

Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Residência em Área Profissional de Saúde
Farmácia Análises Clínicas – Bioquímica Clínica

Validação da metodologia óptica para contagem de eritrócitos e dosagem de hemoglobina no analisador Sysmex-XN

JENNIFER TASSONI STAEHLER

Porto Alegre
2021

Jennifer Tassoni Staehler

Validação da metodologia óptica para contagem de eritrócitos e dosagem de hemoglobina no analisador Sysmex-XN

Monografia apresentada como requisito parcial para conclusão da Residência em Área Profissional de Saúde – Análises Clínicas: Bioquímica Clínica, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Orientadora: Carine Ghem

Coorientador: Iuri Vicente Camargo Morkis

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na
Publicação

Staeher, Jennifer Tassoni

Validação da metodologia óptica para contagem de eritrócitos e dosagem de hemoglobina no analisador Sysmex-XN / Jennifer Tassoni Staeher. -- 2021.

45 f.

Orientadora: Carine Ghem.

Coorientador: Iuri Vicente Camargo Morkis. Trabalho de

conclusão de curso (Especialização)--

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Residência em Área Profissional de Saúde - Análises Clínicas, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Hematologia. 2. Validação. 3. Metodologia Óptica. 4. Canal de reticulócitos. 5. Analisador hematológico. I. Ghem, Carine, orient. II. Morkis, Iuri Vicente Camargo, coorient. III. Título.

Sumário

1. Introdução.....	4
Questão norteadora.....	6
2. Revisão da literatura	6
Hemograma.....	6
Automação em Hematologia	7
HGB, RBC e CHCM	8
3. Objetivos	10
3.1 Gerais	10
3.2 Específicos	10
4. Resultados – Artigo	12
Abstract	14
Resumo.....	15
Introdução.....	16
Métodos	18
Tipo de estudo.....	18
População e amostra.....	18
Materiais e métodos	18
Análise estatística.....	19
Tamanho amostral	20
Aspectos éticos.....	20
Resultados	20
Discussão	21
Conclusões	24
Conflito de interesse	25
Suporte financeiro.....	25
Agradecimentos	25
Tabelas	26
Figuras	27
Referências.....	32
5. Considerações finais.....	33
Referências Bibliográficas	34
Anexos.....	36

1. Introdução

Um hemograma é determinado por um conjunto de testes realizados em laboratório que estabelece aspectos qualitativos e quantitativos das células do sangue, sendo de grande importância no diagnóstico de diversas doenças (1).

A determinação analítica de células sanguíneas e parâmetros hematológicos de interesse pode ser realizada através de analisadores hematológicos automatizados, cujo princípio de detecção baseia-se no método elétrico (impedância elétrica) ou óptico (1). Com base nos parâmetros medidos - eritrócitos (*red blood cells* - RBC), hemoglobina (HGB) e volume corpuscular médio (VCM), é possível obter por cálculo indireto a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), índice que avalia a saturação de hemoglobina nos eritrócitos (2). Algumas situações podem levar a uma medida errônea dos eritrócitos e, conseqüentemente, gerar índices incorretos calculados a partir desse, especialmente o CHCM (3).

A contagem dos eritrócitos nos analisadores automatizados Sysmex XE e XN é realizada pelo método de impedância (RBC-I), baseada nas oscilações de corrente gerada pela célula que atravessa um campo elétrico (1). A evolução das automações em hematologia disponibilizou uma nova metodologia alternativa para a contagem dos eritrócitos, permitindo que a contagem dos eritrócitos seja realizada no canal óptico utilizado para contagem de reticulócitos (RET) (4). Com essa metodologia, a contagem dos eritrócitos (RBC-O) é realizada pela metodologia de citometria de fluxo e a HGB é calculada indiretamente utilizando a medida do conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos maduros (HGB-O). Assim, utilizando diferentes metodologias para medir eritrócitos e hemoglobina, podemos obter diferentes resultados nos índices hematimétricos calculados.

Resultados errôneos de RBC ou HGB podem ser causados por anormalidades dos eritrócitos (aglutinação) ou por interferentes do plasma (lipemia, icterícia, hemólise), assim, gerar um aumento espúrio do CHCM (5). Eritrócitos anormais podem estar relacionados a presença de crioaglutininas na amostra, que causam a aglutinação dos eritrócitos em temperaturas menores que 37°C e, geralmente, a presença desses autoanticorpos é associada clinicamente à anemia hemolítica autoimune (6). Além das crioaglutininas,

desordens que desregulam o volume eritrocitário, tanto hereditárias quanto adquiridas (ex: esferocitose, anemia falciforme) também levam a um aumento do CHCM (7). Portanto, na rotina laboratorial, a elevação do índice CHCM deve ser avaliada cuidadosamente, a fim de determinar se a alteração do CHCM está relacionada a uma patologia, ou apenas a algum artefato da amostra.

Recentemente, vem sendo descrito na literatura a separação espontânea dos eritrócitos aglutinados no canal óptico (3). Isso se deve ao fato da amostra de sangue ser aquecida a 41°C durante 1 minuto no momento de transferência da amostra para a câmara de leitura (4). Essa particularidade torna o canal óptico uma alternativa interessante ao protocolo realizado atualmente nas amostras que apresentam o CHCM alto.

Na rotina laboratorial, a correção da contagem dos eritrócitos, bem como a dos índices eritrocitários calculados indiretamente como o CHCM, pode ser revertida através do pré-aquecimento do sangue (8). Na nossa rotina, amostras que apresentam o valor de CHCM superior a 37,5 g/dL (valor sugerido no manual do fabricante) (9) são incubadas em banho-maria na temperatura de 37°C durante 60 minutos e, posteriormente, um novo hemograma é realizado no equipamento. Nas situações em que o pré-aquecimento da amostra não seja capaz de reverter o aumento do CHCM devido ao alto grau de aglutinação ou outros interferentes, o procedimento indicado é a realização do microhematócrito por microcentrifugação, e liberação de um hemograma sem os índices hematimétricos. Em casos de amostra lipêmica, os índices derivados da HGB não são liberados devido à interferência na reação colorimétrica.

Sendo assim, este trabalho tem o propósito de comparar as metodologias para contagem de eritrócitos pela metodologia impedância e método óptico, para fins de utilização do canal óptico presente no equipamento Sysmex XN como forma correção da contagem dos RBC nos casos de pacientes que apresentam o índice de CHCM acima do ponto de corte. Além disso, a implementação da metodologia da contagem de eritrócitos através do canal óptico diminuiria o tempo estimado para liberação do hemograma.

Questão norteadora

Os resultados obtidos no canal óptico do equipamento Sysmex XN são comparáveis com os resultados obtidos através da metodologia por impedância, após a amostra ser incubada em banho-maria a 37°C por 60 minutos.

2. Revisão da literatura

Hemograma

A contagem total de células sanguíneas ou, simplesmente, hemograma, é utilizado para avaliar as células que estão em circulação de forma qualitativa e quantitativa, sendo assim, é uma ferramenta importante para o diagnóstico de diversas doenças (1). Em um hemograma é possível avaliar as três linhagens de células presentes na corrente sanguínea, são elas: células vermelhas ou eritrócitos; células brancas ou leucócitos e as plaquetas (10).

A partir do resultado do hemograma pode-se inferir o estado de saúde do paciente, se há a presença de agentes infecciosos, doenças crônicas ou agudas, também auxilia no diagnóstico, controle e acompanhamento de doenças proliferativas, pré e pós cirurgias ou eventos traumatológicos (11). Desta forma, a decisão médica com base nos resultados obtidos no hemograma relacionando-o com a clínica apresentada pelo paciente, em conjunto com resultados de outros exames bioquímicos, proporciona um tratamento mais rápido e direcionado (12).

O hemograma completo fornece diversos parâmetros hematológicos que, ao serem avaliados, predizem o estado de saúde geral do paciente, além de inferir também, o estado de saúde da medula óssea, bem como a produção de novas células sanguíneas (12). A análise relacionada a células brancas do sangue, os leucócitos, é chamada de leucograma, que engloba a contagem total e diferencial dos leucócitos, incluindo alterações morfológicas e as diferentes populações leucocitárias (1). Já o plaquetograma envolve a contagem total e a avaliação morfológica de plaquetas (11).

A análise relacionada a série vermelha do sangue é chamada de eritrograma, e nela se encontram os índices hematimétricos que determinam o perfil hematológico das células vermelhas. São eles: contagem total de

eritrócitos (RBC), dosagem de hemoglobina (HGB), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hematócrito (HT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), estimativa de anisocitose (RDW), e além disso, é feita a avaliação morfológica das hemácias a partir da microscopia (1). Neste estudo, iremos focar em três dos parâmetros hematimétricos RBC, HGB e, principalmente, CHCM, que veremos mais adiante.

Automação em Hematologia

A realização do hemograma pode ser de forma manual ou por técnicas automatizadas através dos contadores, que oferecem elevada sensibilidade e especificidade para quantificar células da linhagem eritrocitária, além de realizar também a quantificação e diferenciação dos leucócitos (13). Essa automatização permite ao laboratório a análise de um número maior de amostras em um menor intervalo de tempo, já que exames considerados dentro da normalidade são liberados automaticamente, e apenas uma parte dos hemogramas necessita da avaliação do esfregaço sanguíneo (14). Porém, mesmo com uma automação completa e confiável, a revisão do esfregaço sanguíneo é necessária para a avaliação das formas dos eritrócitos, das inclusões eritrocitárias (como corpos de Howell-Jolly ou pontilhado basófilo) e outras alterações que podem ser observadas (1). A revisão do esfregaço sanguíneo pelo microscopista é realizada a partir de critérios de revisão de lâminas estabelecidos pelo laboratório, que são baseados em: determinação de limites máximos e mínimos padronizados, presença de alarmes emitidos pelos contadores automatizados, idade, solicitação de primeiro exame do paciente e a pedido médico (15). Entretanto, como consenso geral, hemogramas oriundos de pacientes pós-transplantados, em uso de quimioterapia e pacientes graves da UTI devem ser revisados (11).

A contagem de células sanguíneas em analisadores hematológicos pode ser realizada através da impedância, onde as diferentes células presentes no sangue são mensuradas a partir de impulsos elétricos que estas geram ao serem interceptadas por uma corrente elétrica, enquanto passam por um orifício de 60 a 100 μm (1). Através dessa metodologia é possível realizar a contagem dos eritrócitos, e após a lise das hemácias, a contagem das células

brancas e das plaquetas (16). Por essa metodologia é possível se obter o VCM, que ao ser multiplicado pela quantidade de eritrócitos, obtém-se o HT. Através da metodologia de espectrofotometria, é possível obter-se o valor de HGB, e portanto, os valores de HCM e de CHCM que são calculados a partir da HGB (17).

O diferencial leucocitário é realizado através da metodologia de citometria de fluxo onde a incidência de um laser excita os fluorocromos que estão acoplados as glicoproteínas presentes na superfície dos leucócitos (17). Através dessa metodologia é possível realizar a diferenciação em até sete partes: neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos, linfócitos atípicos e células imaturas grandes (granulócitos imaturos e/ou blastos) (16). Além de disso, também são reportados os valores de eritrócitos nucleados ou eritroblastos (NRBC-nuclear red blood cells) através da citometria de fluxo (18).

HGB, RBC e CHCM

A HGB é um parâmetro utilizado para se determinar anemia, quando seus valores se encontram abaixo dos valores de referência. A queda de HGB pode indicar uma anemia hemolítica, anemia por deficiência de ferro, neoplasia hematológica onde há baixa produção por parte da medula óssea, ou ainda, uma hemodiluição devido ao uso de soro intravenoso. Por outro lado, resultados acima dos valores de referência podem indicar que houve desidratação por uso de diuréticos, ou que houve uma transfusão sanguínea, que eleva rapidamente os valores de HGB e RBC (1).

A contagem de RBC antigamente era realizada em câmara de contagem, porém isso representava um erro relativamente alto. Com o passar dos anos o RBC passou a ser determinado através da impedância e hoje em dia, alguns analisadores hematológicos também possuem um canal específico para a análise de reticulócitos presentes no sangue, chamado de canal óptico. Atualmente, é possível realizar a determinação do RBC através desse canal onde a determinação se dá por citometria de fluxo após um minuto de aquecimento a 41 °C (16, 19). Com essa metodologia e o equipamento devidamente calibrado e aferido, o coeficiente de variação da contagem dos eritrócitos fica em menos de 1,5% (11). Neste canal também é possível avaliar

a eritropoiese, onde as células são diferenciadas pelo tamanho e estado de maturação celular (20).

O CHCM se trata de um índice calculado a partir do RBC, VCM e HGB e define a saturação de hemoglobina nos eritrócitos; de forma geral, traduz a coloração dos eritrócitos (1). Reduções dos valores de CHCM indicam que os eritrócitos estão com concentração de hemoglobina abaixo do normal e definem a hipocromia. Essa anormalidade no hemograma ocorre principalmente em indivíduos com intensa reticulocitose, ou seja, eritrócitos imaturos que estão em circulação (11).

Já o aumento de CHCM se dá em casos onde há perda de líquido do eritrócito para o meio extracelular ou quando há redução do tamanho do eritrócito sem a perda do conteúdo de hemoglobina, caracterizando hiperchromia. As células hiperchrômicas possuem CHCM acima dos valores de referência e valores espúrios desse parâmetro podem ocorrer na presença de esferócitos, drepanócitos, células contraídas devido a perda de água ou esquizócitos (5).

