

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE HEMOGRAMAS DO  
CONTADOR ELETRÔNICO ABX PENTRA 60<sup>®</sup> COM A  
MICROSCOPIA.

**Felipe Goulart Monteiro**

Orientadora: Lúcia Mariano da Rocha Silla

Porto Alegre

2005

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE HEMOGRAMAS DO  
CONTADOR ELETRÔNICO ABX PENTRA 60<sup>®</sup> COM A MICROSCOPIA.

Felipe Goulart Monteiro

Dissertação apresentada como exigência para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas pelo  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências  
Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Lúcia Mariano da Rocha Silla

Porto Alegre  
2005

## Ficha Catalográfica

**G694c** Monteiro, Felipe Goulart

Comparação dos resultados de hemogramas do contador eletrônico ABX PENTRA 60<sup>®</sup> com a microscopia / Felipe Goulart Monteiro ; orient. Lúcia Mariano da Rocha Silla. – 2005.

90 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Contagem de células sangüíneas 2. Microscopia 3. Testes hematológicos : Instrumentação I. Silla, Lúcia Marian da Rocha II. Título.

NLM: QY 402

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabalho aos meus pais Odilmar Figueiredo Monteiro e Arcilete A. Goulart Monteiro, aos meus irmãos Odilon Monteiro Neto e Ana Paula Goulart Monteiro e a minha namorada Roberta de Novaes.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora, Lúcia Mariano da Rocha Silla, que não hesitou em aceitar este projeto, investindo tempo, carinho e dedicação na sua execução.

Agradeço ao Alan Birck, pela importante colaboração na análise estatística e por sua amizade.

Agradeço em especial aos colegas Celito Luiz Diel, Nicole Rego de Aquino e Rafael Moresco pelas dicas e auxílio nesta dissertação. Por sua amizade e auxílio nas horas mais difíceis. Aos amigos Rodrigo Herscovitz, Gustavo Galant Vollmer e Rafael Failace por suas amizades e apoio para a realização deste estudo.

Agradeço a Bioquímica Alzira do Carmo Aquino, proprietária do Laboratório Unilab, que possibilitou este estudo no seu serviço, bem como os demais funcionários.

Agradeço ao curso de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, bem como seu corpo docente e funcionários pelo auxílio e desenvolvimento que contribuíram para a concretização deste projeto.

Agradeço a Imensidão Azul

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
<b>I – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
II.1. HEMATOPOESE .....	16
II.2. CÉLULAS SANGUÍNEAS .....	18
II.2.1. Células Vermelhas .....	18
II.2.2. Células Brancas .....	18
II.2.3. Plaquetas .....	19
II.3. COLETA DE HEMOGRAMA .....	19
II.4. ESFREGAÇO SANGUÍNEO EM LÂMINA .....	22
II.5. COLORAÇÃO DO ESFREGAÇO .....	24
II.6. CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS .....	25
II.6.1. Células Vermelhas .....	25
II.6.1.1 Principais anemias .....	28
II.6.2 Células brancas .....	30
II.6.2.1. Neutrófilo .....	30
II.6.2.2 Basófilo .....	32
II.6.2.3 Eosinófilo .....	33

II.6.2.4. Linfócito.....	34
II.6.2.5 Monócito .....	36
II.6.2.6 Principais desordens dos leucócitos.....	37
II.6.2.6.1 Não proliferativas .....	37
II.6.2.6.2 Proliferativas .....	38
II.6.3 Plaquetas .....	39
II.6.3.1 Principais desordens das plaquetas.....	40
II.6.3.1.1 Trombocitopenia.....	40
II.6.3.1.2 Trombocitose.....	40
II.7. METODOLOGIAS EM HEMATOLOGIA.....	41
<b>III – OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
III.1. OBJETIVOS GERAIS .....	47
III.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	47
<b>IV – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>48</b>
<b>Comparison Of Counter Abx Pentra 60® Automated Analysis Of Blood Cells And Blood Smear Microscopy Examination .....</b>	<b>53</b>
<b>Comparação Dos Resultados De Hemogramas Do Contador Eletrônico Abx Pentra 60® Com A Microscopia.....</b>	<b>72</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Hematopoese: Esquema simplificado da diferenciação das células hematopoéticas (modificado de Zago, 2001). ..... 17
- Figura 2:** Veias anticubitais utilizadas na coleta de sangue periférico (A), punção venosa utilizando seringa e agulha (B), Punção venosa a vácuo (modificado de Bain, 2004)..... 20
- Figura 3:** Demonstração das áreas para coleta de sangue capilar feito com lanceta em coletas difíceis/crianças (modificado de Bain, 2004)..... 22
- Figura 4:** Distensão sanguínea em lâmina de vidro 24 X 76 mm (modificado de Bain,2004)..... 23
- Figura 5:** Distensão sanguínea em lâmina com ângulo de 25 a 30° (modificado de Bain,2004)..... 23
- Figura 6:** Diagramas do modo de percorrer as distensões de sangue para contagem diferencial de leucócitos: a) leitura ao longo da distensão, b) método em Ameia, c) método em Ameia modificado (modificado de Bain, 2004)..... 25

<b>Figura 7:</b> Células vermelhas em indivíduo normal (modificado de Heckner, 2000).....	26
<b>Figura 8:</b> Microcitose (VCM de 62 fl) (modificado de Bain, 2004). ....	27
<b>Figura 9:</b> Macrocitose (VCM de 105 fl) (modificado de Bain, 2004). ....	27
<b>Figura 10:</b> Neutrófilo do sangue periférico de indivíduo sadio (modificado de Bain, 2004).....	31
<b>Figura 11:</b> Basófilo do sangue periférico de indivíduo sadio (modificado de Heckner, 2000).....	33
<b>Figura 12:</b> Eosinófilo do sangue periférico de indivíduo sadio (modificado de Heckner, 2000).....	34
<b>Figura 13:</b> Linfócito do sangue periférico de indivíduo sadio (modificado de Heckner, 2000).....	35
<b>Figura 14:</b> Monócito do sangue periférico de indivíduo sadio (modificado de Heckner, 2000).....	36
<b>Figura 15:</b> Plaquetas do sangue periférico de indivíduo sadio (Heckner, 2000).....	39

**Figura 16:** Metodologia de impedância (Clinical Case Studies)..... 41

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Alterações hematológicas não identificadas pelos contadores eletrônicos..... 45

**Tabela 2** – Parâmetros numéricos de limites do serviço de hematologia do Unilab (Laboratório de Unidos de Pesquisas Clínicas Ltda – Porto Alegre – RS –BR)..... 46

## ARTIGO

**Tabela I:** Valores de concordância (Kappa), modificada de Dawson 2001.....60 e 80

**Tabela II:** Correlação entre três analistas clínicos, com os respectivos valores de concordância.....61 e 81

**Tabela III:** Alterações de WBC do método automático e do método manual.....63 e 82

**Tabela IV:** Correlação entre ABX Pentra 60® (Franca) e a microscopia óptica, mostrando valores de correlação (Kappa).....64 e 83

**ABREVIATURAS**

AIDS	Síndrome da imuno deficiência humana
ALL	Leucemia linfóide aguda
CHCM	Concentração hemoglobínica corpuscular média
CID	coagulação intravascular disseminada
CLL	Leucemia linfóide crônica
CTH	Célula tronco hematopoética
DHSS	Sistema Seqüencial Hidrodinâmica Duplo
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EPIs	Equipamentos de proteção individual
fl	fentolitro
FLAGS	Alarmes patológicos
G6PD	glicose – 6 – fosfato desidrogenase
GP IIb	Glicoproteína II b
GP IIIa	Glicoproteína III a
HbA	hemoglobina A
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HDNB	doença hemolítica do recém – nascido
HGB	hemoglobina
HTC	hematócrito
IgE	Imunoglobulina E
LMA	Leucemia mielóide aguda

LMC	Leucemia mielóide crônica
LIC/RM	Células Imaturas
MDSS	Sistema de Multi-distribuição de amostras
mm	milímetros
PBM	Proteína Básica Maior
PLQ	Plaquetas
PNH	Hemoglobinúria Paroxística Noturna
PTI	púrpura trombocitopenia idiopática
PK	piruvato kinase
NK	<i>natural killer</i>
RBC	Eritrócitos
RDW	Amplitude de distribuição (volumétrica) dos eritrócitos
RNA	Ácido ribonucléico
SPSS	Statistical package for the social sciences
WBC	Leucócitos
VCM	Volume corpuscular médio
μm	micrômetro

## I. INTRODUÇÃO

O hemograma é o exame laboratorial de rotina para avaliação qualitativa e quantitativa dos elementos figurados do sangue periférico, sendo um dos exames mais solicitados para obtenção de diagnósticos, avaliações clínicas e acompanhamento evolutivo das diversas doenças humanas. O exame completo deve conter o eritrograma, o leucograma, a contagem de plaquetas e uma descrição da observação da lâmina ou esfregaço sanguíneo. O hemograma é um coadjuvante útil em todos os setores da clínica, e um toque final do especialista o transforma numa abrangente lista de dados e valores para o diagnóstico final do médico.

