IG” e libera alarmes específicos para este

grupo de células, dependendo da análise dos diagramas de dispersão dos canais DIFF e IMI pelo software do equipamento (Figura 6). Se houver um aglomerado anormal de células na área para granulócitos imaturos nos diagramas de dispersão no canal DIFF e ou IMI, um alarme suspeito de IG é disparado (“*Immat Gran?*”) e a contagem das células imaturas derivada do canal DIFF é relatada com um sinal de asterisco, indicando que a contagem IG dessa amostra não deve ser liberada sem a revisão microscópica (WEILAND; KALKMAN; HEIHN, 2002; SYSMEX, 2008; BRIGGS et al., 2011; CIMENTI et al., 2013; EILERTSEN; HAGVE, 2014). O alarme “IG Present” é definido pelo usuário e é gerado quando o IG% ou IG# excedem o valor definido pelo mesmo (SYSMEX, 2008; EILERTSEN; HAGVE, 2014).

FIGURA 6 - ALARME DE GRANULÓCITOS IMATUROS DO SYSMEX XE-5000



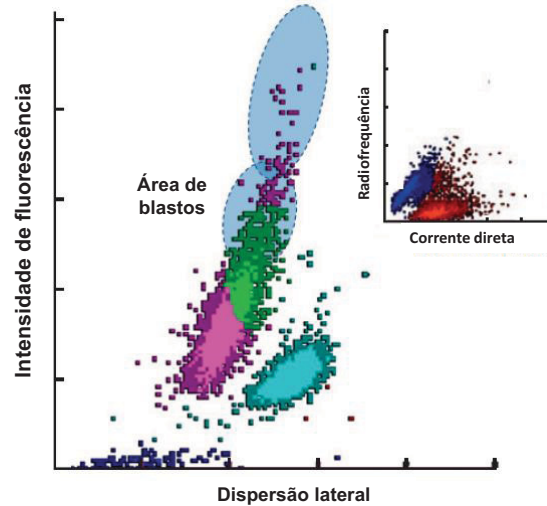
FONTE: Adaptado de BRIGGS, et al., (2011).

NOTA: Figura A - Canal DIFF: Os granulócitos imaturos (IG) têm um maior conteúdo de RNA e DNA em comparação com neutrófilos segmentados, que podem ser detectados pelo aumento da emissão de fluorescência após a excitação com o feixe de laser e estão localizados acima dos pontos azul turquesa. Figura B - Canal IMI: As informações sobre as células imaturas são derivadas do canal de células mielóides imaturas (IMI). A diferenciação das células se baseia nas alterações do pulso da corrente direta, que é equivalente ao tamanho da célula (em volume), e nas alterações da impedância de radiofrequência, que fornece informações sobre a composição interna da célula (núcleo, grânulos). No canal IMI, não só os IG são detectados, mas também os bastonetes e mieloblastos (BRIGGS et al., 2011; CIMENTI et al., 2012; EILERTSEN; HAGVE, 2014).

O alarme de blastos é gerado quando o número de células na área de blastos do canal IMI excede um limite predefinido ou quando células na área de granulócitos imaturos do canal IMI são detectadas mais do que na sua posição no canal DIFF. Esta informação é então combinada com o número de células na área de blastos do canal DIFF, que excedendo o limite de disparo e apresentando um número maior do que a

área de linfócitos atípicos no canal DIFF, leva à liberação do alarme (Figura 7) (BRIGGS et al., 2011; EILERTSEN et al., 2013).

FIGURA 7 - ALARME DE BLASTOS NO SYSMEX XE-5000

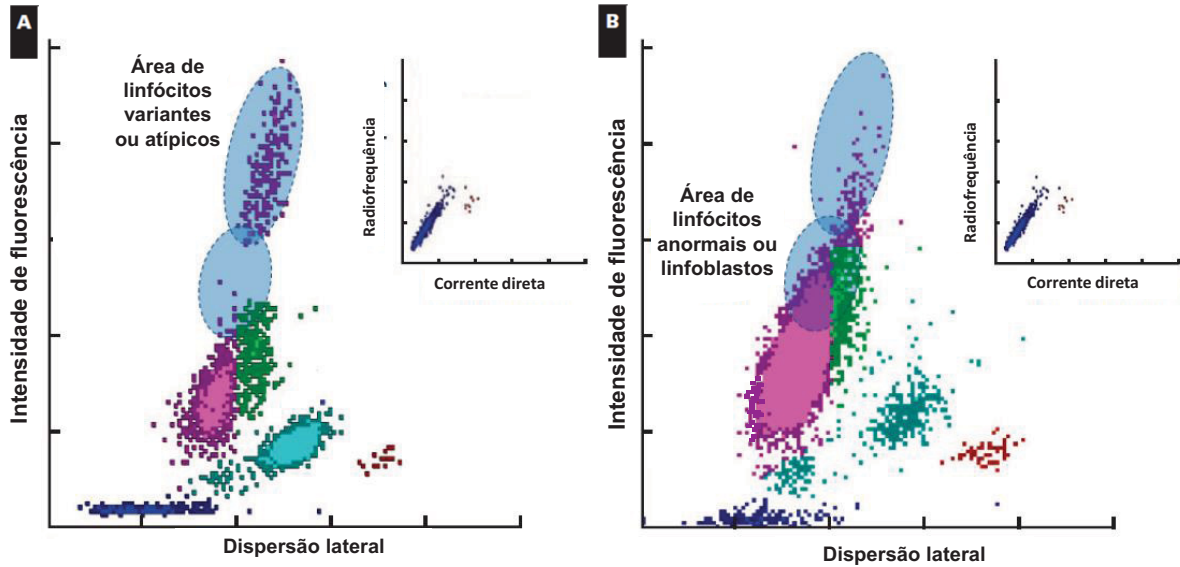


FONTE: BRIGGS et. al., (2011).

NOTA: Para a liberação do alarme de blastos no XE-5000 são utilizadas informações do gráfico de dispersão do canal diferencial de leucócitos (DIFF), à esquerda, e informações do canal de células mielóides imaturas (IMI), canto direito superior. A área sombreada em azul abaixo no canal DIFF é a área onde os blastos são encontrados, mas o alarme será acionado somente se houver também eventos na área de blastos (pontos vermelhos) no canal IMI (BRIGGS et al., 2011; EILERTSEN et al., 2013).

O alarme "*Abn Lympho/L_Blast?*" é gerado quando algumas situações específicas de análise forem atingidas, como: (a) o alarme de "*Blast?*" não for disparado (sem células na área de blastos IMI) e (b) o número de células na área dos linfócitos e na área limite dos monócitos for maior do que o normal. O alarme "*Atypical Lymph?*" corresponde a uma contagem de linfócitos de alta fluorescência (maior que 1% da contagem total de linfócitos) e que o número de células na área de linfócitos atípicos do canal DIFF excede o limite de disparo do *flag*/área de blastos do canal DIFF. Os linfócitos de alta fluorescência provavelmente são linfócitos B ativados ou células plasmáticas (BRIGGS et al., 2011). A Figura 8 ilustra a área do diagrama de dispersão dos canais DIFF e IMI, onde se encontram os linfócitos atípicos.

FIGURA 8 - ALARME DE LINFÓCITOS VARIANTES OU LINFOBLASTOS DO SYSMEX XE-5000

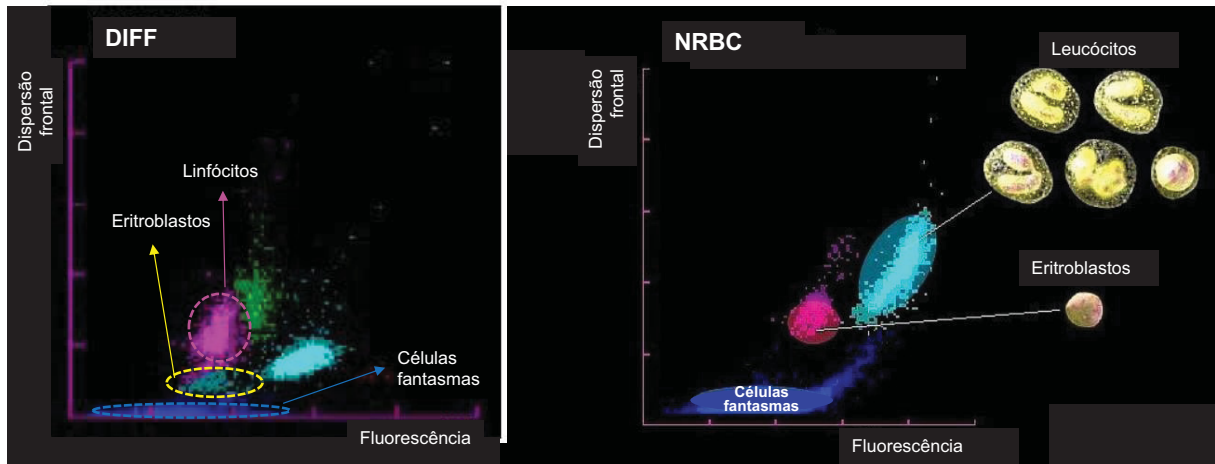


FONTE: (BRIGGS et al., 2011).

NOTA: Os algoritmos de sinalização do XE combinam informações do diagrama de dispersão dos canais diferenciais de leucócitos (DIFF) e de célula imaturas mielóides (IMI) para produzir alarmes específicos para os linfócitos anormais e/ou linfoblastos e linfócitos variantes. Figura A - Alarme de linfócitos variantes/atípicos ou “*Atypical Lymph?*”: A área superior sombreada em azul no canal DIFF (gráfico maior) é onde os linfócitos atípicos (de alta fluorescência) residem. Se não houver eventos na área de linfócitos anormais ou linfoblastos ou na área de blastos no canal IMI (gráfico do canto superior direito), somente o alarme de linfócitos atípicos será desencadeada. Figura B - Alarme de linfócitos anormais ou “*Abn Lympho/L_Blast?*”: A área inferior sombreada em azul no canal DIFF (gráfico maior) é a área onde blastos, linfócitos anormais ou linfoblastos pode residir. Se não houver eventos na área de blastos do canal IMI (gráfico do canto superior direito), estes eventos podem não ser mieloblastos, então somente o alarme de linfócitos anormais ou linfoblasto será disparado. (CHHUY et al., 2013; CIMENTI et al., 2013).

O analisador XE-5000 gera o alarme “*NRBC?*” quando a contagem de eritroblastos não é realizada e eventos na área dos eritroblastos são detectados, localizada entre a região dos linfócitos e dos eritrócitos fantasmas no diagrama de dispersão DIFF (Figura 9). O alarme “*NRBC Present*” é programável pelo operador. Só aparece se a contagem de eritroblastos é solicitada e se a presença de eritroblastos ultrapassa o limite programado. Este modelo relata automaticamente a contagem de eritroblastos para todas as amostras; porém, por opção do operador, esta contagem pode ser realizada apenas quando as contagens de eritroblastos são suficientes para disparar o alarme “*NRBC?*”. Nestas condições, as amostras são repassadas no modo NRBC para enumerar os eritroblastos e corrigir a contagem e a diferencial de leucócitos (SYSMEX, 2008; BRIGGS et al., 2011; SYSMEX, 2018).

FIGURA 9 – DIAGRAMA DE DISPERSÃO DIFF E NRBC



FONTE: Adaptado de SYSMEX (2008)

NOTA: DIFF: Canal diferencial de leucócitos (à esquerda). Eritroblastos localizados abaixo da área de linfócitos e acima das células fantasmas. NRBC: Canal de eritroblastos (à direita). A contagem dos eritroblastos é realizada após análises dos diagramas de dispersão da contagem total e diferencial de leucócitos e o modo NRBC (SYSMEX, 2008).

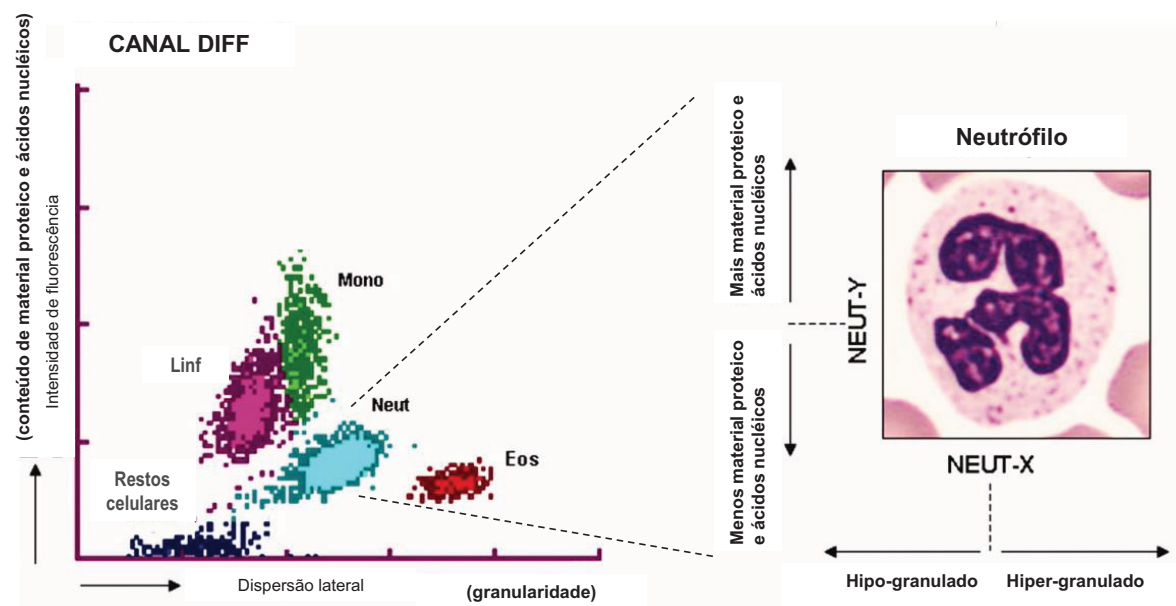
Outros alarmes liberados pelo XE-5000 se referem à população de eritrócitos com tamanho heterogêneo, eritrócitos resistentes à lise, aglutinação de eritrócitos, interferência na dosagem de hemoglobina pela turbidez da amostra e gráficos de dispersão de luz (*scattergrams*) anormais de plaquetas, leucócitos e eritrócitos, expressos como “*WBC Abn Scattergrams*” (gráfico de dispersão de luz de leucócitos anormal), por exemplo. As mensagens de “*WBC, NRBC, RBC, RET e PLT Abn Scattergram*” são geradas quando os aglomerados de células no diagrama de dispersão são considerados anormais pelo equipamento ou quando a contagem celular é baixa, como por exemplo, contagem de leucócitos menor que $0,5 \times 10^3/\mu\text{L}$. Traços (---) aparecem no lugar de dados que não foram calculados e asteriscos (*) aparecem ao lado da contagens não confiáveis, indicando que uma revisão da lâminas de extensão sanguínea precisa ser realizada (SYSMEX, 2008;2018).

3.4.4.1 Parâmetros de Pesquisa

Os índices de Granularidade NEUT-X e NEUT-Y são parâmetros de pesquisa liberados pelos analisadores hematológicos da linha XE. Estes índices correspondem à complexidade interna dos neutrófilos (presença de grânulos e vacúolos) e o conteúdo de ácidos nucléicos da célula (RNA e DNA) (LINSSEN et al., 2008; FURUNDARENA et al., 2010; ZIMMERMANN et al., 2011; LUO et al., 2013).

O NEUT-X corresponde à coordenada x da população de neutrófilos no diagrama de dispersão do canal DIFF, calculados a partir do valor médio da dispersão de luz lateral, e, portanto, mede a granularidade dos neutrófilos. Este parâmetro pode ser útil para diagnosticar pacientes com síndrome mielodisplásica, que apresenta como uma característica comum, a hipogranulação do citoplasma, correlacionada com um baixo índice de granularidade e presença de anemia. De forma análoga, o marcador de atividade de neutrófilos "NEUT-Y" corresponde à coordenada y da população de neutrófilos no diagrama de dispersão do canal DIFF, que representa à fluorescência média detectada e quantifica o conteúdo de ácidos nucleicos e o comportamento fagocítico dos neutrófilos (Figura 10) (LINSSEN et al., 2008; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015).

FIGURA 10 - CANAL DIFF: DETECÇÃO DO NEUT-X E NEUT-Y



FONTE: LINSSEN (2008)

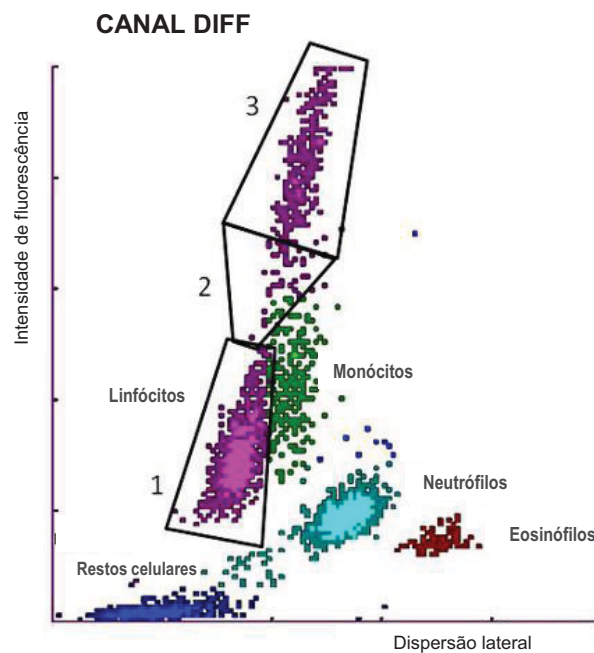
NOTA: Canal DIFF - combinação da dispersão lateral (granularidade) e intensidade de fluorescência (ácidos nucleicos e material proteico). NEUT-X indica a granularidade e NEUT-Y o conteúdo de DNA/RNA dos neutrófilos. Mono: monócitos; Linf: linfócitos, Neut: neutrófilos; Eos: eosinófilos.

Outro parâmetro de pesquisa liberado pelo XE-5000 é o HFLC, que corresponde aos linfócitos altamente fluorescentes (*Highly fluorescent lymphocytes* - HFLC). Os HFLCs estão associados aos linfócitos B ativados que sintetizam clones de anticorpos específicos, chamados de células plasmáticas ou as células linfoplasmocitóides presentes no sangue total periférico (LINSSEN et al., 2007; BRIGGS, 2009; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015).

A medida de HFLC representa todas as células que tem um tamanho próximo aos neutrófilos, mas com uma maior quantidade de RNA, o que resulta em uma maior intensidade de fluorescência detectada pela citometria de fluxo fluorescente (Figura 11). Por isso, estas células aparecem em uma área distinta no diagrama de dispersão do canal DIFF, em uma região acima dos monócitos e linfócitos (LINSSEN et al., 2007; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015; OEHADIAN et al., 2015).

Esta propriedade permite a classificação e quantificação de células na área de linfócitos atípicos pelo Sysmex XE-5000. Quando o número de HFLC atinge um valor limiar, o Sysmex produz um alarme de "linfócitos atípicos" (LINSSEN et al., 2007; BRIGGS et al., 2011; XIE; WU; CUI, 2017).

FIGURA 11 - CONTAGEM DE HFLC



FONTE: Adaptado de OEHADIAN et al., (2015).

NOTA: Área 1, 2 e 3 juntas indicam a contagem total de linfócitos; área 2 e 3 juntas, os linfócitos na área de linfócitos atípicos e a área 3 a contagem de linfócitos altamente fluorescentes (HFLC).

Os fragmentos eritrocitários (FRC – do inglês, *Fragmented red cell*) ou esquizócitos, resultam de danos mecânicos aos eritrócitos (BAIN, 2016). A contagem de fragmentos eritrocitários é um importante indicador para o diagnóstico e monitoramento de pacientes com anemia microangiopática trombótica (TMA) (SAIGO et al., 2002; BANNO et al., 2005; ZINI et al., 2012).

Indivíduos sadios geralmente não apresentam fragmentos eritrocitários na amostra sanguínea (LESESVE et al., 2004; ZINI et al., 2012; BAIN, 2016). Os limites considerados normais estabelecidos em alguns estudos estão descritos no Quadro 2.

QUADRO 2 - VALORES NORMAIS DE FRAGMENTOS ERITROCITÁRIOS

Referência	Fragmentos eritrocitários (%)
ZINI et al. (2012)	Até 0,10%
BURNS; LOU; PATHAK (2004)	Até 0,27%
JIANG et al. (2001)	Entre 0,03 a 0,58%
RUUTU et al. (2007)	Acima de 4%*
LESESVE; SPEYER; PEROL (2015)	Entre 0,12 a 0,16

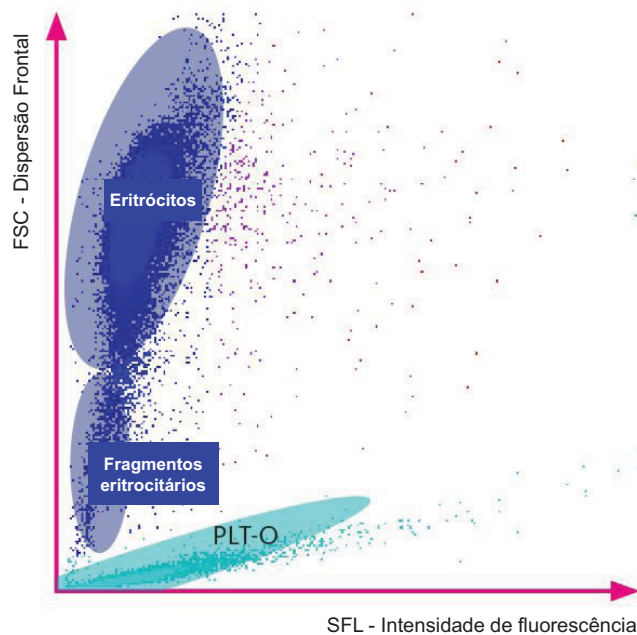
NOTA: *Para diagnóstico de anemia microangiopática trombótica.

O ICSH recomenda que a contagem de esquizócitos $> 1\%$ representa um valor clinicamente significativo para o diagnóstico de TMA em adultos, especialmente quando a presença dos esquizócitos é a anormalidade morfológica eritrocitária predominante (ZINI et al., 2012).

A contagem de esquizócitos é convencionalmente determinada pelo exame microscópio da extensão sanguínea. No entanto, o método manual apresenta um fraco desempenho e baixa reprodutibilidade no reconhecimento de esquizócitos, provavelmente devido a possibilidade de qualquer eritrócito de forma irregular ser considerado um esquizócito (SAIGO et al., 2002; BANNO et al., 2005; LESESVE et al., 2005; ZINI et al., 2012; BAIN, 2016).

Os equipamentos Sysmex usam o canal de reticulócitos para quantificar os esquizócitos, os quais são identificados pela detecção dos eventos mais pequenos, localizados na área dos eritrócitos do diagrama de dispersão, por apresentar um baixo conteúdo de RNA (JIANG et al., 2001; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; BRIGGS, 2009). Esta análise é obtida após a coloração com corante fluorescente polimetina e a detecção da luz de dispersão frontal e a intensidade de fluorescência (Figura 12) (SAIGO et al., 2002; BANNO et al., 2005; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; SYSMEX, 2008).

FIGURA 12 - CANAL RET: CONTAGEM DE FRAGMENTOS ERITROCITÁRIOS



FONTE: Adaptado de SYSMEX (2018).

NOTA: Cada célula é representada no diagrama de dispersão do canal RET com base na intensidade da fluorescência (SFL nas abcissas) e da dispersão frontal (FSC nas ordenadas), que reflete as características celulares, tamanho e conteúdo celular, respectivamente. Os eritrócitos fragmentados (*RBC Fragments*) são visíveis abaixo da população de eritrócitos (RBC). Os esquizócitos estão localizados na área dos eritrócitos pequenos e com baixo conteúdo de RNA (SYSMEX, 2018).

No modelo Sysmex XE-5000, o parâmetro FRC está disponível na tela de pesquisa (BUTTARELLO; PLEBANI, 2008). É esperado que a contagem de esquizócitos (%) determinada a partir desta área tenha uma relação próxima com a contagem determinada pela microscopia ótica (BUTTARELLO; PLEBANI, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho corresponde a uma pesquisa experimental realizada através da análise de hemogramas liberados pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 da Seção de Hematologia da Unidade de Apoio ao Diagnóstico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UAD do HC-UFPR).

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, sob registro do parecer nº 308.937 (ANEXO 1) e pela Instituição Coparticipante - HC-UFPR sob registro do parecer nº 362.044 (ANEXO 2) com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 15104113.0.0000.0102.

A obtenção do material ocorreu na Seção de Hematologia da UAD do HC-UFPR. A avaliação das lâminas e dos resultados do equipamento foram realizados no Laboratório Escola de Análises Clínicas da UFPR. Os materiais utilizados na pesquisa foram lâminas de extensão sanguínea, relatórios com os resultados dos hemogramas obtidos do analisador hematológico Sysmex XE-5000, corante hematológico Newprov, extensora sanguínea, microscópio óptico modelo Olympus BX 41, contador de células Phoenix CP-2100, óleo de imersão e câmara fotográfica Biofocus LOD-5000.

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL

O material de estudo foi constituído de 1.944 hemogramas, com as respectivas lâminas de extensão sanguínea e os relatórios contendo os resultados dos parâmetros hematológicos liberados pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000, recolhidos da rotina laboratorial da UAD do HC-UFPR, de forma consecutiva, no período de 19 a 28 de agosto de 2013, após a liberação dos resultados no sistema de informação hospitalar.