Em geral, quaisquer causas que elevem a HGB ou diminuam o VCM ou HT geram aumento nos valores de CHCM (21). O aumento espúrio da HGB pode ser devido a turvação da amostra pela presença de hiperleucocitose, hiperlipidemia ou hiperbilirrubinemia, também pode ocorrer pela presença de eritrócitos resistentes a lise ou pela presença de sangue fetal no sangue materno (5).

A presença de aglutinação dos eritrócitos ou crioaglutininas é um dos fatores mais comuns que geram resultados de CHCM elevados (3). As crioaglutininas são autoanticorpos da classe IgM que causam aglutinação dos eritrócitos a temperaturas abaixo de 37° C, interferindo na contagem de RBC e do VCM, e conseqüentemente, do CHCM que é um parâmetro que deriva dos anteriores (8). Os fatores que levam ao desenvolvimento desses autoanticorpos costumam ser extrínsecos, como o uso de medicamentos, processos infecciosos, onde a produção de anticorpos para o combate do agente infeccioso gera anticorpos que reconhecem antígenos celulares próprios, danos físicos ou químicos aos eritrócitos, transfusões inadequadas ou incompatibilidades materno-fetais (22). A presença desses autoanticorpos gera

a anemia hemolítica autoimune (AHAI), onde os macrófagos fazem a destruição precoce dos eritrócitos revestidos pelos autoanticorpos (1).

Com o intuito de corrigir os valores espúrios que os interferentes citados anteriormente podem gerar, a amostra é incubada a 37 °C por uma hora e analisada novamente. A incubação consegue reverter o processo de aglutinação dos eritrócitos na maioria dos casos e fornecer o verdadeiro valor de CHCM através da correção dos valores de HT e RBC (19). A utilização do canal de reticulócitos pode ser uma alternativa para a incubação da amostra por uma hora, já que este canal faz o aquecimento a 41 °C por um minuto no momento do processamento da amostra, reduzindo o tempo de análise e liberação dos resultados (4, 19).

3. Objetivos

3.1 Gerais

Validar a metodologia de citometria de fluxo presente no canal de contagem de reticulócitos no equipamento Sysmex XN como forma de corrigir a elevação CHCM das amostras que apresentem o índice acima de 37,5 g/dL.

3.2 Específicos

- Comparar os resultados de eritrócitos, hemoglobina e CHCM medidos/calculados com base na metodologia de citometria de fluxo em amostras de indivíduos com parâmetros hematológicos normais (controle interno de qualidade), em comparação as metodologias empregadas atualmente na rotina (impedância elétrica e espectrofotometria).

- Comparar os resultados de eritrócitos, hemoglobina e CHCM medidos/calculados com base na metodologia de citometria de fluxo dentro de amostras com CHCM elevado (> 37,5 g/dL), em comparação as metodologias empregadas atualmente na rotina (impedância elétrica e espectrofotometria).

- Rastrear em quais situações, patologias ou interferentes da amostra, a utilização da metodologia alternativa (citometria de fluxo), corrige o valor do CHCM.

- Observar a estabilidade dos parâmetros medidos no equipamento Sysmex XN ao longo do dia em amostras do controle de qualidade interno, com

índices hematimétricos normais, empregando a metodologia de citometria de fluxo e as metodologias utilizadas atualmente na rotina (impedância elétrica e espectrofotometria).

4. Resultados – Artigo

Validação da metodologia óptica para contagem de eritrócitos e dosagem de hemoglobina no analisador Sysmex-XN

Título Corrido: Validação da metodologia óptica para correção dos valores de concentração de hemoglobina corpuscular média.

Jennifer Tassoni Staehler^{1,2}, Luana Moro^{1,3}, Gabriel Giron Correa^{1,2}, Luciana Scotti^{1,3}, Iuri Vicente Camargo Morkis^{1,4}, Carine Ghem^{1,5}.

¹ Unidade de Bioquímica Clínica, Serviço de Diagnóstico Laboratorial – Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Brasil.

² Graduação em Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

³ Mestrado em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁴ Mestrado no Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e Adolescente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁵ Doutorado em Ciências da Saúde – Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul

Endereço para correspondência:

Carine Ghem, PhD

Unidade de Bioquímica Clínica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre – RS 90630-000

Brasil

E-mail: cghem@hcpa.edu.br

Abstract

Introduction: Abnormalities in erythrocytes or plasma interferers can generate a spurious increase in the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC).

Objectives: Compare the impedance and optical methodologies for red blood cells (RBC) count and hemoglobin (HGB) measurement as a way to correct the RBC count in cases of patients who have a MCHC index above the cutoff.

Methods: To compare the methodologies, 298 samples with normal MCHC and 120 samples with MCHC greater than 37.5 g/dL were used. The evaluated parameters were RBC, HGB and MCHC. The stability of the samples were evaluated.

Results: There is equivalence between methodologies for newborn samples and in sickle cell anemia (SCA). In agglutinated samples there was a significant difference. Good stability was observed for the RBC and HGB.

Discussion: The heating of the sample at the time of dosing seems to correct MCHC values in samples with increased density, as in SCA or in newborn. For agglutinated samples, a longer heating time is required, and incubation at 37 °C for one hour is still the best option.

Conclusion: The optical methodology is a good alternative for correcting spurious MCHC values, generating faster results without the need for sample incubation, but for cases of agglutination there was no significant correlation.

Keywords: hematology, erythrocytes indices, reticulocyte count, erythrocytes, mean corpuscular hemoglobina concentration, hematologic tests, validation study.

Resumo

Introdução: Anormalidades nos eritrócitos ou interferentes plasmáticos podem gerar um aumento espúrio na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Objetivos: Comparar as metodologias de impedância e óptico para contagem de eritrócitos (RBC) e dosagem de hemoglobina (HGB) como forma de corrigir a contagem de eritrócitos em casos de pacientes que apresentam índice CHCM acima do ponto de corte.

Métodos: Para comparar as metodologias, foram utilizadas 298 amostras com CHCM normal e 120 amostras com CHCM maior que 37,5 g/dL. Os parâmetros avaliados foram RBC, HGB e CHCM. Além disso, a estabilidade das amostras foi avaliada.

Resultados: Há equivalência entre as metodologias para amostras de recém-nascidos e na anemia falciforme (AF). Para amostras aglutinadas, houve uma diferença significativa. Boa estabilidade foi observada para RBC e HGB.

Discussão: O aquecimento da amostra no momento da dosagem parece corrigir os valores de CHCM em amostras com densidade aumentada, como na AF ou no recém-nascido. Para amostras aglutinadas, é necessário um tempo de aquecimento maior e a incubação a 37 °C por uma hora ainda é a melhor opção.

Conclusão: A metodologia óptica é uma boa alternativa para correção de valores espúrios de CHCM em situações específicas, mas para casos de aglutinação não houve uma correlação significativa.

Palavras-chave: hematologia, índices de eritrócitos, contagem de reticulócitos, eritrócitos, concentração hemoglobina corpuscular média, testes hematológicos, estudo de validação.

Introdução

Um hemograma é determinado por um conjunto de testes realizados em laboratório que estabelece aspectos qualitativos e quantitativos das células do sangue, sendo de grande importância no diagnóstico de diversas doenças (1). Em um hemograma é possível avaliar as três linhagens de células presentes na corrente sanguínea, são elas: células vermelhas ou eritrócitos; células brancas ou leucócitos e as plaquetas (10).

A análise relacionada a série vermelha do sangue é chamada de eritrograma, e nela se encontram os índices hematimétricos que determinam o perfil hematológico das células vermelhas. São eles: contagem total de eritrócitos (RBC), dosagem de hemoglobina (HGB), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hematócrito (HT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), estimativa de anisocitose (RDW), e além disso, é feita a avaliação morfológica das hemácias a partir da microscopia (1).

A determinação analítica de células sanguíneas e parâmetros hematológicos de interesse pode ser realizada através de analisadores hematológicos automatizados, cujo princípio de detecção baseia-se no método elétrico (impedância elétrica) ou óptico (1). Com base nos parâmetros medidos do hemograma (RBC, HGB e VCM) é possível obter por cálculo indireto o CHCM, índice que avalia a saturação de hemoglobina nos eritrócitos (2). Algumas situações podem levar a uma medida errônea dos eritrócitos e, conseqüentemente, gerar índices calculados incorretamente, especialmente o CHCM (3).

Resultados errôneos de RBC ou HGB podem ser causados por alguma anormalidade dos eritrócitos (aglutinação) ou por interferentes do plasma (lipemia, icterícia, hemólise) e, assim, gerar um aumento espúrio do CHCM (5). A contagem anormal de eritrócitos pode estar relacionada a presença de crioaglutininas na amostra, que causam a aglutinação dos eritrócitos em temperaturas menores que 37°C e, geralmente, a presença desses autoanticorpos são associados clinicamente à anemia hemolítica autoimune (6). Além das crioaglutininas, desordens que desregulam o volume eritrocitário, tanto hereditárias quanto adquiridas (ex: esferocitose, anemia falciforme)

também levam a um aumento do CHCM (7). Portanto, na rotina laboratorial, a elevação do índice CHCM deve ser avaliada cuidadosamente, a fim de determinar se a alteração do CHCM está relacionada a uma patologia, ou apenas a algum artefato da amostra.

Recentemente, vem sendo descrito na literatura a separação espontânea dos eritrócitos aglutinados no canal óptico (3). Isso se deve ao fato da amostra de sangue ser aquecida a 41°C durante 1 minuto no momento de transferência da amostra para a câmara de leitura (4). Essa particularidade torna o canal óptico uma alternativa interessante ao protocolo realizado atualmente nas amostras que apresentam o CHCM alto.

Na rotina laboratorial, a correção da contagem dos eritrócitos, bem como a dos índices eritrocitários calculados indiretamente como o CHCM, pode ser revertida através do pré-aquecimento do sangue (8). Amostras que apresentam o valor de CHCM superior a 37,5 g/dL (valor sugerido no manual do fabricante) (9) são incubadas em banho-maria na temperatura de 37°C durante 60 minutos e, posteriormente, um novo hemograma é realizado no equipamento. Nas situações em que o pré-aquecimento da amostra não seja capaz de reverter o aumento do CHCM devido ao alto grau de aglutinação ou outros interferentes, o procedimento indicado é a realização do microhematócrito por microcentrifugação, e liberação de um hemograma sem os índices hematimétricos. Em casos de amostra lipêmica, os índices derivados da HGB não são liberados devido à interferência na reação colorimétrica. Sendo assim, este trabalho tem o propósito de comparar as metodologias para contagem de RBC pela metodologia impedância e método óptico, com a finalidade de utilizar o canal óptico presente no equipamento Sysmex XN como forma correção da contagem de RBC nos casos de pacientes que apresentam o índice de CHCM acima do ponto de corte. Além disso, a implementação da metodologia da contagem de RBC através do canal óptico diminuiria o tempo estimado para liberação do hemograma.

Métodos

Tipo de estudo

Estudo transversal prospectivo no período de novembro de 2019 a agosto de 2020 na unidade de Bioquímica Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

População e amostra

Para comparação das metodologias em indivíduos saudáveis do ponto de vista hematológico, que possuem CHCM na faixa normal, foram avaliados resultados de amostras de indivíduos adultos de ambos os sexos, utilizadas diariamente em nossa rotina para controle interno de qualidade do equipamento Sysmex XN. Também foi realizada a verificação da estabilidade dos parâmetros com amostras de controle interno de qualidade, para essa avaliação a mesma amostra de controle interno diário foi processada nos turnos manhã, tarde e noite.

Além da comparação em indivíduos normais, realizamos a análise dessa metodologia em pacientes que apresentaram o índice CHCM elevado. Foram incluídos todos pacientes que realizaram exame de hemograma no laboratório com primeira dosagem de CHCM maior que 37,5 g/dL. Aqueles que não possuam volume suficiente de sangue total para uma terceira dosagem foram excluídos do estudo.

Todas as amostras utilizadas nesse estudo foram coletadas em tubo com anticoagulante K2EDTA e processadas dentro do período de 8 horas após coleta.

Materiais e métodos

Para avaliação da metodologia óptica em valores normais de CHCM, foram coletados os dados do controle interno da qualidade dos analisadores hematológicos, que consiste de indivíduos adultos com parâmetros hematológicos normais. As amostras com valores de CHCM normais foram dosadas através da metodologia por impedância elétrica e por citometria de fluxo e os valores obtidos através das duas metodologias foram comparados e avaliados.

A rotina do laboratório estabelece que todas as amostras com resultado de CHCM maior que 37,5 g/dL sejam incubadas em banho-maria a 37 °C por 60 minutos, para realizar uma segunda dosagem. Tal valor é sugerido no manual do fabricante como crítico e que gera *flag* de possível turbidez na amostra (9), sendo assim, o aquecimento visa eliminar a interferência de crioaglutininas nos índices hematimétricos. Neste estudo, todas as amostras com CHCM maior que 37,5 g/dL foram dosadas no canal óptico. Este canal utiliza a metodologia de citometria de fluxo com fluorescência para contagem de eritrócitos (RBC-O), incluindo também os reticulócitos. A hemoglobina (HB-O) é calculada a partir dos parâmetros RBC-O e conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos. Estes resultados foram comparados com os valores obtidos por impedância na dosagem após a incubação por 1 hora a 37 °C. Todas as amostras foram revisadas por microscopia para avaliação da morfologia da série vermelha, bem como avaliação visual do plasma para verificação de turbidez e lipemia. Essa avaliação tem como objetivo agrupar as causas que elevam o índice CHCM (seja por interferentes, doenças eritrocitárias ou outras causas não identificadas) e analisar em quais situações a metodologia óptica pode ou não normalizar o valor do CHCM. Todas as avaliações referentes a esta pesquisa foram realizadas após a liberação dos resultados dos exames solicitados, sem interferência na rotina da unidade.