A metodologia manual para contagem dos leucócitos foi utilizada isoladamente por um longo período. Após o advento da Automação, surgiram trabalhos científicos questionando os métodos de automação e manual.(Rumke, 1985; Dutcher, 1985; Nakul, 2003).

Desde a introdução da tecnologia com automação na década de 50, surgiram vários equipamentos que permitiram aos laboratórios agilidade para a liberação de resultados. Isto culminou na década de 80, na fabricação de modelos altamente sofisticados que permitiam aspirar, diluir e fornecer toda a série de parâmetros numéricos. A partir de então, abriu-se uma nova era em hematologia laboratorial. Sem a velocidade e habilidade dos modernos contadores automatizados em hematologia, os laboratórios clínicos seriam incapazes de analisar eficientemente o grande volume de amostras que recebem diariamente. Os instrumentos automatizados oferecem alta sensibilidade e precisão na quantificação das células sanguíneas (Ryan, 1995), bem como na contagem diferencial de leucócitos, sendo que desde 1980 o uso da análise diferencial de leucócitos automatizada tem se tornado comum em grande número de laboratórios (Matsuno & Ishizuka, 1998).

No entanto, algumas amostras analisadas pelos contadores automatizados de células ainda requerem avaliação através do esfregaço de sangue periférico para permitir a observação de anormalidades morfológicas (Ryan, 1995). Atualmente, na maioria dos laboratórios que utilizam contadores eletrônicos, a microscopia só é realizada em casos selecionados, de acordo com o protocolo local. (Toledo, 2002).

Mesmo com a tecnologia eletrônica a observação do analista clínico ao microscópio ainda é indispensável. Os elementos celulares patológicos chegam a ser registrados pelo aparelho, porém não são identificados sob o ponto de vista qualitativo. Começa aqui o campo do diagnóstico visual através do microscópio. O exame junto ao microscópio exige uma rigorosa disciplina, deve-se relacionar os dados da automação com os da microscopia e julgar se são condizentes (Arroyo, 2005). Devido a disseminação do uso da automação para a contagem e análise das células sanguíneas é desejável que dentro de cada serviço se estabeleça um procedimento operacional padrão, no sentido de determinar quais as amostras que devem ser analisadas pelo microscópio ótico.

A metodologia de automação tem sido cada vez mais utilizada nos laboratórios de análises clínicas. Este estudo vem contribuir com os já existentes sobre o analisador automático ABX Pentra 60<sup>®</sup> (Montpellier – França), estabelecendo um protocolo de liberação direta, ou seja; sem análise microscópica para esse equipamento no serviço do laboratório Unilab e quantificar a necessidade de profissionais habilitados no setor de hematologia.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### II.1. HEMATOPOESE

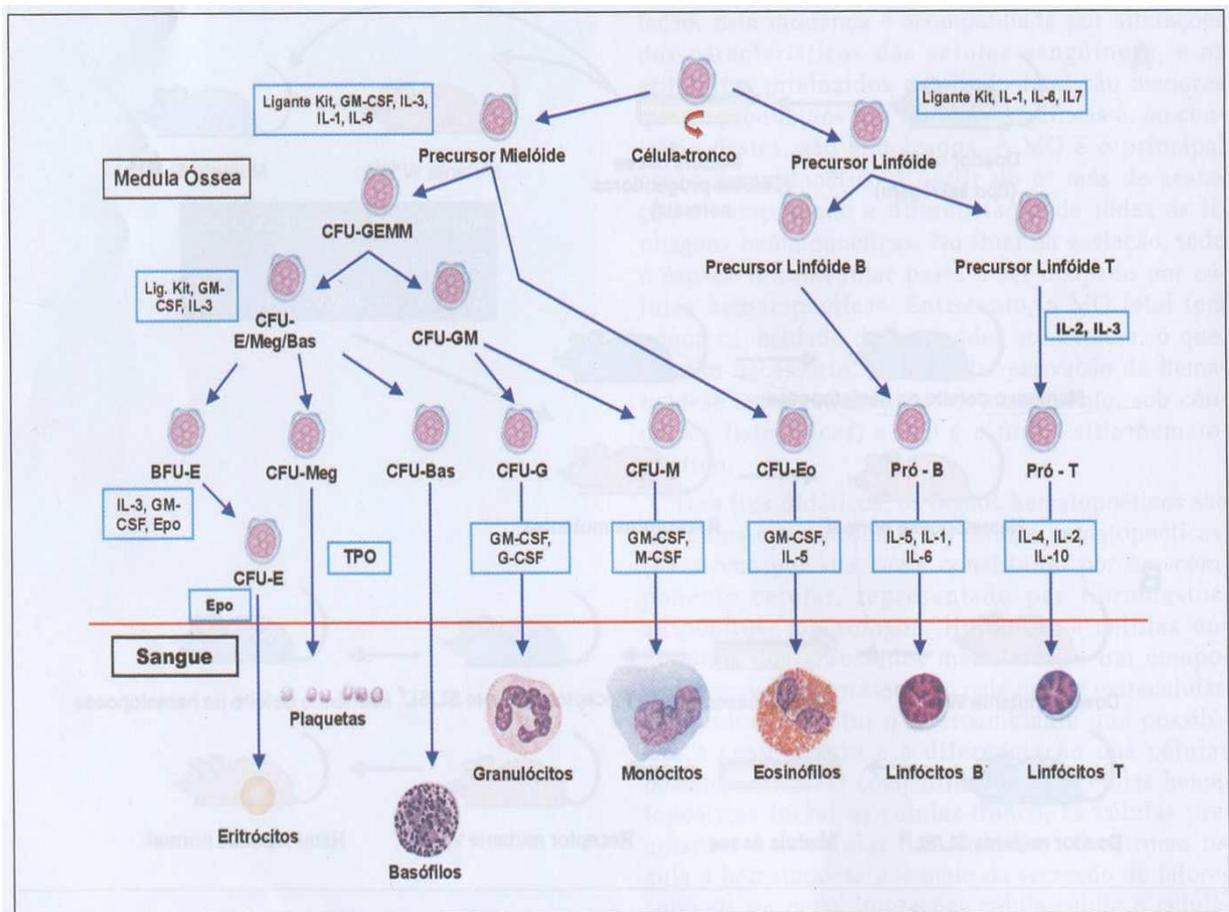
O sangue total é constituído de uma porção acelular (plasma) e outra celular. O plasma corresponde a 55% do volume do sangue, sendo que 92% é água e 8% de proteínas, sais e outros. A porção celular corresponde 45% do volume total do sangue e é composto por glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas.

As células sanguíneas são oriundas da célula mãe, ou célula tronco (*stem cell*), hematopoética (CTH), a qual possui alta capacidade de renovação e diferenciação. As CTH são encontradas na medula óssea, sangue periférico e cordão umbilical. Nos adultos são mais encontradas nos ossos esponjosos, esterno, ossos íliacos e costelas. Já na fase pré-natal a CTH é encontrada em quase todos os ossos até seis meses de idade (Weissman, 2000).

Existem três períodos na hematopoese durante a gestação: período embrionário que dura aproximadamente até o terceiro mês de vida fetal e ocorre no saco vitelino, período hepatoesplênico que predomina do quarto ao sexto mês de vida fetal e o período medular, quando de forma progressiva, a cavidade medular dos ossos passa a ser o sítio preferencial da hematopoese (Rego, 2001).

Um adulto normal produz por dia 6 bilhões de células por quilo, 2,5 bilhões de eritrócitos, 1 bilhão de leucócitos e 2,5 bilhões de plaquetas. Em condições normais a hematopoese (proliferação e diferenciação) ocorre na medula óssea, garantindo o número de células maduras na circulação (Rego, 2001).

As células sanguíneas podem ser de origem mielóide, que se diferenciam para as linhagens granulocíticas, eritrocitárias, monocitárias e megacariocitárias, ou de origem linfóide, que se diferenciam em linfócitos T e B (figura 1).