Os hemogramas foram obtidos a partir de amostras de sangue total coletadas por punção venosa em tubos contendo anticoagulante K2-EDTA de 1,8 mg/mL (Vacuette, Greiner Bio-One), oriundos de pacientes internados e não internados (ambulatoriais) no HC-UFPR, que incluíram os serviços de anestesiologia, células-tronco, cirurgia, clínica médica, dermatologia, endocrinologia, gastroenterologia, ginecologia, hematologia, hepatologia, homeopatia, imunologia, infectologia,

nefrologia, neurologia, odontologia, oftalmologia, otorrinolaringologia, ortopedia, patologia, pneumologia, pronto-atendimento, psiquiatria, quimioterapia, reumatologia, saúde ocupacional, transplante, unidades de terapia intensiva adulta e pediátrica, urologia, dentre outros. As amostras foram processadas dentro de três horas após a coleta pela seção de hematologia da UAD do HC-UFPR.

Foram incluídos nessa pesquisa, todos os hemogramas que apresentaram alarmes quantitativos e qualitativos liberados pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 para avaliação das respectivas lâminas de extensão sanguínea e dos resultados do equipamento, totalizando 1296 amostras. Tais hemogramas, os quais apresentaram ambos os alarmes, foram considerados “positivos”. Os alarmes quantitativos corresponderam às alterações no hemograma que ultrapassaram os limites definidos pelos critérios próprios de liberação direta da Seção de Hematologia da UAD do HC-UFPR, descritos na Instrução de Trabalho -ITR - UAD - HEM – nº 004 (ANEXO 3) enquanto que os alarmes qualitativos corresponderam à suspeita da presença de anormalidades morfológicas na amostra sanguínea, sinalizadas pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000, descritos no item 4.3.

Os hemogramas que não apresentaram alarmes qualitativos e/ou quantitativos liberados pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000, totalizaram 648 amostras (hemogramas “negativos”), cujo resultados não foram totalmente apresentados no presente trabalho. Essas amostras foram analisadas em estudo prévio (SPEZIA, 2015) e apenas alguns dados obtidos foram utilizados como grupo controle, a fim de definir os intervalos normais de determinados parâmetros hematológicos.

Para cada hemograma positivo, uma lâmina de extensão sanguínea foi preparada e corada automaticamente pelo sistema automatizado extensor/corador de lâminas Sysmex SP-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japão), acoplado ao sistema do analisador hematológico SYSMEX XE-5000. As lâminas dos hemogramas positivos que continham pouco volume de sangue, os quais o equipamento não foi capaz de confeccionar automaticamente as respectivas lâminas, foram preparadas manualmente pelo método de extensão do sangue em forma de cunha, no prazo máximo de até três horas após a coleta. A coloração empregada no método automatizado e no manual foi a de May-Grünwald & Giemsa.

As lâminas de extensão sanguínea que não apresentaram qualidade de coloração e a distribuição celular aceitável foram excluídas do presente estudo.

A faixa etária da população estudada (n=1296) variou entre indivíduos de 1 dia a 91 anos de idade, com mediana de 44,7 (18,1-62,3) anos. As amostras provenientes de indivíduos masculinos representaram 49,3% enquanto que 50,7% das amostras foram provenientes do gênero feminino.

4.2 ANÁLISE DAS LÂMINAS DE HEMOGRAMA

Todos os 1296 hemogramas positivos selecionados para a pesquisa foram avaliados através de uma minuciosa análise microscópica das respectivas lâminas de extensão sanguínea devidamente confeccionadas e coradas, a fim de realizar a contagem diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e pesquisa de alterações hematológicas nos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, bem como comparar os valores quali-quantitativos fornecidos pelo analisador hematológico XE-5000.

As análises das lâminas de extensão sanguínea foram realizadas em microscópio óptico modelo Olympus BX-40 (método manual) por um examinador. Em amostras que continham células com características morfológicas de imaturidade ou atipia, foram capturadas imagens da lâmina em questão pela câmara fotográfica LOD-5000 (Biofocus) acoplada ao referido microscópico, para avaliação das imagens por um segundo examinador.

A análise microscópica das lâminas de extensão sanguínea, foram realizadas sem a consulta da contagem diferencial de leucócitos e dos alarmes liberados pelo equipamento. Somente foram disponibilizados para a revisão das lâminas os valores da contagem de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos (VCM, CHCM, HCM e RDW), contagem total de leucócitos e de plaquetas conforme ilustrado na Figura 13.

FIGURA 13 - DADOS FORNECIDOS PARA LEITURA DA EXTENSÃO SANGUÍNEA

Dados do paciente			Série vermelha							Leuc	Plaq			Scan 10x/10 campos			Scan 40x/10 campos			Scan 40x/30 campos
Nº	Sample ID:	Idade:	Sex	Hcs	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	RDW	Leuc	PLT	MPV	Colo-ração	Dist. Ctr	Micro	Aglut. Wbc/Rbc	Cél imat	Roul eaux	Agreg plt
1	130.167.800.021	06/09/1912	F	3,89	10,8	30,3	77,9	27,8	35,6	14,0	8.260	4	-							
2	130.167.614.021	15/07/1948	F	3,57	11,0	31,4	88,0	30,8	35,0	23,3	11.750	200	12,0							
3	130.167.528.021	22A	F	2,09	6,3	19,4	92,8	30,1	32,5	17,5	10.360	380	9,5							
4	130.176.160.021	02/08/1990	M	2,58	7,9	25,1	97,3	30,6	31,5	17,8	4.070	183	11,4							
5	130.135.061.021	27/02/1954	M	3,01	11,2	34,1	113,3	37,2	32,8	13,0	10.330	272	9,9							

FONTE: O autor (2015).

Um protocolo de leitura das lâminas foi utilizado para padronização dos procedimentos da análise microscópica das lâminas. O protocolo foi desenvolvido a

partir de recomendações de comitês internacionais em hematologia (CLSI e ICSH) e adaptados ao presente estudo (BOWEN et al., 1998; RYAN, 2006; CLSI, 2007; ZINI et al., 2012; PALMER et al., 2015; BAIN, 2016).

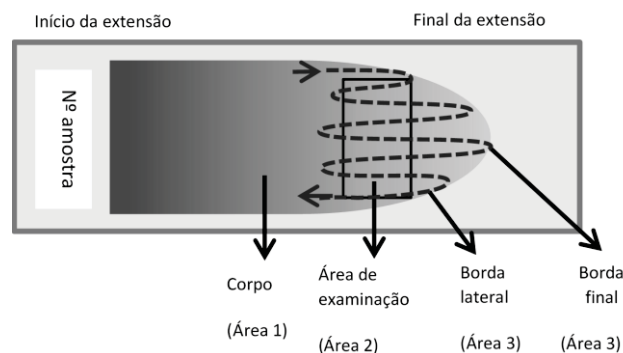
O protocolo foi composto por 3 itens que descrevem os procedimentos de análise de extensão sanguínea utilizados nesse estudo para avaliação da série vermelha, leucocitária e plaquetária, conforme descrito nos itens 4.2.1 à 4.2.3.

4.2.1 Triagem

A triagem ou escaneamento foi realizada percorrendo os campos da lâmina de extensão sanguínea conforme ilustra a Figura 14, que incluem:

- Área 1 (Corpo): parte da lâmina onde há sobreposição de eritrócitos;
- Área 2 (Área de exame): parte da lâmina onde os eritrócitos estão uniformemente distribuídos, com poucos se tocando ou se sobrepondo e;
- Área 3 (Borda lateral e final): parte lateral e final da extensão (cauda).

FIGURA 14 - ÁREAS DA EXTENSÃO SANGUÍNEA PARA TRIAGEM.



FONTE: Adaptado de CLSI (2007).

Percorreu-se pelo menos 10 campos da extensão sanguínea (áreas 1, 2 e 3) com objetiva de 10x (aumento de 100x) para avaliar e relatar a qualidade da coloração, a distribuição celular e a presença de microrganismos (filárias).

Outros 10 campos da extensão sanguínea (áreas 1, 2 e 3) foram avaliados com objetiva de 40x (aumento de 400x) para avaliar e relatar a presença de células imaturas, *rouleaux* eritrocitário e aglutinação de leucócitos e eritrócitos.

Além disso, percorreu-se no mínimo 30 campos da extensão sanguínea (áreas 1, 2 e 3) com objetiva de 40x (aumento de 400x) para pesquisar e quantificar a

presença de agregados plaquetários. Um agregado plaquetário foi definido como um conjunto de pelo menos 5 plaquetas agrupadas, em formato de cacho de uva ou enfileiradas. Quando verificado a presença de um agregado plaquetário durante a triagem, realizou-se a quantificação dos agregados plaquetários observados em 10 campos subsequentes (sem preferência pela área analisada). Os resultados foram reportados, quando a quantidade de agregados plaquetários foi menor que 5 agregados plaquetários em 10 campos analisados ou se foram detectados a quantidade de 5 ou mais agregados plaquetários em 10 campos analisados.

Todas as alterações observadas nesta etapa do protocolo de leitura das lâminas foram registradas em uma planilha Excel para posterior análise dos dados, conforme ilustra a Figura 15:

FIGURA 15 - PLANILHA DE REGISTRO DOS RESULTADOS DA TRIAGEM

Dados do paciente				Scan 10x /10 campos			Scan 40x/10 campos			Scan 40x/30 campos
Nº	Amostra	Idade	Sex	Coloração	Distribuição Celular	Microorganismos	Aglutinação Leucócitos e Eritrócitos	Células Imaturas	Rouleaux	Agregados plaquetários
1	130.167.800.021	06/09/1912	F	1						
2	130.167.614.021	15/07/1948	F							

FONTE: O autor (2015).

NOTA: *Scan* - Triagem da lâmina de extensão sanguínea com objetiva de aumento de 10x e 40x para avaliação e quantificação das alterações encontradas. Microorganismos se refere à pesquisa de microfilárias.

4.2.2 Eritrograma e Plaquetas

Em objetiva de imersão (aumento de 1000x) selecionou-se a área de examinação da lâmina de extensão sanguínea para realizar a análise morfológica celular e a quantificação das alterações encontradas na série vermelha e plaquetária, evitando as áreas iniciais da extensão (corpo), onde há sobreposição de eritrócitos e final da extensão (cauda) onde os eritrócitos estão muito separados um dos outros, conforme ilustrado anteriormente na Figura 14.

- Análise morfológica e quantificação das alterações da série vermelha:

Na área de examinação da extensão sanguínea, há normalmente cerca de 200 eritrócitos por campo no aumento de 1000x. Observou-se e quantificou-se as

alterações da série vermelha pela média dessas alterações encontradas em 10 campos analisados (no mínimo 1000 eritrócitos foram avaliados).

O Quadro 3 descreve a quantificação de cada alteração da série vermelha utilizada no protocolo de leitura das lâminas.

QUADRO 3 - SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E INCLUSÕES CITOPLASMÁTICAS DA SÉRIE VERMELHA.

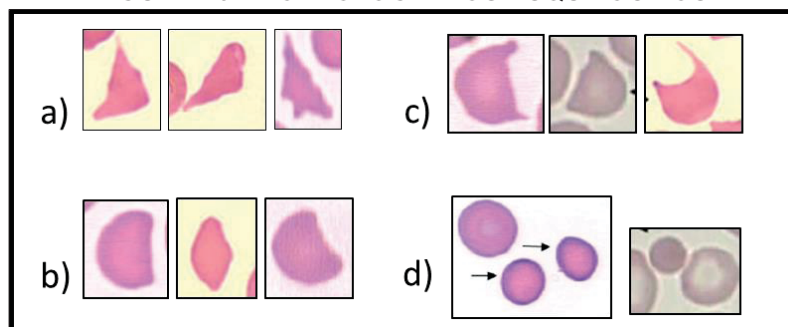
Alterações morfológicas e inclusões celulares	Sistema de classificação		
	1+	2+	3+
Acantócitos Codócitos Dacriócitos Eliptócitos Equinócitos Esferócitos Estomatócitos Policromasia Pontilhado basófilo	N/R	5-20 (%)	> 20 (%)
Macrovalócitos (comparar c/ linfócito peq.)	N/R	2-5 (%)	>5 (%)
Células irreg. contraídas Drepanócitos Esquizócitos Queratócitos ou pré-queratócito	N/R	1-2 (%)	>2 (%)
Howell-Jolly Pappenheimer	N/R	2-3 %	> 3 %

FONTE: Adaptado de Palmer et. al., (2015).

NOTA: N/R: Não relatado. Porcentagem das alterações em relação a 1000 eritrócitos contados.

A definição dos esquizócitos pelo ICSH foi utilizada para auxiliar em um reconhecimento mais confiável dessas células pelo exame microscópico. Os esquizócitos classificados de acordo com ICSH são sempre menores que os eritrócitos e podem ser identificados de acordo com as características morfológicas que apresentam, como células em formato de triângulo, capacete, queratócitos ou microesferócitos (Figura 16) (ZINI et al., 2012; BAIN, 2016).

FIGURA 16 - MORFOLOGIA DOS ESQUIZÓCITOS.



FONTE: ZINI et al., (2012).

NOTA: a) Forma de triângulos, às vezes com ângulos agudos ou espículas, com bordas retas ou com contorno redondo de um lado (microcrescentes), muitas vezes distorcidos, geralmente de coloração escura e ocasionalmente pálido; b) Forma de capacete, com uma zona amputada, raramente duas, destacada por uma margem reta e bordas com ângulos acentuados; c) Células com formas de chifres ou queratócitos, maiores que os pequenos fragmentos, apresentam um

par de espículas separado por um segmento de membrana côncavo semicircular, às vezes com dois ou até três pares de espículas; d) Formas de microesferócitos ou esferoesquizócitos, hiperdensos, com forma arredondada e aumento da coloração (ZINI et al., 2012).

- Análise morfológica e quantificação das alterações das plaquetas:

Uma plaqueta normal mede de 1,5 a 3 µm de diâmetro. Plaquetas grandes medem de 3 a 7 µm (aproximadamente o diâmetro de um eritrócito normal), enquanto que plaquetas gigantes são maiores que o tamanho de um eritrócito normal, com diâmetro de 10 a 20 µm. As plaquetas gigantes podem ser comparadas com o tamanho de um linfócito pequeno. Quantificou-se as alterações morfológicas das plaquetas conforme descrito no Quadro 4.

QUADRO 4 - SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PLAQUETAS GIGANTES

Alterações morfológicas	Sistema de classificação		
	1+	2+	3+
Plaquetas gigantes	N/R	11-20 %	> 20 %

NOTA: O sinal “+” significa o sistema de quantificação em cruzes. % média por campo em relação ao total de plaquetas por campo de 1000x

O número de plaquetas foi estimado pelo método de Fônio modificado segundo o cálculo: nº plaquetas/µL = quantidade de plaquetas observadas em 1000 eritrócitos contados x o número de eritrócitos/µL / 1000.

As alterações observadas foram registradas em uma planilha Excel conforme Figura 17 para posterior análise estatística dos dados.

FIGURA 17 - PLANILHA DE REGISTRO DOS RESULTADOS DOS ERITRÓCITOS E PLAQUETAS DAS LÂMINAS DE EXTENSÃO SANGUÍNEA.

Nº	PLT	Fonio = plaq em 1000 Hcs	Série vermelha							Morfologia e quantificação (%) aumento 1000x/ em 1000 Hcs									
			Hcs	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	RDW	Policrom	Eliptóc	Dacri	Esquiz	Queratóc	Acant	Codóc	Esferóc	...	Obs.:
1	4		3,89	10,8	30,3	77,9	27,8	35,6	14,0										
2	200		3,57	11,0	31,4	88,0	30,8	35,0	23,3										
3	380		2,09	6,3	19,4	92,8	30,1	32,5	17,5										
4	183		2,58	7,9	25,1	97,3	30,6	31,5	17,8										
5	272		3,01	11,2	34,1	113,3	37,2	32,8	13,0										

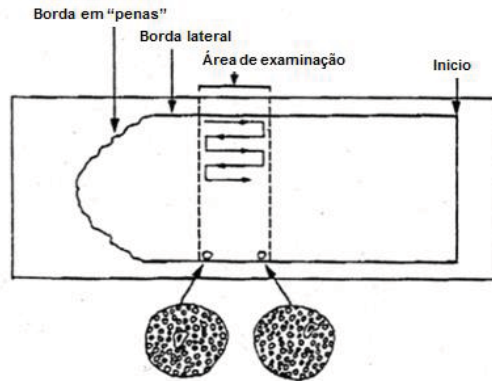
FONTE: O autor (2015).

4.2.3 Leucócitos e eritroblastos

A contagem diferencial de leucócitos e a pesquisa de alterações citoplasmáticas e morfológicas da série branca foram realizadas em objetiva de imersão (1000x). O método de rastreamento do tipo “ameia” (“*battlement*” track) foi utilizado para a contagem diferencial dos leucócitos, conforme recomendação do CLSI (2007). (Figura

18). Selecionou-se a área de examinação e percorreu-se a lâmina de um lado para outro e de cima para baixo, seguindo um único sentido, sem repassar pela mesma área. Os resultados foram expressos em porcentagem.

FIGURA 18 - MÉTODO DE RASTREAMENTO PARA CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS



FONTE: Adaptado do Documento H20-A2 (CLSI, 2007).

Cada célula identificada foi classificada em uma das seguintes categorias:

- Blastos;
- Promielócito;
- Mielócito neutrófilo
- Metamielócito neutrófilo
- Neutrófilo segmentado;
- Neutrófilo bastonete;
- Monócito
- Pró-monócito
- Eosinófilo (mesmo se apresentar características de imaturidade);
- Basófilo;
- Linfócitos normais (pequeno, grande e grande granular);
- Linfócitos variantes (tipo monocitoide, ameboide ou linfoblastoide)
- Linfócitos anormais (*Hairy cells*; células de linfoma, linfoblastos, pró-lymfócitos e plasmócitos)

A identificação do neutrófilo segmentado foi baseada nos seguintes aspectos morfológicos: (1) núcleo contendo dois ou mais lóbulos ligados por um filamento de cromatina (os lóbulos podem estar dobrados ou ainda sobrepostos) e (2) núcleo possuir uma constrição menor que 1/3 do diâmetro máximo dos lóbulos. O neutrófilo bastonete foi caracterizado por não apresentar lóbulos ou, se lobulado, estes

apresentarem uma constrição com largura maior que 1/3 do diâmetro máximo do lóbulo, com evidente material nuclear entre as margens (AKENZUA et al., 1974; CORNBLEET, 2002).

Em cada lâmina foram realizadas duas contagens diferenciais de leucócitos de 100 células, percorrendo a lâmina em um único sentido, conforme ilustrado na Figura 18. Um total de 200 leucócitos foram contados por um único examinador. A média da porcentagem dos leucócitos foi calculada com base nas duas contagens diferenciais manuais de 100 células cada. A contagem absoluta foi calculada a partir da contagem total de leucócitos do Sysmex XE-5000.

Paralelamente à contagem diferencial de leucócitos, contou-se os eritroblastos. O resultado foi expresso como o número dessas células encontradas em 100 leucócitos contados.

A presença de anormalidades citoplasmáticas dos neutrófilos, tais como, corpúsculo de Döhle, vacuolização citoplasmática, granulações tóxicas, hipogranulação ou agranulares, hipersegmentação (neutrófilos com 6 ou mais lóbulos ou mais de 3% com 5 lóbulos), hiposegmentação (neutrófilo Pelger-Huet) e bastonete de Auer também foram relatadas. As granulações tóxicas foram quantificadas pelo percentual de células com a referida alteração em relação aos neutrófilos contados.

4.3 TIPOS DE ALARMES

Os alarmes liberados pelo Sysmex XE-5000 podem ser divididos em duas categorias: alarmes qualitativos e/ou alarmes quantitativos. Os alarmes qualitativos que foram avaliados no presente estudo e a anormalidade morfológica esperada na extensão sanguínea estão descritos no Quadro 5.

QUADRO 5 - ALARMES QUALITATIVOS LIBERADOS PELO SYSMEX XE-5000 QUE INDICAM ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS

Flags	Parâmetros hematológicos
<i>"Immat Gran?"</i>	Granulócitos imaturos (metamielócitos, mielócitos e promielócitos).
<i>"Left Shift?"</i>	Bastonetes
<i>"Atypical Lymph?"</i> e <i>"Abn Lympho/L_Blast?"</i>	Linfócitos variantes/atípicos Linfócitos anormais/Linfoblastos
<i>"Blast?"</i>	Blastos
<i>"NRBC?"</i>	Eritroblastos
<i>"Plaq Clumps?"</i>	Agregados plaquetários
<i>"Fragments?"</i>	Fragmentos de eritrócitos

FONTE: O autor (2017).

Os limites de disparo para todos os alarmes suspeitos foram as configurações de fábrica, designadas como *Q-flag* de 100.

4.4 CRITÉRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DE LÂMINAS POSITIVAS

Os critérios utilizados para classificar uma lâmina “positiva” foram definidos de acordo com a relevância clínica das alterações morfológicas observadas na leitura da lâmina de extensão sanguínea. A definição dos critérios de positividade se basearam em artigos científicos e recomendações de comitês internacionais de hematologia, adaptados a este estudo (NCCLS, 1992; BOWEN et al., 1998; BARNES et al., 2005; ZINI et al., 2012; PALMER et al., 2015). O Quadro 6 descreve os parâmetros hematológicos com seus respectivos critérios de positividade avaliados no presente estudo.

QUADRO 6 - CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS PARA CLASSIFICAÇÃO DE LÂMINA POSITIVA.

Parâmetros hematológicos	Critério de positividade	Referências
Granulócitos imaturos	> 2% metamielócito ou ≥ 1% mielócito e/ou promielócito	BARNES et al., 2005
Desvio a esquerda	≥ 6% bastonetes	NCCLS, 1992
Linfócitos variantes	≥ 5% linfócitos atípicos (variantes) e/ou ≥ 1% plasmócitos ou linfoblastos	BARNES et al., 2005
Blastos	≥ 1% blastos	BARNES et al., 2005
Eritroblastos	≥ 1% eritroblastos	BARNES et al., 2005
Agregados plaquetários	≥ 5 agregados plaquetários	BOWEN et al., 1998
Fragmentos de eritrócitos	≥ 1% esquizócitos em 1000 eritrócitos	ZINI et al., 2012; PALMER et al., 2015.

O resultado da leitura da lâmina de extensão sanguínea foi então, classificada segundo os critérios de positividade descritos acima e comparado com o respectivo alarme liberado pelo Sysmex XE-5000® para avaliação do desempenho dos alarmes.

4.5 DESEMPENHO ANALÍTICO E DESENHO DO ESTUDO

A avaliação do comportamento do analisador hematológico Sysmex XE-5000 foi realizada através da correlação das contagens manual e automatizada e a

determinação do desempenho analítico dos alarmes, obtida através dos parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN).

A análise e quantificação das alterações da série vermelha e a contagem de plaquetas foi realizada sequencialmente nas primeiras 466 amostras recolhidas para o estudo. Foi realizada a pesquisa de esquizócitos pela microscopia ótica a fim de correlacionar este achado com o alarme "*Fragments?*" e o parâmetro de pesquisa FRC liberados pelo equipamento. Entre as 466 amostras iniciais avaliadas, apenas 10 amostras continham o alarme "*Fragments?*", Posteriormente, foram incluídas nessa análise, 25 amostras com o alarme "*Fragments?*", selecionadas entre as demais amostras, totalizando 491 amostras para a avaliação da série vermelha, sendo 35 com alarmes de fragmentos e 456 sem o alarme de fragmentos eritrocitários. A avaliação das plaquetas incluiu a correlação da contagem de plaquetas manual e automatizada.

A correlação entre a contagem diferencial de leucócitos entre o método manual e automatizado foi realizada de acordo com cada subtipo celular. A correlação da contagem de neutrófilos foi realizada pela soma de bastonetes e segmentados obtida pelo método manual, para ser comparada com a contagem total de neutrófilos do método automatizado. A contagem de metamielócitos, mielócitos e promielócitos representou a contagem de granulócitos imaturos pelo método manual e pelo XE-5000. Bastonetes e blastos não foram incluídos. Desta forma, foi realizada a correlação de granulócitos imaturos entre contagem manual e automatizada. Na correlação da contagem de linfócitos entre os dois métodos, foram agrupados em uma mesma categoria, os linfócitos normais, variantes, pró-linfócitos e plasmócitos observados pelo método manual, para realizar a comparação com a contagem de linfócitos do equipamento.

A avaliação do desempenho analítico do Sysmex XE-5000 foi realizada com base nas recomendações do ICSH (2007) e por critérios definidos no presente estudo conforme descritos anteriormente, através da comparação de um alarme específico de determinada anormalidade, com os achados morfológicos encontrados na extensão sanguínea. Os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) foram obtidos após a classificação dos resultados em:

- Verdadeiro-positivo (VP): definidos quando a anormalidade detectada pela microscopia ótica atingiu os critérios de positividade e a respectiva anormalidade foi sinalizada pelo equipamento;

- Falso-positivo (FP): definidos quando o equipamento sinalizou a amostra e nenhuma alteração foi encontrada na análise microscópica da extensão sanguínea;
- Falso-negativo (FN): definidos quando a anormalidade foi observada pela análise da extensão sanguínea e o equipamento não sinalizou a respectiva anormalidade e;
- Verdadeiro-negativo (VN): se nenhuma sinalização foi ativada pelo equipamento e nenhuma anormalidade detectada pelo exame microscópico.

Por opção do operador, a contagem de eritroblastos foi realizada apenas nas amostras que continham o pedido da contagem de reticulócitos adicionalmente ao pedido de hemograma.

As amostras que apresentaram o alarme de “*WBC Abn Scattergram*” e as contagens diferenciais de leucócitos não disponíveis ou incompletas, indicadas pelo sinal (----), não foram incluídos na análise estatística de determinado parâmetro. Este sinal indica que a contagem automatizada não foi disponibilizada pelo equipamento, possivelmente devido à algum tipo de interferência na análise automatizada, não possibilitando a comparação com os resultados na análise microscópica da extensão sanguínea.