Para a avaliação da estabilidade dos parâmetros hematológicos, a mesma amostra com valores hematimétricos normais foi avaliada pelo equipamento Sysmex XN três vezes ao dia (manhã, tarde e noite), pelas metodologias de impedância elétrica e citometria de fluxo e os valores obtidos foram comparados para se observar as possíveis variações.

Todos os dados foram coletados diretamente do equipamento; nenhuma coleta em dados de prontuário foi realizada.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa estatístico SPSS 20.0 (Statistical Package for Social Sciences- Professional Statistics™). As variáveis numéricas estão descritas sob a forma de medianas e as variáveis categóricas estão descritas sob a forma de proporções. Para avaliar a correlação entre as duas metodologias foi utilizado o teste de Spearman e para

avaliar a concordância foram utilizados os testes de Wilcoxon e McNemar. Para verificar a estabilidade da amostra ao longo do dia foi utilizado o teste de Kruskal-wallis. Para todas as análises foi considerado um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Tamanho amostral

Para detectar um valor mínimo de $p = 0,65$ no teste de correlação em amostras de indivíduos saudáveis do ponto de vista hematológico, considerando hipótese nula $p = 0,5$ e os seguintes parâmetros para o cálculo: poder de 90%, α de 0,01, foi determinado o tamanho amostral de 293, utilizando o programa R 3.5.1.

A referência utilizada para o cálculo amostral dos indivíduos com CHCM elevado e para a avaliação do CHCM normal, seguiu o protocolo estabelecido para validação de métodos de acordo com “Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial” (SBPC/ML 2018), o qual prevê número amostral de no mínimo 120 amostras para comparação (23).

Aspectos éticos

Este projeto foi encaminhado para aprovação ao Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para avaliação (Projeto número 2019-0293), e para a Plataforma Brasil (CAAE: 12894919.6.000.5327). O presente projeto envolve riscos mínimos relacionados a quebra de confidencialidade dos dados obtidos, portanto os pesquisadores assinaram o Termo de Compromisso de Utilização de Dados, no qual se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes, o Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas e a carta de aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Anexo).

Resultados

Foram avaliadas 293 amostras com valores de CHCM dentro da normalidade, onde observou-se que os parâmetros RBC, HGB e CHCM apresentaram uma boa e significativa correlação entre as metodologias avaliadas (Figura 1). Apesar das correlações se mostrarem significativas,

utilizamos o teste de Wilcoxon para avaliar as diferenças entre as dosagens nas metodologias utilizadas. Verificamos que não houve diferença significativa para as medianas dos parâmetros HB e CHCM, permitindo concluir que esses parâmetros são equivalentes nas metodologias analisadas (Tabela 1). Os dados também indicam que para RBC a hipótese nula foi rejeitada, demonstrando que os métodos não são equivalentes para esse parâmetro.

Na Figura 2 podemos observar a estabilidade das amostras ao longo do dia. As análises foram feitas nos três turnos e as medianas obtidas foram comparadas. Nas duas metodologias pode-se observar uma boa estabilidade para os parâmetros RBC e HGB, que não demonstraram oscilações significativas ao longo do dia, ao contrário do CHCM, que demonstrou maior variação com o passar do tempo.

As amostras com valores de CHCM alterado demonstraram uma correlação significativa entre RBC e HGB quando comparamos a metodologia por impedância após 1 hora de banho a 37 °C e metodologia óptica (Figura 3), porém houve diferença significativa entre as medianas para esses parâmetros, verificado no teste de Wilcoxon. O parâmetro CHCM apresentou uma correlação fraca e inversamente proporcional, entretanto verificamos que não houve diferença significativa entre as medianas do CHCM no teste de Wilcoxon (Tabela 2).

Entre as amostras com valores espúrios de CHCM, as principais causas observadas que elevam o CHCM foram a presença de eritrócitos aglutinados, anemia falciforme, amostras de recém-nascidos (RN) e outras causas, que incluem leucemias, linfomas, tumores de órgãos sólidos, transplantes, infecções, hiperleucocitose, hipernatremia, lipemia e esferocitose. Pode-se observar que o protocolo de incubação a 37 °C seguido de repetição na metodologia por impedância obteve maior sucesso na correção do CHCM quando as amostras apresentavam aglutinação. Porém, nos demais grupos a metodologia óptica obteve mais sucesso na correção do CHCM (Tabela 3).

Discussão

A presença de interferentes na amostra tem sido associada a dificuldades na contagem de RBC, HGB e os índices hematimétricos derivados desses, bem como o CHCM (1). A principal causa que eleva os valores de CHCM e que

está bem descrita na literatura, é a presença de crioaglutininas, além disso, desordens na membrana dos eritrócitos, anemia falciforme e em recém-nascidos, também já foram descritos (11). Porém pode-se observar na rotina laboratorial o aumento dos valores de CHCM em casos que ainda não estão claros na literatura, como em pacientes acometidos por infecções virais, neoplasias, pacientes transplantados ou com desordens eletrolíticas, pacientes em uso de quimioterapia, imunossupressores ou em tratamento antirretroviral. Nesses casos há um estado transitório de CHCM alterado, em que não são observadas anormalidades nos eritrócitos ou outros interferentes analíticos (5). Uma tabela com possíveis causas de alteração nos valores de CHCM pode ser vista na publicação de Alban Godon *et al*, de 2012 (24).

A principal técnica que vem sendo empregada na tentativa de corrigir valores errôneos de CHCM obtidos de amostras com interferentes, é o banho-maria a 37 °C por uma hora, sugerido por Finland em 1945 (25). Entretanto, o uso do protocolo padrão do banho-maria nem sempre consegue corrigir a presença de interferentes e os índices hematimétricos calculados não são confiáveis, pois não podem ser considerados valores verdadeiros e não devem ser liberados no laudo. Recentemente o avanço da tecnologia e o uso de equipamentos automatizados para a realização dos hemogramas, permitiu que a metodologia óptica fosse estudada para substituir protocolo de incubação a 37 °C seguido de repetição na metodologia de impedância. No presente estudo a metodologia óptica demonstrou boa concordância com a metodologia por impedância quando comparadas em amostras sem alterações, de pacientes com valores dentro dos limites de referência. Esse achado possibilita seu uso como controle interno da metodologia e dos equipamentos analisadores em uso no laboratório e qualifica a metodologia como equivalente ao método padrão.

A metodologia óptica, utilizada no canal de reticulócitos, demonstrou também que pode ser utilizada na presença de certos interferentes e conseguimos elucidar em quais casos a nova metodologia pode ser aplicada. Com esse estudo foi possível observar que, de forma geral, as duas metodologias empregadas não demonstram diferenças significativas, porém quando estratificamos os grupos, a metodologia óptica corrigiu os valores de CHCM alterado nos grupos de amostras de pacientes com anemia falciforme e

RN. Esse achado pode ser justificado pelo aumento da densidade sanguínea causada pelos eritrócitos falcizados, que ao serem aquecidos, diminuem sua densidade e o valor de CHCM é corrigido. Em 1984 Embury *et al* demonstrou que há associação diretamente proporcional entre o CHCM e a densidade dos eritrócitos falcizados (26). Já Linderkamp *et al* em 1982 concluiu que os eritrócitos em RN são menos maleáveis e mais densos do que eritrócitos de adultos, gerando um aumento no CHCM (27).

Além disso, o grupo Outros, onde se encontram causas não tão bem descritas na literatura apresentou resultados sem diferença significativa da metodologia padrão, dessa forma podemos levar em consideração que o tempo de processamento da amostra é inferior na metodologia óptica, e que nesse caso poderíamos utilizar a nova metodologia na rotina laboratorial. A hipótese da densidade também se aplica aos pacientes desse grupo de estudos, pois hipernatremia, leucocitose e uso de alguns medicamentos podem causar essa mesma interferência nos valores de CHCM. Essa hipótese pode ser verificada utilizando o teste de osmolalidade, que reflete a concentração de substâncias presentes no sangue.

Diferentemente do esperado, o grupo de amostras com eritrócitos aglutinados demonstrou que o banho-maria por 1 hora ainda é a melhor opção já que o canal óptico aquece a amostra por apenas 1 minuto, sugere-se que em casos de amostras muito agregadas, manter a metodologia padrão.

Outros estudos foram realizados utilizando a metodologia óptica como forma de corrigir o CHCM, como La Goia que demonstrou que amostras com aglutinação tiveram correção da contagem de RBC por desagregação dos eritrócitos após o aquecimento, levando a correção do CHCM (28). Ferrero-Vacher demonstrou que o uso do canal de reticulócitos é importante nos casos de crioaglutininas, porém deve-se sempre prestar atenção aos *flags* reportados pelo aparelho como o de “RET Scattergram”, pois podem haver outros interferentes, como hemólise, e o resultado liberado mesmo pela metodologia óptica pode não ser confiável (29).

A análise da estabilidade demonstrou que os parâmetros RBC e HGB se mantêm constantes ao longo de um dia e podem ser dosados dentro desse período caso seja necessário, porém o CHCM perde estabilidade e seu resultado passa a não ser confiável com o passar do tempo. Isso pode ser

devido a esse parâmetro ser derivado do cálculo $CHCM = HGB / (RBC/VCM)$, e o aumento do VCM gerado pela absorção de líquido extracelular pelos eritrócitos resulta na redução do CHCM ao longo do tempo.

Outros estudos vêm sendo realizados sobre o canal de reticulócitos com o intuito de utilizá-lo como ferramenta de monitoramento de pacientes ou até mesmo no uso cotidiano do laboratório de análises clínicas, em casos específicos de anemias, anemias hemolíticas e crioaglutininas. Susane Franck *et al* mostrou potencial utilidade do canal de reticulócitos no diagnóstico de anemia por deficiência de ferro, onde foi possível observar correlação entre os parâmetros oferecidos por essa metodologia e a quantidade de hemoglobina nos reticulócitos, que é um indicador precoce de anemia por deficiência de ferro (30). Outro estudo que corrobora com o achado anterior, foi o de Mauro Butarello *et al*, mostrando que o uso do canal de reticulócitos pode ser utilizado como acompanhamento da terapia com administração de ferro (31). E ainda, Berda-Haddad *et al* observou que o uso do canal de reticulócitos para contagem de RBC é possível em casos de crioaglutinação, e para a dosagem de HGB em casos de interferência óptica.

O presente estudo apresentou como limitação o número amostral na classificação dos interferentes, sendo necessários estudos com número amostral maior e com outros tipos de interferentes para que se possa elucidar as aplicações do canal de reticulócitos na rotina laboratorial, não gerando prejuízo nos resultados e com alta sensibilidade e especificidade. A determinação de um ponto de corte no uso da metodologia óptica para as amostras aglutinadas seria de grande valor, pois desta forma poderíamos estabelecer para quais casos, a metodologia padrão ainda deve ser a escolhida na tentativa de corrigir o valor espúrio de CHCM. Além disso, mais testes que avaliam a densidade das amostras seriam úteis para correlacionar valores alterados de CHCM com outros interferentes que não a aglutinação, já que vários desses interferentes não estão bem descritos na literatura.

Conclusões

Foi possível observar que o canal de reticulócitos tem a capacidade de corrigir o valor de CHCM nos casos de anemia falciforme, para amostras de recém-nascidos e na presença de outros interferentes, porém o mesmo não

pode ser dito em relação as amostras aglutinadas, já que os testes não foram conclusivos. Nossos resultados não corroboram aos já apresentados em outras pesquisas, sendo assim, mais estudos são necessários para elucidar a aplicação da metodologia óptica na rotina laboratorial. Entretanto, o uso da metodologia óptica presente no canal de reticulócitos dá uma excelente oportunidade de melhoria na rotina laboratorial, otimizando o tempo de liberação de resultado e fornecendo um hemograma completo com todos os índices hematimétricos.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse envolvido no desenvolvimento do presente trabalho.

Suporte financeiro

Este trabalho teve apoio financeiro da empresa Sysmex.

Agradecimentos

Agradecimentos a Sysmex que apoiou a execução desse trabalho e aos autores envolvidos na execução do mesmo.

Tabelas

Tabela 1 Comparação entre os parâmetros realizada nas metodologias de impedância e óptica em amostras com valores normais de CHCM.

Parâmetros	Mediana (mín-máx)	p-valor
RBC-I	5,00 (3,83 - 6,31)	< 0,001
RBC-O	4,88 (3,82 - 6,30)	-
HGB-I	14,70 (11,70 - 18,10)	0,526
HGB-O	14,70 (11,60 - 20,00)	-
CHCM-I	34,10 (30,60 - 37,40)	0,652
CHCM-O	34,20 (30,40 - 38,20)	-

Teste de Wilcoxon

Tabela 2 Comparação entre os parâmetros, realizada nas metodologias impedância após banho-maria a 37 °C por uma hora e óptica em amostras com valores de CHCM alterados.