**Figura 1:** Hematopoese: Esquema simplificado da diferenciação das células hematopoéticas (modificado de Zago, 2001).

## **II.2. CÉLULAS SANGUÍNEAS**

### **II.2.1. Células Vermelhas**

As células sanguíneas vermelhas são as mais abundantes no corpo. A contagem normal das células está entre 4,5 e 6,5 milhões de células/mm<sup>3</sup>. Embora as hemácias sejam células anucleadas, constituídas apenas por uma membrana plasmática e citoplasma, são bastante complexas. Originam-se na medula óssea pela proliferação e maturação dos eritroblastos, fenômeno chamado de eritropoese, regulado pela eritropoetina que é o principal fator de crescimento envolvido (Zago, 2001).

Os eritrócitos ou hemácias normais, têm forma de disco circular e bicôncavo. Essa forma única permite a célula ter uma área superficial muito maior onde a troca gasosa ocorrerá. A hemoglobina é a proteína responsável por esta função. A hemoglobina constitui 95% das proteínas das hemácias. No adulto a hemoglobina encontrada nas hemácias é predominantemente a hemoglobina A (HbA) (Vallada, 1988).

### **II.2.2. Células Brancas**

Os leucócitos ou glóbulos brancos (WBC), formam o grupo mais heterogêneo de células do sangue, tanto do ponto de vista morfológico quanto fisiológico. Embora os leucócitos desempenhem papel pela defesa do organismo, cada subtipo detém funções bastante específicas e distintas entre si, que em conjunto, estruturam o sistema imunológico. São classificados em dois grupos principais, os granulócitos (que tem grânulos no citoplasma das células) e os agranulócitos, que não possuem grânulos. Dos granulócitos

destacamos os neutrófilos, basófilos e os eosinófilos, e dos agranulócitos, os linfócitos, plasmócitos e monócitos (Nascimento, 2002<sup>2</sup>).

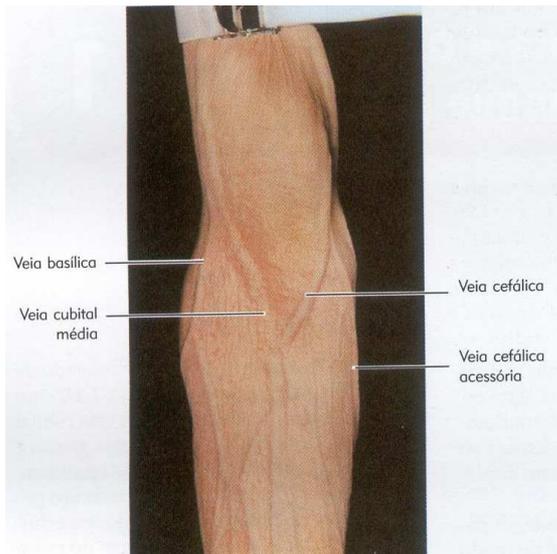
### **II.2.3. Plaquetas**

Megacariocitopoese é o processo celular de proliferação (por citocinas pleiotrópicas) e diferenciação dos megacariócitos, levando a produção de plaquetas. A produção diária em um adulto normal chega a 100 trilhões de células (Wendling, 1999; Italiano, 1999).

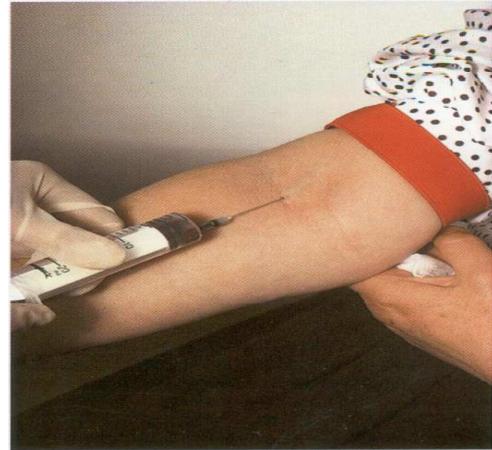
As plaquetas vivem em média cerca de 10 dias na circulação sanguínea. Elas têm as funções de hemostasia e coagulação sanguínea (contenção inicial do sangue) (Hanson, 1985).

### **II.3. COLETA DO HEMOGRAMA**

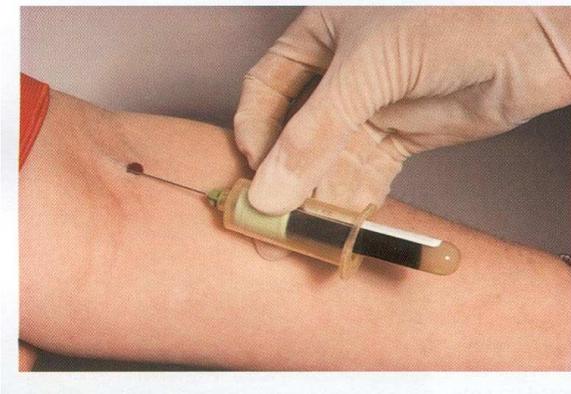
A coleta de material é de fundamental importância para a realização de um hemograma. Esta pode ser feita a qualquer hora do dia, evitando apenas coletas feitas após as refeições e duas horas após exercícios. No adulto o sangue é geralmente coletado de veias da fossa antecubital (figura 2), com agulha e seringa ou tubo a vácuo. Nos adultos as seringas utilizadas são 25 X 8 mm ou 25 X 9 mm com agulhas com 0,9 e 0,8 mm de calibre. Para as crianças as agulhas utilizadas são de 25 x 6 mm ou 25 X 7 com 0,7 e 0,6 mm de calibre (ICSH, 1993).



A)



B)



C)

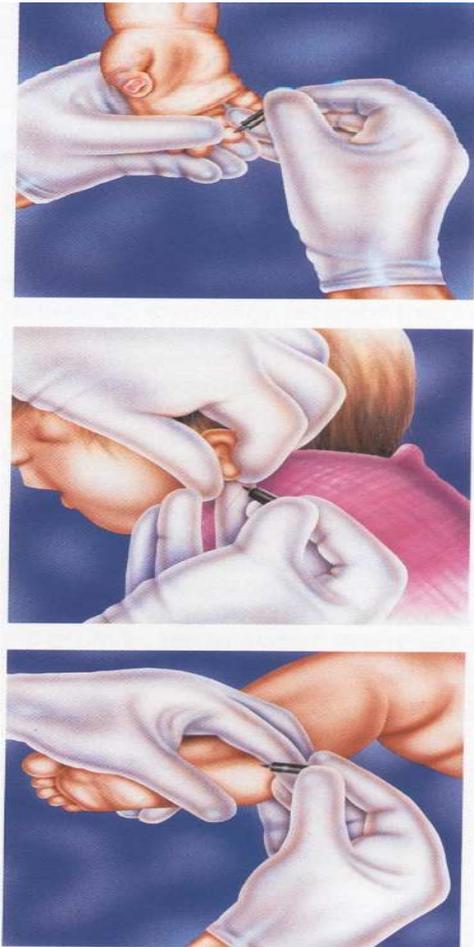
**Figura 2:** Veias anticubitais utilizadas na coleta de sangue periférico (A), punção venosa utilizando seringa e agulha (B), Punção venosa a vácuo (modificado de Bain, 2004).

Um anticoagulante deve ser utilizado para impedir a coagulação do sangue devido à sua remoção do corpo. O (EDTA) Etilenodiaminotetracético é o anticoagulante mais utilizados nos laboratórios de hematologia, pois preserva melhor o volume celular e morfologia, além de permitir um tempo de estoque mais longo com pouco efeito sobre a estabilidade da amostra. Amostras colhidas em postos distantes podem ser feitos com precisão pelo analisador automático em até 8 horas se for hemograma normal e até 6 horas se não for hemograma normal (Gallo Rocha, 1997). Heparina (alguns testes bioquímicos e

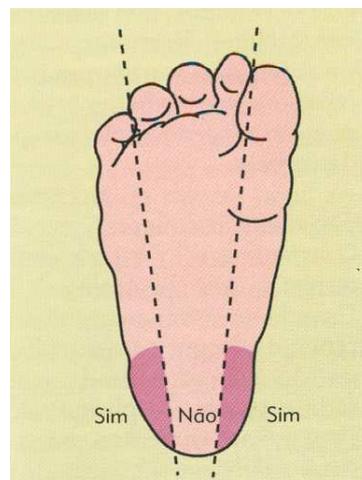
hematológicos), citrato de sódio (coagulação), fluoretode sódio (alguns testes bioquímicos) são anticoagulantes adicionais usados para procedimentos especializados (Dale, 1998).