As amostras que apresentaram as contagens de leucócitos abaixo de $0,4 \times 10^3/\mu\text{L}$, também não foram incluídas na análise estatística de correlação, devido à quantidade de células na lâmina serem insuficientes para realizar a contagem diferencial de 200 células.

4.6 PARÂMETROS DE PESQUISA

Os parâmetros de pesquisa que foram analisados no presente estudo foram NEUT-X, NEUT-Y, HFLC e FRC.

Os parâmetros NEUT-X e NEUT-Y avaliados foram correlacionados com a presença de granulações tóxicas (GT) nos neutrófilos. As GTs foram avaliadas de maneira quantitativa (porcentagem de neutrófilos com GT, expresso em %) e qualitativa (se presente ou ausente, representado pelo sinal +/-). Avaliou-se os parâmetros NEUT-X e NEUT-Y nas amostras que apresentaram granulações tóxicas nos neutrófilos, nas amostras com quantidade de granulócitos imaturos maior que 3%, nas amostras que apresentaram os alarmes “*Left Shift?*”, “*Immat Gran?*” e “*Blast?*” e nas amostras que apresentaram contagem de neutrófilos maior que 80%.

Adicionalmente, foram examinadas a relação entre os parâmetros NEUT-X e NEUT-Y e a presença de granulação tóxica dos neutrófilos, a presença de granulócitos imaturos, os alarmes “*Left Shift?*”, “*Immat Gran?*” e “*Blast?*” e neutrofilia.

Os linfócitos variantes e anormais foram analisados em conjunto com os alarmes “*Atypical Lymph?*” e “*Abn Lympho/L_Blast?*” na avaliação do parâmetro de pesquisa HFLC.

O índice de pesquisa FRC foi correlacionado com a presença de fragmentos eritrocitários (queratócitos, esquizócitos e esferócitos) na extensão sanguínea e com o alarme “*Fragments?*” gerado pelo analisador Sysmex XE-5000.

Os parâmetros NEUT-X e Y e o HFLC são liberados pelo equipamento em todos os hemogramas. O índice FRC é liberado pelo equipamento apenas quando uma contagem de reticulócitos é requerida.

As análises efetuadas para avaliação dos parâmetros de pesquisa incluíram como grupo controle as amostras “negativas” (n=648), ou seja, aquelas que não apresentaram alarmes qualitativos e/ou quantitativos pelo Sysmex XE-5000, visando validar os resultados obtidos dos parâmetros de pesquisa analisados.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software Excel (Versão 2010, Microsoft, Redmond, WA) foi utilizado para construir uma planilha ativa com os dados capturados do Sysmex XE-5000, denominada planilha de registro dos resultados, conforme descrito no item 4.2

Para variáveis contínuas a normalidade foi verificada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Variáveis com distribuição normal foram descritas como média e desvio padrão e comparadas com o teste t-Student (bidirecional). Variáveis contínuas sem distribuição normal foram expressas como mediana e intervalo interquartil (25% - 75%) e comparadas com o teste U de Mann-Whitney. Análises de correlação foram realizadas com o teste de Pearson ou Spearman, conforme apropriado. Variáveis categóricas foram comparadas com o teste do Chi-quadrado.

Os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foram realizados com software MedCalc Statistical version 17.9.2 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium) a partir de uma tabela de contingência (tabela 2x2) conforme descrito no Quadro 7.

QUADRO 7 - MATRIZ PARA ANÁLISE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Resultados		Análise Manual (referência)	
		Positivo	Negativo
Sysmex XE-5000	Positivo	VP Verdadeiro Positivo	FP Falso Positivo
	Negativo	FN Falso Negativo	VN Verdadeiro Negativo

Legenda: VP, verdadeiro positivo
 FN, falso negativo
 VN, verdadeiro negativo
 FP, falso positivo

O método estatístico utilizado para a determinação do desempenho dos alarmes foi realizado da seguinte forma:

$$\text{Sensibilidade (\%)} = (VP/VP + FN) \times 100;$$

$$\text{Especificidade (\%)} = (VN/VN + FP) \times 100$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo (\%)} = (VN/VN + FN) \times 100$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo (\%)} = (VP/VP + FP) \times 100$$

Onde VP = verdadeiro positivo; FN = falso negativo, VN = verdadeiro negativo e FP = falso positivo.

O programa Statistica 10.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA) foi utilizado nas análises e estatísticas descritivas. O valor de probabilidade inferior a 5% ($p < 0,05$) foi considerado significativo em todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os resultados dos principais parâmetros hematológicos das 1296 amostras provenientes da Seção de Hematologia da UAD do HC-UFPR que apresentaram resultados “positivo” obtidos pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS OBTIDOS NO SYSMEX XE-5000

Parâmetros hematológicos	Mediana	25-75%	Mínimo	Máximo
Idade	44,6	18,1-62,3	0	91
Eritrócitos ($10^{12}/L$)	3,8	3,2-4,5	1,5	6,9
Hemoglobina (g/L)	11,0	9,0-12,7	3,9	20,1
Hematócrito (%)	33,3	27,6-38,1	13,0	62,0
VCM (fL)	87,3	81,7-92,1	49,0	120,5
HCM (pg)	29,1	27,2-30,7	13,0	43,8
CHCM (%)	33,3	32,2-34,2	25,8	39,4
RDW-DP (fL)	47,3	42,3-55,2	31,6	133
RDW (%)	15,1	13,8-17,3	11,3	34,6
Leucócitos ($10^3/\mu L$)	8,7	5,3-12,8	0,01	283,3
Plaquetas ($10^3/\mu L$)	214	104-313	1	1361
VPM	10,6	9,8-11,5	8,2	14,5
Reticulócitos (%)	1,93	1,3-3,1	0,09	33,7

NOTA: n=1296; Os valores são expressos em mediana (intervalo interquartil, 25%-75%); VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW: *Red Cell Distribution Width* ou índice de Anisocitose; VPM: Volume Plaquetário Médio; DP: Desvio Padrão.

5.2 RESULTADO DA REVISÃO DAS LÂMINAS

Através da revisão microscópica das 1296 extensões sanguíneas, utilizando a metodologia descrita no protocolo de leitura do item 4.2 foram obtidos os seguintes resultados:

5.2.1 Triagem

A qualidade da coloração e a distribuição celular não foi aceitável em 1,9% (n=25) e 0,1% (n=1) das 1296 lâminas analisadas, respectivamente. As demais alterações observadas na etapa de triagem da análise das extensões sanguíneas estão resumidas na Tabela 2:

TABELA 2 - TRIAGEM DAS EXTENSÕES SANGUÍNEAS

Itens analisados	Critério	Frequências (%)
Qualidade de coloração e distribuição celular	Não aceitável	2,0 (26)
Células imaturas	Presente	14,5 (188)
Agregados plaquetários	> 5	1,6 (20)
<i>Rouleaux</i> eritrocitário	Presente	0,4 (5)
Aglutinação de leucócitos e eritrócitos	Presente	0,1 (1)
Microrganismos	Presente	0

NOTA: n=1296

Após a avaliação das lâminas pela triagem, foram selecionadas as extensões sanguíneas adequadas para proceder a análise de cada parâmetro, conforme descrito nos itens a seguir.

5.2.2 Eritrograma e Plaquetas

Em relação a alterações de série vermelha foram avaliadas 474 lamina, com 34 amostras apresentando o alarme “*Fragments?*”.

Os resultados clinicamente significativos, de acordo com o sistema de classificação sugerido pelo ICSH (PALMER et al., 2015), estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3 - IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA SÉRIE VERMELHA ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS ANALISADAS

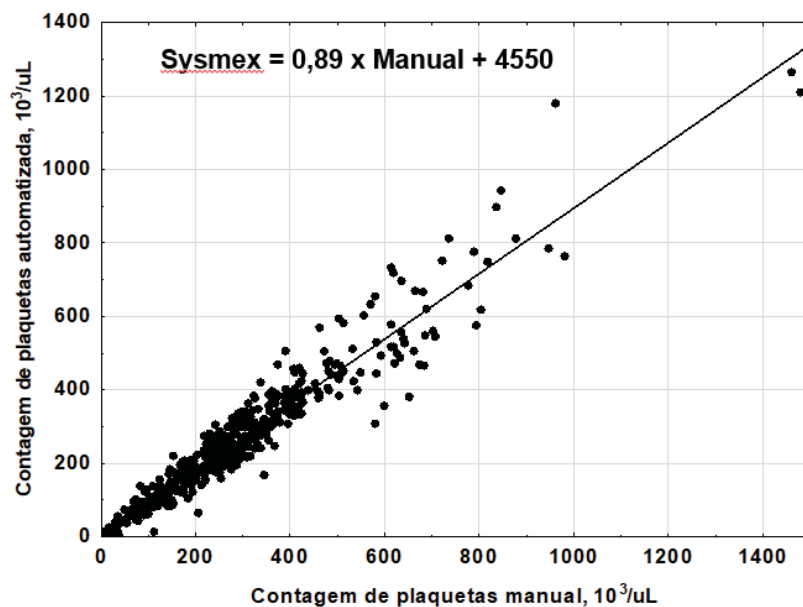
Alterações morfológicas e inclusões celulares	Sistema de classificação	
	2+	3+
Esquizócitos	42	9
Eliptócitos	11	-
Drepanócitos	2	7
Queratócitos ou pré-queratócito	5	2
Equinócitos	5	-
Codócitos	2	-
Dacriócitos	1	-
Estomatócitos	1	-
Acantócitos	-	-
Esferócitos	-	-
Policromasia	-	-
Pontilhado basófilo	-	-
Macrovalócitos	-	-
Células irregularmente contraídas	-	-
Howell-Jolly	-	-
Pappenheimer	-	-

NOTA: n=474. Sistema de classificação em cruzes (+). O sinal (-) indica que não foram atingidos os critérios de quantificação clinicamente significativo de acordo com as Recomendações do ICSH para a padronização da nomenclatura e classificação de características morfológicas das células do sangue periférico descritos por PALMER et al. (2015)

Para análise morfológica e a quantificação das plaquetas, após a triagem, foram avaliadas um total de 455 lâminas. Quatro amostras apresentaram plaquetas hipogranulares e nenhuma amostra apresentou plaquetas gigantes.

A correlação (coeficiente de correlação de Pearson) entre os resultados da contagem automatizada de plaquetas pelo Sysmex XE-5000 e a contagem manual pelo método de Fônio modificado foi de $r=0,95$ ($p<0,05$). A comparação entre os procedimentos automatizado e manual e a análise de regressão linear, representada pela equação de correlação ($y = ax + b$), onde y corresponde ao número de plaquetas pelo método automatizado e x ao número de plaquetas pelo método manual está ilustrada na Figura 19.

FIGURA 19 - COMPARAÇÃO ENTRE A CONTAGEM MANUAL E AUTOMATIZADA DE PLAQUETAS.



FONTE: O autor (2017).

NOTA: Coeficiente de Correlação de Pearson: $r=0,95$ ($p<0,05$)

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a contagem de plaquetas pelos métodos manual e automatizado através do Teste U – Mann Whitney ($p=0,027$). A contagem manual (mediana de $271 \times 10^3/\mu\text{L}$) foi significativamente maior (11,8%) em comparação ao método automatizado (mediana de $239 \times 10^3/\mu\text{L}$).

A pesquisa de agregados plaquetários foi realizada, após triagem em 1276 lâminas e a presença de agregados plaquetários (grumos com 5 ou mais plaquetas) foi observada em 282 amostras (22,1%). Em apenas 20 dessas amostras (1,6%), a

quantidade de agregados plaquetários foi suficiente para atingir o critério de positividade estabelecido neste estudo (> 5 agregados plaquetários).

5.2.3 Leucócitos e eritroblastos

Após a triagem, a avaliação da contagem diferencial de leucócitos entre os métodos manual e automatizado foi realizada em 1216 amostras. Um total de 80 amostras não foram incluídos na análise estatística de correlação por apresentaram o alarme de “*WBC Abn Scattergram*”, com as contagens diferenciais de leucócitos não disponíveis ou incompletas, indicadas pelo sinal (----), amostras que apresentaram as contagens de leucócitos abaixo de $0,4 \times 10^3/\mu\text{L}$ e lâminas que apresentaram má distribuição celular e coloração inaceitável.

Na comparação da contagem absoluta automatizada e manual de leucócitos, não foram observadas diferenças significativas entre as médias das contagens de linfócitos, eosinófilos, basófilos e eritroblastos ($p > 0,05$). As contagens de neutrófilos, monócitos e IG apresentaram diferenças significativas entre os dois métodos de contagem (Tabela 4). O mesmo comportamento foi observado para as contagens relativas.

TABELA 4 - CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS MANUAL E AUTOMATIZADA

Parâmetro	Manual (#)	XE-5000® (#)	Manual (%)	XE-5000® (%)	Teste-t (#)	r (#)
Neutrófilos †	6815 (± 6125)	6343 (± 5613)	65,6 (± 21,6)	61,1 (± 20,8)	0,047	0,99
Linfócitos ‡	2025 (± 2979)	2152 (± 3326)	23,8 (± 19,0)	25,3 (± 18,5)	0,318	0,98
Monócitos	562 (± 451)	779 (± 554)	6,6 (± 4,5)	9,1 (± 5,9)	<0,001	0,83
Eosinófilos	283 (± 1783)	307 (± 2142)	2,5 (± 4,6)	2,6 (± 5,0)	0,763	0,99
Basófilos	39 (± 71)	43 (± 89)	0,5 (± 0,9)	0,5 (± 0,7)	0,141	0,51
IG ‡‡	60 (± 283)	158 (± 681)	0,6 (± 1,9)	1,4 (± 2,7)	<0,001	0,90
Eritroblastos	186 (± 1862)	160 (± 1498)	1,4 (± 15,7)	1,3 (± 12,7)	0,835	0,99

NOTA: Contagem manual de 200 células realizada em 1216 amostras, exceto eritroblastos (n=361).

Os valores são expressos em média (± desvio padrão)

(#) - Contagem absoluta (uL)

(%) - Contagem relativa

† - Neutrófilos bastonetes e segmentados;

‡ - Linfócitos Normais, Variantes, pró-linfócitos e plasmócitos;

‡‡ - IG = Granulócitos imaturos (promielócitos + mielócitos + metamielócitos).

Teste-t: Diferenças significativas entre os métodos ($p < 0,05$) estão em negrito

r - Coeficiente de correlação de Pearson.

De acordo com os coeficientes de correlação obtidos no presente estudo, a contagem diferencial de leucócitos realizada pelo método manual demonstrou uma

correlação muito forte ($r=0,90-1,00$) com a contagem do analisador Sysmex XE-5000 para a contagem absoluta dos neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e eritroblastos. Para a contagem de monócitos e granulócitos imaturos, a correlação foi forte ($r=0,70-0,90$) e para basófilos a correlação foi moderada ($r=0,50-0,70$), conforme descrito na Tabela 4. Na avaliação da contagem diferencial de leucócitos relativa, observou-se uma correlação muito forte para neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e eritroblastos ($r=0,96$, $r=0,96$, $r=0,94$ e $r=0,99$, respectivamente). Os monócitos apresentaram forte correlação entre os métodos ($r=0,75$) e os basófilos e granulócitos imaturos tiveram uma correlação moderada ($r=0,61$ e $r=0,58$, respectivamente).

5.3 FREQUÊNCIAS DE AMOSTRAS COM SINALIZAÇÃO DE ALARMES

As análises com o sistema automatizado Sysmex XE-5000 ($n=1296$), mostraram que, 1179 amostras apresentaram 3177 tipos de alarmes quantitativos, 489 amostras apresentaram 856 tipos de alarmes qualitativos (suspeitos) e 319 amostras apresentaram 354 tipos de alarmes com registros gráficos de dispersões anormais. Foram observados até 7 tipos de alarmes (qualitativos ou quantitativos) detectados em uma mesma amostra. Os alarmes quantitativos encontrados nas 1296 amostras estão descritos na Tabela 5 (página 68).

Os alarmes qualitativos relacionados aos leucócitos foram encontrados em 693 amostras, sendo 522 alarmes suspeitos de células anormais e/ou imaturas (40,3% do total) descritos na Tabela 6, e 171 alarmes que sugerem interferência analítica pelo XE-5000 (13,2% do total) descritos na tabela 7.

Os alarmes qualitativos relacionados à série vermelha (Tabela 6) totalizaram 272 sinalizações (21,0% do total). Entre estes, os alarmes de eritroblastos representaram 46,3% dos alarmes da série vermelha e 9,7% do total geral de alarmes.

A série plaquetária representou 35,3% ($n=458$) dos alarmes qualitativos liberados pelo equipamento, entre os quais, 378 foram devido aos gráficos de dispersão anormal de plaquetas ou VPM não disponível (29,2%), conforme descrito na Tabela 7.

TABELA 5 - ALARMES QUANTITATIVOS LIBERADOS PELO SYSMEX XE-5000 DE ACORDO COM O CRITÉRIO DE POSITIVIDADE DEFINIDOS PELA UAD DO HC-UFPR

Parâmetros	Critério de positividade	Flags quantitativos
		N
Eritrócitos	> 6,5 x 10 ⁶ /μL	3
Hemoglobina	< 8,0 g/dL	157
VCM	< 74 fL ou >105 fL	148
CHCM	< 30,5 g/dL	89
RDW-CV	> 18,5%	232
RDW-SD	> 70,0 fL	61
Reticulócitos	> 0,150 x 10 ⁶ /μL ou > 2,5%	161
Eritroblastos	> 2/100 Leucócitos	25
Leucócitos	< 3,3 x 10 ³ /μL	170
Leucócitos	> 20,0 x 10 ³ /μL	101
Neutrófilos #	< 1,0 x 10 ³ /μL	128
Neutrófilos #	> 15,0 x 10 ³ /μL	84
Neutrófilos %	< 25%	99
Neutrófilos %	> 80%	250
Linfócitos #	< 0,8 x 10 ³ /μL	292
Linfócitos #	> 5,0 x 10 ³ /μL	96
Linfócitos %	< 8%	192
Linfócitos %	> 70%	42
Monócitos #	> 1,3 x 10 ³ /μL	175
Monócitos %	> 20%	53
Eosinófilos #	> 2,5 x 10 ³ /μL	13
Eosinófilos %	> 30%	3
Basófilos #	> 0,5 x 10 ³ /μL	3
Basófilos %	> 3%	14
IG	> 0,1 x 10 ³ /μL ou > 3%	269
Plaquetas	< 100 x 10 ³ /μL	310
Plaquetas	> 1.000 x 10 ³ /μL	7
Total de flags quantitativos		3177

Os tipos e o número total de alarmes qualitativos ou “suspeitos” liberados pelo XE-5000 encontrados nas 1296 amostras estão descritos na Tabela 6.

TABELA 6 - ALARMES QUALITATIVOS E AS ANORMALIDADES CORRESPONDENTES

Alarmes	Anormalidades suspeitas	Flags qualitativos
		N
“Left Shift?”	Bastonetes	163
“Immat Gran?”	Metamielócito, Mielócito e/ou promielócito	146
“NRBC?”	Eritroblastos	126
“Blast?”	Blastos	105
“Plaq Clumps?”	Agregados plaquetários	80
“Atypical Lymph?”	Linfócitos atípicos/variantes,	47
“Abn Lympho/L_Blast?”	plasmócitos ou linfoblastos	61
“HGB Defect ? ”	Morfologia anormal de eritrócitos	41
“Fragments?”	Esquízócitos	35
“Iron Deficiency ? ”	Deficiência de ferro	24
“Turb/HGB Inter? ”	Interferência na dosagem de hemoglobina pela turbidez da amostra	21
“Dimorphic Population”	População de eritrócitos com tamanho heterogêneo	4
“RBC Lyse Resist”	Eritrócitos resistentes à lise	3
TOTAL 856 alarmes qualitativos		

NOTA: n=1296

As amostras que apresentaram dispersão anormal ou aquelas onde o XE-5000 não realizou a contagem, os quais sugerem interferência analítica pelo XE-5000, estão descritos na Tabela 7.

TABELA 7 - TIPOS DE ALARMES QUE SUGEREM INTERFERENCIA ANALÍTICA PELO ANALISADOR HEMATOLÓGICO SYSMEX XE-5000

Tipo celular	Alarmes	Flags qualitativo N
Série plaquetária	Gráfico de dispersão de plaquetas anormal	221 ^a
	VPM não disponível (----)	157 ^a
Série branca	Gráfico de dispersão de leucócitos anormal	120 ^b
	Contagem diferencial de leucócitos não disponível ou incompleta (----)	51 ^b
Série vermelha	Gráfico de dispersão de eritroblastos anormal	9 ^c
	RDW-CV não disponível (----)	5 ^c
	Gráfico de dispersão de eritrócitos anormal	4 ^c

Nota: Os alarmes que sugerem interferência analítica liberados pelo Sysmex XE-5000 referente à série plaquetária totalizam 378 alarmes ^(a); a série branca (leucócitos) totalizou 171 alarmes ^(b) e a série vermelha (eritrocitária) totalizaram 18 alarmes ^(c).

5.4 DESEMPENHO ANALÍTICO DO SYSMEX XE-5000

De acordo com os critérios de positividade definidos no presente estudo, entre as 1275 extensões sanguíneas analisadas, foram detectadas pela microscopia ótica 124 amostras com desvio a esquerda, 152 amostras com IG, 31 amostras com blastos, 13 amostras com linfócitos variantes e anormais, 108 amostras com eritroblastos, 21 amostras com agregados plaquetários. Os fragmentos eritrocitários visualizados pela microscopia ótica, que atingiram os critérios de positividade, totalizaram 76 das 474 lamina de extensão sanguínea analisadas.

A avaliação dos resultados obtidos através da análise microscópica em conjunto com os alarmes emitidos pelo Sysmex XE-5000, foram utilizados para calcular o desempenho analítico do equipamento em estudo, através dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, obtidos a partir de uma tabela de contingência 2x2 (APÊNDICE 1).

A Tabela 8 mostra o desempenho dos alarmes avaliados no presente estudo.

TABELA 8 - DESEMPENHO ANALÍTICO DO SYSMEX XE-5000

Flags x Manual	Porcentagens (%)			
	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
<i>"Immat Gran?"</i> x Granulócitos Imaturos	28,9 (22,0-36,9)	91,1 (89,3-92,7)	30,1	90,5
<i>"Left Shift?"</i> x Desvio a esquerda	66,9 (57,9-75,1)	93,4 (91,8-94,8)	52,2	96,3
<i>"Blast?"</i> x Blastos	67,7 (48,5-82,7)	93,5 (91,9-94,8)	20,6	99,1
<i>"Atypical Lymph?"</i> x Linfócitos variantes	30,0 (8,1-64,6)	96,7 (95,5-97,6)	6,7	99,4
<i>"Atypical Lymph?"</i> x Pró-linfócitos, Plasmócitos e linfoblastos	33,3 (1,7 -87,5)	96,5 (95,3-97,5)	2,2	99,8
<i>"Abn Lympho/L_Blast?"</i> x Linfócitos variantes	30,0 (8,1-64,6)	95,7 (94,4-96,7)	5,2	99,4
<i>"Abn Lympho/L_Blast?"</i> x Pró-linfócitos, Plasmócitos e linfoblastos	100 (31,0-100)	95,7 (94,4-96,7,9)	5,2	100
<i>"Atypical Lymph?" e "Abn Lympho/L_Blast?"</i> x Linfócitos variantes, Pró-linfócitos, Plasmócitos e linfoblastos	61,5 (32,3-84,9)	93,3 (91,8-94,6)	8,7	99,6
<i>"NRBC?"</i> x Eritroblastos	37,9 (28,9-47,8)	93,1 (91,4-94,4)	33,7	94,2
<i>"Plaq Clumps?"</i> x Agregados plaquetários	28,6 (11,3-52,2)	94,3 (92,9-95,6)	7,8	98,7
<i>"Fragments?"</i> x Esquizócitos	23,7 (1,5-35,1)	96,0 (93,4-97,6)	52,9	86,7

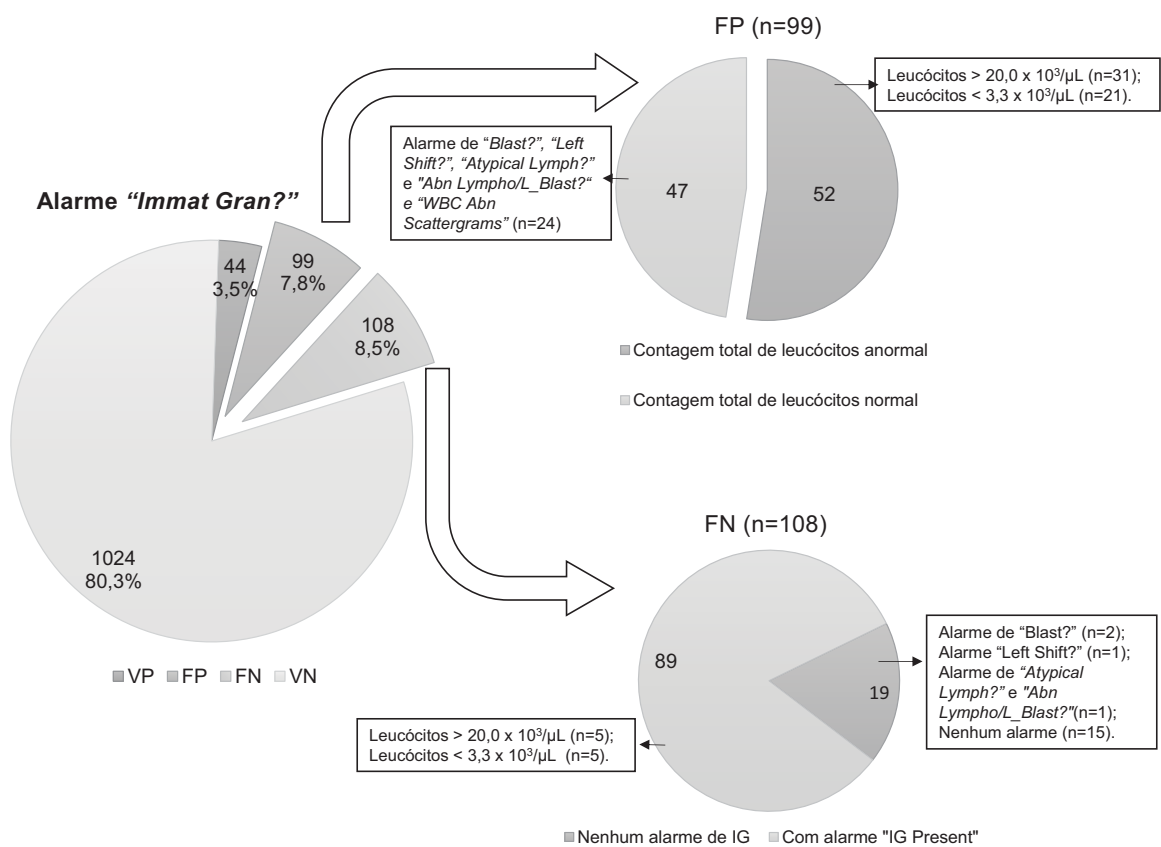
NOTA: *"Immat Gran?"*: Granulócitos imaturos; *"Left Shift?"*: Desvio a esquerda; *"Atypical Lymph?"*: *"Abn Lympho/L_Blast?"*: Linfócitos variantes ou linfócitos anormais; *"Blast?"*: Blastos; *"NRBC?"*: Eritroblastos; *"Plaq Clumps?"*: Agregados plaquetários; *"Fragments?"*: Esquizócitos. Valor Preditivo Positivo (VPP). Valor Preditivo Negativo (VPN)

5.4.1 Alarmes de Granulócitos Imaturos

Na avaliação dos alarmes de granulócitos imaturos, foram observadas 152 amostras que apresentaram células precursoras mielóides no exame microscópico da extensão sanguínea. A taxa de resultados FN foi de 8,5% (n=108), dentre as quais,

89 amostras apresentaram o alarme de "IG Present" (5 com leucopenia e 5 com leucocitose) e 19 amostras não apresentaram nenhum alarme de IG, com duas amostras marcadas com alarme de "Blast?", uma com alarme "Left Shift?" e uma com alarme de "Atypical Lymph?" e "Abn Lympho/L_Blast?", restando 15 amostras sem nenhuma sinalização, sendo 5 delas leucopênicas. Em relação as amostras FP (n=99; 7,8%), nenhuma amostra apresentou o alarme "IG Present" (Figura 20)

FIGURA 20 – TAXAS DE VP, FP, VN E FN DO ALARME DE GRANULÓCITOS IMATUROS



FONTE: O autor (2018).