Parâmetros	Mediana (mín-máx)	p-valor
RBC-B	3,06 (1,11 – 5,69)	< 0,001
RBC-O	3,09 (1,10 – 5,70)	-
HGB-B	10,30 (4,80 – 20,40)	0,001
HGB-O	10,05 (4,00 – 19,00)	-
CHCM-B	37,25 (29,60 – 86,30)	0,811
CHCM-O	36,85 (29,60 – 90,10)	-

Teste de Wilcoxon

Tabela 3 Perfil de correção do CHCM de acordo com o interferente encontrado

	Banho n (%)	Óptico n (%)	p-valor
Aglutinação (n = 30)	24 (80)	9 (30)	< 0,001
Anemia Falciforme (n = 21)	3 (14,3)	18 (85,7)	0,001
RN (n = 14)	3 (21,4)	12 (85,7)	0,012
Outros (n = 55)	33 (60,0)	38 (69,1)	0,424
Todos (n = 120)	63 (52,5)	77 (64,2)	0,126

Teste de McNemar

Figuras

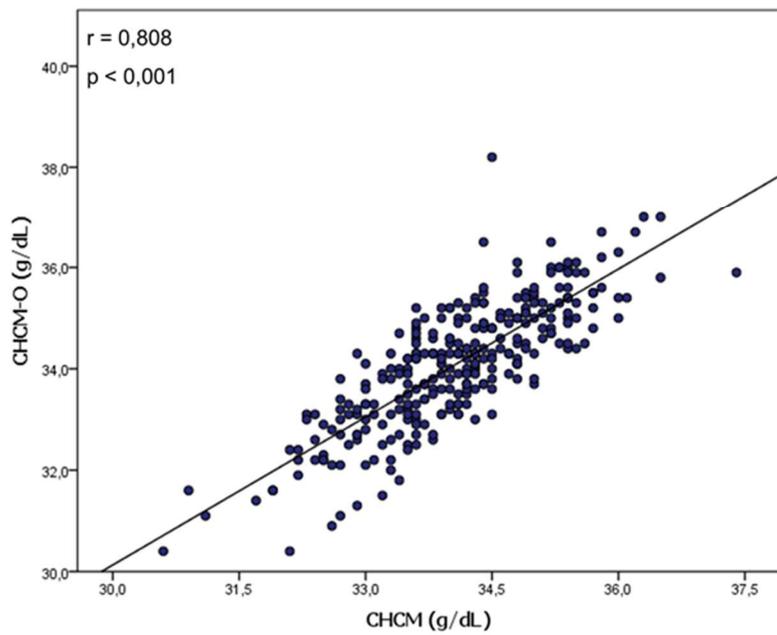
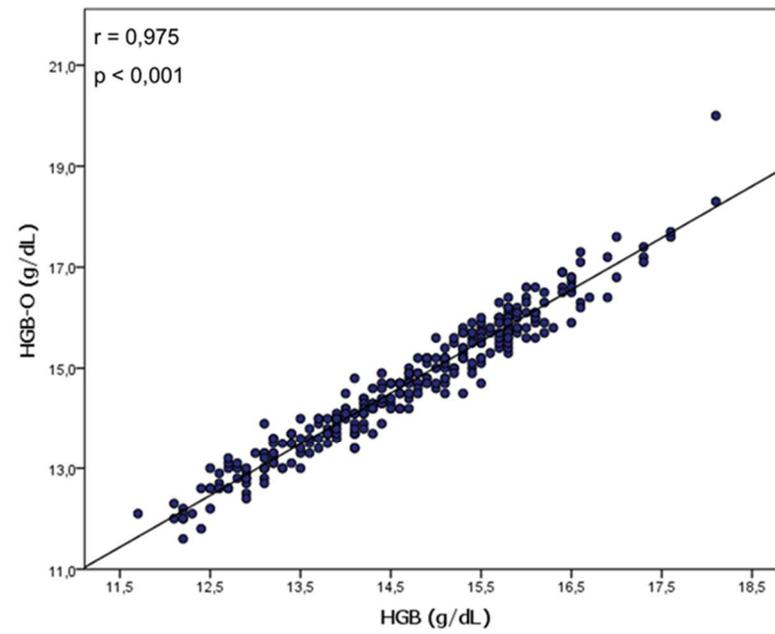
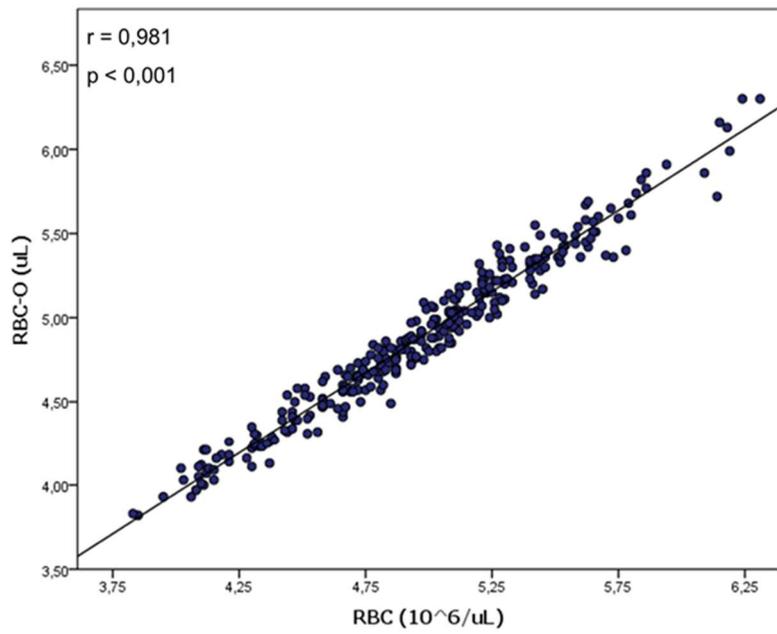


Figura 1 Correlação entre as metodologias impedância e óptica em amostras com CHCM normal.

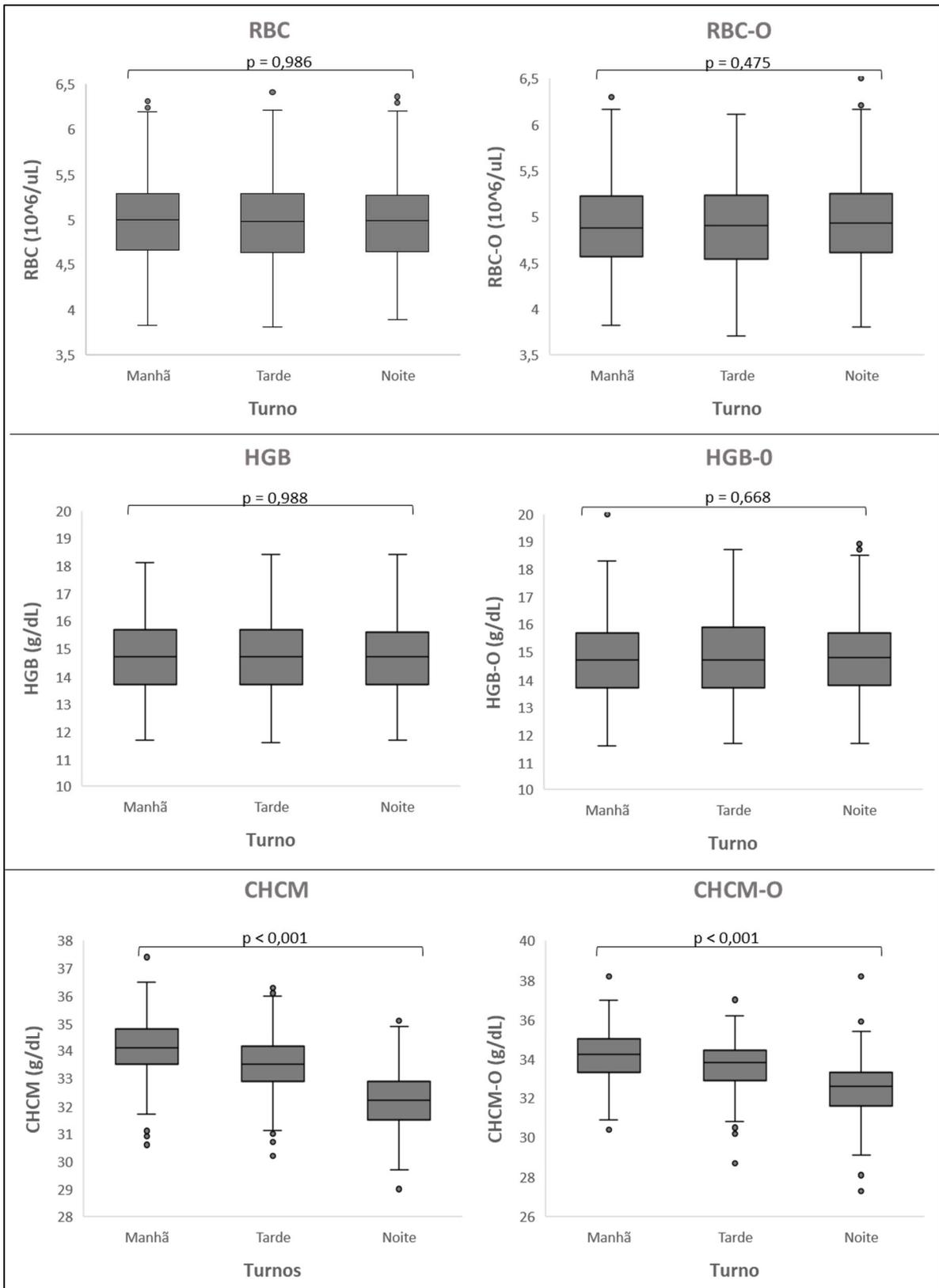


Figura 2 Representação da estabilidade dos parâmetros RBC, HGB e CHCM ao longo do dia na metodologia por impedância e óptica, realizado a partir do teste de Kruskal-wallis.

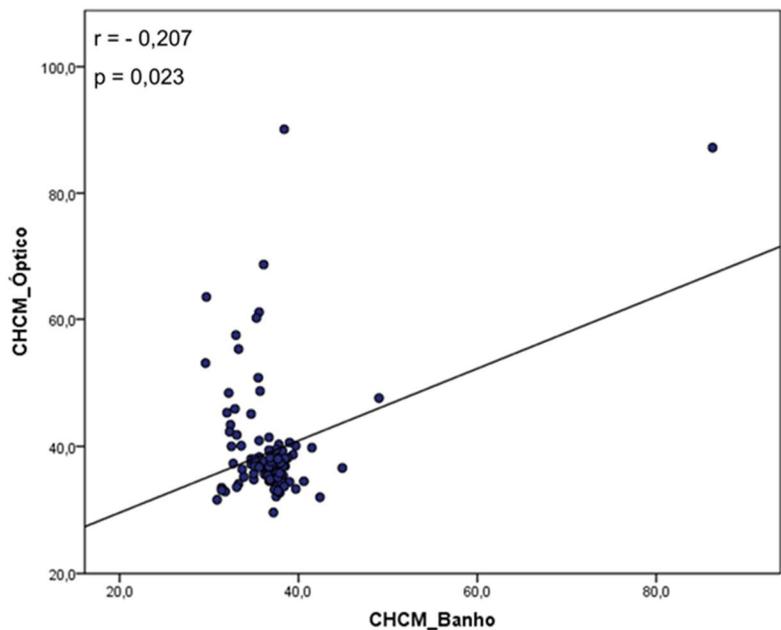
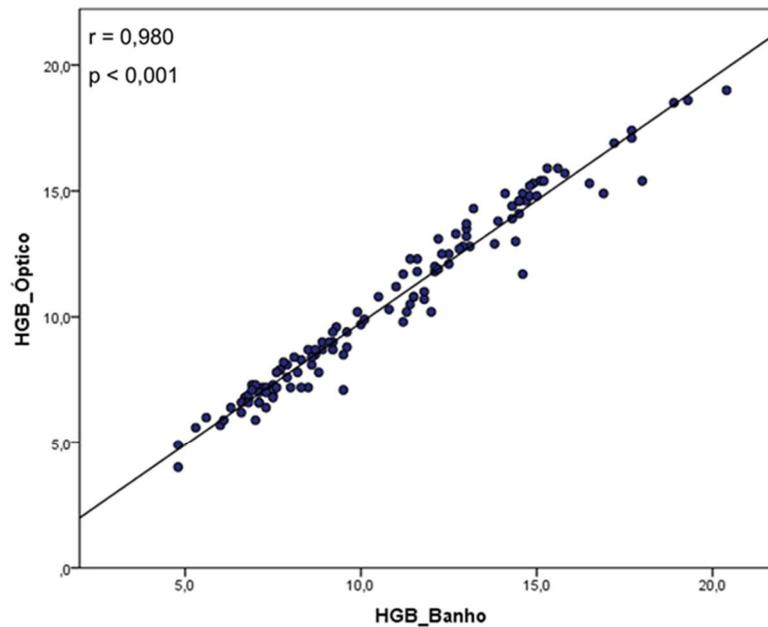
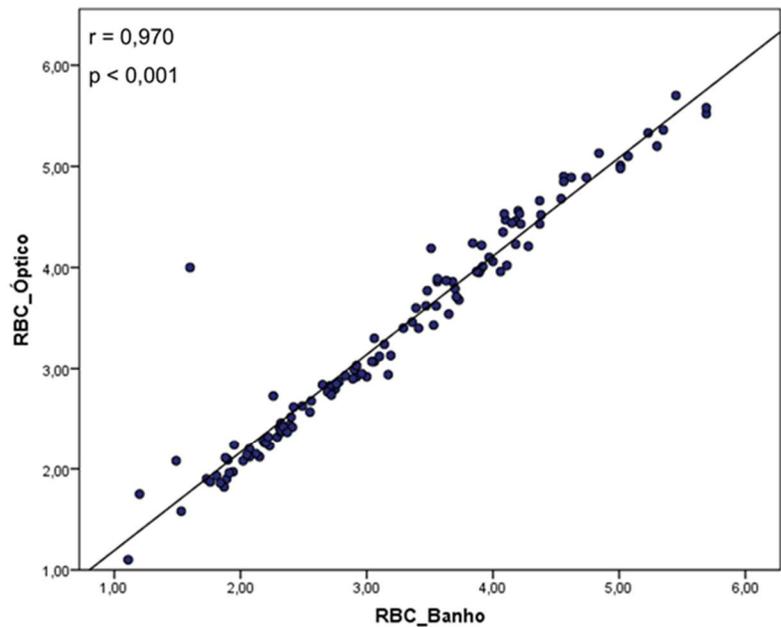


Figura 3 Comparação entre as metodologias impedância após banho-maria a 37 °C por uma hora e óptica, em amostras com CHCM alterado.