A veia cubital mediana é a preferida, por ser mais grossa e firme, mas a cefálica e a basílica são igualmente satisfatórias. Para evidenciar a veia para a coleta, utiliza-se garrote, que deve ser colocado 10 cm acima do local da punção, por no máximo 1 minuto, pois, a hemoconcentração provoca 2% de aumento das cifras hematimétricas (Van Kampen, 1983; Mull, 1993). Logo após a escolha do local de coleta é feita a assepsia do local utilizando álcool a 70%. A agulha deve ser introduzida na veia escolhida com um ângulo de 15°. Logo que o sangue inicie sua entrada para a seringa o garrote é solto e a coleta deve ser feita lentamente para evitar hemólise. Após retirada da agulha, uma pressão com o dedo polegar em um algodão por cinco minutos sem dobrar o braço é importante para que não ocorra lesões no paciente. Dano ao nervo cutâneo antebraquial lateral é uma raríssima complicação da punção das veias da fossa antecubital. (Sander, 2004). A lâmina com o esfregaço sanguíneo deve ser feita no ato da coleta (Gallo Rocha, 1997).

Em recém nascidos, lactentes e adultos com veias de difíceis acessos, pode ser necessária a coleta de sangue por punção na pele, chamado de sangue “capilar ou arteriolar”, ou coleta em artérias (desaconselhável). O sangue capilar pode ser obtido através de um ferimento causado por uma lanceta na superfície plantar do calcanhar e lóbulo da orelha (em bebês e crianças com menos de 2 anos), e em crianças maiores e adultos nos dedos das mãos (figura 3). A coleta feita por lanceta pode dar resultados falso-positivos, como contagem de plaquetas mais baixas, os índices hematimétricos 17% mais altos e contagem de leucócitos 20% mais altas (Brecher, 1953).



A)



B)

**Figura 3:** Demonstração das áreas para coleta de sangue capilar feito com lanceta em coletas difíceis/crianças (modificado de Bain, 2004).

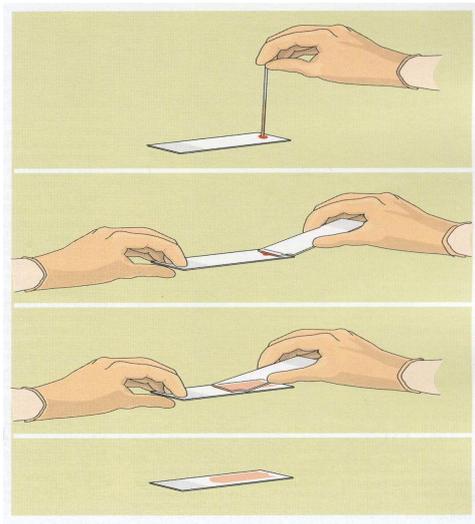
#### II.4. ESFREGAÇO SANGUÍNEO EM LÂMINA

O material coletado é encaminhado para o setor de hematologia onde será processado (leitura automática e análise do esfregaço). Para realizar uma boa distensão sanguínea deve-se utilizar lâminas de vidro 24 X 76 mm limpas e desengorduradas (figura 4). Uma gota de sangue é colocado com auxílio de um tubo capilar próximo à extremidade

da lâmina, com uma lâmina distensora é aplicado um ângulo de 25 a 30°, e com um movimento suave e uniforme distende-se o sangue (figura 5).



**figura 4:** Distensão sanguínea em lâmina de vidro 24 X 76 mm (modificado de Bain, 2004).

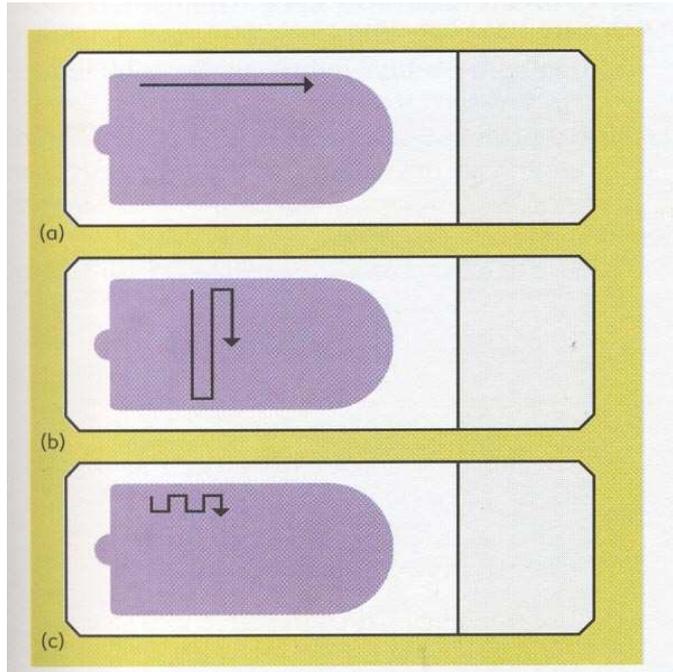


**Figura 5:** Distensão sanguínea em lâmina com ângulo de 25 a 30° (modificado de Bain, 2004).

## II. 5. COLORAÇÃO DO ESFREGAÇO

Após distensão, a lâmina segue para a coloração. Este é um dos passos mais importantes na identificação de unidades celulares. A finalidade da coloração é facilitar a observação microscópica de células e diferenciá-las de acordo com suas características tintoriais. Para este fim, utiliza-se componentes essenciais dos corantes de Romanowsky (criador do corante) (Wittekind, 1979). Compõe os componentes: básico (catiônico), como azul de metileno, que confere cor azul aos ácidos nucléicos ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA), às nucleoproteínas, aos grânulos dos basófilos e, fracamente, aos grânulos dos eosinófilos. Além do corante ácido (aniônico), como o eosinato de violeta, que confere cor laranja à hemoglobina. Os dois corantes são usualmente dissolvidos em álcool metílico para fixação. Esta coloração também é chamada de Giemsa (Savi, 2002).

No esfregaço sanguíneo já corado as células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) começam a ser analisadas do ponto de vista qualitativo, com a análise microscópica das células sanguíneas. A análise do esfregaço pode ser feita de três maneiras: ao longo da distensão, método de Ameia e método de Ameia modificado (figura 6).



**Figura 6:** Diagramas do modo de percorrer as distensões de sangue para contagem diferencial de leucócitos: a) ao longo da distensão, b) método em Ameia, c) método em Ameia modificado (modificado de Bain, 2004).

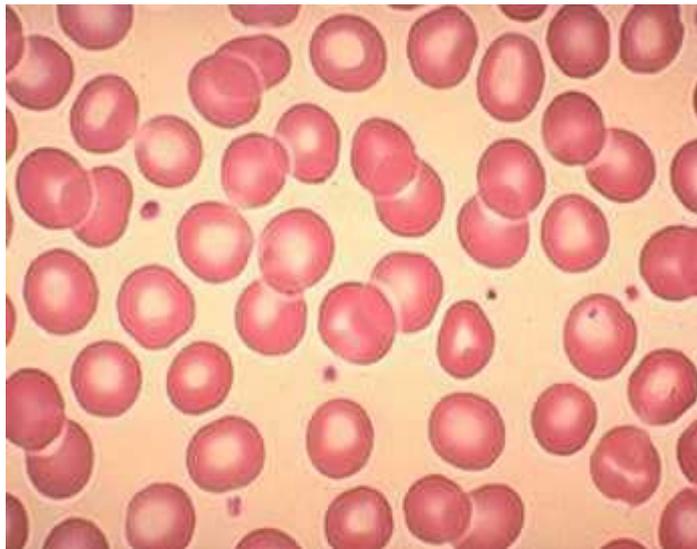
## II.6. CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

### II.6.1. Células Vermelhas (RBC)

Os eritrócitos apresentam um contorno circular com diâmetro médio de 7,5  $\mu\text{m}$ , com uma área central mais pálida ocupando um terço da célula (figura 7). Nesse elemento celular podem acontecer alterações quanto ao seu número, tamanho, forma, distribuição e coloração (Vallada, 1988).