Legenda: IG: Granulócitos Imaturos; VP: verdadeiro positivo; FN: falso negativo; VN: verdadeiro negativo; FP: falso positivo.

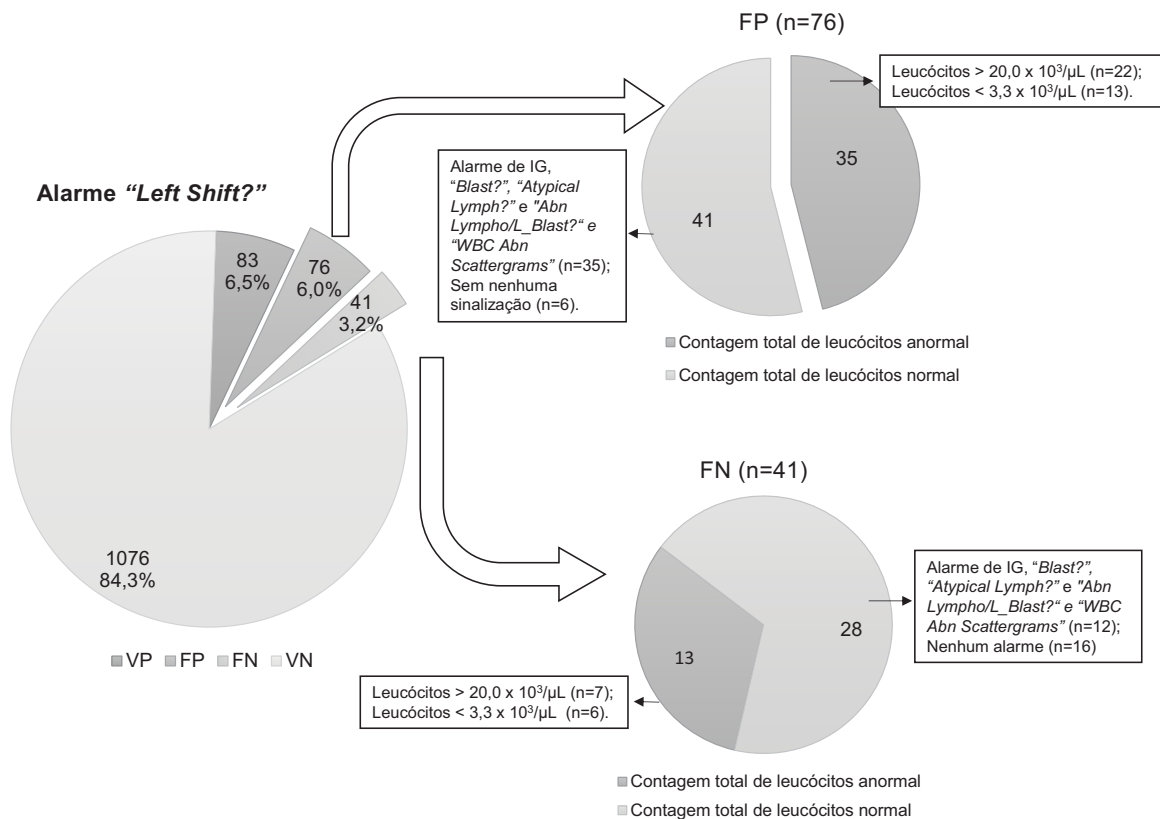
5.4.2 Alarme de Desvio a Esquerda

No presente estudo foram encontradas 83 amostras (6,5%) sinalizadas com o alarme "Left Shift?" e com as contagens diferenciais com $\geq 6\%$ de bastonetes (VP). Das 41 amostras FN (32%), 28 apresentaram a contagem total de leucócitos normal,

sendo que 12 foram sinalizadas com os alarme de IG Present, “*Immat Gran?*”, “*Blast?*” e “*WBC Abn Scattergrams*”. Em 16 amostras o equipamento não detectou nenhuma anormalidade.

Em 76 amostras FP (6,0%), 35 amostras apresentaram a contagem total de leucócitos anormal (22 com leucocitose e 13 com leucopenia). Apenas 6 amostras FP não apresentaram nenhuma indicação de revisão da lâmina ou qualquer tipo de alarme adicional ao “*Left Shift?*” (Figura 21).

FIGURA 21 - TAXAS DE VP, FP, VN E FN DO ALARME DESVIO A ESQUERDA



FONTE: O autor (2018).

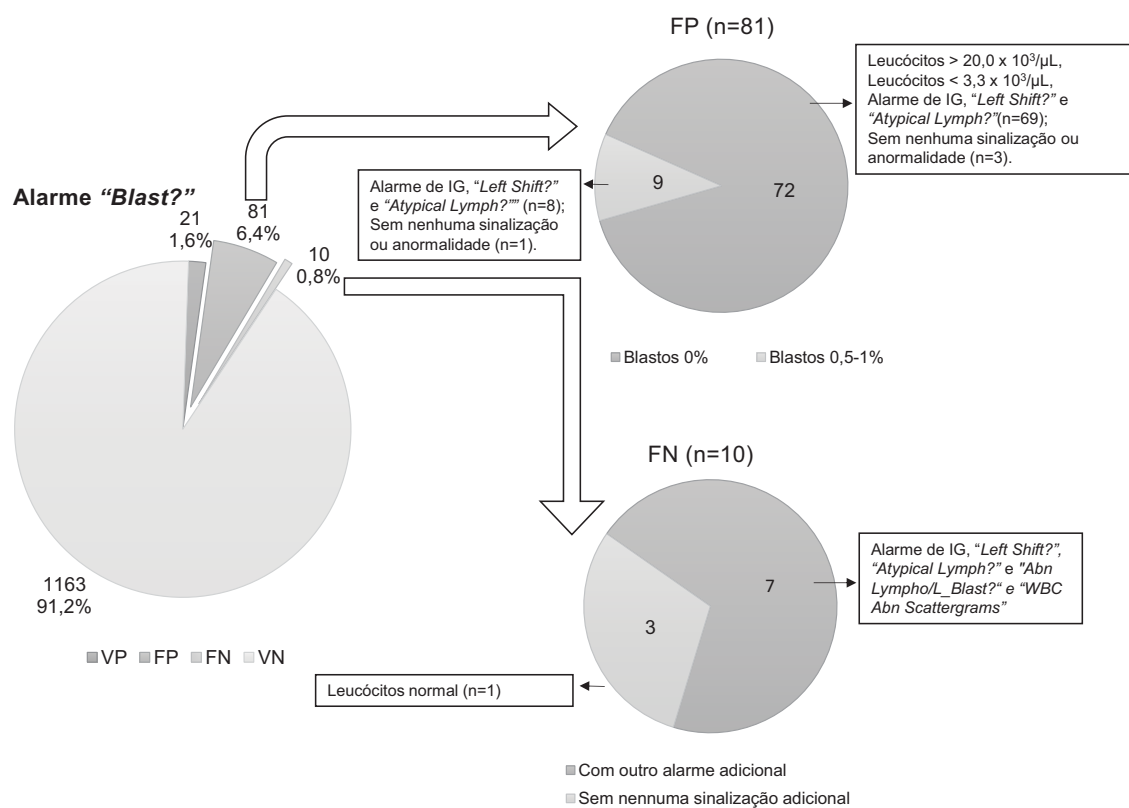
Legenda: “*Left Shift?*”: Desvio a esquerda; IG: Granulócitos Imaturos; VP: verdadeiro positivo; FN: falso negativo; VN: verdadeiro negativo; FP: falso positivo.

5.4.3 Alarame de Blastos

Foram observados $\geq 1\%$ de blastos pelo exame microscópico em 1,6% das amostras (n=21) que o equipamento sinalizou o alarme “*Blast?*”. Das 102 amostras sinalizadas pelo Sysmex XE-5000 com alarme “*Blast?*”, em 72 amostras não foram

visualizados blastos e em 9 foram visualizados entre 0,5% e 1% de blastos pela microscopia ótica, sendo portanto, amostras consideradas falso-positivas (n=81). A taxa de resultado de FN foi 0,8% (n=10), sendo 7 delas marcadas pelos alarmes de “*Immat Gran?*”, “*Left Shift?*”, “*Atypical Lymph?*” e “*Abn Lympho/L_Blast?*” e “*WBC Abn Scattergrams*” e nas 3 amostras restantes, o equipamento não produziu nenhum alarme suspeito de leucócitos (Figura 22).

FIGURA 22 - TAXAS DE VP, FP, VN E FN DO ALARME DE BLASTOS



FONTE: O autor (2018).

Legenda: IG: Granulócitos Imaturos; VP: verdadeiro positivo; FN: falso negativo; VN: verdadeiro negativo; FP: falso positivo.

5.4.4 Alarমে de Linfócitos Variantes

Entre as amostras selecionadas para avaliação do desempenho analítico dos alarmes de linfócitos variantes e/ou anormais, dez (0,8%) amostras apresentaram $\geq 5\%$ linfócitos atípicos (variantes) e 3 (0,2%) apresentaram $\geq 1\%$ plasmócitos ou pró-linfócitos.

O alarme de “*Atypical Lymph?*” ocorreu em 45 amostras (3,5%), dentre elas, 3 foram de VP para a presença de linfócitos atípicos na extensão sanguínea (0,2%). Quarenta e duas amostras foram de FP (3,3%), entre elas, uma apresentou plasmócitos, 21 estavam sinalizadas também com alarme de “*Blast?*”, 5 com alarme adicional de IG, 8 delas também foi marcada pelo alarme “*Abn Lympho/L_Blast?*”, restando 7 amostras sem nenhuma sinalização suspeita para leucócitos.

A taxa de FN foi de 0,5%. O alarme de “*Abn Lympho/L_Blast?*” ocorreu em 57 amostras (4,8%), dentre elas, 3 foram de VP (0,2%). Das 54 amostras FP (4,2%), 3 apresentaram blastos e 3 linfócitos variantes. Nenhuma amostra apresentou FN para o flag de “*Abn Lympho/L_Blast?*”.

5.4.5 Alarme de Eritroblastos, agregados plaquetários e esquizócitos

As contagens de eritroblastos ($\geq 1\%$) foram determinadas em 108 lâminas (8,5%) no exame microscópico (intervalo, 0,5-293/100 leucócitos). O analisador sinalizou um resultado positivo para eritroblastos em 122 amostras, sendo 41 delas VP (3,2%) e 81 FP (6,3%). Em 1153 amostras, o XE-5000 contou zero eritroblastos, sendo 1086 amostras VN (85,7%) e 67 amostras FN (5,2%).

Agregados plaquetários que atingiram os critérios de positividade foram visualizados em 21 amostras, sendo que em apenas 6 amostras, a presença de agregados plaquetários foi detectada tanto pelo método manual, quanto automatizado, caracterizando as amostras VP. A taxa de FP foi de 5,6% (n=71).

A taxa de VP para o alarme de fragmentos eritrocitários foi de 3,8% (n=18) e a de FN 12,2% (n=58). Dezesesseis amostras sinalizadas pelo XE-5000 foram de FP. As amostras VN totalizaram 386 testes.

5.5 PARÂMETROS DE PESQUISA

Os resultados para os índices de granularidade NEUT-X e NEUT-Y de amostras “positivas” obtidos no presente estudo e de amostras “negativas” obtidos de um estudo prévio estão resumidos na Tabela 9.

TABELA 9 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE NEUT-X E NEUT-Y

Parâmetro	Amostras	Média	Mediana	DP	Mínimo	Máximo
NEUT-X	Negativas	133,8	133,8	3,3	123,5	144,0
	Positivas (todas as amostras)	135,3*	135,1	4,2	98,8	149,3
	Positivas c/ GT presente	137,7	137,6	4,2	126,6	148,2
	Positivas com IG > 3%	136,6	136,6	4,6	126,6	147,3
	Positivas com Alarmes de IG, "Left Shift?" e "Blast?"	136,3	136,3	4,9	98,8	149,3
	Positivas com Neutrofilia (>80%)	136,6	136,6	3,8	126,6	148,2
NEUT-Y	Negativas	44,8	44,7	2,7	37,1	53,8
	Positivas (todas as amostras)	46,5*	45,7	5,3	28,8	78,5
	Positivas c/om GT presente	50,6	48,9	7,3	28,8	78,5
	Positivas com IG > 3%	49,4	48,3	6,8	32,7	69,3
	Positivas com Alarmes de IG, "Left Shift?" e "Blast?"	48,6	47,3	7,2	28,8	78,5
	Positivas com Neutrofilia (>80%)	48,9	48,0	5,9	38,4	78,5

NOTA: Negativas (Amostras sem alarmes): n=648; Positivas (Amostras com alarmes): n=1033. GT: Granulações tóxicas; IG: Granulócitos Imaturos. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Conforme demonstrado na Tabela 9, os valores médios para NEUT-X e NEUT-Y foram significativamente maiores nas amostras classificadas como "positivas" ($p < 0,05$) do que nas amostras "negativas".

A correlação entre os índices NEUT-X e NEUT-Y e as granulações tóxicas nos neutrófilos visualizadas na extensão sanguínea foi aplicada em diversos cenários como: todas as amostras "positivas", somente nas amostras com granulações tóxicas presentes, com granulócitos imaturos acima de 3% e com alarmes *Left Shift*, IG Present, "Immat Gran?" e "Blast?", conforme descrito na Tabela 10.

TABELA 10 - CORRELAÇÃO ENTRE NEUT-X E NEUT-Y E OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Parâmetros hematológicos	NEUT-X (r)	NEUT-Y (r)
Granulações tóxicas (%) em todas as amostras positivas	0,34	0,43
Granulações tóxicas (+/-) em todas as amostras positivas	0,22	0,31
Granulações tóxicas presentes (%)	0,33	0,28
Granulações tóxicas (%) de amostras com IG > 3%	0,50	0,46
Granulações tóxicas (+/-) de amostras com IG > 3%	0,12	0,18
Granulações tóxicas (%) de amostras com alarmes de IG, "Left Shift?" e "Blast?"	0,36	0,44
Granulações tóxicas (+/-) de amostras com alarmes de IG, "Left Shift?" e "Blast?"	0,20	0,43
Granulações tóxicas (%) de amostras com neutrofilia (>80%)	0,25	0,32
Granulações tóxicas (+/-) de amostras com neutrofilia (>80%)	0,05	0,11
Granulações tóxicas (%) de NEUT-X + 2DP	0,31	0,26
Granulócitos imaturos (%)	0,14	0,24

NOTA: n = 1033; (%) percentual de granulações tóxicas em 100 neutrófilos contados; (+/-): presença ou ausência de granulações tóxicas; r = coeficiente de correlação de Pearson.

A Tabela 11 apresenta os valores obtidos das amostras negativas e positivas da contagem de granulócitos imaturos e mostra a diferença entre as médias observadas entre os dois grupos estudados.

TABELA 11 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE GRANULÓCITOS IMATUROS

Parâmetro	IG				
	Amostras	Negativas XE-5000	Negativas Manual	Positivas XE-5000	Positivas Manual
Média		0,3	0,1	1,4*	0,6*
Mediana		0,2	0,0	0,5	0,0
DP		0,2	0,2	2,6	1,9
Mínimo		0,0	0,0	0,0	0,0
Máximo		1,8	1,8	28,4	28,4

NOTA: Negativas (Amostras sem alarmes): n=648; Positivas (Amostras com alarmes): n=1033.

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Com relação ao índice de pesquisa HFLC, a estatística descritiva de amostras classificadas como “positivas” e “negativas” estão descritas na Tabela 12.

TABELA 12 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE HFLC

Parâmetro	Amostras	Média	Mediana	DP	Mínimo	Máximo
HFLC (%)	Negativas	0,1	0,1	0,2	0	1,1
	Positivas (todas as amostras)	0,2*	0,1	0,3	0	4,3
	Positivas (linfocitose >70%)	0,3*	0,2	0,4	0	1,4
	Positivas (Alarme "Abn Lympho/L_Blast?")	0,4*	0,2	0,4	0	1,7
	Positivas (Alarme "Atypical Lymph?")	1,4*	1,1	0,8	0,5	4,3

NOTA: Negativas (Amostras sem alarmes): n=648; Positivas (Amostras com alarmes): n=1033.

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A Tabela 13 demonstra os coeficientes de correlação do HFLC com a presença na extensão de sanguínea de plasmócitos, linfócitos variantes, de amostras com alarmes relacionados a anormalidades de linfócitos, amostras com linfocitose

TABELA 13 - CORRELAÇÃO ENTRE HFLC E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

		Parâmetro	r
HFLC	versus	Plasmócitos	0,09
		Linfócitos variantes	0,13
		Alarme "Atypical Lymph?"	0,57
		Alarme "Abn Lympho/L_Blast?"	0,15
		Contagem de Linfócitos %	0,21
		Linfocitose (>70%)	0,07

NOTA: Negativas (Amostras sem alarmes): n=648; Positivas (Amostras com alarmes): n=1033.

O parâmetro FRC foi analisado a partir de amostras classificadas como “negativas” e “positivas”, nas quais a contagem de FRC foi realizada pelo XE-5000. Desta forma, o número amostral para FRC disponível para esta análise, incluiu 111 amostras no grupo de hemogramas “positivos”, obtidos a partir das 1296 amostras com alarmes e, 94 amostras no grupo de hemogramas “negativos”, que correspondem a amostras sem a presença de alarmes (dados obtidos de 648 amostras analisadas em um estudo anterior conforme descrito em SPEZIA, 2015). A Tabela 14 demonstra a estatística descritiva do parâmetro FRC e da contagem de esquizócitos manual.

TABELA 14 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE HEMOGRAMAS COM FRC

Parâmetro	Amostras	Média	Mediana	DP	Mínimo	Máximo
FRC (10 ⁶ /uL)	Negativas	0,02	0,01	0,04	0	0,31
	Positivas	0,07	0,03	0,09	0	0,53
FRC (%)	Negativas	0,32	0,11	0,81	0	6,49
	Positivas	1,88*	0,83	2,33	0	9,36
Esquizócitos em amostras c/ FRC disponível (%)	Manual	0,65*	0,40	0,90	0	6,20
Esquizócitos em todas as amostras (%)	Manual	0,45	0,20	0,78	0	6,50
Esquizócitos em amostras c/ alarme “Fragments?” (%)	Manual	1,11	1,00	0,77	0	3,50
Esquizócitos em amostras que atingiram o critério de positividade (%)	Manual	1,79	1,40	1,16	1	6,5

NOTA: Negativas (Amostras sem alarmes): n=94; Positivas (Amostras com alarmes): n=111; Manual (amostras com contagem de FRC disponível): n=111; (todas as lâminas analisadas): n=474; (amostras c/ alarme “Fragments?”): n=34; (em amostras que atingiram o critério de positividade): n=76. * Diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

A correlação entre as 111 amostras que apresentaram o índice FRC e a presença de esquizócitos, queratócitos e esferócitos observados nessas lâminas de extensão sanguínea foi de r=0,25, enquanto que para o *flag* “Fragments?”, o grau de correlação foi de r=0,72 nessas amostras.

A correlação entre o alarme “Fragments?” e todas as lâminas analisadas (n=474), independentemente se atingiram ou não o critério de positividade para esquizócitos (≥ 1% esquizócitos em 1000 eritrócitos) na lâmina, foi de r=0,28.

6 DISCUSSÃO

Atualmente os laboratórios clínicos enfrentam cenários desafiadores com o constante aumento das solicitações de exames laboratoriais e a necessidade da racionalização dos custos para a realização destes exames. No setor da hematologia laboratorial, a revisão da extensão sanguínea continua sendo um dos maiores desafios, pois além de requerer profissionais capacitados e constantemente treinados, esta metodologia apresenta inúmeros problemas na sua execução, tais como a distribuição das células sobre a lâmina, a qualidade da coloração e a subjetividade para avaliação morfológica das células sanguíneas (BRIGGS et al., 2011; CHHUY et al., 2013).

As taxas de revisão de extensão sanguínea podem variar entre 10% a 50% nos laboratórios clínicos, o que depende da população atendida e das diretrizes locais para proceder a revisão (BARNES et al., 2005; BRIGGS et al., 2011). Em um estudo, cerca de 80% das revisões de extensão sanguínea foram desencadeadas por alarmes gerados pelo equipamento, porém aproximadamente 60% destas revisões não apresentaram novas informações das que foram sinalizadas pelo equipamento (NOVIS et al., 2006; BRIGGS et al., 2011).

Os participantes indicaram que algumas informações novas foram aprendidas na revisão de 5471 (35,7%), e nenhuma informação nova foi aprendida com a revisão de 9875 (64,3%), esfregaços de sangue.

A eficácia de um equipamento hematológico pode ser medida pela sua capacidade em diminuir o número de alarmes falso-positivos sem perder a sua sensibilidade, aumentando conseqüentemente a eficiência laboratorial (BRIGGS et al., 2011; BRIGGS et al., 2012; CHHUY et al., 2013). Analisadores hematológicos com capacidade de realizar contagens rápidas e precisas de células anormais, mesmo em pequena quantidade, podem significar o fim da necessidade de revisões de extensão sanguínea, modificando substancialmente o dia-a-dia do setor da hematologia laboratorial (FERNANDES; HAMAGUCHI, 2007).

O analisador hematológico XE-5000 (Sysmex), incorporou melhorias na tecnologia para detecção de células anormais em relação ao modelo XE-2100. Porém a confiabilidade da eficiência dos seus alarmes ainda apresenta resultados controversos em relação ao seu uso na prática clínica (STAMMINGER et al., 2002).

A avaliação dos parâmetros hematológicos liberados pelo analisador XE-5000 no presente estudo foi realizada através da correlação entre as contagens de 200 células pela microscopia ótica em extensão sanguínea de amostras que apresentaram alarmes quantitativos ou qualitativos pelo método automatizado. Além disso, os parâmetros de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN foram determinados para avaliar o desempenho analítico dos alarmes relacionados aos leucócitos, a contagem de eritroblastos, agregados plaquetários e fragmentos eritrocitários.

6.1 CORRELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS MANUAL E AUTOMATIZADA

No presente estudo, o analisador hematológico XE-5000 apresentou uma forte correlação para amostras anormais quando comparado com o método de referência (contagem manual microscópica). No entanto, deve-se notar que a qualidade dos resultados obtidos variou significativamente para as diferentes subpopulações de leucócitos e entre contagens absolutas e relativas. Os resultados mostraram uma correlação muito forte entre a contagem de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, granulócitos imaturos e eritroblastos nas contagens absolutas. A contagem de basófilos apresentou correlação moderada entre as contagens absolutas e relativas. Na avaliação da contagem diferencial relativa, os monócitos e granulócitos imaturos apresentam pior desempenho em relação a contagem absoluta.

Em relação as subpopulações celulares de leucócitos maduros, os resultados do presente trabalho são semelhantes aos obtidos em outros estudos, corroborando a boa correlação que existe entre os resultados das contagens manual e automatizada para leucócitos maduros, independente do modelo do equipamento (RUZICKA et al., 2001; STAMMINGER et al., 2002; WEILAND et al., 2002; ARROYO et al., 2005; BRIGGS et al., 2012; BRUEGEL et al., 2015).