Referências

1. Oliveira RAG. Hemograma: Como fazer e interpretar. 2nd ed. São Paulo 2015.
2. Online LT. Complete Blood Count (CBC) 2015 February 10th 2020. Available from: <https://labtestsonline.org/tests/complete-blood-count-cbc>.
3. Ermens AA, et al. New erythrocyte and reticulocyte parameters on CELL-DYN Sapphire: analytical and preanalytical aspects. *Int J Lab Hematol*. 2012;34(3):274-82.
4. Zandecki M, et al. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *Int J Lab Hematol*. 2007;29(1):21-41.
5. Berda-Haddad Y, et al. Increased mean corpuscular haemoglobin concentration: artefact or pathological condition? *Int J Lab Hematol*. 2017;39(1):32-41.
6. Berentsen S e Tjonnfjord GE. Diagnosis and treatment of cold agglutinin mediated autoimmune hemolytic anemia. *Blood Rev*. 2012;26(3):107-15.
7. Glogowska E e Gallagher PG. Disorders of Erythrocyte Volume Homeostasis. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(0 1):85-91.
8. La Gioia A, et al. Short preheating at 41 degrees C leads to a red blood cells count comparable to that in RET channel of Sysmex analysers in samples showing cold agglutination. *J Clin Pathol*. 2018;71(8):729-34.
9. Costa BMB, et al. Interference of cold agglutinin autoantibodies in erythrogram interpretation: a case report and literature review. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2018;54(4).
10. Sumita NM, et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). Automação laboratorial: histórico, seleção, implantação e gestão.: Manole; 2018.
11. Failace R. Hemograma manual de interpretação. 6 ed ed. Porto Alegre 2015.
12. Godon A, et al. [Automated hematology analysers and spurious counts Part 3. Haemoglobin, red blood cells, cell count and indices, reticulocytes]. *Annales de Biologie Clinique*. 2012;70(2):155-68.
13. Finland M, et al. Cold agglutinins. I. occurrence of cold isohemagglutinins in various conditions. *The Journal of Clinical Investigation*. 1945;24(4):451-7.
14. Embury SH, et al. Concurrent sickle cell anemia and alpha-thalassemia. Effect on pathological properties of sickle erythrocytes. *The Journal of Clinical Investigation*. 1984;73(1):116-23.
15. Linderkamp O, et al. Deformability of density separated red blood cells in normal newborn infants and adults. *Pediatric Research*. 1982;11:964-8.
16. Goia AL. Eliminating or Minimizing the Effects of Cold Agglutinins on the Accuracy of Complete Blood Count Results. *Annals os Laboratory Medicine*. 2019;39(499-500).
17. Ferrero-Vacher C, et al. [Erythrocytic parameters Sysmex in a case of severe haemolysis]. *Biologie au Quotidien* 2015;73(6):729-32.
18. Franck S, et al. Potential utility of Ret-Y in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. *Clinical Chemistry*. 2004;50(7):1240-2.
19. Buttarello M, et al. The new reticulocyte parameter (RET-Y) of the Sysmex XE 2100: its use in the diagnosis and monitoring of posttreatment sideropenic anemia. *American Journal of Clinical Pathology*. 2004;121(4):489-95.

5. Considerações finais

Foi possível comparar os resultados obtidos das duas metodologias para os parâmetros RBC, HGB e CHCM em amostras de pacientes normais, e esta análise concluiu uma equivalência significativa entre os métodos.

Ainda, foram analisados os mesmos parâmetros em amostras de pacientes com CHCM alterado, e nesta análise demonstrou que a utilização da metodologia óptica se equivale a metodologia por impedância na presença de alguns interferentes, porém não pode ser utilizado em qualquer situação onde o valor de CHCM esteja alterado. Cada caso deve ser criteriosamente analisado a fim de verificar qual a causa mais provável que esteja gerando um valor alto de CHCM a fim de utilizar a melhor metodologia para tentar corrigi-lo. A metodologia foi validada com métodos estatísticos, porém é necessário que o n amostral seja expandido com o intuito de avaliar melhor os diferentes interferentes que podem estar presentes e que elevam o valor de CHCM.

E além disso, a estabilidade foi verificada e pode-se observar que o tempo de processamento da amostra vai interferir no resultado de CHCM, pois foi o único que apresentou diferença significativa entre as medianas avaliadas nos três turnos. Dessa forma, o tempo de processamento da amostra é de grande importância e deve ser realizado o quanto antes, a fim de reduzir erros laboratoriais e liberação de valores errôneos.

Esse trabalho teve grande contribuição para a prática profissional, já que a validação de metodologias está presente na rotina laboratorial e sua realização segue padrões estabelecidos em normativas nacionais. Além disso, a redução do tempo de liberação dos resultados tem grande impacto no seguimento terapêutico do paciente, no auxílio de diagnóstico e acompanhamento medicamentoso. Sendo assim, a validação de metodologias que melhorem o fluxo de trabalho, reduzam o tempo de processamento e liberação de resultados e aumentem a sensibilidade e a especificidade das análises, deve estar sempre em mente da equipe de saúde envolvida.

Referências Bibliográficas

1. Oliveira RAG. Hemograma: Como fazer e interpretar. 2nd ed. São Paulo 2015.
2. Ermens AA, Hoffmann JJ, Krockenberger M, Van Wijk EM. New erythrocyte and reticulocyte parameters on CELL-DYN Sapphire: analytical and preanalytical aspects. *Int J Lab Hematol.* 2012;34(3):274-82.
3. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *Int J Lab Hematol.* 2007;29(1):21-41.
4. La Gioia A, Fumi M, Fiorini F, Pezzati P, Balboni F, Bombara M, et al. Short preheating at 41 degrees C leads to a red blood cells count comparable to that in RET channel of Sysmex analysers in samples showing cold agglutination. *J Clin Pathol.* 2018;71(8):729-34.
5. Berda-Haddad Y, Faure C, Boubaya M, Arpin M, Cointe S, Frankel D, et al. Increased mean corpuscular haemoglobin concentration: artefact or pathological condition? *Int J Lab Hematol.* 2017;39(1):32-41.
6. Berentsen S, Tjonnfjord GE. Diagnosis and treatment of cold agglutinin mediated autoimmune hemolytic anemia. *Blood Rev.* 2012;26(3):107-15.
7. Glogowska E, Gallagher PG. Disorders of Erythrocyte Volume Homeostasis. *Int J Lab Hematol.* 2015;37(0 1):85-91.
8. Costa BMB, Vellés MC, Viana MMFB, Rebelo CIM. Interference of cold agglutinin autoantibodies in erythrogram interpretation: a case report and literature review. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2018;54(4).
9. Systems SX-SAH. Flagging Interpretaton Guide 2017.
10. Online LT. Complete Blood Count (CBC) 2015 February 10th 2020. Available from: <https://labtestsonline.org/tests/complete-blood-count-cbc>.
11. Failace R. Hemograma manual de interpretação. 6 ed ed. Porto Alegre 2015.
12. Society CC. Complete blood count (CBC) February 10th 2020. Available from: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/diagnosis-and-treatment/tests-and-procedures/complete-blood-count-cbc/?region=on>.
13. Failace R, Pranke P. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de hemogramas através de contadores eletrônicos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2004;3(26):156-66.
14. Matsuno K, Ishizuka S. New technology of automated blood cell differential counting. *Rinsho Byori.* 1998;46(4):361-6.
15. Gulati GL, Alomari M, Kocher W, Schwarting R. Criteria for blood smear review. *Laboratory Medicine.* 2002;33(5):374-7.
16. Bacall NS. Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2009;31(4).
17. Dondelinger RM. Hematology Analyzers. *Biomedical Instrumentation & Technology.* 2009;43(4):300-4.
18. Caribe SAL. Sysmex Especificações Sysmex Lighting the way with diagnosis 2012 [Available from: <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Hematology/XNSeries/Pages/XN-9000-Hematology-Analyzer.aspx>].
19. Roccaforte V, Sciarini F, Proserpio V, Buonocore R, Zavaroni EM, Burati S, et al. Use of the reticulocyte channel warmed to 41°C of the XN-9000 analyzer in samples with the presence of cold agglutinins. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy.* 2020.
20. Caribe SAL. Sysmex Tecnologia e Parâmetros Clínicos Avançados Sysmex Lighting the way with diagnosis 2012 [Available from: <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Hematology/XNSeries/Pages/XN-9000-Hematology-Analyzer.aspx>].

21. Oliveira RAGd. Hemograma Como fazer e interpretar. 2 ed. São Paulo 2015.
22. Araujo MIFd, Lima MAMd, Assis MMLd, Almeida MMCd. Research of crioagglutinins in old patients of the city of Patos, Paraíba. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 2018.
23. Sumita NM, Galoro CAo, Shcolnik W, Ferreira CEoS, Dias CMM, Campana GA, et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). Automação laboratorial: histórico, seleção, implantação e gestão.: Manole; 2018.
24. Godon A, Genevieve F, Marteau-Tessier A, Zandecki M. [Automated hematology analysers and spurious counts Part 3. Haemoglobin, red blood cells, cell count and indices, reticulocytes]. Annales de Biologie Clinique. 2012;70(2):155-68.
25. Finland M, Peterson OL, Allen HE, Samper BA, Barnes MW, Stone MB. Cold agglutinins. I. occurrence of cold isohemagglutinins in various conditions. The Journal of Clinical Investigation. 1945;24(4):451-7.
26. Embury SH, Clark MR, Monroy G, Mohandas N. Concurrent sickle cell anemia and alpha-thalassemia. Effect on pathological properties of sickle erythrocytes. The Journal of Clinical Investigation. 1984;73(1):116-23.
27. Linderkamp O, Wu PYK, Meiselman HJ. Deformability of density separated red blood cells in normal newborn infants and adults. Pediatric Research. 1982;11:964-8.
28. Goia AL. Eliminating or Minimizing the Effects of Cold Agglutinins on the Accuracy of Complete Blood Count Results. Annals of Laboratory Medicine. 2019;39(499-500).
29. Ferrero-Vacher C, Senlis J-É, Loustaunau D, Aquaronne D, Jeandel P-Y, Sudaka I. [Erythrocytic parameters Sysmex in a case of severe haemolysis]. Biologie au Quotidien 2015;73(6):729-32.
30. Franck S, Linssen J, Messinger M, Thomas L. Potential utility of Ret-Y in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. Clinical Chemistry. 2004;50(7):1240-2.
31. Buttarello M, Temporin V, Ceravol R, Farina G, Bulian P. The new reticulocyte parameter (RET-Y) of the Sysmex XE 2100: its use in the diagnosis and monitoring of posttreatment sideropenic anemia. American Journal of Clinical Pathology. 2004;121(4):489-95.

Anexos

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL
HCPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ÓPTICA PARA CONTAGEM DE ERITRÓCITOS E DOSAGEM DE HEMOGLOBINA NO ANALISADOR SYSMEX-XN

Pesquisador: Carine Ghem

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 12894919.6.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.923.250

Apresentação do Projeto:

Resultados errôneos de RBC ou hemoglobina podem ser causados por alguma anormalidade dos eritrócitos ou por interferentes do plasma (lipemia, icterícia, hemólise, aglutinação dos eritrócitos), e assim, gerar um aumento espúrio do CHCM. Eritrócitos anormais podem estar relacionados a presença de crioaglutininas na amostra, que causam a aglutinação dos eritrócitos em temperaturas menores que 37°C e, geralmente, a presença desses autoanticorpos são associados clinicamente à anemia hemolítica autoimune. Além das crioaglutininas, desordens que desregulam o volume eritrocitário, tanto hereditárias quanto adquiridas (ex: esferocitose, anemia falciforme) também levam a um aumento do CHCM. Portanto, na rotina laboratorial, a elevação do índice CHCM deve ser avaliada cuidadosamente, a fim de determinar se a alteração do CHCM está relacionada a uma patologia, ou apenas a algum artefato da amostra. Na rotina laboratorial, a correção da contagem dos eritrócitos, bem como a dos índices eritrocitários calculados indiretamente como o CHCM, pode ser revertida através do pré-aquecimento do sangue, porém em situações em que o préaquecimento da amostra não é capaz de reverter o aumento do CHCM, o procedimento indicado é a realização do microhematócrito por microcentrifugação, e liberação de um hemograma sem os índices hematimétricos. Sendo assim, nosso

objetivo é comparar as metodologias para contagem de eritrócitos- impedância e óptico, para fins

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTOALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

37

Continuação do Parecer: 3.923.250

de utilização do canal óptico presente no equipamento Sysmex XN como forma correção da contagem dos RBCs nos casos de pacientes que apresentam o índice de CHCM acima do ponto de corte. A implementação da metodologia da contagem de eritrócitos através do canal óptico diminuiria o tempo estimado para liberação do hemograma.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Validar a metodologia de citometria de fluxo presente no canal de contagem de reticulócitos presente no equipamento Sysmex XN como forma de corrigir a elevação CHCM das amostras que apresentem o índice acima de 37,5 g/dL em determinadas situações.