O eritograma é definido por três valores primários: hematócrito em percentual (HTC), hemoglobina em gramas por decilitro (HGB) e concentração das hemácias por unidade de volume em  $\text{mm}^3$  (RBC), e três valores chamados de índices hematimétricos, que são calculados, ou obtidos pela análise dos valores primários: volume corpuscular médio

medido em fentolitro (VCM), hemoglobina corpuscular média medida em picograma (HCM) e concentração hemoglobínica corpuscular média, medida em gramas por decilitro (CHCM) ou percentagem (Van Kampen, 1983). O VCM é calculado pela fórmula  $VCM = HTC/RBC$ , o HCM é calculado pela fórmula  $HCM = HGB/RBC$  e o CHCM é calculado pela fórmula  $CHCM = HGB/HTC$ .



**Figura 7:** Células vermelhas em indivíduo normal (modificado de Heckner, 2000).

Sob condições normais todos os RBCs possuem volume, forma e coloração semelhantes. Estas características são refletidas nos índices hematimétricos, descritos acima (VCM, HCM, CHCM) e no *red cell distribution width* (RDW), ou amplitude de distribuição dos eritrócitos. Este último é um dado obtido apenas na automação, por um cálculo, e estima o grau de anisocitose das hemácias.

De acordo com os índices primários podemos ter eritrócitos normocíticos (VCM 80 – 100 fl), macrocíticos (VCM > 100fl), microcíticos (VCM < 80fl). O índice de anisocitose (vários tamanhos ao mesmo tempo) é obtido pelo RDW. Microcitose (figura 8) e macrocitose (figura 9) podem ser encontrados nas anemias hipocrômicas, talassemias e anemias

refratárias, respectivamente (Willians, 1976). No exercício da clínica, resultados com alterações microcíticas e macrocíticas devem ser bem valorizados e estudados (Nascimento, 2001).



**Figura 8:** Microcitose (VCM de 62 fl) (modificado de Bain, 2004).



**Figura 9:** Macrocitose (VCM de 105 fl) (modificado de Bain, 2004).

As células vermelhas podem ser classificadas do ponto de vista da coloração como: normocrômicas (tem a quantidade normal de hemoglobina), hiperocrômicas (maior intensidade de cor que o normal), hipocrômicas (células pálidas) e anisocromia (variabilidade no grau de coloração). Essas alterações podem ser expressas pelo HCM que informa a “quantidade de hemoglobina dentro das hemácias”.

Pecilocitose é o termo utilizado quando há um número exagerado de células de forma anormal (pecilócitos). Destas variações destacam-se: esferocitose, eliptocitos, ovalócitos, dacriócitos, equinócitos, acantócitos, estomatócitos, drepanócitos e células alvo (Coutinho, 2001).

Existem muitas condições que contribuem para desordens das células vermelhas. A desordem mais comum que afeta a células vermelhas é a anemia, ou decréscimo na quantidade de células sanguíneas e/ou hemoglobina. Há uma grande variedade de causas abrangendo de perda de sangue crônica a deficiências nutricionais.

#### **II.6.1.1. Principais Anemias**

##### **Anemia devido à perda de sangue**

- Aguda: perda repentina de sangue com choque (principalmente no trato gastrointestinal como úlceras etc);
- Crônica: perda de sangue crônica e em pequenas quantidades;

### **Anemia devido à deficiência de fatores de células vermelhas**

- Deficiência de nutriente essencial: (ferro, vitamina B12 e ácido fólico / folato). Se qualquer um desses nutrientes não está disponível em quantidade suficiente através da ingestão ou se há um problema de metabolismo ou absorção, resulta em anemia. São normalmente referidas como anemias por deficiência de ferro ou anemias megaloblásticas;
- Outras desordens: função renal, função do fígado, função de sistema endócrino, infiltração na medula óssea.
- Anemia aplástica
- Anemia sideroblástica

### **Anemia devido à deficiência na produção de células vermelhas**

- Desordens de membrana
- Esferocitose hereditária
- Eliptocitose hereditária
- Estomatocitose hereditária
- Hemoglobinúria Paroxística Noturna (PNH)
- Desordens de hemoglobina: hemoglobinopatias - Ex: Doenças de hemoglobinas S, C, D e E, onde a mais comum é a anemia falciforme, talassemias (beta talassemia é a mais comum)
- Desordens metabólicas (mais comuns são: glicose – 6 – fosfato desidrogenase (G6PD) e piruvato kinase (PK))

- Desordens adquiridas ou extrínseca: agentes químicos (chumbo), agentes infecciosos (malária), agentes físicos (substituição da válvula cardíaca), venenos de animais e anemia imuno-hemolítica (doença hemolítica do recém – nascido: HDNB)

## II.6.2.Células Brancas (WBC)

### II.6.2.1. Neutrófilo

Os granulócitos neutrófilos, ou simplesmente neutrófilo, são assim chamados pela sua tonalidade neutra nas colorações de Romanowsky. Tem como principal função prevenir ou retardar infecções e ainda evitar a ação de agentes estranhos por fagocitose (processo de ingestão de pequenas partículas para dentro da célula, digestão enzimática e expulsão dos resíduos). Também são importantes nos processos inflamatórios quando essas células migram rapidamente para o local da inflamação fazendo quimiotaxia (Falcão, 2001).

O neutrófilo maduro mede de 12 a 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro. O citoplasma é acidófilo, com muitos grânulos finos. O núcleo possui cromatina em grumos, sendo dividido em 2 a 5 lóbulos distintos, ligados por estreitos filamentos de heterocromatina densa, limitados pela membrana nuclear (figura 10). O núcleo tende a adotar uma disposição aproximadamente circular, pois, na célula viva, os lóbulos nucleares estão dispostos em círculo ao redor do centróssomo. Na mulher pode se ver o *drumstick*, um apêndice em baqueta de tambor, ou em gota, projetando-se do núcleo de uma pequena percentagem de células. No corpo humano estas células têm uma vida média de 7 a 6 horas (Bain, 2004).



**Figura 10:** Neutr3f3lo do sangue perif3rico de indiv3duo sadio (modificado de Bain, 2004).

Os est3gios de maturaç3o entre o mieloblasto e metamiel3cito apresentam-se predominantemente na medula 3ssea e n3o s3o encontrados normalmente no sangue perif3rico, exceto em situaç3es patol3gicas. Os neutr3filos bastonetes s3o encontrados em pequena quantidade no sangue perif3rico em condiç3es normais. Entre as principais alteraç3es e anormalidades que podem estar presentes no n3cleo dos neutr3filos destacamos abaixo.

- Desvio a esquerda: gravidez, infecç3o, hipoxia e choque
- Hipersegmentaç3o: eritropoese megalobl3stica, defici3ncia de ferro, uremia e infecç3o
- Hiposegmentaç3o: anomalia de Pelger-Huet, bilobulados com anomalias cong3nitas, anomalia de Pelger-Huet adquirida
- Aumento de projeç3es nucleares: s3ndrome de Turner
- N3cleo em anel: (LMC) leucemia miel3ide cr3nica, (LMA) leucemia miel3ide aguda, anemia megalobl3stica

Entre as principais alterações e anormalidades do citoplasma dos neutrófilos destacamos:

- granulação reduzida: síndromes mielodisplásicas, deficiência congênita da lactoferrina
- Granulação aumentada: gravidez, infecção, inflamação, anemia aplástica, anomalia de Alder – Reilly, leucemia neutrofílica crônica
- Vacuolização: infecção, intoxicação alcoólica, anomalia de Jordan, deficiência de carnitina.
- Corpos de Dohle: infecções, inflamação, queimadura, gravidez, LMA, síndromes mielodisplásicas, anomalia de May-Hengglin
- Material fagocitado: infecções bacterianas e fúngicas, malária, leishmaniose, mieloma múltiplo, carcinomas, tumor de Wilms, lúpus eritematoso sistêmico.

#### **II.6.2.2. Basófilo**

Os basófilos são capazes de realizar fagocitose, mas não está certo que esta seja sua principal função. Pela possibilidade de liberar histamina para fora das células, acredita-se que eles tenham função secretora, também parecem estar envolvidos em reações de hipersensibilidade imediata (pois possuem receptores IgE em sua membrana), como asma alérgica e algumas reações de hipersensibilidade tardia como alergias de contato. Seu tamanho é semelhante ao do neutrófilo, medindo de 10 a 14  $\mu\text{m}$  de diâmetro, apresentam núcleo central com 2 ou 3 lóbulos, com tamanho intermediário entre os dos neutrófilos e o dos eosinófilos. O citoplasma é abundante com grânulos grandes, grosseiros e uniformes, de cor preto-azulado, os quais são capazes de obscurecer o núcleo (figura 11). Os grânulos podem estar em número reduzido nas síndromes mieloproliferativas e mielodisplásicas e em

alergias agudas. No sangue periférico os basófilos são geralmente encontrados em pequenos números, se encontrados. A contagem varia de 0 a 100 células/mm<sup>3</sup> ou 0 – 1% (Falcão, 2001).