Fujimoto et al. (2000) relatou que a contagem de eosinófilos, apesar de sua baixa frequência, apresenta, em geral, um menor coeficiente de variação entre a contagem manual e a automatizada, provavelmente pela facilidade de sua identificação pelos dois métodos. A contagem de basófilos realizada pelo método automatizado, em geral, apresenta imprecisão quando comparada com a contagem manual. Esta imprecisão pode ser devida, em parte, ao baixo número dessas células

em amostras normais (RUMKE et al., 1975; RUZICKA et al., 2001; KANG et al., 2008).

Para a contagem de monócitos, o baixo grau de correlação encontrado entre as contagens automatizada e manual está de acordo com outros estudos para a maioria dos analisadores hematológicos e não pode ser explicado devido a sua frequência relativamente baixa nas amostras analisadas. Tecnicamente, os monócitos são uma subpopulação difícil de identificar, tanto pela microscopia ótica quanto pela dispersão de luz, principalmente quando outras células anormais, como granulócitos imaturos ou linfócitos grandes estão presentes na amostra (GOOSSENS; VAN HOVE; VERWILGHEN, 1991; ARROYO et al., 2005).

O comportamento dos resultados das contagens de monócitos, basófilos e granulócitos imaturos corroboram para o entendimento das limitações que os analisadores hematológicos apresentam. Existem várias causas comuns de imprecisão da contagem de leucócitos automatizados. A maioria dos equipamentos são sensíveis na detecção de grandes populações de células anormais; no entanto, quando a percentagem de células anormais cai abaixo de 5%, as contagens tornam-se imprecisas (CHABOT-RICHARDS; GEORGE, 2014; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015).

Benattar e Flandrin (1999) avaliaram a influência da qualidade da extensão sanguínea sobre a contagem de monócitos. Os autores recomendaram a utilização dos métodos automatizados para confecção de lâminas, o que poderia diminuir algumas variáveis associadas ao procedimento manual, que no caso da contagem de monócitos, influencia sua eficácia.

Em geral, os métodos automatizados são superiores aos métodos manuais de contagem de células sanguíneas, principalmente pela contagem de um grande número de células por amostra, o que reduz significativamente os erros estatísticos causados por erros na medição da amostra, diluição, ou enumeração de células. A principal vantagem da microscopia ótica em relação a contagem automatizada é a diferenciação celular baseada em detalhes citológicos característicos, especialmente de células imaturas (FUJIMOTO et al., 2000; RUZICKA et al., 2001; GULATI et al., 2002; PIERRE, 2002; STAMMINGER et al., 2002; FERNANDES; HAMAGUCHI, 2007; CUI et al., 2010; BRIGGS et al., 2012).

6.2 DESEMPENHO ANALÍTICO DOS ALARMES

A avaliação do desempenho analítico dos analisadores hematológicos pode ser obtida através da avaliação do número de revisões de extensão sanguínea em relação a presença ou não de alarmes qualitativos, determinando a eficiência do equipamento em detectar células patológicas (CLSI, 2007; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; BRIGGS et al., 2011).

No presente trabalho, a avaliação do desempenho analítico do analisador XE-5000 foi realizada através do cálculo de parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) obtidos após a classificação das amostras em Verdadeiro Positivo (VP), Verdadeiro Negativo (VN), Falso Positivo (FP) e Falso Negativo (FN) (NCCLS, 1992; ICSH, 1994; CLSI, 2007).

A maioria dos alarmes avaliados neste estudo apresentaram alta especificidade (acima de 90%), demonstrando a boa capacidade do equipamento XE-5000 em analisar de maneira correta amostras sem alterações hematológicas. Por outro lado, a sensibilidade em torno de 30% para estes alarmes indica que amostras com anormalidades celulares, podem não ser sinalizadas através de *flags*.

Seguindo o princípio de que a presença de alarmes obriga a revisão de extensão sanguínea, 40,3% (522/1296) das amostras deveriam ser revisadas microscopicamente, devido a presença de alarmes relacionados a alterações nos leucócitos. Outros estudos apontaram que aproximadamente 20 a 25% dos alarmes gerados pelos analisadores hematológicos nas rotinas laboratoriais estavam relacionados a anormalidades morfológica dos leucócitos (BARNES et al., 2005; NOVIS et al., 2006; BRIGGS et al., 2011; ROUSSEL et al., 2012).

6.2.1 Granulócitos Imaturos

A quantificação de granulócitos imaturos é rotineiramente realizada pela microscopia ótica, porém o exame é demorado e trabalhoso. A aplicação de novas tecnologias no desenvolvimento dos analisadores hematológicos permitiu aos laboratórios a substituição da sinalização de populações de células anormais por uma contagem real de tais células. A contagem automatizada de IG oferece maior precisão, rapidez e menor coeficiente de variação na liberação dos resultados em comparação com as contagens diferenciais manuais, mesmo quando estas células estão presentes

em números muito pequenos (BRIGGS et al., 2000; FUJIMOTO et al., 2000; NIGRO et al., 2005; FERNANDES; HAMAGUCHI, 2007).

A qualidade e confiabilidade da contagem do IG tem sido considerada útil, porém a aplicabilidade da sinalização do alarme "*Immat Gran?*" é questionável (WEILAND et al., 2002; FERNANDES; HAMAGUCHI, 2007; EILERTSEN; HAGVE, 2014).

Na avaliação dos alarmes de granulócitos imaturos realizada no presente estudo, foram considerados a soma de metamielócito, mielócitos e prómielócitos visualizados na extensão sanguínea. A presença de um único mielócito ou promielócito ($\geq 1\%$) e ou mais de dois metamielócitos ($> 2\%$) classificou a extensão sanguínea como positiva. Foram avaliados o limite de configuração de fábrica ("*Q-flag*" de 100) para acionar o alarme "*Immat Gran?*" e o limite de $> 0,1 \times 10^3/\mu\text{L}$ ou 3% de IG definido pelo usuário para acionar o alarme "IG Present".

A sensibilidade da detecção de IG encontrada no presente estudo foi baixa (28,9%), indicando que o equipamento apresentou um fraco desempenho em detectar amostras que continham granulócitos imaturos na extensão sanguínea segundo o critério adotado. A probabilidade de um resultado com alarme de IG ter realmente a alteração também se mostrou baixa, de acordo com o valor preditivo positivo encontrado.

Entre os resultados FN, 19 amostras não apresentaram nenhum alarme relacionado aos IG. A quantidade de IG observada nas lâminas de extensão sanguínea dessas amostras não sinalizadas foi baixa, (de 0,5 a 3% de metamielócitos e de 0,5 a 2% mielócitos e prómielócitos). O equipamento também realizou uma contagem de IG baixa nessas amostras (de 0,4 a 2,6% de IG).

A baixa sensibilidade encontrada na presente pesquisa difere dos resultados encontrados em outros estudos (RUZICKA et al., 2001; STAMMINGER et al., 2002; BRUEGEL et al., 2015). Stamminger e colaboradores (2002) relataram não ter encontrado nenhum resultado falso-negativo para o alarme de granulócitos imaturos utilizando o XE-2100, obtendo uma sensibilidade de 100% para este alarme. Um estudo conduzido por Ruzicka e colaboradores (2001), analisando 486 amostras com o XE-2100, observou em 84 lâminas, a presença de $\text{IG} \geq 1\%$, com uma taxa de FN de 1% ($n=7$), das quais, 4 amostras eram leucopênicas e 3 amostras apresentaram a contagem total de leucócitos normal, com uma sensibilidade de 92%. Os autores sugerem que o analisador hematológico é altamente sensível para a presença de

baixo número de células precursoras mielóides. Bruegel e colaboradores (2015) encontraram uma sensibilidade de 80% para o XE-5000 para este alarme.

Eilertsen, Heide e Hagve (2014), por sua vez, relataram que o desempenho analítico do Sysmex XE-5000 é insuficiente para sinalizar IG, indicando que o alarme "*Immat Gran?*" não é um critério suficiente para ativar uma revisão microscópica. Neste estudo, foi observado que os alarmes de IG obtidos das mesmas amostras em três equipamentos XE-5000 resultou em baixa concordância entre eles.

A especificidade obtida no presente estudo foi alta (91,1%), mostrando que os resultados sem alarmes para IG liberados pelo modelo XE-5000 são confiáveis. Outros autores obtiveram resultados de especificidade semelhantes ao presente estudo (91%, 92% e 81%, respectivamente) para este *flag* (RUZICKA et al., 2001; STAMMINGER et al., 2002; BRUEGEL et al., 2015). Portanto, se o resultado do equipamento não apresentou alarme para IG, a probabilidade de não haver IG nesta amostra é de 90,5 %, de acordo com o resultado do VPN.

A avaliação da presença de qualquer alarme de IG ("*Immat Gran?*" ou "IG Present"), considerando a contagem de IG $\geq 1\%$ na revisão de extensão sanguínea, a taxa de FN do nosso estudo seria de apenas 1 amostra, muito semelhante a estudos anteriormente citados. As diferenças entre os dados do presente estudo com outros trabalhos semelhantes podem ser devido ao critério de positividade da lâmina de IG $\geq 3\%$ ou o modelo do equipamento analisado.

O critério de positividade da lâmina utilizado por Stamminger e colaboradores (2002) foi de pelo menos 2% de promielócitos, mielócitos ou metamielócitos detectados na lâmina, enquanto Ruzicka e colaboradores (2001) consideraram a presença de $\geq 1\%$ de mielócitos e / ou promielócitos na categoria de precursores mielóides. Ambos estudos avaliaram o modelo Sysmex XE-2100. Eilertsen, Heide e Hagve (2014) avaliaram o XE-5000 utilizando como critério de positividade a presença de um único mielócito e promielócito (0,5%) e ou dois metamielócitos (1%) na extensão sanguínea, enquanto que Bruegel e colaboradores (2015) consideraram $\geq 2\%$ de metamielócitos ou $\geq 1\%$ de mielócitos / promielócitos para caracterizar a presença do IG. Pérez e colaboradores (2016), avaliando o modelo XE-5000, encontraram uma sensibilidade de 66,0% e especificidade de 83,6% considerando a contagem de $\geq 1\%$ de granulócitos imaturos.

A forma de seleção das lâminas e o modo de leitura aplicados no presente estudo (sem o conhecimento prévio da contagem diferencial e dos alarmes que o

equipamento liberou), poderiam ter influenciado nossos resultados. Na maioria dos outros estudos, apenas lâminas com *flags* específicos para cada análise são selecionadas. Além disso, os autores não informam sobre o conhecimento prévio dos resultados para a avaliação microscópica da amostra. Sabe-se que o acesso do observador aos relatórios liberados pelo equipamento antes da análise da extensão sanguínea, leva a uma leitura tendenciosa para a pesquisa de determinada anormalidade. Sendo assim, a contagem diferencial realizada com o conhecimento prévio do tipo do alarme que está sendo avaliado, pode induzir o observador a gerar um maior número de VP, o que pode conseqüentemente, aumentar a sensibilidade do método.

Das 108 amostras de FN (8,5%), se retirarmos as amostras que apresentaram outros alarmes, como "IG Present" (89), "*Blast?*" (2), "*Left Shift?*" (1), "*Atypical Lymph?*" junto com "*Abn Lympho/L_Blast?*" (1) e amostras leucopênicas (5), restariam apenas 10 amostras sem qualquer sinalização.

As amostras FP (n=99) foram aquelas que o XE-5000 sinalizou "*Immat Gran?*" e a contagem diferencial não ultrapassou 3% de IG. Porém, a revisão microscópica seria desencadeada nessas amostras devido a outros fatores como: leucopenia (n=21), leucocitose (n=31) ou pela presença de outros alarmes suspeitos relacionados aos leucócitos (n=24), como "*Blast?*", "*Left Shift?*", "*Atypical Lymph?*", "*Abn Lympho/L_Blast?*" e "*WBC Abn Scattergrams*", restariam 23 amostras verdadeiramente FP. Nenhuma amostra FP apresentou o alarme "IG Present".

O desempenho analítico do alarme "*Immat Gran?*" para as amostras verdadeiramente positivas e negativas, apresentou sensibilidade e especificidade do alarme de 94,8% e 98,0%, respectivamente.

Briggs e colaboradores (2011) relataram que as taxas de resultados falso-positivos dos alarmes liberados são altas em todos os analisadores e mostrou que as melhorias desenvolvidas no modelo XE-5000, com algoritmos aprimorados para sinalização, em comparação com o XE-2100 reduziram o número de revisões de lâmina e aumentaram a produtividade do laboratório. Para pacientes com histórico médico conhecido, a contagem de IG automatizada já é considerada suficiente, economizando, assim, tanto o tempo de preparo, quanto o tempo para a revisão da lâmina de extensão sanguínea (BRIGGS et al., 2011; SYSMEX, 2011b; GEORGE, 2012; CIMENTI et al., 2013).

Apesar da boa correlação entre os métodos avaliados, a média da contagem automatizada (1,4%) foi maior que a contagem manual (0,6%) para os granulócitos imaturos, com uma diferença significativa entre as mesmas ($p < 0,05$). Em um estudo realizado por Stamminger e colaboradores (2002), os resultados das contagens de IG no analisador XE-2100 foram inferiores às contagens manuais. Outros autores encontraram uma forte correlação entre os métodos, porém, com elevado desvio padrão nas contagens manuais de IG (FUJIMOTO et al., 2000; FERNANDES; HAMAGUCHI, 2007; HOTTON et al., 2013). A contagem maior de IG pelo método automatizado em relação à contagem manual pode ser devido as diferenças morfológicas entre bastonetes e metamielócitos que nem sempre são facilmente distinguíveis. Enquanto que pela microscopia, um número limitado de células é identificado como bastonetes, o sistema automatizado já considera um metamielócito (FUJIMOTO et al., 2000; WEILAND et al., 2002; EILERTSEN; HAGVE, 2014).

Outra explicação para a diferença das contagens manual e automatizada pode ser devido às estatísticas de contagem. Os equipamentos têm uma vantagem estatística sobre a contagem manual pelo maior número de células contadas (RUMKE et al., 1975; EILERTSEN; HAGVE, 2014). Eilertsen, Heide e Hagve (2014) verificaram uma maior concordância entre as contagens de IG automatizadas do que entre contagens de IG a partir das duas contagens manuais. Além disso, a diferença nas contagens manual e automatizada também pode ser resultante de uma distribuição não-homogênea de leucócitos nas extensões sanguíneas. A técnica de cunha para a preparação das extensões sanguíneas pode causar uma distribuição não homogênea de leucócitos nas lâminas, sendo que células grandes, como o IG, podem ser empurradas para a borda e para os lados da lâmina e, assim, não serem visualizados na área de exame para serem incluídos na contagem (FUJIMOTO et al., 2000; PERKINS, 2003; EILERTSEN; HAGVE, 2014)

Estudos relataram que os bastonetes são os tipos celulares que mais contribuem para a liberação do alarme de "*Immat Gran?*", levando ao questionamento do alarme "*Immat Gran?*" também ser uma medida de desvio a esquerda (RUZICKA et al., 2001; EILERTSEN; HAGVE, 2014). Neste contexto, o pequeno tamanho amostral com desvio a esquerda ($n=9$) entre os resultados FP para o alarme de IG, prejudicou esta avaliação.

Embora os resultados quantitativos discordantes sejam complexos de avaliar, nossos achados indicam que a contagem de IG pelo XE-5000 pode ser considerada mesmo quando acompanhada por um alarme de "*Immat Gran?*".

6.2.2 Desvio a esquerda

Os analisadores hematológicos modernos fornecem uma contagem de neutrófilos precisa, porém, na maioria dos modelos, não existe uma contagem específica de bastonetes (SENZEL; SPITZER; DECRISTOFARO, 2010). Os equipamentos se limitam a gerar um alarme de desvio à esquerda, indicando a necessidade da revisão da extensão sanguínea. O analisador Sysmex XE-5000 dispara o alarme "*Left Shift?*" (desvio à esquerda) baseado na combinação de padrões de anormalidades detectados na área do gráfico de dispersão dos canais DIFF e IMI (WEILAND et al., 2002; BRIGGS et al., 2011; SYSMEX, 2011b;2018).

O alarme de desvio à esquerda tem sido relatado como a causa mais frequente para a revisão morfológica na rotina laboratorial (CORNBLEET, 2002; NOVIS et al., 2006; WEERKAMP; TAAL; DE BOER, 2011).

A avaliação do alarme "*Left Shift?*" realizada no presente estudo, apresentou uma taxa de FN de 3,2% (n=41), ou seja, nessas amostras, a contagem manual de bastonetes foi maior que 6%, porém, o equipamento não sinalizou o alarme "*Left shift?*". Dessas 41 amostras FN, 28 delas apresentaram uma contagem de leucócitos normal, sendo que 12 delas, houve a presença de alarmes de granulócitos imaturos, blastos e alarmes do diagrama de dispersão anormal de leucócitos, totalizando 16 amostras sem nenhuma sinalização adicional, correspondendo às lâminas que não seriam revisadas pela microscopia ótica.

A taxa de FP foi de 6,0% (n=76) das amostras, nas quais o equipamento sinalizou o alarme "*Left Shift?*" sem uma contagem de $\geq 6\%$ de bastonetes na extensão sanguínea. Em 47 dessas amostras, foram visualizados pelo menos um granulócito imaturo em 200 células contadas e das 29 amostras em que não foram visualizadas nenhuma célula imatura, 23 tinham bastonetes em quantidade menor que o critério estabelecido (média de 2,4%). Nas amostras com o alarme "*Left Shift?*", a porcentagem média de neutrófilos bastonetes encontrada foi de 7,6% enquanto que, para as amostras que não apresentaram o alarme, a média foi de 1,3%.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, o Sysmex XE-5000 apresentou uma sensibilidade moderada (66,9%) na detecção de amostras com desvio a esquerda. A probabilidade do resultado sinalizado pelo XE-5000 apresentar a alteração foi de apenas 52,2%. A especificidade obtida para o alarme “*Left Shift?*” mostrou que o equipamento foi capaz de excluir as amostras que não apresentam desvio a esquerda em 93,4% dos testes. A probabilidade das amostras sem o alarme “*Left Shift?*”, serem realmente negativas foi de 96,3%.

Stamminger e colaboradores (2002) realizaram um estudo com o modelo XE-2100 e encontraram uma sensibilidade de 43% e especificidade de 96% para o alarme de desvio a esquerda, utilizando como critério a contagem de bastonetes de 6%. Neste estudo, a combinação da contagem de bastonetes ($>0,9 \times 10^9/L$) e neutrófilos $> 80\%$, aumentou a sensibilidade do alarme para 83%. Em um estudo realizado por Briggs e colaboradores (2011) com o equipamento XE-5000, os autores encontraram valores de 35,7% de sensibilidade e 98,4% de especificidade, porém, os mesmos não descrevem os critérios utilizados para a avaliação do desempenho desse alarme.

Em trabalho semelhante ao nosso, Kang e colaboradores (2008) utilizando o modelo XE-2100 encontraram taxas de 3% e 7% de resultados FN e FP respectivamente. Ruzicka e colaboradores (2001) encontraram uma taxa de FN de 1% e FP de 16% para o alarme “*Left Shift?*” utilizando o modelo XE-2100, porém, os autores avaliaram o alarme de desvio a esquerda associado com o alarme de granulócitos imaturos.

O presente estudo avaliou 159 amostras sinalizadas com o alarme “*Left Shift?*”. A maioria destas amostras (91,8%) apresentaram junto ao alarme “*Left Shift?*”, alarmes adicionais relacionados aos leucócitos, como “*IG Present?*”, “*Immat Gran?*”, “*Blast?*”, “*Atypical Lymph?*”, “*Abn Lympho/L_Blast?*” e “*WBC Abn Scattergrams?*”. Weerkamp e colaboradores (2011) observaram em 26,4% das amostras, o alarme “*Left Shift?*” associado a outro *flag*.

6.2.3 Blastos

O alarme de blastos é uma das mensagens de alerta liberada pelos analisadores hematológicos que apresenta importância clínica das mais relevantes (BRUEGEL et al., 2015).

Na avaliação dos alarmes de blastos realizada no presente estudo, o XE-5000 liberou 6,4% de resultados FP (n=81 de 1275), dos quais 77 deles eram amostras adicionalmente marcadas pelos alarmes de granulócitos imaturos, desvio a esquerda ou linfócitos atípicos, com leucocitose e leucopenia. Apenas 4 amostras não apresentaram nenhuma sinalização adicional. A microscopia ótica detectou em 64 das 81 amostras FP, pelo menos uma célula imatura mielóide ou a presença de desvio a esquerda. Entre as 10 amostras FN, apenas 2 lâminas não seriam revisadas pela microscopia pois não apresentaram nenhuma sinalização ou anormalidade detectada pelo equipamento, sendo considerada uma amostra verdadeiramente FN.

No presente estudo, foram detectados $\geq 1\%$ de blastos em 31 amostras pela microscopia ótica, sendo 21 amostras classificadas como VP. A sensibilidade e especificidade para o alarme de “*Blast?*” foi de 67,7% e 93,5%, respectivamente. Se considerarmos a presença de blasto (a partir de 0,5%) junto a sinalização “*Blast?*”, 30 amostras foram caracterizadas como VP e 26 amostras FN, não alterando a sensibilidade e especificidade do método avaliado (53,6% e 94,1% respectivamente).

Nossos dados revelam uma sensibilidade limitada do XE-5000 na sinalização de blastos, corroborando com outros estudos que encontraram baixas taxas de sensibilidade na detecção de blastos (BRIGGS et al., 2011; EILERTSEN et al., 2013; BRUEGEL et al., 2015; FURUNDARENA et al., 2017). Eilertsen e colaboradores (2013), investigaram a confiabilidade do alarme de blastos em 3 analisadores hematológicos Sysmex XE-5000. A presença de uma única célula blástica (0,5%) encontrada na extensão sanguínea foi considerada como resultado verdadeiro-positivo. Os autores testaram diferentes limites de *Q-flag* em três equipamentos, o que resultou em uma variação de sensibilidade para o alarme de blastos de 54,0 a 75,0% entre eles. A sensibilidade mais alta foi obtida com valor de *Q-flag* de 100, o mesmo utilizado em nosso estudo. O maior valor da especificidade (81,0%) foi obtida com *Q-flag* de 300. Com um aumento da especificidade do alarme de blasto, os autores reduziram a taxa de revisão de lâmina em 12%, com conseqüente aumento no número de resultados falsos-negativos (de 13% para 19%) (EILERTSEN et al., 2013).

Bruegel e colaboradores (2015) demonstraram bons resultados para a sensibilidade do alarme “*Blast?*” no modelo XN-2000. Hotton e colaboradores (2013) relataram especificidade de 100% para este alarme, porém, os autores alcançaram este resultado utilizando a associação dos três alarmes em conjunto (blastos, IG e

linfócitos anormais). Quando os autores consideraram apenas o alarme de blastos, a sensibilidade foi de 72% para o XN-2000.

Na avaliação do alarme de “*Blast?*” combinado com o alarme “*Abn Lympho/L_Blast?*”, Ruzicka e colaboradores (2001) não observaram um aumento na sensibilidade da sinalização de blastos, mas sim, um aumento dos resultados de FP. Os autores relataram que o modelo NE-8000 gerou duas vezes mais resultados FP quando comparado ao modelo XE-2100 (11% vs 5%, respectivamente).

Apesar de alguns alarmes, como o “*Blast?*”, terem pouca capacidade de prever a presença de alterações específicas, a presença de um alarme específico pode estar indicando a existência de qualquer outra anormalidade hematológica. Por exemplo, uma contagem diferencial com sinalização da presença de linfócitos atípicos (“*Atypical Lymph?*”) pode significar a presença de blastos na revisão da extensão sanguínea (SIRECI et al., 2010b; CHABOT-RICHARDS; GEORGE, 2014).

De 81 resultados FP, em 64 amostras, ao invés da observação de blastos, foram visualizadas células imaturas mielóides e em uma amostra, linfócitos variantes. Quatro amostras eram leucopênicas e 6 apresentaram contagem de leucócitos acima de $20,0 \times 10^3/\mu\text{L}$. As 5 amostras FP restantes tiveram alarmes adicionais de granulócitos imaturos. Portanto, somente em uma amostra não foi visualizada nenhuma alteração compatível com o alarme de blastos.

Eilertsen, Vollestad e Hagve (2013), relataram que em amostras com blastos observados na extensão sanguínea, aproximadamente 5% não apresentavam o alarme “*Blast?*”. Os autores consideraram a presença de um único blasto (0,5%) como uma lâmina positiva. Nossos dados diferem dos resultados destes autores, onde foram observados $\geq 1\%$ de blastos na extensão sanguínea em 0,8% das amostras (n=10; FN), sem nenhum alarme de blasto acionado pelo XE-5000. Entre as 10 amostras falso-negativas, 7 apresentaram alarmes de “*Atypical Lymph?*” ou “*Abn Lympho/L_Blast?*”, “*IG Present?*”, “*Left Shift?*”, “*Immat Gran?*” ou “*WBC Abn Scattergrams?*”. Somente três amostras FN não foram sinalizadas com nenhum outro alarme relacionado aos leucócitos pelo equipamento. Porém, em duas delas, as amostras eram leucopênicas e ainda teriam a extensão sanguínea revisada devido a amostra apresentar alarme de “*PLT Abn Distrib?*” e “*Fragments?*”.

Ruzicka e colaboradores (2001) relataram excelente sensibilidade de sinalização para blastos pelo modelo XE-2100 em contagem de leucócitos normais e elevadas. Neste estudo, todas as 5 amostras FN exibiram contagem de leucócitos

abaixo de $2,5 \times 10^9/L$. Os autores compararam os modelos NE 8000 e XN 2100 e obtiveram taxas de FN de 2% e 1 %, respectivamente.