Objetivos específicos

- Comparar os resultados de eritrócitos, hemoglobina e CHCM medidos/calculados com base na metodologia de citometria de fluxo em amostras de indivíduos com parâmetros hematológicos normais (controle interno de qualidade), em comparação às metodologias empregadas atualmente na rotina (impedância elétrica e espectrofotometria).
- Comparar os resultados de eritrócitos, hemoglobina e CHCM medidos/calculados com base na metodologia de citometria de fluxo dentro de amostras com CHCM elevado ($\geq 37,5$ g/dL), em comparação às metodologias empregadas atualmente na rotina (impedância elétrica e espectrofotometria).
- Rastrear através da análise do esfregaço de sangue e a centrifugação da amostra em quais situações, patologias ou interferentes da amostra, a utilização da metodologia alternativa, citometria de fluxo, corrige o valor do CHCM.
- Observar a estabilidade dos parâmetros medidos no equipamento Sysmex XN ao longo do dia em amostras do controle de qualidade interno, com índices hematimétricos normais, empregando as metodologias de citometria de fluxo e as metodologias atualmente na rotina (impedância elétrica e espectrofotometria).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O presente projeto envolve riscos mínimos relacionados a quebra de confidencialidade dos dados obtidos, portanto os pesquisadores assinarão o Termo de Compromisso de Utilização de Dados,

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL
HCPA



Continuação do Parecer: 3.923.250

no qual se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes, e o Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas.

Benefícios:

Espera-se que com a referida validação avaliar o desempenho e confiabilidade dos analisadores hematológicos, para que futuramente possam ser empregados na rotina do laboratório, como uma ferramenta ágil e segura para a realização do hemograma nos casos de pacientes com CHCM elevado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de emenda ao projeto com a seguinte justificativa:

Para dar andamento ao projeto, a autora Luana Moro foi substituída pela Jennifer Tassoni Staehler, graduada em Farmácia, Residente em Análises Clínicas pelo programa de Residência Integrada Multiprofissional e em Área Profissional da Saúde, que assumiu o projeto como Trabalho de Conclusão de Residência. Além disso, um objetivo específico foi acrescentado com o intuito de complementar e demonstrar de forma estatística, dados de parâmetros que são coletados durante a rotina, como controle de qualidade interno. A

metodologia não sofre alterações com esse acréscimo nos objetivos, pois os dados obtidos são oriundos de amostras que estão na rotina do laboratório e serão analisados estatisticamente para que se possa demonstrar a estabilidade dos parâmetros medidos pelo Sysmex-XN ao longo do dia. Os resultados serão demonstrados através de regressão linear obtendo-se o coeficiente de correlação intraclasse, pois este demonstra mais fidedignamente a concordância nos resultados obtidos através das duas metodologias que serão avaliadas. Demais alterações visam aprimorar o projeto, como a especificação do tipo de estudo, atualização do cronograma e o acréscimo dos possíveis fatores de risco envolvendo os pacientes participantes do estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta os documentos pertinentes para a avaliação da emenda.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para a emenda no parecer 3.796.738 foram adequadamente respondidas

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL ;
HCPA**



Continuação do Parecer: 3.923.250

pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 10/03/2020. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda E1 aprovada.

Documento aprovado:

Projeto versão de 13/12/2019 (ProjetoSystemxEmenda.docx)

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1490224_E1.pdf	10/03/2020 09:01:57		Aceito
Outros	RespostaaoCEP.docx	10/02/2020 16:57:23	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Declaração de concordância	Declaracao_de_Concordancia.pdf	27/01/2020 11:40:57	Eva Mônica Dias Gonçalves	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	JustificativaPlataformaBrasil.pdf	24/01/2020 15:48:34	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	TermodeCompromissoParaUtilizacaodeMaterialBiologico_Jennifer.pdf	24/01/2020 15:43:55	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	TermodeCompromissoParaUtilizacaodeMaterialBiologico_luri.pdf	24/01/2020 15:43:45	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	TermodeCompromissoParaUtilizacaodeMaterialBiologico_Gabriel.pdf	24/01/2020 15:43:36	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	TermodeCompromissoParaUtilizacaodeMaterialBiologico_Carine.pdf	24/01/2020 15:43:23	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	TermodeCompromissoParaUtilizacaodeDadosInstitucionais_Jennifer.pdf	24/01/2020 15:43:12	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	TermodeCompromissoParaUtilizacaodeDadosInstitucionais_luri.pdf	24/01/2020 15:42:48	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	TermodeCompromissoParaUtilizacaodeDadosInstitucionais_Gabriel.pdf	24/01/2020 15:42:35	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	TermodeCompromissoParaUtilizacaodeDadosInstitucionais_Carine.pdf	24/01/2020 15:42:26	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	TermodeCompromissoParaUtilizacaodeDados_Jennifer.pdf	24/01/2020 15:42:14	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTOALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL ;
HCPA**



Continuação do Parecer: 3.923.250

Outros	TermodeCompromissoParaUtilizacaode Dados_luri.pdf	24/01/2020 15:41:58	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	TermodeCompromissoParaUtilizacaode Dados_Gabriel.pdf	24/01/2020 15:41:44	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	TermodeCompromissoParaUtilizacaode Dados_Carine.pdf	24/01/2020 15:41:34	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	JustificativaPlataformaBrasil.pdf	24/01/2020 15:40:55	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	DelegacaodeFuncoes_Atualizado.pdf	24/01/2020 15:39:55	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	CartaJustificativa.docx	13/12/2019 14:45:07	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoSysmexEmenda.docx	13/12/2019 14:44:15	Jennifer Tassoni Staehler	Aceito
Outros	RespostaPendenciaCEP.docx	30/05/2019 13:36:28	Carine Ghem	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	02/05/2019 10:24:39	Carine Ghem	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoSysmexCHCM.docx	30/04/2019 12:20:59	Carine Ghem	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 18 de Março de 2020

**Assinado por:
Têmis Maria Félix
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br



A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [RBAC], criada em 1969, é o órgão oficial de divulgação científica da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas [SBAC]. A RBAC tem circulação trimestral e seus artigos estão indexados no LILACS [Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde].

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [RBAC] é publicada em português e é dedicada à divulgação de pesquisa científica de qualidade metodológica reconhecida, relacionada às várias áreas das análises clínicas e da patologia clínica veterinária.

Ao submeter o original do manuscrito, os autores assumem a responsabilidade do manuscrito não ter sido previamente publicado e nem estar sendo simultaneamente analisado por outro periódico, quer na íntegra ou parcialmente, excetuando-se resumos ou relatórios preliminares publicados em anais de reuniões científicas. Todos os autores deverão assinar e encaminhar a Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais, assumindo formalmente a autoria pelo manuscrito e oficializando a cessão do copyright. A declaração assinada deverá ser remetida sob a forma de documento em ".pdf". As opiniões, asserções e conclusões emitidas nos manuscritos, bem como a veracidade das informações e citações bibliográficas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

Os autores deverão declarar no manuscrito qualquer potencial conflito de interesse, incluindo aqueles de natureza política e financeira. O documento formal de interesse é a Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais mencionada acima.

Os autores deverão declarar todas as fontes de financiamento ou suporte público ou privado recebidas para a realização do estudo. No caso de estudos realizados sem recursos financeiros, da mesma forma, os autores deverão declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

Quando a investigação envolver seres humanos, a publicação do manuscrito estará condicionada ao cumprimento irrestrito das diretrizes normativas do Conselho Nacional de Saúde [CNS] e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa [CONEP]. A declaração de que os procedimentos seguidos nos experimentos estão em consonância com os princípios éticos aceitos pelas normativas nacional (Resolução CNS 466/2012) e internacional (Declaração de Helsinki/ World Medical Association) deverá ser explicitamente firmada no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética em Pesquisa [CEP] da instituição responsável pela investigação deverá ser também aí declarado. Uma cópia em ".pdf" da autorização do CEP deverá ser encaminhada juntamente com o manuscrito. Quando se tratar de pesquisa com animais, as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal [CONCEA] e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal [COBEA], bem como do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Institute for Laboratory Animal Research/ National Academy of Science - USA] deverão ser incondicionalmente respeitadas e seu cumprimento também deverá ser declarado, explicitamente, no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais [CEUA] da instituição responsável pela pesquisa deverá ser igualmente declarado e uma cópia em ".pdf" da autorização do CEUA deverá ser, da mesma forma, encaminhada com o manuscrito. Quando os autores forem filiados a instituições não brasileiras, estes deverão declarar no manuscrito o cumprimento de diretrizes normativas e remeter documentação local de mesmo efeito legal.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial de Saúde [OMS], do International Committee of Medical Journal Editor [ICMJE] e do Workshop ICTRP. Desse modo, somente serão aceitos para publicação os artigos de ensaios clínico-laboratoriais que tenham recebido um número de identificação em um dos registros de ensaios clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE. Entidades que registram ensaios clínicos segundo os critérios do ICMJE são: Australian New Zealand Clinical Trials Registry [ANZCTR], International Standard Randomised Controlled Trail Number [SRCTN], Netherlands Trial Register [NTR], UMIN Clinical Trials Registry [UMIN-CTR], WHO International Clinical Trials Registry Platform [ICTRP]. No entanto, o número de identificação obtido no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC (<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>) do Ministério da Saúde [DECIT/MS], Organização Panamericana de Saúde [OPAS] e Fundação Oswaldo Cruz [Fiocruz]

é igualmente aceito pela RBAC. O número de identificação/ identificador primário deverá ser declarado ao final da seção Material e Métodos.

Apenas serão recebidos manuscritos que estejam rigorosamente de acordo com as normas aqui especificadas. Os manuscritos serão avaliados por pareceristas/ revisores indicados pelo Conselho Editorial e/ou, eventualmente, pelos autores. Quando indicados pelos autores, deverá ser informado nome completo dos pareceristas/ revisores, e-mail e instituição de origem. O Conselho Editorial se reserva o direito, no entanto, de acatar ou não a sugestão de pareceristas/ revisores por parte dos autores. A aceitação dos manuscritos será feita em função da originalidade, importância e contribuição científica para o desenvolvimento da área. Manuscritos aprovados poderão sofrer alterações de ordem editorial, desde que não alterem o mérito do trabalho. Manuscritos recusados pelos pareceristas/ revisores serão informados imediatamente aos autores.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* está estruturada em 15 seções ou áreas temáticas, cuja indicação deverá ser feita pelos autores, no momento da submissão do manuscrito, sendo elas:

1. Bacteriologia Clínica
2. Virologia Clínica
3. Micologia Clínica
4. Parasitologia Clínica
5. Imunologia Clínica
6. Bioquímica Clínica e Biologia Molecular
7. Hematologia Clínica e Imunohematologia
8. Citologia Clínica e Anatomia Patológica
9. Boas Práticas de Laboratório Clínico e Biossegurança
10. Gestão e Controle da Qualidade no Laboratório Clínico
11. Bioética e Ética em Pesquisa
12. História da Saúde e Ensino das Análises Clínicas
13. Microbiologia de Alimentos
14. Patologia Clínica Veterinária/ Medicina Veterinária Laboratorial
15. Toxicologia Clínica e Biologia Forense

Os manuscritos poderão ser submetidos dentro das categoriais de comunicação científica designadas abaixo:

ARTIGOS ORIGINAIS: trabalhos nos quais são informados os resultados obtidos em pesquisas de natureza empírica ou experimental original, cujos resultados possam ser replicados e/ou generalizados. Deverão atender aos princípios de objetividade e clareza da questão norteadora. Os artigos originais deverão ser estruturados de maneira a conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 250 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

ARTIGOS DE REVISÃO: trabalhos com avaliações críticas e sistematizadas da literatura sobre um determinado assunto que deverá dar ao leitor uma cobertura geral acerca do tema apresentado. Os artigos de revisão deverão conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract não estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), texto ordenado (títulos e subtítulos), opiniões e conclusões (quando couber) e referências bibliográficas (até 30 referências). O trabalho não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências. Estes trabalhos são escritos a convite do editor.

ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO: trabalhos descritivos e interpretativos com base em literatura recente sobre o estado atual de determinado assunto. Os critérios técnicos que deverão ser utilizados são os mesmos definidos para os Artigos de Revisão. Estes trabalhos são também escritos a convite do editor.