**Figura 11:** Basófilo do sangue periférico de indivíduo sadio (modificado de Heckner, 2000).

### II.6.2.3. Eosinófilo

Os eosinófilos medem de 12 – 17  $\mu\text{m}$  de diâmetro, ligeiramente maior que o neutrófilo. Tem núcleo com 2 ou 3 lóbulos (geralmente é bi-lobulado), citoplasma coberto por grânulos esféricos (eosinófilos) e grandes que coram-se de laranja-avermelhado, característica peculiar de alta afinidade dos grânulos pela eosina (Savi, 2002). (figura 12). Os grânulos são formados principalmente por uma proteína chamada de Proteína Básica Maior (PBM), esta é responsável pelas duas principais funções: mediação de processos inflamatórios associados a alergia, a defesa contra parasitas metazoários helmínticos, em certos distúrbios cutâneos alérgicos, neoplásicos e inflamação aguda. (Rue, 2001). Eosinofilia deve ser um parâmetro considerado quando ocorrer infecção parasitária, mas este aspecto merece relevância no conjunto dos fatores de diagnóstico de parasitoses e

jamais como indicador isolado de alguma patologia (Rue, 2001). Uma contagem normal de eosinófilos varia de 50 a 250 células/mm<sup>3</sup> ou 1 – 4%. Sua granulação é anormal em vários defeitos genéticos, incluindo a síndrome de Chediak – Higashi e anomalia de Alder – Reilly, onde os grânulos mostram-se cinza- esverdeados.

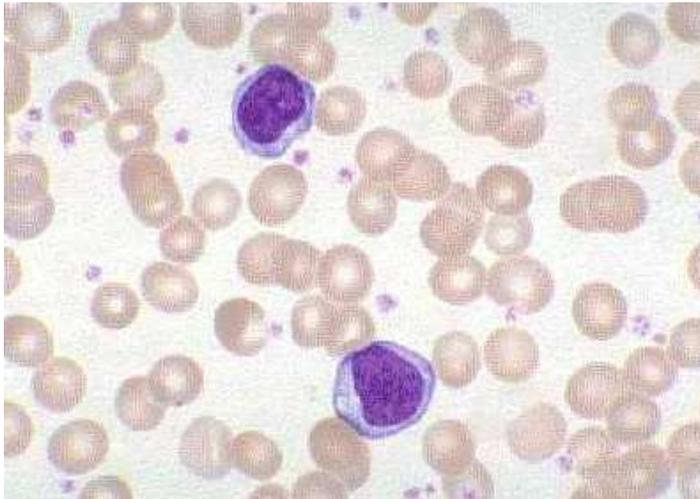


**Figura 12:** Eosinófilo do sangue periférico de indivíduo sadio (modificado de Heckner, 2000).

#### II.6.2.4. Linfócitos

Os linfócitos são pequenas células mononucleares sem grânulos no citoplasma. São os menores dentre os leucócitos, um pouco maiores do que as células vermelhas, contém 10 a 16µm de diâmetro. Apresentam núcleo redondo e homogêneo que fica intensamente corado, o citoplasma é escasso (figura 13). Eles são divididos em grupos, dos quais os principais são os linfócitos T, B e NK (*natural killer*). Os linfócitos B correspondem a 5 a 15% dos linfócitos, originam-se de um precursor da medula óssea e têm a função de sintetizar os anticorpos contra antígenos específicos. Já os linfócitos T têm a peculiaridade de completar seu processo de maturação no timo, têm a função de controle da resposta imunológica, em todos os níveis, desempenhando também e de forma específica a defesa contra agentes intra-celulares como vírus e células estranhas como enxertos alogênicos e células tumorais.

Estes linfócitos correspondem de 65 a 80% dos linfócitos circulantes. Por último, os linfócitos NK são a minoria das células linfóides em circulação e originam-se, como as demais, de um precursor linfóide na medula óssea. Sua principal função é de destruir células alvo, agindo sobre células tumorais e células infectadas por vírus (Nicola, 1989; Heckner 2000).

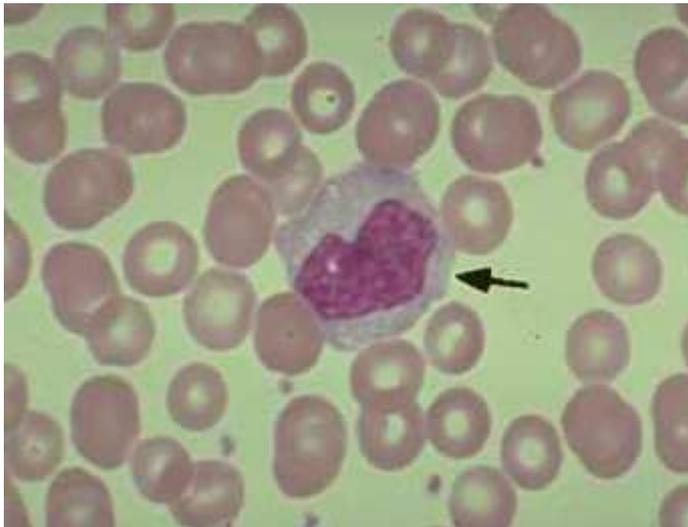


**Figura 13:** Linfócito do sangue periférico de indivíduo sadio (modificado de Heckner, 2000).

A estimulação ou ativação dos linfócitos leva a alterações fisiológicas que culminam também por alterar a sua morfologia, assumindo uma forma mais imatura (linfoblasto) ou mesmo linfoplasmocitose. Anormalidades morfológicas e hereditárias dos linfócitos acontecem na síndrome de Chediak – Higashi e na anomalia de Alder – Reilly.

### II.6.2.5. Monócitos

Os monócitos são as maiores células normais do sangue, com diâmetro de 12 a 20 $\mu$ m. São células de formato irregular com núcleo grande, oval ou dentado e posicionado centralmente, com citoplasma abundante, de coloração cinza ou azul claro acinzentado, com vários vacúolos e com pequenos grânulos finos. A cromatina é delicada, predominantemente frouxa, com estreitos filamentos ligando pequenas áreas de cromatina mais densa (figura 14). Sua principal função é a fagocitose de partículas grandes, corpos estranhos e destruição de células tumorais. Nos tecidos, os monócitos evoluem a macrófagos, que estão associados a vários estados infecciosos e inflamatórios, doenças malignas e as parasitoses. A contagem normal destas células é de 50 a 800 células/mm<sup>3</sup> ou 1- 8%, estas células têm meia-vida curta de 4 – 8 horas (Martinez-Pomares, 1996).



**Figura 14:** Monócito do sangue periférico de indivíduo sadio (modificado de Bain, 2004).

Os mais imaturos são chamados de monoblastos e os de diferenciação intermediária, de promielócitos, encontrados na medula óssea em condições normais.

### II.6.2.6. Principais Desordem dos Leucócitos

As desordens dos leucócitos podem ser divididas em dois grupos gerais: desordens não – proliferativas e proliferativas, conforme segue abaixo:

#### II.6.2.6.1. Não Proliferativas

- Neutrofilia: Infecção localizada (apendicite), infecção sistêmica (septicemia), acidose diabética, drogas tóxicas/químicas (ex: chumbo, corticosteroides), estímulos físicos/ emocionais, hemorragia e hemólise.
- Neutropenia: hipoplasia mieloide (agranulocitose), estágios iniciais de infecções e hiperesplenismo.
- Eosinofilia: doença alérgica (asma), desordens de pele (eczema), infestações parasitas, doenças infecciosas (febre escarlate) e síndrome de Loeffler.
- Eosinopenia: Estresse agudo e estados inflamatórios agudos.
- Basofilia: reações alérgicas, leucemia mieóide e policitemia Vera.
- Basopenia: em tratamento com corticoesteróides, infecções agudas e stress.
- Monocitose: estágio de recuperação de infecção aguda e endocardite bacteriana subaguda.
- Monocitopenia: em leucemias (Hairy cell).
- Linfocitose: infecções, pertussis “tosse comprida”, mononucleose infecciosa, infecção por citomegalovírus, toxoplasmose, desordens auto imunes (lúpus eritematoso sistêmico) e câncer.