Briggs e colaboradores (2011) encontraram 3 amostras falso-negativas para o alarme de blastos pelo XE-5000 em pacientes com leucopenia. Estes dados comprovam a baixa sensibilidade de sinalização deste alarme em contagens de leucócitos baixas (RUZICKA et al., 2001; BRIGGS et al., 2011).

A ausência de blastos com a presença de outras anormalidades encontradas na extensão sanguínea quando o alarme “*Blast?*” é disparado, pode ser um indicativo da necessidade de ajustes nas configurações de fábrica para melhorar a performance dos alarmes (EILERTSEN et al., 2013).

A aplicação de ajustes nos fatores (*Q-flag*) e algoritmos, deve ser realizada com cuidado para que ocorra um equilíbrio entre o risco de perder células patológicas ou aumentar o número de contagens manuais, resultando em uma menor produtividade laboratorial (SIRECI et al., 2010b; EILERTSEN et al., 2013).

Essa discordância pode ser devida às limitações da contagem diferencial pela microscopia ótica ou ao fato do observador não ter visualizado a presença de blastos em uma contagem de 100 células. É bem conhecido que a classificação manual das células é subjetiva e tem uma aplicação limitada em populações celulares de baixa frequência. Desta maneira, torna-se difícil avaliar a relevância da detecção de um único blasto (RUMKE et al., 1975; EILERTSEN; HAGVE, 2014).

Outro aspecto importante a ser avaliado nestes estudos, é a metodologia utilizada na leitura das lâminas. A revisão da lâmina realizada de modo “cego” pelo observador, não leva em conta uma contagem tendenciosa à procura de determinado tipo celular, como ocorre em situações onde se tem o resultado do equipamento no momento da revisão da lâmina (VAN DER MEER; SCOTT; KEIJZER, 2004).

6.2.4 Linfócitos variantes

A citometria fluorescente incorporada nos analisadores hematológicos tem melhorado a detecção dos linfócitos variantes e linfoblastos, o que pode ser útil em laboratórios que atendem serviços de oncologia (STAMMINGER et al., 2002). A evolução da eficiência destes alarmes pode ser comprovada com a redução do número de sinalizações falso-positivas para linfócitos variantes de 11,4% para 4,5%

comparando-se os modelos XE-2100 e XE-5000, respectivamente (BRIGGS et al., 2011).

Na maioria dos equipamentos, o número de alarmes relacionados a presença de linfócitos anormais ou atípicos restringe-se a um tipo de alarme. Nos modelos mais recentes da Sysmex, são incorporados dois tipos destes alarmes: “*Atypical Lymph?*” e “*Abn Lympho/L_Blast?*” (BRIGGS et al., 2011).

No presente estudo, para a avaliação de cada um dos alarmes “*Atypical Lymph?*” e “*Abn Lympho/L_Blast?*” considerou-se, de forma separada, uma análise com a contagem de linfócitos variantes encontrados na extensão sanguínea e em outra, a contagem de linfócitos anormais (pró-linfócitos, plasmócitos e linfoblastos). Por último, foi analisada a contagem de todos os linfócitos variantes e anormais com a soma dos dois tipos de alarmes: “*Atypical Lymph?*” e “*Abn Lympho/L_Blast?*”.

Em um estudo conduzido por Kang e colaboradores (2008), utilizando o analisador XE-2100, foi observado que 1,2% das amostras (n=5) apresentaram mais de 5% de linfócitos variantes encontrados na análise da extensão sanguínea, juntamente com o alarme “*Atypical Lymph?*”. Ruczika e colaboradores (2001) encontraram 5% (22/486) das amostras com $\geq 5\%$ de linfócitos atípicos. A taxa de falso-negativo do presente estudo foi semelhante às encontradas no estudo conduzido por Kang e colaboradores (2008) utilizando outros equipamentos (Cell-Dyn-Safira= 0,7%; ADVIA modelo 120= 0,5%; Beckman-Coulter LH 750= 1,2% e Sysmex XE-2100= 0,7%).

A sensibilidade para a detecção de linfócitos variantes foi baixa, tanto para o alarme de “*Atypical Lymph?*” quanto para o alarme “*Abn Lympho/L_Blast?*”. Resultado semelhante foi obtido por Ruczika e colaboradores (2001), utilizando o analisador hematológico modelo XE-2100.

Outra explicação para este comportamento estaria relacionada as características morfológicas muito heterogêneas que os linfócitos variantes e as células linfóides apresentam. A subjetividade da análise morfológica realizada pela microscopia ótica é mais complexa quando se trata da identificação destas células, sendo que até analistas experientes, apresentam dificuldades no seu relato correto (RUZICKA et al., 2001; STAMMINGER et al., 2002; HOFFMANN, 2004; VAN DER MEER et al., 2004; BRIGGS et al., 2011).

A dificuldade em classificar corretamente linfócitos variantes é tema de discussão há muitos anos. Koepke, em 1977 (citado por SIRECI et al., 2010b) ,

usando dados de um ensaio de proficiência enviado para mais de 4000 laboratórios nos Estados Unidos, relatou um coeficiente de variação de 88% para a contagem de linfócitos atípicos. Van der Meer (2007), ao enviar imagens (PowerPoint) de leucócitos para 671 analistas de 157 laboratórios na Holanda, detectou significativa variabilidade inter-observadores na classificação de linfócitos atípicos (34%), inclusive quando a mesma célula foi mostrada duas vezes.

Briggs e colaboradores (2011) obtiveram sensibilidade maior do que a observada em nosso estudo quando avaliou os dois alarmes de células linfóides em conjunto (51,2%). Na avaliação dos alarmes "*Atypical Lymph?*" e "*Abn Lympho/L_Blast?*" em conjunto, a sensibilidade encontrada no presente estudo foi maior (61%) para a detecção de linfócitos variantes e anormais em comparação com a avaliação dos alarmes separados. Kang e colaboradores (2008) encontraram uma boa sensibilidade (89,6%) na avaliação conjunta dos dois alarmes.

Chhuy e colaboradores (2013) demonstraram que o disparo do alarme de *ABN LIMPH* do XE-5000 está correlacionado com altas contagens de linfócitos (particularmente acima de $4 \times 10^9 / L$).

No presente estudo, também foi observada uma maior frequência de alarmes "*Abn Lympho/L_Blast?*" em amostras com linfocitose (35,1%) quando comparadas as amostras com linfopenia (10,5%), correspondendo às contagens de linfócitos $>5,0$ e $<0,8 \times 10^9/L$, respectivamente. Corroborando, a frequência do alarme "*Atypical Lymph?*" foi de 24,4% em amostras com linfocitose e 2,2% em amostras com linfopenia.

A especificidade dos alarmes de linfócitos variantes e anormais foi alta em todas as avaliações dos alarmes. Outros autores encontraram resultados semelhantes nos modelos XE-5000 (95,3%) e XE-2100 (95,0% e 89,6%) (RUZICKA et al., 2001; KANG et al., 2008; BRIGGS et al., 2011). Estes resultados apontam uma grande probabilidade de um alarme para linfócitos variantes dar negativo em amostras que não contém esta anormalidade (especificidade $>90\%$), reforçando o alto VPN obtido em nossas análises (99,4 a 100%).

Nossos resultados, vêm ao encontro dos achados de outros autores, quanto a dificuldade na aplicação das informações fornecidas pelos analisadores hematológicos na análise quantitativa e qualitativa das células linfóides. Tal quadro reforça a necessidade de padronização e intenso treinamento para a equipe de profissionais que revisam extensões sanguíneas.

6.2.5 Eritroblastos

Para alguns analisadores hematológicos, a contagem dos eritroblastos tem efeito direto sobre a contagem de leucócitos, pois podem ser identificados como um pequeno linfócito maduro, sendo necessária a contagem dos eritroblastos pela microscopia ótica e a correção da contagem total de leucócitos (BRIGGS, 2009; HWANG et al., 2016)

O analisador Sysmex XE-5000 quantifica os eritroblastos através da citometria de fluxo fluorescente, o qual permite a discriminação dos eritroblastos entre as outras células nucleadas, fornecendo uma contagem total dos leucócitos e a contagem de linfócitos corrigida (BRIGGS et al., 2000; RUZICKA et al., 2001; BRIGGS et al., 2011; PIPITONE et al., 2012; HWANG et al., 2016; FURUNDARENA et al., 2017; SYSMEX, 2018). O alarme “NRBC?” é gerado quando a contagem de eritroblastos não é realizada e quando eventos são detectados na área dos eritroblastos no diagrama de dispersão do canal DIFF e do canal NRBC.

A avaliação do alarme “NRBC?” realizada no presente estudo, mostrou uma sensibilidade baixa na detecção de eritroblastos, mas uma especificidade alta, considerando contagens de eritroblastos igual ou acima de 1% na extensão sanguínea. Estudos semelhantes consideraram a positividade da extensão sanguínea, aquelas cuja quantidade de eritroblastos é de no mínimo 0,5% (BRIGGS et al., 2000; RUZICKA et al., 2001). Na avaliação do uso de 0,5% ou de 1% de eritroblastos na extensão sanguínea realizada no presente estudo, não foi observada uma mudança significativa na sensibilidade e na especificidade do alarme “NRBC?”.

O equipamento XE-5000 realizou a contagem de eritroblastos em 364 amostras entre as 1275 selecionadas após a triagem, mas somente 37 delas apresentaram mais de 1% de eritroblastos pela contagem automatizada. O equipamento realizou a contagem de eritroblastos através do canal RET, somente para as amostras em que havia um pedido de contagem de reticulócitos programado pelo operador. Inicialmente, o equipamento sinalizou 126 amostras com NRBC?, mas após a triagem foram removidas as amostras que não apresentaram qualidade da lâmina, restando 122 delas. Em 108 amostras foram encontrados eritroblastos igual ou acima de 1% no exame microscópico, com 67 amostras falso negativas para o alarme “NRBC?”. Destas, 30 amostras apresentaram contagens de eritroblastos de 1% e em 13 amostras, foram contadas até 2 eritroblastos em 100 leucócitos no exame

microscópico. Entre as 67 amostras FN, em 22 amostras o equipamento sinalizou o alarme quantitativo “NRBC Present”, indicando que a amostra continha mais de 2% de eritroblastos, não ultrapassando o limite necessário para o disparo do alarme “NRBC?”. Na avaliação conjunta, onde os dois alarmes relacionados à presença de eritroblastos foi encontrado (“NRBC?” e “NRBC Present”), a sensibilidade e a especificidade aumentaram (58,3% e 95,8%, respectivamente), com VPP e VPN de 42,9% e 96,0%, respectivamente.

Houve uma forte correlação entre as contagens manual e automatizada de eritroblastos, similar às encontradas em outros estudos (BRIGGS et al., 2011; PIPITONE et al., 2012; TANTANATE; KLINBUA, 2015). Os valores de eritroblastos obtidos pela contagem manual variaram entre 0% a 293%. Em contagens com menos de 2% de eritroblastos pelo método manual, o modelo XE-5000 apresentou contagens maiores, provavelmente pelo maior número de célula analisadas. Por outro lado, as contagens manuais tendem a superestimar a quantidade de eritroblastos em situações onde estas células estão em maior número na circulação (BRIGGS et al., 2000; RUZICKA et al., 2001).

Briggs e colaboradores (2000) comparando a contagem de eritroblastos pelos métodos manual e automatizado (modelo Sysmex XE-2100), obtiveram uma taxa de FN acima daquela encontrada no presente estudo (9,5% vs 5,2%). Os autores observaram que na avaliação de 149 amostras patológicas, não foram sinalizados alarmes relacionados ao eritroblastos em duas amostras, uma proveniente de paciente com mielodisplasia (1,5%) e a outra de um recém-nascido (1%).

A avaliação do alarme “NRBC” é difícil de ser mensurada, pois esta determinação depende de contagem adicional, requerida pelo analisador. Desta forma, a aplicabilidade da contagem dos eritroblastos no modelo XE-5000 é limitada quanto ao seu uso na rotina laboratorial. A contagem de eritroblastos propriamente dita somente foi realizada, de forma adicional, quando na amostra foi solicitada conjuntamente a contagem de reticulócitos, o que limita uma análise como a realizada em outros alarmes, como os de granulócitos imaturos e blastos. Além disto, a elevação dos custos do exame frequentemente desestimula sua contagem. Com isto, cabe aos fabricantes concentrarem esforços técnicos para tornar a contagem de eritroblastos mais acessível as rotinas laboratoriais.

6.2.6 Plaquetas e agregados plaquetários

Alguns analisadores hematológicos são capazes de gerar alarmes quando há suspeita da presença de agregados plaquetários na amostra. A sensibilidade e especificidade destes alarmes é bastante variável entre os diferentes equipamentos disponíveis no mercado (BRIGGS et al., 2007; ZANDECKI et al., 2007; GULATI et al., 2013; BRUEGEL et al., 2015).

Os resultados da presente pesquisa demonstraram que os alarmes de agregados plaquetários (*“Plaq Clumps?”*) liberados pelo Sysmex XE-5000 apresentaram baixa sensibilidade e boa especificidade em identificar agregados plaquetários. Outros estudos que avaliaram o desempenho do analisador Sysmex XE-5000 na detecção de agregados plaquetários obtiveram índices de sensibilidade e especificidade de 57% e 99 % (HAWKINS et al., 2016) e de 10% e 98,4% (BRIGGS et al., 2011) respectivamente, o que ilustra que o alarme de agregados plaquetários não é totalmente confiável nos analisadores avaliados.

A baixa sensibilidade do método dificulta a identificação de situações que levam a formação de agregação plaquetária e reforça a necessidade da análise microscópica para sua detecção. Desta forma, a avaliação da extensão sanguínea pela microscopia ótica ainda é de extrema importância em um hemograma, devido às limitações que o método automatizado apresenta (GULATI et al., 2013; COMAR; MALVEZZI; PASQUINI, 2014; BRUEGEL et al., 2015).

Apesar da possível influência de agregados plaquetários sobre a contagem de plaquetas, o resultado do presente estudo não demonstrou diferença significativa entre a contagem de plaquetas pelo XE-5000 e a microscopia ótica. Uma possível explicação para este resultado pode ser devido ao pequeno número de alarmes *“Plaq Clumps?”* sinalizados pelo equipamento.

Nossos resultados reforçam a necessidade de definir um critério para caracterizar um agregado plaquetário na extensão sanguínea. O uso de cinco plaquetas unidas para afirmar que é um agregado plaquetário necessita maior divulgação, para que outros estudos, com outros analisadores hematológicos sejam realizados e, desta forma, seja possível melhorar a discussão sobre a real aplicabilidade desta definição.

Este quadro dificulta uma conclusão mais apurada sobre o uso deste alarme. Fica claro porém, que cada laboratório deve ter um protocolo definido sobre a tomada

de ação em amostras que apresentem alarmes para agregados plaquetários liberados pelo equipamento ou quando a análise microscópica das plaquetas deve ser realizada, não só em relação à contagem, mas também na pesquisa de agregados plaquetários e plaquetas gigantes, fatores esses que geram resultados falsamente diminuídos (BRIGGS et al., 2007; ZANDECKI et al., 2007; COMAR et al., 2014).

6.2.7 Esquizócitos

A contagem automatizada de esquizócitos é recomendada pelo ICSH *Schistocyte Working Group* como complemento útil ao exame microscópico para o monitoramento de pacientes com o diagnóstico de TMA. A liberação dos resultados é rápida, de baixo custo e com reprodutibilidade excelente (especialmente em altas contagens) (BANNO et al., 2005; ZINI et al., 2012).

Devido ao maior número de células contadas pelos métodos automatizados em comparação com a contagem manual, a imprecisão da contagem automatizada tende a ser menor (SAIGO et al., 2002; BANNO et al., 2005; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008).

A contagem manual de esquizócitos também apresenta grande variabilidade na interpretação morfológica entre os laboratórios e entre os observadores. A falta de padronização de critérios de identificação e de metodologias utilizadas para a contagem de esquizócitos torna a informação diagnóstica deste achado muitas vezes inconsistente (BANNO et al., 2005; LESESVE et al., 2005; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; ZINI et al., 2012).

No presente estudo, a contagem de esquizócitos foi obtida em porcentagem, após a avaliação de 474 extensões sanguíneas, onde 1000 eritrócitos foram contados e classificados usando os critérios morfológicos descritos anteriormente.

A fraca correlação ($r=0,25$) entre a porcentagem de esquizócitos detectada pelo método manual e a contagem automatizada (índice FRC%) no presente estudo, não estão de acordo com outros estudos, os quais indicam boa correlação entre os dois métodos (JIANG et al., 2001; SAIGO et al., 2002; LESESVE et al., 2004; BANNO et al., 2005; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; CHALVATZI et al., 2013).

Nossos resultados demonstraram que a contagem manual de esquizócitos foi significativamente menor quando comparada ao método automatizado, independentemente da condição clínica do paciente. Esse dado difere de outros

autores que apontam que a contagem de esquizócitos manual tende a ser maior do que a automatizada (BANNO et al., 2005; CHALVATZI et al., 2013).

A diferença obtida ao compararmos com trabalhos semelhantes, pode ser explicada pelos critérios morfológicos utilizados. A contagem de esquizócitos realizada nesta pesquisa seguiu os critérios definidos pelo ICSH e o método de análise das lâminas foi previamente padronizado. Estudos sugerem que a superestimação da contagem de esquizócitos pela microscopia, provavelmente se deve a grande variabilidade inter-observador que ocorre devido à falta de critérios morfológicos previamente definidos para identificação dos esquizócitos (BANNO et al., 2005; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008).

Os valores normais encontrados em diversos estudos variam de menos de 0,1 a 0,6 esquizócitos por 1000 eritrócitos. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo (ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015). No entanto, deve-se estar atento com a interpretação das contagens relatadas de esquizócitos, uma vez que as contagens automatizadas podem erroneamente contar micrócitos como esquizócitos (ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015).

Na avaliação do *flag* de fragmentos eritrocitários, o equipamento não apresentou boa sensibilidade: das 76 lâminas que continham esquizócitos na extensão sanguínea, o analisador XE-5000 sinalizou o alarme *Fragments?* em apenas 18 amostras. A especificidade encontrada foi excelente (96,0%), com VPP de 52,9 e VPN de 86,8. A correlação foi fraca entre as amostras que apresentaram alarmes de fragmentos eritrocitários e as que atingiram o critério de positividade para esquizócitos ($\geq 1\%$ esquizócitos em 1000 eritrócitos) na lâmina.

Briggs e colaboradores (2011) apontaram que o alarme "*Fragments?*" não apresentou boa sensibilidade nos equipamentos avaliados: das 33 extensões sanguíneas com presença de fragmentos eritrocitários, o modelo XE-2100 sinalizou apenas 7 amostras enquanto que o modelo XE-5000 sinalizou apenas 3 amostras. Por sua vez, outros estudos demonstraram que o alarme de fragmentos eritrocitários apresenta boa sensibilidade (entre 91,8% e 100%) e baixa especificidade no diagnóstico de TMA (de 20% para 52,2%) (LESESVE et al., 2004; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; ZINI et al., 2012). A alta sensibilidade e baixa especificidade pode ocorrer devido a presença de aniso-poiquilocitose e fragmentos eritrocitários que não sejam esquizócitos, causando um maior índice de FP, o qual, na rotina laboratorial

deve levar a um exame microscópico da extensão sanguínea para confirmar a presença de esquizócitos (LESESVE et al., 2004; BRIGGS, 2009).

Nosso estudo apresentou uma taxa de FP de 3,4% (n=16). Na maioria dos analisadores hematológicos, os fragmentos eritrocitários são identificados com base no tamanho e teor de hemoglobina, independentemente da sua forma; portanto, outras partículas, como pequenos eritrócitos ou mesmo fragmentos de membrana podem ser incluídos na contagem, o que poderia explicar casos de amostras falso-positivas (BANNO et al., 2005; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; ZINI et al., 2012; ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015).

Neste contexto, fica claro que os métodos automatizados podem ser úteis para fins de triagem (quando clinicamente apropriado). Além disso, a presença de alarme de fragmentos eritrocitários é um importante estímulo para um exame microscópico mais criterioso em relação a presença destas células na extensão sanguínea (LESESVE; SALIGNAC; LECOMPTE, 2007; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008). Como a sensibilidade e a especificidade do alarme *Fragments?* tem se mostrado bem variável, é recomendável que este parâmetro seja avaliado tanto em amostras patológicas, quanto em amostras normais, antes de sua introdução na prática laboratorial (BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; BRIGGS et al., 2014; LESESVE et al., 2015).

6.3 PARÂMETROS DE PESQUISA

O analisador hematológico Sysmex XE-5000 fornece, além dos parâmetros usuais do hemograma, parâmetros de pesquisa com potencial utilização na prática clínica. Entre esses, consideramos relevante avaliar neste estudo, os parâmetros estruturais e de maturação de neutrófilos (NEUT-X e NEUT-Y), os linfócitos de alta fluorescência, denominado parâmetro HFLC, bem como o índice de fragmentos eritrocitários (FRC).

6.3.1 NEUT-X e NEUT-Y

O índice de granularidade NEUT-X representa a granulação tóxica do neutrófilo, obtido pela citometria de fluxo fluorescente através da medição da luz de dispersão lateral. Por sua vez, o que o parâmetro NEUT-Y, avalia a maturidade

nuclear dos neutrófilos através do conteúdo de ácido nucleico celular (DNA e RNA), medido pela intensidade da fluorescência no canal DIFF da linha XE da Sysmex (FURUNDARENA et al., 2010; ZIMMERMANN et al., 2011; LUO et al., 2013). Combinado com outros parâmetros, os índices de granularidade podem ser utilizados pelos clínicos como uma importante ferramenta na detecção de neutrófilos hipo ou hipergranulados que ocorrem, por exemplo, durante as mielodisplasias ou em processos inflamatórios, respectivamente (FURUNDARENA et al., 2010; LE ROUX et al., 2010; LUO et al., 2013; CORNET; BOUBAYA; TROUSSARD, 2015).

A correlação entre a ativação de neutrófilos e o índice de granularidade tem sido estudada, porém, dados concretos de sua aplicabilidade clínica no diagnóstico de doenças infecciosas ou sepse são escassos (LINSSEN et al., 2008; FURUNDARENA et al., 2010; ZIMMERMANN et al., 2011; LUO et al., 2013; CORNET et al., 2015). Além disso, a definição de intervalos de referência confiáveis para estes parâmetros ainda não é bem clara.

No presente estudo, inicialmente foi avaliado um grupo de amostras para a determinação dos valores normais desses novos parâmetros de pesquisa (amostras negativas obtidas a partir de um estudo anterior descrito por SPEZIA, 2015). Em seguida, foi analisado o potencial desses parâmetros na interpretação da contagem de IG em amostras de sangue coletadas de pacientes que apresentaram contagem de IG aumentada (>3%). Também foram avaliados a relação do índice de granularidade com outros parâmetros representativos de processos infecciosos, como desvio a esquerda e granulações tóxicas

Os resultados encontrados nas amostras negativas para NEUT-X e NEUT-Y foram semelhantes ao estudo publicado por Furundarena e colaboradores (2010).

Um valor médio de NEUT-X e NEUT-Y mais elevado que em amostras normais, foi observado em amostras com presença de granulações tóxicas, reforçando a ideia de que existe uma associação entre os índices de granularidade com processo inflamatórios ou infecciosos (AL-GWAIZ; BABAY, 2007; ZIMMERMANN et al., 2011; LUO et al., 2013).

Buscando um entendimento sobre o significado dos valores aumentados de NEUT-X nas amostras em estudo, explorou-se a relação entre este parâmetro e a granularidade do citoplasma dos neutrófilos. Os resultados obtidos mostraram uma correlação fraca entre o NEUT-X e as granulações tóxicas dos neutrófilos em todas as amostras avaliadas ($r=0,34$).

Zimmermann e colaboradores (2011) avaliaram o índice-GI (*GI-Index*) como um parâmetro para a granularidade dos neutrófilos em doenças inflamatórias. Este índice é calculado a partir de um desvio-padrão da média de NEUT-X e observaram uma boa correlação da granulação tóxica dos neutrófilos visualizadas na extensão sanguínea com o índice-GI.

Na amostragem estudada, aproximadamente 10% das amostras apresentaram uma contagem de IG acima de 3%, resultado semelhante ao encontrado por Cornet e colaboradores (2015). A correlação dos parâmetros NEUT-X e NEUT-Y com o percentual de granulações tóxicas encontradas em amostras com contagem de IG > 3% foi fraca ($r=0,50$ e $r=0,46$, respectivamente), porém, superior a correlação encontrada na análise com todas as amostras. Cornet e colaboradores (2015) não encontraram correlação entre a contagem de IG (% e #) com o índice de granularidade e a intensidade reativa dos neutrófilos do Sysmex XN-1000, que são parâmetros equivalentes ao NEUT-X e NEUT-Y.

Resultados semelhantes de coeficiente de correlação foram obtidos na avaliação da granulação tóxica dos neutrófilos em amostras que apresentaram alarmes relacionados aos granulócitos imaturos, desvio a esquerda e blastos e em amostra com neutrofilia, apesar dos valores médios de NEUT-X e NEUT-Y serem significativamente maiores nesses grupos estudados.

A utilização desses parâmetros contribui tanto para diagnóstico clínico e laboratorial como para a melhora do fluxo de trabalho e podem ser utilizados como uma metodologia alternativa no diagnóstico das síndromes mielodisplásicas e nas sepses. Porém, mais estudos são necessários para avaliar a real aplicabilidade desses parâmetros de pesquisa.