COMUNICAÇÃO BREVE: trabalhos originais cuja relevância para o conhecimento de determinado tema justifica a apresentação científica de dados iniciais de pequenas séries ou dados parciais de ensaios clínico-laboratoriais. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

RELATO DE CASO: trabalhos com descrição detalhada e análise crítica de casos clínico-laboratoriais atípicos que, pela sua raridade na literatura ou apresentação não usual, merecem uma divulgação e discussão científica. Os relatos de casos deverão conter: título (até 200 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract com contexto e relato contendo descrição, discussão e conclusão (até 200 palavras), introdução, apresentação e relato do caso, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

NOTA TÉCNICA: Descrição/ validação de instrumentos, métodos e técnicas. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 200 palavras), introdução, metodologia e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto ordenado (títulos e subtítulos) não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

RESENHA: Revisão crítica de obra recém publicada (até 3 anos), orientando o leitor quanto a suas características e usos potenciais. É fundamental que não se trate apenas de um sumário ou revisão dos capítulos da obra, mas efetivamente uma crítica. Este tipo de contribuição está limitado a 6 páginas, incluindo todos os seus elementos. Não há resumo/ *abstract*.

IMAGENS EM ANÁLISES CLÍNICAS: máximo de duas figuras com qualidade de 300 dpi gravadas em ".jpg" ou ".tif" e até 3 autores e três referências que não deverão ser citadas no texto. As imagens deverão conter título descritivo. O texto deverá conter um máximo de 300 palavras com ênfase na caracterização das figuras. Agradecimentos não deverão ser declarados.

CARTA AO EDITOR: correspondências de conteúdo científico com comentários, discussões ou críticas a artigos recentes (dois números anteriores) publicados na *Revista Brasileira de Análises Clínicas* ou ainda com relatos de pesquisas originais, achados técnico-científicos significativos, opiniões qualificadas sobre um tema específico das análises clínicas, bem como menções ou obituários de personalidades da área da saúde e análises clínicas onde deverá ser destacado seu perfil científico e sua contribuição acadêmica e profissional. Os autores de artigos originais citados por terceiros serão convidados a responder aos comentários e críticas a eles dirigidos. Nesta categoria, o texto tem formato livre, mas não deverá exceder 500 palavras e 5 referências.

EDITORIAIS: escritos a convite do editor, sob tema específico, mas considerando a área de enfoque da *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. Deverão conter um máximo de 2000 palavras e até 10 referências bibliográficas. Não serão aceitos editoriais enviados espontaneamente.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* avalia manuscritos para publicação em português e inglês. Manuscritos em português devem estar em consonância com a norma culta. A submissão de manuscritos em inglês é enfaticamente estimulada pelo Conselho Editorial. Quando neste idioma, recomenda-se a revisão por profissional que tenha o inglês como primeira língua e que, preferencialmente, esteja familiarizado com a área do trabalho. O Conselho Editorial, caso considere necessário, poderá enviar os manuscritos submetidos em inglês para um revisor do idioma, repassando os custos aos autores, após a autorização expressa dos mesmos. em inglês para um revisor do idioma, repassando os custos aos autores, após a autorização expressa dos mesmos

A estrutura geral do manuscrito deverá acompanhar a normalização técnica conforme o quadro abaixo.

ESTRUTURA DOS ARTIGOS	
Português	Inglês
Título Completo <i>Incluir versão em Inglês</i>	Complete Title Incluir versão em Português
Título Corrido <i>Incluir versão em Inglês</i>	Running Title Incluir versão em Português
Autores	Authors
Resumo <i>Incluir versão em Inglês</i>	Summary Incluir versão em Português
Palavras-Chaves <i>Incluir versão em Inglês</i>	Keywords Incluir versão em Português
Introdução	Introduction
Material e Métodos	Material and Methods
Ética	Ethics
Resultados	Results
Discussão	Discussion
Conclusão	Conclusion
Conflito de interesse	Conflicts of Interests
Suporte Financeiro	Funding Sources
Agradecimentos	Acknowledgements
Referências	References

TÍTULO COMPLETO: Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho. Recomenda-se iniciar pelo termo que representa o aspecto mais relevante da pesquisa com os demais termos em ordem decrescente de importância. O título não deverá conter nenhuma abreviatura e os nomes das espécies ou palavras em latim deverão vir em letras minúsculas (excetuando-se, quando for o caso, a primeira letra da palavra) e em itálico. **TÍTULO**

CORRIDO: Deverá ser resumido e conter a ideia central do trabalho.

AUTORES: Os nomes completos dos autores por extenso, graus acadêmicos e filiação institucional deverão ser mencionados. O nome completo, endereço profissional, telefone e e-mail do autor responsável pelo manuscrito deverá ser especificado.

RESUMO: Deverá ser redigido de forma impessoal, bem como ser conciso e claro, pondo em relevo, de forma precisa, os fatos de maior importância encontrados e as conclusões obtidas. Deverá ser elaborado ainda de forma estruturada, contendo introdução, objetivos, material e métodos, resultados, discussão e conclusões. Referências não deverão ser citadas e o emprego de acrônimos e abreviaturas deverá ser limitado.

PALAVRAS-CHAVE: Deverão ser indicados termos que permitam a identificação do assunto tratado no trabalho. As palavras-chaves deverão ser extraídas do vocabulário DeCS [Descritores em Ciências da Saúde], elaborado pela Bireme, e/ou MeSH [Medical Subject Headings], elaborado pelo NLM [National Library of Medicine]. Os vocabulários DeCS (<http://decs.bvs.br/>) e MeSH (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>) deverão ser consultados, pois nenhuma outra palavra-chave será aceita.

INTRODUÇÃO: Deverá apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto. Nesta seção, as citações deverão ser restringidas ao mínimo necessário. A introdução não deverá incluir ainda dados ou conclusões do trabalho em referência. O último parágrafo deverá expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do resumo.

MATERIAL E MÉTODOS: Deverão ser apresentados de forma breve, porém suficiente para possibilitar a reprodução e replicação do trabalho. Nesta seção, deverão ser informados o desenho experimental e o material envolvido, bem como deverá ser feita a descrição dos métodos utilizados. Métodos já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referidos apenas por citação. Fontes de reagentes e equipamentos (empresa, cidade, estado e país) deverão ser mencionados. Nomes que são marcas registradas deverão ser também, claramente, indicados. Para melhor leitura e compreensão, subtítulos poderão ser estabelecidos.

ÉTICA: Nesta seção, deverá ser declarado, textualmente, o cumprimento da legislação, quando estudos com seres humanos ou animais forem procedidos. Deverá ser mencionado também a aprovação do Comitê de Ética correspondente da instituição a qual pertencem os autores responsáveis pelos experimentos, inclusive, informando, claramente, o número do parecer. O Corpo Editorial da Revista poderá recusar artigos que não cumpram rigorosamente os preceitos éticos da pesquisa.

RESULTADOS: Deverão ser apresentados em sequência lógica e com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e acompanhados de gráficos, tabelas, quadros e ilustrações. Os dados constantes nesses elementos gráficos, no entanto, não deverão ser repetidos integralmente no texto, evitando-se, desse modo, superposições. Apenas as informações mais relevantes deverão ser transcritas e enfatizadas.

DISCUSSÃO: Deverá ficar restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, procurando, sempre que possível, uma correlação com a literatura da área. Não deverá ser incluída uma revisão geral sobre o assunto. A repetição de resultados ou informações já apresentadas em outras seções, bem como especulações que não encontram justificativa para os dados obtidos deverão ser evitadas.

CONCLUSÕES: Deverão ser concisas, fundamentadas nos resultados e na discussão, contendo deduções lógicas e correspondentes aos objetivos propostos. Em alguns casos, poderá ser incluída no item discussão, não havendo necessidade de repeti-la em item a parte.

CONFLITOS DE INTERESSE: Deverá ser informada, de maneira explícita, por todos os autores, a existência ou não de conflitos de interesse que podem derivar do trabalho. Não havendo conflitos de interesse, deverá ser escrito "Não há conflitos de interesse".

SUPORTE FINANCEIRO: Deverão ser informados todos os tipos de apoio, fomento ou financiamento obtidos para a realização do projeto de pesquisa.

AGRADECIMENTOS: Deverão ser curtos, concisos e restritos àquelas pessoas e/ou instituições que colaboraram com auxílio técnico e/ou recursos. No caso de órgãos de fomento, não deverão ser utilizadas siglas.

TABELAS: O título deverá ser breve e descritivo, apresentando de maneira precisa seu conteúdo e o contexto (ou amostra) a partir do qual a informação foi obtida. Deverá estar ainda inserido na parte superior da ilustração e ser precedido pela palavra "Tabela", seguida por um número identificador em algarismos arábicos. A numeração das tabelas deverá ser feita consecutivamente, a partir da ordem de citação no texto. Serão permitidas notas explicativas de rodapé (legendas), indicadas por asteriscos e dispostas ao final da tabela. Para notas

de rodapé, deverá ser utilizado algarismos romanos. As tabelas deverão ser elaboradas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e em sua parte inferior e sem linhas verticais. Não deverão ser utilizadas também linhas horizontais internas. Os dados das tabelas deverão ser digitados em tamanho 10 e com minúsculas, excetuando-se as letras do início das palavras e as siglas. Nas tabelas, deverá ser empregado espaçamento entrelinhas 1,5, sem qualquer forma de tabulação ou recuos de parágrafos. O comprimento da tabela não deverá exceder 55 linhas, incluindo título, e apresentar largura máxima de 17cm. Os dados apresentados em tabelas não deverão ser repetidos em gráficos. As tabelas deverão ser compostas em programa Word ou MS-Excel e enviadas em arquivo separado. Deverá ser evitado um número excessivo de tabelas.

FIGURAS: Todas as ilustrações que não se enquadram no conceito de tabela são consideradas figuras, portanto: quadros, gráficos, desenhos, imagens e fotografias. Deverão ter um título breve e descritivo, disposto em sua parte inferior. Deverão ainda ser numeradas com algarismos arábicos, consecutivamente, na ordem de aparecimento no texto e citadas como figuras. As figuras deverão ter boa resolução (mínimo de 300 dpi), ser gravadas em formato ".jpg" ou ".tif" e medir no mínimo 12 x 17cm e no máximo 20 x 25cm. As escalas deverão ser indicadas por uma linha ou barra na figura e referenciadas, se necessário, na legenda. Os gráficos deverão ser preparados nos programas Microsoft Word ou MS-Excel em formato ".doc", ".docx" ou ".xls" e não como imagem. Imagens produzidas em software estatístico devem ser convertidas para formato MS-Excel, caso não seja possível converter para formato ".tif". Ilustrações coloridas somente poderão ser aceitas se os autores assumirem os custos. Os dados apresentados nas figuras não deverão repetir aqueles já descritos nas tabelas. Os locais aproximados onde as ilustrações serão colocadas deverão ser determinados no texto. As figuras deverão ser enviadas em arquivos separados. Não deverão ser enviados um número excessivo de figuras.

REFERÊNCIAS: As referências, em todas as categorias de trabalho científico, deverão ser normalizadas de acordo com o estilo Vancouver publicado em *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* [Normas para Uniformização de Manuscritos Submetidos às Revistas Biomédica] pelo *International Committee of Medical Journal Editors [ICMJE]* (<http://www.icmje.org>) e que pode ser consultado em www.scielo.br/pdf/rcbc/v35n6/v35n6a14.pdf (Versão em Português) ou em www.icmje.org/urms_full.pdf (Versão em Inglês). A abreviação dos títulos dos periódicos deverá seguir o recomendado em *List of Journals Indexed in Index Medicus [National Library For Medicine]* (<http://www.nlm.gov/tsd/serials/lji.html>) ou no Portal de Revistas Científicas em Ciências da Saúde [Biblioteca Virtual em Saúde] (<http://portal.revistas.bvs.br/index.php?lang=pt>). Sugere-se incluir aquelas referências estritamente pertinentes à problemática abordada e evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. A lista das referências deverá ser numerada de acordo com a ordem em que os autores foram citados no texto e não em ordem alfabética. Deverão ser listados somente os trabalhos consultados e citados no texto. Citações de "resumo", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionados no texto, mas não serão aceitos como referências bibliográficas. A exatidão das referências será de responsabilidade exclusiva dos autores.

As citações e menções no texto de informações colhidas em outras fontes, bem como as referências bibliográficas deverão seguir o exposto abaixo:

TEXTO: Deverá ser utilizado em todo o manuscrito o Sistema de Chamada Numérico. Neste sistema, as citações dos documentos deverão ter numeração única e consecutiva, indicada pelo número da referência em expoente e entre parênteses. Os autores serão numerados por ordem de sua citação no texto, independentemente da ordem alfabética. As referências citadas em legendas de tabelas e figuras deverão manter a sequência com as referências citadas no texto. O mesmo trabalho mencionado mais de uma vez deverá manter, sempre que aparecer, o primeiro número a ele atribuído.

Observações Gerais:

- Quando houver dois autores, deverá ser utilizada a partícula "e" entre os sobrenomes;
- Quando houver 3 ou mais autores, deverá ser indicado apenas o primeiro sobrenome seguido da expressão latina "et al.";
- Quando uma entidade, corporação, editores ou projetos editoriais assumirem a responsabilidade integral pelo documento deverão ser indicados/ tratados como autores;
- Nomes contendo mais de um sobrenome deverá ser indicado o último sobrenome, sem partículas de ligação como "de" ou "da";
- Sobrenomes duplos, com hífens ou apóstrofos ou que formem uma expressão deverão ser indicados em seu conjunto;
- Temos relacionados a graus de parentesco (filho, júnior, neto, sobrinho), deverão ser indicados após os sobrenomes e por extenso.