- Linfocitopenia: desordens de deficiência imunológica (AIDS), casos avançados de doença de Hodgkin

#### II.6.2.6.2. Proliferativas

##### **Leucemias mieloproliferativas:**

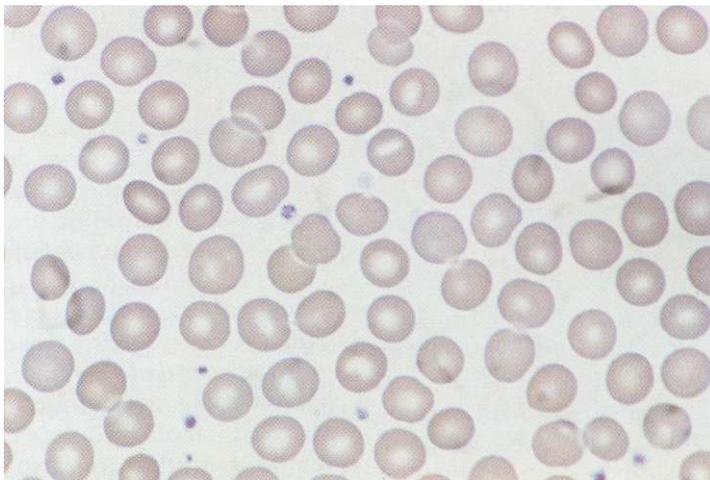
- LMA (leucemia mielóide aguda) – Leucemia mieloblástica aguda (M1 e M2), Leucemia promielocítica aguda (M3), Leucemia mielomonocítica aguda (M4 e M5) e síndrome DiGuglielmo/ eritroleucemia (M6).
- LMC (Leucemia mielóide crônica).
- Policitemia Vera - mielofibrose com metaplasia mielóide e síndromes mielodisplásicas – pré-leucemia.

##### **Leucemias linfoproliferativas:**

- Leucemia linfóide aguda (ALL).
- Leucemia linfóide crônica (CLL).
- Leucemia Hairy Cell.
- Linfomas malignos (Doença de Hodgkin e linfoma não – Hodgkin).

### II.6.3. Plaquetas

As plaquetas são pequenas células em forma de disco de aproximadamente 2 – 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro. No esfregaço sanguíneo são os menores elementos. São formadas de fragmentos do citoplasma do seu precursor, o megacariócito (presente na medula), e o tempo médio de vida é de 10 dias no sangue (figura 16). Sua membrana plasmática é rica em fosfolípidos e glicoproteínas, sendo as últimas receptoras para diversos fatores, como Von Willerbrand e o fibrinogênio, assim como responsáveis pelas funções de adesão, agregação e ativação plaquetária (Falcão, 2001). Esta pequena célula é muito importante pois tem as funções de hemostasia e coagulação sanguínea (contenção inicial do sangue). Uma contagem normal de plaquetas é na faixa de 140.000 a 440.000 células/ $\text{mm}^3$ .



**Figura 15:** Plaquetas do sangue periférico de indivíduo sadio (Heckner, 2000).

O tamanho das plaquetas pode ser avaliado ao microscópio comparando-se o diâmetro destas com a dos eritrócitos ou com micrometro ocular. Macrotrombócitos é a nomeação a plaquetas com tamanho acima de 4  $\mu\text{m}$  e esta alteração pode estar ligada a várias doenças congênitas (Síndrome de Bernard – Soulier, S. Epstein, S. Sebastian, anomalia de Chediak – Higashi, anomalia de May – Hengglin entre outras), ou adquiridas

(púrpuras, policitemia Vera, LMC, leucemia megacarioblástica entre outras) (Wendling, 1999).

### **II.6.3.1. Principais Desordens das Plaquetas**

As desordens de plaquetas podem ser classificadas como quantitativas (trombocitopenia ou trombocitose) ou qualitativas.

#### **II.6.3.1.1. Trombocitopenia**

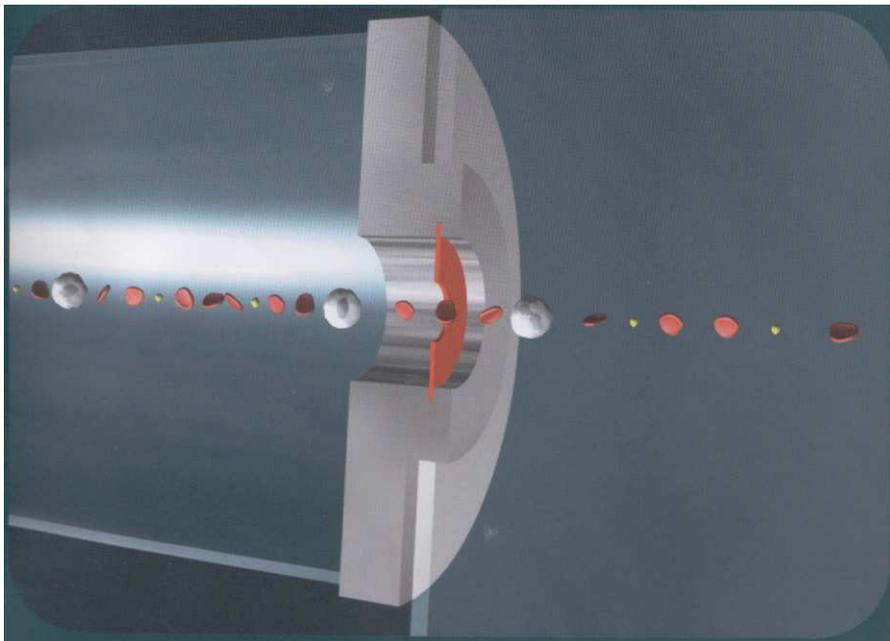
- Presença de petéquias ou púrpuras, que são hemorragias superficiais de coloração avermelhada ou purpúrica.
- Irradiação, drogas quimioterapêuticas, infiltração na medula óssea, púrpura trombocitopênica idiopática (PTI) e coagulação intravascular disseminada (CID).

#### **II.6.3.1.2. Trombocitose**

- Pós esplenectomia.
- Respostas a traumas e infecções.
- Policitemia Vera.

## II.7. METODOLOGIAS EM HEMATOLOGIA

Na maioria dos contadores hematológicos o princípio da contagem é baseado na impedância, que é a mudança de pulsos elétricos produzidos pelas células quando passam através de uma micro-abertura calibrada com dois eletrodos localizados em cada lado da abertura (Figura 16). As células, suspensas em um diluente (ABX diluent® (ABX Pentra 60® - Montpellier – França) condutor de corrente elétrica, passam através desta micro-abertura, aumentando a resistência do caminho elétrico entre os dois eletrodos, emitindo pulsos que são amplificados e analisados por um microprocessador. A amplitude (magnitude) de cada pulso elétrico indica o volume da célula. São feitas duas contagens de 10.000 células em 5 segundos, com um jato do fluido ABX cleaner® (Montpellier – França) entre as duas a fim de efetuar limpeza (Nascimento, 2002<sup>2</sup>).



**Figura 16:** Metodologia de impedância (Clinical Case Studies)

Outra metodologia encontrada em alguns contadores hematológicos é a citometria de fluxo. Esta técnica é útil em situações nas quais as células precisam ser contadas e separadas por subpopulações. Utiliza sondas fluorescentes que se fixam em determinados componentes das células quando combinados com amostra de sangue. A amostra é então processada por um método de difração de luz. Os padrões de difração das células marcadas pela fluorescência são específicos para certos tipos de células. O citômetro de fluxo é um sofisticado microscópio, com capacidade de analisar rapidamente múltiplas propriedades de células isoladas e suspensas num meio líquido. As células passam a uma velocidade muito rápida, em fila única, através de um feixe luminoso de grande intensidade. Cada célula emite sinais luminosos fluorescentes e espalhados ao atravessar o feixe de luz. Esses sinais luminosos são amplificados e convertidos em sinais elétricos, que estão digitados e processados, armazenados e exibidos graficamente por um computador.