6.3.2 HFLC

O parâmetro de pesquisa HFLC indica a presença de linfócitos altamente ativados, como células B ativadas ou células plasmáticas (OEHADIAN et al., 2015). Alguns linfócitos atípicos são formados a partir da diferenciação de linfócitos B em células plasmáticas, em resposta a estimulação antigênica (XIE et al., 2017). Esta função efetora das células B torna seu citoplasma rico em RNA, sugerindo a capacidade de produção de proteínas (anticorpos) por essas células, que podem ser

detectadas pela intensidade de fluorescência no canal DIFF como linfócitos altamente fluorescentes (LINSSEN et al., 2007).

Os linfócitos altamente fluorescentes (HFLC) raramente são vistos no sangue periférico de indivíduos normais; portanto, os valores de HFLC de indivíduos saudáveis devem ser zero ou próximos de zero (ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015). Essas células normalmente residem na medula óssea ou em alguns tecidos linfóides periféricos, mas podem atravessar o sistema linfático e alcançar a circulação sanguínea (LINSSEN et al., 2007). Os pacientes com sepse mostraram níveis significativamente elevados de HFLCs, podendo estes ser úteis para monitorar pacientes com infecções e ou sepsis (ARNETH; MENSCHIKOWKI, 2015). Por esta razão, o aumento do número de células plasmáticas no sangue pode indicar algumas patologias, como doenças infecciosas, autoimunes ou malignidade hematológica (LINSSEN et al., 2007; GEORGE, 2012).

Portanto, a capacidade de medir células plasmáticas pelo parâmetro HFLC em um analisador hematológico de rotina pode ser vantajosa e útil para o diagnóstico clínico e o monitoramento terapêutico em muitas doenças (LINSSEN et al., 2007).

O analisador Sysmex XE-5000, identifica os linfócitos atípicos localizados na região HFLC do diagrama de dispersão do canal DIFF, pelo aumento no valor de HFLC%. Embora as células plasmáticas decorrentes de tumores, como linfoma linfoplasmocítico e linfoma de células B, também estejam localizadas próxima da região HFLC do diagrama de dispersão, foi relatado que o HFLC% não aumenta em tais casos (XIE et al., 2017).

No presente estudo, a presença de linfócitos variantes e anormais observadas pelo método manual foi comparado com o parâmetro HFLC obtido no modelo XE-5000. As populações de células analisadas foram descritas no item 4.2.3. Os valores de HFLC encontrados nas amostras negativas estão de acordo com os valores publicados por Pekelharing e colaboradores (2010) e são estatisticamente diferentes dos valores médios encontrados nas amostras consideradas positivas. Também houve diferença significativa entre os valores de HFLC encontrados nas amostras negativas e amostras com contagens de linfócitos acima de 70%, amostras sinalizadas com os alarmes "*Abn Lympho/L_Blast?*" e principalmente nas amostras com o alarme "*Atypical Lymph?*".

Houve uma correlação moderada entre o HFLC e as amostras que apresentaram o alarme "*Atypical Lymph?*". Por outro lado, a correlação entre o

parâmetro HFLC e presença de células plasmáticas, linfócitos variantes, alarme "*Abn Lympho/L_Blast?*" e amostras com linfocitose foi fraca.

O valor médio de HFLC encontrado nas amostras que apresentaram o alarme "*Atypical Lymph?*" se aproxima dos valores encontrados por XIE e colaboradores (2017). Neste estudo, o autor relatou que um aumento no número de HFLC foi principalmente devido à presença de linfócitos atípicos detectados pela microscopia ótica em amostras provenientes de pacientes com infecção viral. Fang e colaboradores (2014) definiram que valores de HFLC acima de 1% são considerados elevados.

No estudo realizado por Linssen e colaboradores (2007), foi demonstrado que os monócitos, IG, células "*Natural Killer*" (NK) e linfócitos atípicos não apresentaram correlação com a contagem de HFLC. Por outro lado, os linfócitos B ativados definidos na extensão sanguínea como células plasmáticas, resultaram em uma excelente correlação com HFLC.

A utilização dos valores encontrados entre o parâmetro HFLC e a pesquisa de linfócito variantes na extensão sanguínea parece ser aplicável na rotina laboratorial em algumas situações. Algumas limitações da aplicação deste parâmetro observadas no presente trabalho podem estar relacionadas ao pequeno número de amostras que apresentaram linfócitos variantes na extensão sanguínea. Porém, valores altos de HFLC pode ser um elemento adicional para a pesquisa mais cuidadosa de linfócitos atípicos na extensão sanguínea.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no estudo de 1296 hemogramas provenientes de pacientes atendidos na Seção de Hematologia da UAD do HC-UFPR, analisadas pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 e pela microscopia ótica, permitiram as seguintes conclusões:

- As contagens diferenciais de leucócitos (exceto basófilos), granulócitos imaturos, eritroblastos e plaquetas realizadas pelo XE-5000 apresentaram forte correlação com a contagem manual, apresentando-se como uma alternativa na avaliação quantitativa dessas células;
- Os alarmes que sinalizaram a suspeita de blastos ("*Blast?*"), granulócitos imaturos ("*Immat Gran?*"), desvio a esquerda ("*Left Shift?*"), linfócitos variantes ("*Atypical Lymph?*" e "*Abn Lympho/L_Blast?*"), eritroblastos ("*NRBC?*"), fragmentos eritrocitários ("*Fragments?*") e agregados plaquetários ("*Plaq Clumps?*") apresentaram alta especificidade (superior a 91%), ou seja, nas amostras analisadas pelo analisador XE-5000, a presença de determinada anormalidade se mostrou improvável quando o respectivo alarme não foi disparado;
- Os alarmes suspeitos para a presença de granulócitos imaturos ("*Immat Gran?*"), linfócitos variantes ("*Atypical Lymph?*"), eritroblastos ("*NRBC?*"), agregados plaquetários ("*Plaq Clumps?*") e fragmentos eritrocitários ("*Fragments?*") apresentaram baixa sensibilidade (de 23,7% a 37,9%), o que indica um desempenho insuficiente do analisador XE-5000 para sinalizar a presença destas anormalidades celulares na amostra;
- A combinação dos alarmes "*Atypical Lymph?*" e "*Abn Lympho/L_Blast?*" melhorou a sensibilidade destes alarmes na detecção da presença de linfócitos variantes pela microscopia ótica;
- Os parâmetros de pesquisa NEUT-X e NEUT-Y apresentaram fraca correlação com alterações reacionais dos neutrófilos, como a presença de granações tóxicas, bem como com a presença de desvio a esquerda e/ou contagem de granulócitos imaturos acima de 3%;
- O parâmetro de pesquisa HFLC e FRC apresentaram valores médios estatisticamente diferentes no grupo de amostras positivas em comparação

com o grupo de amostras negativas, demonstrando o potencial destes parâmetros em indicar a presença de alterações reacionais dos linfócitos e fragmentos eritrocitários, respectivamente;

- A contagem de leucócitos e eritroblastos fornecida pelo XE-5000 é confiável, porém para alguns grupos celulares, o exame microscópico da extensão sanguínea continua sendo necessário para a detecção destas células;
- Os resultados obtidos no presente estudo devem ser analisados de forma individualizada, respeitando a característica amostral e a tecnologia utilizada no equipamento estudado.
- Neste contexto, o trabalho ressalta a importância de se conhecer as características técnicas e analíticas de cada equipamento, visando o correto emprego da tecnologia que o mesmo oferece, pois, apesar das suas deficiências, (principalmente os alarmes que demandam de uma confirmação através da revisão da lâmina), os analisadores hematológicos fornecem dados muito precisos e de real aplicabilidade para o clínico na rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS

- AKENZUA, G. I. et al. Neutrophil and band counts in the diagnosis of neonatal infections. **Pediatrics**, v. 54, n. 1, p. 38-42, 1974.
- AL-GWAIZ, L. A.; BABAY, H. H. The diagnostic value of absolute neutrophil count, band count and morphologic changes of neutrophils in predicting bacterial infections. **Medical Principles and Practice**, v. 16, n. 5, p. 344-7, 2007.
- ALLOU, K. et al. The routine leukocyte differential flow cytometry HematoFlow™ method: A new flagging system for automatic validation. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 88, n. 6, p. 375-84, 2015.
- ARNETH, B. M.; MENSCHIKOWKI, M. Technology and new fluorescence flow cytometry parameters in hematological analyzers. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 29, n. 3, p. 175-83, 2015.
- ARROYO, M. E. et al. Analytic performance of the PENTRA 80 automated blood cell analyzer for the evaluation of normal and pathologic WBCs. **American journal of clinical pathology**, v. 123, n. 2, p. 206-14, Feb 2005.
- BAIN, B. J. Diagnosis from the blood smear. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 5, p. 498-507, Aug 4 2005.
- BAIN, B. J. **Células sanguíneas: um guia prático**. 5ª. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- BANNO, S. et al. Quantification of red blood cell fragmentation by the automated hematology analyzer XE-2100 in patients with living donor liver transplantation. **Clin Lab Haematol**, v. 27, n. 5, p. 292-6, 2005.
- BARNES, P. W. et al. The International Consensus Group for Hematology Review: Suggested Criteria for Action Following Automated CBC and WBC Differential Analysis. **Laboratory hematology**, v. 11, n. 2, p. 83-90, 2005.
- BENATTAR, L.; FLANDRIN, G. Comparison of the classical manual pushed wedge films, with an improved automated method for making blood smears. **Hematol Cell Ther**, v. 41, n. 5, p. 211-5, 1999.
- BENTLEY, S. A. Automated differential white cell counts: a critical appraisal. **Baillieres Clin Haematol**, v. 3, n. 4, p. 851-69, 1990.
- BORQUE, L.; ESCANERO, J. F.; URRECHAGA, E. Potential utility of the new Sysmex XE 5000 red blood cell extended parameters in the study of disorders of iron metabolism. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 11, p. 1411, 2009/11/01 2009.
- BOWEN, K. L. et al. Platelet clumps, nucleated red cells, and leukocyte counts:A comparison between the Abbott CELLDYN ® 4000 and Coulter® STKS. **Laboratory Hematology**, v. 4, p. 7-16, 1998.

BRIGGS, C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. **International journal of laboratory hematology**, v. 31, n. 3, p. 277-97, Jun 2009.

BRIGGS, C. et al. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. **International journal of laboratory hematology**, 2014.

BRIGGS, C. et al. New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter--the XE 2100. **Clinical And Laboratory Haematology**, v. 22, n. 6, p. 345-50, 2000.

BRIGGS, C.; HARRISON, P.; MACHIN, S. J. Continuing developments with the automated platelet count. **International journal of laboratory hematology**, v. 29, n. 2, p. 77-91, 2007.

BRIGGS, C. et al. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. **J Clin Pathol**, v. 65, n. 11, p. 1024-30, 2012.

BRIGGS, C. J. et al. 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**, v. 136, n. 2, p. 309-16, 2011.

BRUEGEL, M. et al. Comparison of five automated hematology analyzers in a university hospital setting: Abbott Cell-Dyn Sapphire, Beckman Coulter DxH 800, Siemens Advia 2120i, Sysmex XE-5000, and Sysmex XN-2000. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 53, n. 7, p. 1057-71, 2015.

BURNS, E. R.; LOU, Y.; PATHAK, A. Morphologic diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. **American journal of hematology**, v. 75, n. 1, p. 18-21, 2004.

BUTTARELLO, M. Quality specification in haematology: the automated blood cell count. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 346, n. 1, p. 45-54, 2004.

BUTTARELLO, M.; PLEBANI, M. Automated blood cell counts: state of the art. **American journal of clinical pathology**, v. 130, n. 1, p. 104-16, 2008.

CAPPELLETTI, P. 'Ematologia di Laboratorio. **RIMeL/IJLaM**, v. 4, p. 247-58, 2005.

CHABOT-RICHARDS, D. S.; GEORGE, T. I. White Blood Cell Counts: Reference Methodology. **Clinics in Laboratory Medicine**, n. 0, p. 2-14, 2014.

CHALVATZI, K. et al. Evaluation of fragmented red cell (FRC) counting using Sysmex XE-5000--Does hypochromia play a role? **International journal of laboratory hematology**, v. 35, n. 2, p. 193-9, 2013.

CHAPMAN, M. Hematology analyzers offer new technology and user-friendliness. **Lab Medicine**, v. 31, n. 3, p. 146-50, 2000.

CHHUY, J. et al. Pertinence of the Sysmex XE-5000 parameters: rule of slide review in a context of 'normal' lymphocyte count (defined from control and mantle cell

lymphoma blood specimens). **International journal of laboratory hematology**, v. 35, n. 5, p. 510-6, 2013.

CIMENTI, C. et al. The predictive value of immature granulocyte count and immature myeloid information in the diagnosis of neonatal sepsis. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 50, n. 8, p. 1429-32, 2012.

CIMENTI, C. et al. The Role of Immature Granulocyte Count and Immature Myeloid Information in the Diagnosis of Neonatal Sepsis. In: RESCH, B. **Neonatal Bacterial Infection**. London: IntechOpen, 2013. p. 59-78.

CLSI. **Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard: CLSI document H20-A2**. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.

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? **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 36, n. 3, p. 219-25, 2014.

COMAR, S. R.; MALVEZZI, M.; PASQUINI, R. Evaluation of criteria of manual blood smear review following automated complete blood counts in a large university hospital. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 39, n. 4, p. 306-17, 2017.

CORNBLEET, P. J. Clinical utility of the band count. **Clin Lab Med**, v. 22, n. 1, p. 101-36, 2002.

CORNET, E.; BOUBAYA, M.; TROUSSARD, X. Contribution of the new XN-1000 parameters NEUT-RI and NEUT-WY for managing patients with immature granulocytes. **International journal of laboratory hematology**, v. 37, n. 5, 2015.

CUI, W. et al. Development of the personalized criteria for microscopic review following four different series of hematology analyzer in a Chinese large scale hospital. **Chin Med J**, v. 123, n. 22, p. 3231-7, Nov 2010.

DENICOLA, D. B. Advances in hematology analyzers. **Top Companion Anim Med**, v. 26, n. 2, p. 52-61, 2011.

EILERTSEN, H.; HAGVE, T. A. Do the flags related to immature granulocytes reported by the Sysmex XE-5000 warrant a microscopic slide review? **American journal of clinical pathology**, v. 142, n. 4, p. 553-60, 2014.

EILERTSEN, H.; VOLLESTAD, N. K.; HAGVE, T. A. The usefulness of blast flags on the Sysmex XE-5000 is questionable. **American journal of clinical pathology**, v. 139, n. 5, p. 633-40, 2013.

FANG, Y. et al. High Fluorescence Lymphocyte Cell Counts are NOT an Early Marker For Sepsis. **American journal of clinical pathology**, v. 142, n. suppl_1, p. A085-A, 2014.

FERNANDES, B.; HAMAGUCHI, Y. Automated enumeration of immature granulocytes. **American journal of clinical pathology**, v. 128, n. 3, p. 454-63, 2007.

FUJIMOTO, H. et al. Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. **Cytometry**, v. 42, n. 6, p. 371-8, 2000.

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

FURUNDARENA, J. et al. Comparison of abnormal cell flagging of the hematology analyzers Sysmex XN and Sysmex XE-5000 in oncohematologic patients. **International journal of laboratory hematology**, v. 39, n. 1, p. 58-67, 2017.

FURUNDARENA, J. R. et al. The utility of the Sysmex XE-2100 analyzer's NEUT-X and NEUT-Y parameters for detecting neutrophil dysplasia in myelodysplastic syndromes. **International journal of laboratory hematology**, v. 32, n. 3, p. 360-6, 2010.

GEORGE, T. I. Malignant or benign leukocytosis. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 475, 2012.

GOOSSENS, W.; VAN HOVE, L.; VERWILGHEN, R. Monocyte counting: discrepancies in results obtained with different automated instruments. **Journal of clinical pathology**, v. 44, n. 3, p. 224-7, 1991.

GROTTO, H. Z. W. O hemograma: importância para a interpretação da biópsia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 31, n. 3, p. 178-82, 2009.

GULATI, G. L. et al. Criteria for blood smear review. **Lab Medicine**, v. 33, n. 5, p. 374-7, 2002.

GULATI, G. L. et al. Optimization of Criteria for Verification of Automated Platelet Counts Generated by the Sysmex XE-2100 Hematology Analyzer. **Lab Medicine**, v. 40, n. 9, p. 535-9, September 1, 2009 2009.

GULATI, G. L. et al. Purpose and Criteria for Blood Smear Scan, Blood Smear Examination, and Blood Smear Review. **Ann Lab Med**, v. 33, p. 1-7, 2013.

HAWKINS, J. et al. Assessment of the Reliability of the Sysmex XE-5000 Analyzer to Detect Platelet Clumps. **Laboratory medicine**, v. 47, n. 3, p. 189-94, 2016.

HOFFMANN, J. J. How useful are haematology analyser flags? v. 42, n. 4, p. 357-8, 2004.

HOTTON, J. et al. Performance and abnormal cell flagging comparisons of three automated blood cell counters: Cell-Dyn Sapphire, DxH-800, and XN-2000. **American journal of clinical pathology**, v. 140, n. 6, p. 845-52, 2013.

HOUWEN, B. Blood film preparation and staining procedures. **Laboratory hematology**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2000.

HOUWEN, B. The differential cell count. **Laboratory hematology**, v. 7, n. 2, p. 89-100, 2001.

HWANG, D. H. et al. Automated nucleated RBC measurement using the sysmex XE-5000 hematology analyzer: Frequency and clinical significance of the nucleated RBCs. **American journal of clinical pathology**, v. 145, n. 3, p. 379-84, 2016.

ICSH. Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. **Clin Lab Haematol**, v. 16, n. 2, p. 157-74, 1994.

JIANG, M. et al. Quantification of red blood cell fragmentation by automated haematology analyser XE-2100. **International journal of laboratory hematology**, v. 23, n. 3, p. 167-72, 2001.

KANG, S. H. et al. Comparison of four hematology analyzers, CELL-DYN Sapphire, ADVIA 120, Coulter LH 750, and Sysmex XE-2100, in terms of clinical usefulness. **International journal of laboratory hematology**, v. 30, n. 6, p. 480-6, 2008.

LANTIS, K. L. et al. 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**, v. 119, n. 5, p. 656-62, 2003.

LE ROUX, G. et al. Routine diagnostic procedures of myelodysplastic syndromes: value of a structural blood cell parameter (NEUT-X) determined by the Sysmex XE-2100TM. **International journal of laboratory hematology**, v. 32, n. 6p1, 2010.

LECOMPTE, T. P.; BERNIMOULIN, M. P. Novel parameters in blood cell counters. **Clinics in laboratory medicine**, v. 35, n. 1, p. 209-24, 2015.

LEHNER, J.; GREVE, B.; CASSENS, U. Automation in hematology. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 34, n. 5, p. 328-39, 2007.

LESESVE, J. F. et al. Schizocytes: reproductibilité du diagnostic morphologique et intérêt de méthodes observateur-indépendantes. *Annales de Biologie Clinique*, 2005. p.279-89.

LESESVE, J. F. et al. Comparative evaluation of schistocyte counting by an automated method and by microscopic determination. **American journal of clinical pathology**, v. 121, n. 5, p. 739-45, 2004.

LESESVE, J. F.; SALIGNAC, S.; LECOMPTE, T. Laboratory measurement of schistocytes. **International journal of laboratory hematology**, v. 29, n. 2, p. 149-51, 2007.

LESESVE, J. F.; SPEYER, E.; PEROL, J. P. Fragmented red cells reference range for the Sysmex XN-series of automated blood cell counters. **International journal of laboratory hematology**, v. 37, n. 5, p. 583-7, 2015.

LINSSEN, J. et al. Automation and validation of a rapid method to assess neutrophil and monocyte activation by routine fluorescence flow cytometry in vitro. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 74, n. 5, p. 295-309, 2008.

LINSSEN, J. et al. Identification and quantification of high fluorescence-stained lymphocytes as antibody synthesizing/secretory cells using the automated routine hematology analyzer XE-2100. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 72, n. 3, p. 157-66, 2007.

LUO, Y. et al. Utility of neut-X, neut-Y and neut-Z parameters for rapidly assessing sepsis in tumor patients. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 422, p. 5-9, 2013.

NCCLS. **Reference Leukocyte Count (Proporcional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard H-20 A**. Pensilvania, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, (NCCLS), 1992.

NCCLS. **Tubes and additives for venous blood specimen collection; approved standard: document H1-A5**. 5^a. Pennsylvania: NCCLS, 2003.

NIGRO, K. G. et al. Performance of an automated immature granulocyte count as a predictor of neonatal sepsis. **American journal of clinical pathology**, v. 123, n. 4, p. 618-24, 2005.

NOVIS, D. A. et al. 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**, v. 130, n. 5, p. 596-601, 2006.

OEHADIAN, A. et al. New parameters available on Sysmex XE-5000 hematology analyzers contribute to differentiating dengue from leptospirosis and enteric fever. **International journal of laboratory hematology**, v. 37, n. 6, p. 861-8, 2015.

PALMER, L. et al. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. **International journal of laboratory hematology**, v. 37, n. 3, p. 287-303, Jun 2015.

PEKELHARING, J. et al. Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults. **Sysmex Journal International**, v. 20, n. 1, 2010.

PÉREZ, I. et al. Local verification between the hematological analyzers Sysmex XN-series and XE-5000. **International journal of laboratory hematology**, v. 38, n. 3, p. 256-64, 2016.

PERKINS, S. L. Examination of the Blood and Bone Marrow. In: GREER, J. P., et al. **Wintrobe's clinical hematology**. 11. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. p. 16-35.

PETERSON, P. et al. Physician Review of the Peripheral Blood Smear: When and Why. **Laboratory hematology**, v. 7, n. 4, p. 175-9, 2001.

PIERRE, R. V. Peripheral blood film review. The demise of the eyecount leukocyte differential. **Clin Lab Med**, v. 22, n. 1, p. 279-97, 2002.

PIPITONE, S. et al. Evaluation of automated nucleated red blood cells counting on Sysmex XE5000 and Siemens ADVIA 2120. **Clin Chem Lab Med.**, v. 50, n. 10, p. 1857-9, 2012.

PRATUMVINIT, B. et al. Validation and optimization of criteria for manual smear review following automated blood cell analysis in a large university hospital. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 137, n. 3, p. 408-14, Mar 2013.

ROUSSEL, M. et al. Toward a reference method for leukocyte differential counts in blood: comparison of three flow cytometric candidate methods. **Cytometry A**, v. 81, n. 11, p. 973-82, 2012.

RUMKE, C. L.; BEZEMER, P. D.; KUIK, D. J. Normal values and least significant differences for differential leukocyte counts. **J Chronic Dis**, v. 28, n. 11-12, p. 661-8, 1975.

RUUTU, T. et al. Diagnostic criteria for hematopoietic stem cell transplant-associated microangiopathy: results of a consensus process by an International Working Group. **Haematologica**, v. 92, n. 1, p. 95-100, Jan 2007.

RUZICKA, K. et al. The new hematology analyzer Sysmex XE-2100: performance evaluation of a novel white blood cell differential technology. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 125, n. 3, p. 391-6, 2001.

RYAN, D. H. Estudio de la sangre periférica e medula ósea. In: LICHTMAN, M. A. e WILLIAMS, W. J. **Williams Hematology**. 7. New York: McGraw-Hill Companies, 2006. p. 29-46.

SAIGO, K. et al. Usefulness of automatic detection of fragmented red cells using a hematology analyzer for diagnosis of thrombotic microangiopathy. **International journal of laboratory hematology**, v. 24, n. 6, p. 347-51, 2002.

SENZEL, L. B.; SPITZER, E. D.; DECRISTOFARO, J. D. A Streamlined Laboratory Process for Obtaining Band Counts in Hospitalized Neonates. **Lab Medicine**, v. 41, n. 5, p. 279-83, 2010.

SILVA, P. H. et al. Fase pós-analítica: aspectos gerais da hemostasia e hemostasia primária. In: _____. **Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016. p. 317-45.

SIMSON, E.; GASCON-LEMA, M.; BROWN, D. Performance of automated slidemakers and stainers in a working laboratory environment—routine operation and quality control. **International journal of laboratory hematology**, v. 32, n. 1, p. 64-76, 2010.

SIRECI, A. N. et al. Validation and implementation of an algorithm for reporting the automated absolute neutrophil count from selected flagged specimens. **American journal of clinical pathology**, v. 134, n. 5, p. 720-5, 2010a.

SIRECI, A. N.; SCHLABERG, R.; KRATZ, A. A method for optimizing and validating institution-specific flagging criteria for automated cell counters. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 134, n. 10, p. 1528-33, Oct 2010b.

SPEZIA, J. **Avaliação dos resultados liberados automaticamente pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000**. 108 p. Mestrado. Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2015.

STAMMINGER, G. et al. Performance of the XE-2100 leucocyte differential. **Clin Lab Haematol**, v. 24, n. 5, p. 271-80, 2002.

SYSMEX. **Flagging Interpretation Guide Document Number: MKT-40-1010**. Mundelein, IL: Sysmex America, 2008.

SYSMEX. Fluorescence flow cytometry in haematology. **Sysmex Xtra Online**, Sysmex Publication, v. August, p. 1-11, 2011a.

SYSMEX. The Immature Granulocyte Count - The first to know about inflammation. **Sysmex Xtra Online**, p. 1-4, 2011b.

SYSMEX. Analisador hematológico Sysmex XE-5000. **Sysmex Corporation**. Disponível em: <www.sysmex.com/la/pt/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-5000-Hematology-Analyzer.aspx>. Acesso em: 03/03/2015

SYSMEX. Academy. **Sysmex Corporation**. Disponível em: <<http://www.sysmex-europe.com/academy.html>>. Acesso em: 12/03/2018

TANTANATE, C.; KLINBUA, C. Performance evaluation of the automated nucleated red blood cell enumeration on Sysmex XN analyser. **International journal of laboratory hematology**, v. 37, n. 3, p. 341-5, 2015.