Alguns exemplos de citações:

- Um/dois autores: No mesmo ano, Nishimura e Miyaji⁽²⁶⁾ mudaram a denominação do fungo para *Hortaea werneckii*, em homenagem a Parreiras Horta.
- Mais de dois autores: Giannopoulos et al.⁽³²⁾ também observaram maior prevalência de NIC 1 em mulheres na faixa etária de 20 a 30 anos enquanto NIC 3 foi mais frequente em mulheres com mais de 50 anos.

- Autores corporativos: De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes,⁽¹⁷⁾ os sinais e sintomas de hiperglicemia incluem: polidipsia, poliúria, perda de peso, fome exagerada, visão embaçada, infecções repetidas na pele e mucosas, dificuldade na cicatrização de ferimentos, fadiga e dores nas pernas (má circulação).

- Editores/ Projetos editoriais: Conforme o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas,⁽⁵⁾ a meia-vida inicial da anfotericina B é de 24-48 horas e sua meia-vida terminal é de 15 dias.

- Sem indicação de nome de autor: O diagnóstico de hipertireoidismo, por sua vez, é dado a partir de resultados baixos de T4 livre e elevados de TSH.⁽¹⁴⁾

AUTORES: Os autores deverão ser referenciados por seu sobrenome, tendo apenas a primeira letra em maiúscula, seguido do(s) nome(s) abreviado(s) e sem vírgulas e pontos. Todos os autores deverão ser referenciados e separados por vírgulas (o mesmo é válido para livros), apesar do estilo Vancouver recomendar que apenas sejam indicados os 6 primeiros autores, quando o número de autores for maior. Deverão ser dados espaços após as vírgulas.

Observações Gerais:

- Quando o documento consultado possuir apenas editores ou compiladores, esta condição deverá ser indicada logo após os nomes dos autores;
- Quando a autoria do documento for de uma organização, a referência deverá ser iniciada diretamente pelo nome da entidade. Se houver mais de uma entidade com subordinação entre elas, estas deverão entrar em ordem decrescente de hierarquia e serem separadas por pontos. Se as entidades não apresentarem subordinação, estas deverão ser separadas por ponto e vírgula;
- Quando o documento consultado não possuir autoria, a referência deverá ser iniciada por seu título;
- Quando o documento consultado for tese, dissertação ou monografia deverá ser empregada a seguinte correspondência entre tipo e grau: tese: doutorado, tese: livre-docência, tese: PhD, dissertação: mestrado, monografia: especialização, monografia: graduação;
- Quando o documento consultado for de natureza jurídica (Constituição Federal ou Estadual, Emenda Constitucional, Medida Provisória, Leis, Decretos, Portarias, Resoluções e Códigos), deverão ser seguidos os padrões de autoria/ emissão recomendados pela NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT, 2002), com a apresentação gráfica adaptada ao estilo de Vancouver.
- Toda informação adicionada à referência que for encontrada em alguma fonte que não o documento consultado ou informação complementar à referência como suporte do documento ou tradução de alguma expressão deve ser adicionada entre [colchetes].

TÍTULO DE ARTIGOS/ DOCUMENTOS: Os títulos dos artigos/ documentos consultados deverão ser referenciados em letras minúsculas, no entanto, a primeira palavra deverá ser iniciada por letra maiúscula. O texto do título não deverá vir nem em negrito e nem em itálico e deverá ser finalizado por ponto.

TÍTULO DE PERIÓDICOS/ REVISTAS E ANO: Os títulos de periódicos/ revistas consultados deverão ser referenciados abreviados e finalizados com ponto. Importante considerar que todos os pontos da abreviatura do título deverão ser eliminados, com exceção do último, empregado para separar o título do ano. Um espaço deverá ser dado entre o ponto colocado ao final do título e o ano. A separação entre ano e volume deverá ser feita com a utilização de ponto e vírgula.

MÊS, VOLUME, NÚMERO E PÁGINAS: O estilo Vancouver recomenda que os meses sejam referenciados em inglês e de forma abreviada, independente da língua do texto: *Jan, Feb, Mar, Apr, May, Jun, Jul, Aug, Sep, Oct, Nov, Dec*. No entanto, a RBAC aceita a abreviação em português daqueles manuscritos nesse idioma. Quando o periódico apresentar paginação contínua ao longo de um volume, o mês e o número poderão ser omitidos. Ano, volume, número e páginas deverão ser escritos sem qualquer espaço entre eles. Quando as páginas do artigo consultado exibirem números coincidentes, deverão ser eliminados os números iguais (445-449, utilizar: 445-9).

EDIÇÃO E LOCAL DE PUBLICAÇÃO: As edições de documentos consultados deverão ser referenciadas após o título, em algarismos arábicos, seguidas de ponto e da palavra "edição" no idioma que figura na publicação original e de forma abreviada. Quando for a primeira edição, essa não deverá ser indicada. Quando houver a definição do local de publicação, este deverá ser indicado em seguida à edição.

PARÁGRAFOS: Quando a referência ocupar mais de uma linha, esta deverá ser reiniciada na primeira posição na linha inferior, sem recuos.

Alguns exemplos de referências:

Periódicos:

- Um Autor: Marques SA. Paracoccidioidomycosis. Clin Dermatol. 2012 Nov;30(6):610-5.
- Mais de um autor: Lee MY, Telisinghe PU, Ramasamy R. Cervical cancer in Brunei Darussalam. Singapore Med J. 2012 Sep;53(9):604-7.
- Até seis autores: Okita Y, Narita Y, Miyakita Y, Ohno M, Nagai S, Shibui S. Management of cytomegalovirus infection in a patient with malignant glioma treated with temozolomide and steroids. Intern Med. 2012;51(20):2967-71.
- Mais de seis autores: Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, et al. Cryptococcus neoformans-

Cryptococcus gattii Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Nov;56(11):5898-906.

Autores pessoais e corporativos: Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al; Members of LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis*. 2012;16(3):205-42.

Volume com suplemento: Maljaars J, Peters HP, Masclee AM. The gastrointestinal tract: neuroendocrine regulation of satiety and food intake. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Dec;26 Suppl 2:241-50.

Número com suplemento: Komrokji RS, Verstovsek S, Padron E, List AF. Advances in the management of myelofibrosis. *Cancer Control*. 2012;19(4 Suppl):4-15.

Editorial com indicação de autoria: Tamaoki J, Saito H. Diagnosis, evaluation and monitoring of asthma [editorial]. *Allergol Int*. 2012;61(3):351-2.

Editorial sem indicação de título: Bartels PD. Editorial. *Ugeskr Laeger*. 2012;174(42):2518.

Artigo/ Editorial sem indicação de autoria: Improved and Emerging Gel-free Separation and Detection Methods for Proteomics [editorial]. *Proteomics*. 2012;12(19-20):2902-3.

Carta ao editor: Dettenkofer M, Conrad A. Hand hygiene prevents MRSA transmission [letter]. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(8):139.

Artigo com DOI: Newman TB, Pletcher MJ, Hulley SB. Overly aggressive new guidelines for lipid screening in children: evidence of a broken process. *Pediatrics*. 2012 Aug;130(2):349-52. doi: 10.1542/peds.2012-0481.

Autor corporativo: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of fungal infection associated with injection of methylprednisolone acetate solution from a single compounding pharmacy - United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2012 Oct 19;61:839-42.

Livros:

Um autor/ mais de um autor: Stockham SL, Scott MA. *Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2011.

Autor de obra e de capítulo: Rey L. *Bases da parasitologia médica*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

Capítulo: Rodrigues RMMMS, Nogueira MD. Fiscalização de alimentos por análise microscópica. In: Almeida-Muradian LB, Camargo Penteado MV. *Vigilância Sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2007. p. 72-80.

Reponsabilidade intelectual destacada: Diniz D, Sugai A, Guilhem D, Squinca F, organizadores. *Ética em pesquisa: temas globais*. Brasília: Editora UNB; 2008.

Teses, Dissertações e Monografias:

Autor e indicação de grau: Maranhão FCA. *Análise da expressão gênica no dermatófito Trichophyton rubrum mimetizando a infecção in vitro: pH e diferentes fontes de carbono regulando genes*. São Paulo. Tese [Doutorado em Genética] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; 2008.

Eventos Científicos:

Anais com indicação de título: Anais do 5º Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007.

Anais com indicação de autoria, trabalho e título: Neufeld PM, Melhem M, Szescs MW, Santos LH, Dornelas-Ribeiro M, Maia S, et al. *Espécies de Candida isoladas de pacientes leucêmicos*. In: Anais do 5. Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007. p. 314.

Órgãos/ Instituições:

Um autor corporativo: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes*. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.

Mais de um autor corporativo: Fundação Oswaldo Cruz; Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. *Relatório de atividades: 2006*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2007.

Referências Legislativas:

Leis: Brasil. Lei no. 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 20 set 1990; seção 1.

Decretos: Brasil. Decreto no. 7.580, de 28 de junho de 2011. Regulamenta a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, para dispor sobre a organização do Sistema Único de Saúde - SUS, o planejamento da saúde, a assistência à saúde e a articulação interfederativa, e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 29 jun 2011; seção 1.

Portarias: Ministério da Saúde (Brasil). Portaria no. 2.616, de 12 de maio de 1998. Expede diretrizes e normas para a prevenção e o controle da infecção hospitalar. *Diário Oficial da União* 13 mai 1998; seção 1.

• Resoluções: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos. *Diário Oficial da União* 14 out 2005; seção 1.

Meios Eletrônicos:

Periódicos: Mondelli AL, Niéro-Melo L, Bagagli E, Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Sugizaki MF, Carneiro MV, Villas Boas PJF. *Candida* spp.: manual identification (reference method) and automated identification (Vitek system platform). *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* [periódicos na internet]. 2012 set [acesso em 29 de out 2012]; 18(3). Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v18n3/a11v18n3.pdf>.

Referências legislativas: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 306, de 13 de dezembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de saúde [resolução RDC na internet]. *Diário Oficial da União* 10 dez 2004 [acesso em 28 out 2012]. Disponível em: <http://www.unesp.br/pgp/pdf/rdc30604anvisa.pdf>.

Eventos Científicos: Albuquerque P, Kyaw CM, Saldanha RR, Brigido MM, Felipe MSS, Silva-Pereira I. Identification and Characterization of Phase-Specific cDNAs Encoding for Two Hydrophobins in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. In: 4o. Congresso Virtual de Micologia de Hongos Patógenos em América Latina [evento na internet]. 2003 27jun-14jul; Caracas, Venezuela [acesso em 10 jul 2003]. Disponível em: <http://congresomicologia.ucv.ve>.

A tramitação de manuscritos será feita exclusivamente online pelo Sistema de Gestão de Publicações (SGP), no endereço: www.sgponline.com.br/rbac/sgp. Outras formas de submissão, não serão aceitas.

Observações Gerais:

• A comunicação entre os diferentes participantes do processo editorial de avaliação e publicação (autores, revisores e editor) será feita apenas de forma eletrônica pelo SGP, sendo o autor responsável pelo manuscrito informado automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status;

• Apenas o autor responsável pelo manuscrito deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema e posterior acesso por meio de login e senha;

• A RBAC comunicará individualmente, por e-mail, a cada autor a sua participação no manuscrito. Caso um dos autores não concorde com sua participação, o manuscrito será recusado;

• O SGP atribuirá a cada manuscrito um número de registro e o autor principal será notificado de que o manuscrito está completo e apropriado para iniciar o processo de revisão;

• Pedidos de fast-track poderão ser considerados desde que justificados e solicitados por orientadores e/ou coordenadores de programas de pós-graduação ou responsáveis por departamentos, laboratórios, setores ou serviços de instituições públicas ou privadas ou ainda se rigorosamente fundamentados por seus autores. Os pedidos de fast-track deverão vir endereçados ao editor da RBAC em documento em papel timbrado da instituição e carimbado por seus superiores hierárquicos.

MODELO DE DECLARAÇÃO

Declaração de Responsabilidade, Conflitos de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais

Os autores abaixo assinados vimos submeter o artigo intitulado "Título do Artigo" à apreciação do Corpo Editorial da *Revista Brasileira de Análises Clínicas - RBAC* para sua publicação. Nesta oportunidade, declaramos estar de acordo com que os direitos autorais referentes ao artigo em tela tornem-se propriedade exclusiva da RBAC desde sua submissão, sendo vedada a reprodução total ou parcial, em qualquer meio de divulgação, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e concedida pela editoria da RBAC. Declaramos também que o artigo não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros e que seu conteúdo é de inteira responsabilidade dos autores. Declaramos ainda que este é um trabalho original e que não foi publicado anteriormente e nem está sendo considerado para publicação em outro periódico, tanto no formato impresso quanto no eletrônico. Os autores confirmam estar cientes e concordantes com a publicação do artigo na RBAC e afirmam não haver qualquer tipo de conflito de interesse do tema abordado no artigo com pessoas, entidades ou instituições.

Nomes dos autores e assinaturas:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Data: ____ / ____ / ____.