TKACHUK, D. C.; HIRSCHMANN, J. V. Approach to the Microscopic Evaluation of Blood and Bone Marrow. In: _____. **Wintrobe's atlas of clinical hematology**. 1^a. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 275-86.

VAN DER MEER, W.; SCOTT, C. S.; KEIJZER, M. H. Automated flagging influences the inconsistency and bias of band cell and atypical lymphocyte morphological differentials. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 42, n. 4, p. 371-7, 2004.

VAN DER MEER, W. et al. The divergent morphological classification of variant lymphocytes in blood smears. **J Clin Pathol**, v. 60, n. 7, p. 838-9, 2007.

VAN DER MEER, W. et al. Does the band cell survive the 21st century? **Eur J Haematol**, v. 76, n. 3, p. 251-4, 2006.

WARD, P. C. The CBC at the turn of the millennium: an overview. **Clin Chem**, v. 46, n. 8 Pt 2, p. 1215-20, 2000.

WEERKAMP, F.; TAAL, P. H.; DE BOER, B. A. Left Shift 1+ flag for the detection of band neutrophils: interlaboratory variations and recommendations for the routine laboratory. **International journal of laboratory hematology**, v. 33, n. 6, p. 601-9, 2011.

WEILAND, T.; KALKMAN, H.; HEIHN, H. Evaluation of the automated immature granulocyte count (IG) on Sysmex XE-2100 automated haematology analyser vs. visual microscopy (NCCLS H20-A). **Sysmex J Int**, v. 12, n. 2, p. 63-70, 2002.

XIE, H.; WU, Y.; CUI, W. Correlation between the cell population in the automated hematology analyzer high-fluorescence region and atypical lymphocyte flags. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, p. 1-6, 2017.

ZANDECKI, M. et al. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. **International journal of laboratory hematology**, v. 29, n. 1, p. 4-20, 2007.

ZIMMERMANN, M. et al. Granularity Index of the Sysmex XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 49, n. 7, p. 1193-8, 2011.

ZINI, G. et al. ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes. **International journal of laboratory hematology**, v. 34, n. 2, p. 107-16, 2012.

APÊNDICE 1 - RESULTADOS DO DESEMPENHO DOS ALARMES

Os resultados do desempenho dos alarmes de granulócitos imaturos, desvio a esquerda, linfócitos variantes e linfócitos anormais, blastos, eritroblastos, agregados plaquetários, fragmentos eritrocitários, bem os valores de VP, FP, FN e VN de cada alarme estão descritos nos quadros abaixo, onde VP = verdadeiro positivo; FN = falso negativo, VN = verdadeiro negativo e FP = falso positivo, a partir de uma tabela de contingência, conforme QUADRO MODELO.

QUADRO MODELO: MATRIZ PARA ANÁLISE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Resultados		Análise Manual (referência)	
		Positivo	Negativo
Sysmex XE-5000	Positivo	VP Verdadeiro Positivo	FP Falso Positivo
	Negativo	FN Falso Negativo	VN Verdadeiro Negativo

VP, verdadeiro positivo; FN, falso negativo; VN, verdadeiro negativo; FP, falso positivo

Os alarmes liberados pelo Sysmex XE-5000 foram comparados com a análise morfológica da extensão sanguínea, descritos a seguir como o respectivo alarme *versus* a categoria celular correspondente.

Resultados		Análise Manual (referência) Metamielócito, Mielócito e/ou promielócito	
		Positivo	Negativo
Sysmex XE-5000 "Immat Gran?"	Positivo	44	99
	Negativo	108	1024

Resultados		Análise Manual (referência) Bastonetes	
		Positivo	Negativo
Sysmex XE-5000 "Left Shift?"	Positivo	83	76
	Negativo	41	1076

Resultados		Análise Manual (referência) Linfócitos variantes	
		Positivo	Negativo
Sysmex XE-5000 "Atypical Lymph?"	Positivo	3	42
	Negativo	7	1223

Resultados		Análise Manual (referência) Pró-linfócitos, Plasmócitos e linfoblastos	
		Positivo	Negativo
Sysmex XE-5000 "Atypical Lymph?"	Positivo	1	44
	Negativo	2	1228

Resultados		Análise Manual (referência) Pró-linfócitos, Plasmócitos e linfoblastos	
		Positivo	Negativo
Sysmex XE-5000 "Abn Lympho/L_Blast?"	Positivo	3	54
	Negativo	0	1218

Continuação APÊNDICE 1

Resultados		Análise Manual (referência) Linfócitos variantes	
		Positivo	Negativo
Sysmex XE-5000 “Abn Lympho/L_Blast?”	Positivo	3	54
	Negativo	7	1211

Resultados		Análise Manual (referência) Linfócitos variantes + Pró-linfócitos, Plasmócitos e linfoblastos	
		Positivo	Negativo
Sysmex XE-5000: “Atypical Lymph?” + “Abn Lympho/L_Blast?”	Positivo	8	84
	Negativo	5	1178

Resultados		Análise Manual (referência) Blastos	
		Positivo	Negativo
Sysmex XE-5000 “Blast?”	Positivo	21	81
	Negativo	10	1163

Resultados		Análise Manual (referência) Eritroblastos	
		Positivo	Negativo
Sysmex XE-5000 “NRBC?”	Positivo	41	81
	Negativo	67	1086

Resultados		Análise Manual (referência) Agregados plaquetários	
		Positivo	Negativo
Sysmex XE-5000 “Plaq Clumps?”	Positivo	6	71
	Negativo	15	1184

Resultados		Análise Manual (referência) Esquizócitos	
		Positivo	Negativo
Sysmex XE-5000 “Fragments?”	Positivo	18	16
	Negativo	58	382

ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação dos alertas emitidos pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 com a Microscopia Ótica.

Pesquisador: Juliana Spezia

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15104113.D.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 308.937

Data da Relatoria: 12/08/2013

Apresentação do Projeto:

Comparação dos alertas emitidos pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 com a Microscopia Ótica

AUTORES: Prof. Dr. Aguinaldo José Nascimento (orientador), Professor Railson Henneberg (coorientador) e Juliana Spezia (Mestranda PPG em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, UFPR.

Os autores pretendem avaliar o desempenho do equipamento Sysmex XE-5000 comparando os resultados liberados com as lâminas de extensão sanguínea a fim de comprovar sua eficiência em relação aos alertas emitidos, agilizando os serviços prestados pela seção de Hematologia e aumentando a confiabilidade nos resultados liberados. Os autores apresentam como hipótese a possível correlação entre os alarmes emitidos pelo analisador hematológico com as anormalidades encontradas após leitura das lâminas de extensão sanguínea em microscopia ótica.

Os autores utilizarão amostras de sangue periférico coletadas em EDTA provenientes de pacientes do Laboratório do Hospital de Clínicas da UFPR processadas no analisador hematológico Sysmex XE-5000. Serão analisados os hemogramas da rotina da Seção de Hematologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da UFPR liberados pelo analisador hematológico Sysmex

Endereço: Rua Padre Camargo, 280
Bairro: 2º andar
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 308.937

XE-5000 e as lâminas de extensão sanguínea dos respectivos hemogramas confeccionadas pela Seção de Hematologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da UFPR. As lâminas que necessitarem de

repetição ou que não forem confeccionadas automaticamente pelo equipamento, serão feitas pela aluna mestranda Juliana Spezia. Após a secagem das lâminas de extensão sanguínea as mesmas serão coradas com corante May-Grunwald-Giemsa no Laboratório Clínico Escola da UFPR.

A observação das lâminas de extensão sanguínea será feita com auxílio de microscópio óptico modelo Nikon e câmera fotográfica para registro das observações.

Os resultados serão analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) inteiramente causalizada e fatorial, seguida de teste de Turkey com o emprego do programa estatístico Statistica 10.0 (StatSoft). Será considerada significância estatística para $p < 0,05$.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL Comparar os alarmes emitidos nos resultados dos hemogramas pelo analisador automático Sysmex XE-5000 da Seção de Hematologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da UFPR com a avaliação microscópica das lâminas de extensão sanguínea e determinar a concordância entre os dois métodos, avaliando assim o desempenho e confiabilidade do equipamento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar os alarmes que indicam anormalidades nos hemogramas emitidos pelo analisador hematológico com a microscopia ótica;
- Verificar a reprodutibilidade e especificidade dos alarmes com alterações encontradas na microscopia ótica;
- Comparar os resultados liberados pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 com os dados laboratoriais dos pacientes.

Objetivo da

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os autores informam que serão obtidas amostras de sangue periférico, concomitantemente com a coleta normalmente realizada pelo Hospital de Clínicas da UFPR, não havendo qualquer desconforto adicional ao paciente, e que as mesmas serão selecionadas a partir dos resultados liberados pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 que apresentarem alarmes que sugerem confirmação posterior em lâmina.

Endereço: Rua Padre Camargo, 280
Bairro: 2º andar
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 308.937

Segundo os autores não será utilizado o fator de exclusão e serão analisadas todas as amostras liberadas pelo equipamento.

O material a ser utilizado pela pesquisa serão as lâminas de extensão sanguínea confeccionadas após análise pelo equipamento Sysmex XE-5000 e os relatórios liberados pelo aparelho. O material será utilizado especificamente para os propósitos dessa pesquisa. As amostras de sangue serão obtidas por punção venosa, em tubos com anticoagulante EDTA e extensões sanguíneas preparadas a partir destes tubos. Os dados e os resultados do hemograma dos pacientes serão retirados do banco de dados da Seção de Hematologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da UFPR e serão utilizados especificamente para os propósitos da pesquisa. Qualquer outro estudo que possa surgir será previamente submetido ao Comitê de Ética.

Os autores informam ainda que serão seguidos rigorosamente os Procedimentos Operacionais Padrão de Coleta de Material Biológico e manuseamento das amostras sendo obrigatório durante a realização da pesquisa o uso de equipamento de proteção individual (EPIs).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo comparativo entre métodos automatizados empregados nos laboratórios de análises clínicas, especificamente para perfil hematológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos exigidos estão anexados; a anuência vem assinada pela Gerente da Unidade de Apoio Diagnóstico, Sra. Mônica Silveira e a Análise de Mérito vem assinada pelo Prof. Paulo Henrique Silva.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram atendidas e os esclarecimentos prestados esclareceram as dúvidas do relator.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Padre Camargo, 280
Bairro: 2º andar
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 308.937

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

CURITIBA, 19 de Junho de 2013

Assinador por:
Claudia Seely Rocco
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280
Bairro: 2º andar
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP - HC-UFPR



HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação dos alertas emitidos pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 com a Microscopia Ótica.

Pesquisador: Juliana Spezia

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15104113.D.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 382.044

Data da Relatoria: 30/07/2013

Apresentação do Projeto:

Comparação dos alertas emitidos pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 com a Microscopia Ótica

AUTORES: Prof. Dr. Aguinaldo José Nascimento (orientador), Professor Railson Henneberg (coorientador) e Juliana Spezia (Mestranda PPG em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, UFPR.

Os autores pretendem avaliar o desempenho do equipamento Sysmex XE-5000 comparando os resultados liberados com as lâminas de extensão sanguínea a fim de comprovar sua eficiência em relação aos alertas emitidos, agilizando os serviços prestados pela seção de Hematologia e aumentando a confiabilidade nos resultados liberados. Os autores apresentam como hipótese a possível correlação entre os alarmes emitidos pelo analisador hematológico com as anormalidades encontradas após leitura das lâminas de extensão sanguínea em microscopia ótica.

Os autores utilizarão amostras de sangue periférico coletadas em EDTA provenientes de pacientes do Laboratório do Hospital de Clínicas da UFPR processadas no analisador hematológico Sysmex XE-5000. Serão analisados os hemogramas da rotina da Seção de Hematologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da UFPR liberadas pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 e as lâminas de extensão sanguínea dos respectivos hemogramas confeccionadas pela

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



CEMAC/UFPR

HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR



Continuação do Parecer: 362.D44

Seção de Hematologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da UFPR. As lâminas que necessitarem de repetição ou que não forem confeccionadas automaticamente pelo equipamento, serão feitas pela aluna mestranda Juliana Spezia. Após a secagem das lâminas de extensão sanguínea as mesmas serão coradas com corante May-Grunwald-Giemsa no Laboratório Clínico Escola da UFPR. A observação das lâminas de extensão sanguínea será feita com auxílio de microscópio óptico modelo Nikon e câmara fotográfica para registro das observações.

Os resultados serão analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) inteiramente causalizada e fatorial, seguida de teste de Turkey com o emprego do programa estatístico Statistica 10.0 (StatSoft). Será considerada significância estatística para $p < 0,05$. XE-5000 e as lâminas de extensão sanguínea dos respectivos hemogramas confeccionadas pela Seção de Hematologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da UFPR. As lâminas que necessitarem de repetição ou que não forem confeccionadas automaticamente pelo equipamento, serão feitas pela aluna mestranda Juliana Spezia. Após a secagem das lâminas de extensão sanguínea as mesmas serão coradas com corante May-Grunwald-Giemsa no Laboratório Clínico Escola da UFPR.

A observação das lâminas de extensão sanguínea será feita com auxílio de microscópio óptico modelo Nikon e câmara fotográfica para registro das observações.

Os resultados serão analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) inteiramente causalizada e fatorial, seguida de teste de Turkey com o emprego do programa estatístico Statistica 10.0 (StatSoft). Será considerada significância estatística para $p < 0,05$.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL Comparar os alarmes emitidos nos resultados dos hemogramas pelo analisador automático Sysmex XE-5000 da Seção de Hematologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da UFPR com a avaliação microscópica das lâminas de extensão sanguínea e determinar a concordância entre os dois métodos, avaliando assim o desempenho e confiabilidade do equipamento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar os alarmes que indicam anormalidades nos hemogramas emitidos pelo analisador hematológico com a microscopia ótica;
- Verificar a reprodutibilidade e especificidade dos alarmes com alterações encontradas na microscopia ótica;
- Comparar os resultados liberados pelo analisador hematológico Sysmex XE-5000 com os dados

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



CEP@HC UFPR

HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR



Continuação do Parecer: 362.D44

laboratoriais dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os autores não será utilizado o fator de exclusão e serão analisadas todas as amostras liberadas pelo equipamento.

O material a ser utilizado pela pesquisa serão as lâminas de extensão sanguínea confeccionadas após análise pelo equipamento Sysmex XE-5000 e os relatórios liberados pelo aparelho. O material será utilizado especificamente para os propósitos dessa pesquisa. As amostras de sangue serão obtidas por punção venosa, em tubos com anticoagulante EDTA e extensões sanguíneas preparadas a partir destes tubos. Os dados e os resultados do hemograma dos pacientes serão retirados da banca de dados da Seção de Hematologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da UFPR e serão utilizados especificamente para os propósitos da pesquisa. Qualquer outro estudo que possa surgir será previamente submetido ao Comitê de Ética.

Os autores informam ainda que serão seguidos rigorosamente os Procedimentos Operacionais Padrão de Coleta de Material Biológico e manuseamento das amostras sendo obrigatório durante a realização da pesquisa o uso de equipamento de proteção individual (EPIs).

Serão coletadas amostras de sangue concomitantemente com a coleta normalmente realizada pelo Hospital de Clínicas da UFPR, não havendo qualquer desconforto adicional ao paciente.

Através desta pesquisa espera-se verificar se os resultados liberados pelo analisador são compatíveis com a avaliação microscópica do hemograma auxiliando na liberação de resultados confiáveis e em menor tempo para o paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo comparativo entre métodos automatizados empregados nos laboratórios de análises clínicas, especificamente para perfil hematológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram encaminhados (anexo).

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados ao CEP de origem, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo:

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br



CEP/HC/UFPR

Continuação do Parecer: 362.D44

HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR

**NOTIFICAÇÃO**

A recomendação deste CEP está relacionada aos seguintes itens:

- 1) Instrumento de pesquisa.
- 2) CV ou link do lattes do pesquisador principal.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências solicitadas pela Comissão de Ética do Setor de Ciências da Saúde foram atendidas.

Quanto à viabilidade de execução nas dependências do Hospital de Clínicas, o projeto de pesquisa pode ser aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 468/2012, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



CEPAC/UFPR

Continuação do Parecer: 362.D44

HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR



CURITIBA, 15 de Agosto de 2013

Assinador por:
Renato Tambara Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br

ANEXO 3 – INSTRUÇÃO DE TRABALHO - ITR - UAD - HEM – Nº 004



INSTRUÇÃO DE TRABALHO ITR - UAD - HEM – Nº 004		Folha 01/06
UNIDADE FUNCIONAL/SERVIÇO/SEÇÃO Unidade de Apoio diagnóstico – Serviço de Análises Clínicas – Seção de Hematologia		
NOME DA INSTRUÇÃO DE TRABALHO		
CRITÉRIOS DE REVISÃO/LIBERAÇÃO DE HEMOGRAMAS AUTOMATIZADOS		
ELABORADO POR Samuel Ricardo Comar		DATA 07/10/2008
APROVADO POR		DATA
RESPONSÁVEL PELA EXECUÇÃO DA INSTRUÇÃO Farmacêuticos bioquímicos da Seção de Hematologia.		
REVISÕES	DATA	RESPONSÁVEL
1ª REVISÃO	09/10/2010	
2ª REVISÃO	11/11/2012	
3ª REVISÃO		
4ª REVISÃO		
REGISTRO DE PÁGINAS QUE FORAM ALTERADAS E SUBSTITUÍDAS		
1ª REVISÃO		
2ª REVISÃO		
3ª REVISÃO		
4ª REVISÃO		

Elaborado por Samuel Ricardo Comar CRF-PR 12.832

Objetivo da Instrução de Trabalho

Indicar os critérios para decidir quando há ou não necessidade de se realizar a revisão microscópica da lâmina de hemograma.

1. CRITÉRIOS PARA SE REALIZAR AÇÃO APÓS ANÁLISE DAS CONTAGENS GLOBAL E DIFERENCIAL:
SÉRIE BRANCA

CRITÉRIO	PARÂMETRO	OBSERVAÇÃO 1	OBSERVAÇÃO 2	AÇÃO 1	AÇÃO 2 (se necessário)
1	Léucócitos	$<3,3 \times 10^3/\mu\text{l}$	$>20,0 \times 10^3/\mu\text{l}$	Revisar a lâmina	Diferencial manual
2	Neutrófilos #	$<1,0 \times 10^3/\mu\text{l}$	$>15,0 \times 10^3/\mu\text{l}$	Revisar a lâmina	Diferencial manual
3	Neutrófilos %	$<25 \%$	$>80 \%$	Revisar a lâmina	Diferencial manual
4	Linfócitos #	$<0,8 \times 10^3/\mu\text{l}$	$>5,0 \times 10^3/\mu\text{l}$	Revisar a lâmina	Diferencial manual
5	Linfócitos %	$<8 \%$	$>70 \%$	Revisar a lâmina	Diferencial manual
6	Monócitos #		$>1,3 \times 10^3/\mu\text{l}$	Revisar a lâmina	Diferencial manual
7	Monócitos %		$>20 \%$	Revisar a lâmina	Diferencial manual
8	Eosinófilos #		$>2,5 \times 10^3/\mu\text{l}$	Revisar a lâmina	Diferencial manual
9	Eosinófilos %		$>30 \%$	Revisar a lâmina	Diferencial manual
10	Basófilos #		$>0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$	Revisar a lâmina	Diferencial manual
11	Basófilos %		$>3 \%$	Revisar a lâmina	Diferencial manual
12	IG#		$>0,1 \times 10^3/\mu\text{l}$	Revisar a lâmina	Diferencial manual
13	IG%		$>3 \%$	Revisar a lâmina	Diferencial manual

SÉRIE VERMELHA				
CRITÉRIO	PARAMETRO	OBSERVAÇÃO 1	OBSERVAÇÃO 2	AÇÃO
14	RBC		$>8,60 \times 10^6/\mu\text{l}$	Revisar a lâmina
15	Hemoglobina	$<8,0 \text{ g/dl}$		Revisar a lâmina e verificar integridade da amostra
16	VCM	$<74 \text{ fl}$	$\geq 105 \text{ fl}$	Revisar a lâmina e checar microcitose e macrocitose
17	CHCM	$<30,5$		Revisar a lâmina, investigar possível contaminação da amostra, checar relação sangue : anticoagulante, checar hipocromia
18	RDW-CV		$>18,5 \%$	Revisar a lâmina e checar aniso
19	RDW-SD		$>70\text{fl}$	Revisar a lâmina e checar aniso
20	Rebucóitos	$>0,150 \times 10^6/\mu\text{l}$	$>2,5 \%$	Revisar a lâmina e checar policromatofilia
21	NRBC automatizado		$>2/100\text{WBC}$	Revisar a lâmina e, se necessário, contar eritroblastos/100 WBC. Corrigir WBC quando NRBC manual for $\geq 10/100 \text{ WBC}$

PLAQUETAS				
CRITÉRIO	PARAMETRO	OBSERVAÇÃO 1	OBSERVAÇÃO 2	AÇÃO
22	Plaquetas #	$<100.000/\mu\text{l}$	$>1.000.000/\mu\text{l}$	Revisar a lâmina, fazer estimativa plaquetária e comparar com a contagem automatizada

Elaborado por Samuel Ricardo Comar CRF-PR.12.832



ALERTAS SUSPEITOS

CRITÉRIO	FLAG	AÇÃO
23	<i>Immature Gran? ou Ig/Band?</i> (Granulócitos imaturos e bastonetes)	Revisar a lâmina e, se necessário, fazer diferencial manual
24	<i>Left shift?</i> (Desvio nuclear à esquerda)	Revisar a lâmina e, se necessário, fazer diferencial manual
25	<i>Atypical Lympho?</i> (Linfócitos atípicos)	Revisar a lâmina e, se necessário, fazer diferencial manual
26	<i>Abnormal Lympho/Blasts?</i> (Blastos, células imaturas ou linfócitos atípicos)	Revisar a lâmina e, se necessário, fazer diferencial manual
27	<i>Blasts?</i> (Blastos)	Revisar a lâmina e, se necessário, fazer diferencial manual
28	<i>NRBC?</i> (Eritroblastos)	Revisar a lâmina e caso seja positivo, contar eritroblastos/100 leucócitos
29	<i>RBC Fragment?</i> (Fragmentos eritrocitários)	Revisar a lâmina e checar esquistócitos
30	<i>Dimorphic RBC Population</i> (População eritrocitária heterogênea)	Checar gráfico de distribuição de volume eritrocitário e verificar anisocitose na lâmina
31	<i>RBC Lyse resistance</i> (eritrócitos resistentes à lise)	Passar novamente a amostra e caso seja positivo, revisar lâmina e checar se há morfologia eritrocitária anormal
32	<i>Platelet Clumps? e Platelet Clumps (S)?</i> (agregados plaquetários) <i>PLT Clumps</i> : verificar na área inferior do scattergrama. <i>PLT Clumps (S)</i> : verificar gráfico de distribuição de volume plaquetário. Houve erro na impedância	Checar presença de coágulos na amostra e agregados plaquetários na lâmina. Se não for possível avaliar na lâmina devido à presença de agregados, liberar em obs.: presença de agregados plaquetários na lâmina, contagem automatizada de plaquetas prejudicada, sugere-se solicitar nova amostra para confirmação do resultado

OUTRAS OBSERVAÇÕES			
CRITÉRIO	PARÂMETRO	OBSERVAÇÃO 1	AÇÃO
33	Se for recém-nato		Fazer diferencial manual e revisar a lâmina
34	WBC, RBC, Hb, Plaq, Retíc	Excederem a linearidade do aparelho (indicado pelo sinal @ do lado do parâmetro)	Checar a amostra, revisar a lâmina e, diluir a amostra e passá-la novamente
35	WBC e Plaq	Valores menores que a linearidade do aparelho	WBC = $0,00 \times 10^3/\mu\text{l}$, checar na lâmina e liberar $<0,005 \times 10^3/\mu\text{l}$. Plaq = $0 \times 10^3/\mu\text{l}$, verificar coágulo, passar plaqueta ótica, se Plaq-O = $0 \times 10^3/\mu\text{l}$, contar em câmara de Neubauer conforme POP-UAD-HEM Nº 002 Contagem de plaquetas em câmara de Neubauer
36	WBC, RBC, Hb, Plaq	{—} Problemas na voltagem; Falha mecânica	Procurar coágulos na amostra, se negativo, passar novamente, se persistir, contar por método alternativo ou passar a amostra em outro contador
37	Contagem diferencial	Quando o contador não libera a contagem diferencial ou a mesma é incompleta	Fazer diferencial manual e revisar a lâmina
38	Hemoglobina	<i>Turbidity/HGB Interf?</i> <i>HGB Defect?</i> Hemoglobina elevada em relação às demais constantes.	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
39	{*}	Indica que os resultados não são confiáveis	Fazer diferencial manual e revisar a lâmina

Elaborado por Samuel Ricardo Comar CRF-PR.12.832

2. REFERÊNCIAS:

ADVIA 120 Hematology System. Manual do operador, 1999.

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.

FAILACE, R.; PRANKE, P. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de hemogramas através de contadores eletrônicos. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, v. 26(3), p. 159-166, 2004.

HYUN, B. H.; GULATI, G. L.; ASHTON, J. K. Differential leukocyte count: manual or automated, what should it be? *Yonsei medical journal*. v. 32(4), 283-291, 1991.

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*, v. 119, p. 656-662, 2003.

SYSMEX XE-2100D Automated Hematology Analyzer Guide.

SYSMEX XT-2000i Automated Hematology Analyzer Guide.

WARD, P. C. J. The CBC at the Turn of the Millennium: An Overview. *Clinical Chemistry*. v. 46(8B), p. 1215-1220, 2000.