Na amostra sanguínea com o diluente eletrolítico, as hemácias são lisadas (ABX Alphalyse® ABX Pentra 60® - Montpellier – França) e a partir daí três volumes dessa amostra são separados e transferidos para diferentes canais:

**A – *First Dilution Chanel*** – Câmara de primeira diluição;

**B - *Matriz de LMNE (LMNE matrix channel)*** – onde é dispensado o reativo (ABX Eosinofix® - Montpellier – França) que fixa o núcleo do eosinófilo com uma coloração específica. Os linfócitos e monócitos apresentam alterações diferenciadas: a membrana do linfócito se desloca completamente para o núcleo e a do monócito parcialmente. Os neutrófilos não são afetados pois possuem uma proteína protetora de membrana (Nascimento, 2002<sup>2</sup>)

**C – *RBC/PLT channel*** – Câmara de RBC e Plaquetas;

**D – *WBC/Baso channel*** Canal de contagem de leucócito.

Existem várias diferenças entre a contagem por automação e a contagem manual, entre elas as principais:

**A - Número de Células:** Na contagem manual são contadas entre 100 a 200 células, como preconizado por diversos autores (Koepke, 1985). Na automação o resultado liberado é obtido através de um maior número de células contadas, pois são duas contagens de 10.000 células (Nascimento, 2002<sup>1</sup>; Nascimento, 2002<sup>2</sup>), totalizando 20.000 células. A contagem manual vem sendo menos utilizada com o surgimento de novos equipamentos automatizados, a frequência em que é realizada gira em torno de 10% a 15% no departamento de hematologia do Hospital St. Mary's, London (Bain, 2005).

**B - Distribuição das Células:** A contagem manual é feita em esfregaço sangüíneo sobre lâmina de vidro onde a diferença de tamanhos, gravidades específicas, aderências entre os diversos tipos de leucócitos caracterizam uma distribuição irregular. Por se tratar de sangue sem anticoagulante, a maioria dos neutrófilos e dos monócitos se concentram nas margens e na cauda do esfregaço (Vallada, 1988; Wintrobe, 1979), diferente do visto na corrente sangüínea. Na automação se utiliza o sangue total com anticoagulante. As hemácias são lisadas em diluente eletrolítico. Cada tipo de leucócito, após corado e diferenciado, é agrupado e contado no momento da passagem da célula por uma micro-abertura, o que gera a emissão de pulsos elétricos. Na automação as duas contagens - relativa e absoluta - são executadas de modo semelhante, isto é, em um fluxo que tem uma distribuição semelhante à da corrente sanguínea.

**C - Linfócitos Típicos** – Há margem de erro de aproximadamente 25% na contagem manual de linfócitos, o que torna mais freqüente o achado de valores normais e elevados, quando comparada à automação (Dutcher, 1985).

**D – Monócitos e neutrófilos** - No esfregaço sangüíneo em lâmina de vidro, os monócitos se concentram no mesmo local que os neutrófilos (Vallada, 1998; Wintrobe, 1979) e estes, geralmente em maior quantidade. Na contagem manual, os neutrófilos são mais freqüentemente visualizados e assim, atinge-se, às suas custas, rapidamente uma contagem de 100 a 200 células, o que pode gerar um erro em torno de 10% a 100 % na contagem manual dos monócitos (Dutcher, 1985).

Grandes centros de patologia clínica, pelo alto volume de amostras em suas rotinas, vêm confeccionando esfregaços somente para amostras que tenham alarmes patológicos. O setor de hematologia do Centro de Medicina Diagnóstica Fleury (São Paulo SP, Brasil) confecciona esfregaços quando os parâmetros ultrapassam os limites de variação definidos pelo serviço ou para pacientes com diagnóstico prévio de doença hematológica e/ou investigando afecções como toxoplasmose, mononucleose e citomegalia. Nestes casos é gerado um alerta (*flags*) que obriga automaticamente a confecção de esfregaços (Toledo, 2002). A observação em esfregaço junto com os resultados da automação evitam erros de diagnóstico em um contexto clínico (Bain, 2005).

Mesmo com a tecnologia eletrônica a observação do analista clínico ao microscópio ainda é indispensável. Os elementos celulares patológicos chegam a ser registrados pelo aparelho, porém não são identificados sob o ponto de vista qualitativo. Começa aqui o campo do diagnóstico visual através do microscópio (Heckner, 2000). Para esse fim utiliza-se objetivas com aumento de 40 ou 50 e objetiva de imersão de 100 aumentos. O exame junto ao microscópio exige uma rigorosa disciplina, deve-se relacionar os dados da automação com os da microscopia e julgar se são condizentes. Na tabela 1 mostramos alterações

hematológicas não identificadas pelos contadores hematológicos.

**Tabela 1** – Alterações hematológicas não identificadas pelos contadores eletrônicos.

ERITROGRAMA	Policromatofilia Pecilocitose Eliptócitos Esferócitos Acantócitos Inclusões (Howell-Jolly, pontilhado basófilo) Células em alvo Rouleaux Drepanócito ou hemácia falciforme <i>Plasmódium falciparum</i> – Malária
LEUCOGRAMA	Granulações tóxicas Hipersegmentação Bastão de Auer Desvio à esquerda sem neutrofilia Corpos de Döhle Anomalia de Pelger-Huët Plasmócitos Linfócitos atípicos sem linfocitose Blastos <5%

Para os hemogramas com *flags* a distensão da lâmina e o exame microscópico são exigidos habitualmente. Os critérios para a confecção e avaliação das lâminas de esfregaço de sangue periférico estão na tabela 2 e os principais alarmes patológicos são os seguintes:

**A - RBC:** macrocitose, microcitose e hipocromia;

**B - WBC:** linfocitose, linfopenia, neutrocitose, neutropenia, monocitose, eosinofilia, blastos, basófilos, leucocitose e linfócitos atípicos;

**C - PLQ:** macroplaquetas, trombocitose e trombopenia.

**Tabela 2** – Parâmetros numéricos de limites do serviço de hematologia do Unilab (Laboratório de Unidos de Pesquisas Clínicas Ltda – Porto Alegre – RS –BR).

Eritrócitos (milhões/ $\mu$ L)	<4,0	>5,8
Hemoglobina (g/dL)	<11,0	>18,0
Hematócrito (%)	< 35,0	>53,0
VCM (fL)	<80	>100,0
HCM (pg)	<27,0	>33%
CHCM (%)	<32,0	>36,0
RDW (%)	<11,0	>15,0
Leucócitos (/ $\mu$ L)	<3600	>12000
Neutrófilos (/ $\mu$ L)	<1500	>8000
Neutrófilos (%)	<45	>70
Linfócitos (/ $\mu$ L)	<800	>4500
Linfócitos (%)	<20	>50
Monócitos (/ $\mu$ L)	<100	>1000
Monócitos (%)	2	>10
Eosinófilos (/ $\mu$ L)	0	>700
Eosinófilos (%)	0	>7
Plaquetas (/ $\mu$ L)	<100000	>500000

A metodologia de automação tem sido cada vez mais utilizada nos laboratórios de análises clínicas, tornando necessário estudos que venham determinar a confiabilidade destes aparelhos em nosso meio. Este estudo vem contribuir com os já existentes sobre o analisador automático ABX Pentra 60<sup>®</sup> (Montpellier – França).

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1 OBJETIVO GERAL**

Comparar os resultados dos hemogramas do analisador automático ABX Pentra 60® (Montpellier – França) do Unilab – (Laboratório Unidos de Pesquisas Clínicas Ltda) com a microscopia óptica e determinar a concordância entre os dois métodos, avaliando assim o desempenho do contador automático.

#### **III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Permitir a criação de protocolos para liberação automática de hemogramas, sem necessidade de exames complementares, e programar a necessidade de profissionais no setor de hematologia.

#### IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABX Diagnostics - *Pentra 60 - User Manual*. Montpellier, France, 1999.
- ARROYO ME, TABERNERO MD, GARCIA MMA, ORFAO A. Analytic performance of the Pentra 80 automated blood cell analyzer for the evaluation for normal and pathologic WBCs. *Am J Clin Pathol* 2005 Feb; 123(2):206-14.
- BAIN JB. *Células Sanguíneas – Um guia prático*, 3<sup>rd</sup> ed, Porto Alegre: Artmed; 2004. p 12 – 121.
- BAIN JB. Diagnosis from the blood smear. *N Engl J Med* 2005 aug 4; 353(5):498-507.
- BRECHER G, SCHNEIDERMAN M, CRONKITE EP. The reproducibility and constancy of the platelet count. *Am J Clin Pathol* 1953 Jan; 23 (1): 15-26.
- COHEN AM, CYCOWITZ Z, MITTELMAN M, LEWINSKI UH, GARDYN J. The incidence of pseudothrombocytopenia in automatic blood analyzers. *Haematologia (Budap)* 2000; 30(2):117-21.
- COUTINHO V, COUTINHO AM. Alterações dos eritrócitos. In: ZAGO MA, FALCÃO RP, PASQUINI R. editors. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. Produção, dinâmica e função das células sanguíneas. São Paulo: Editora Atheneu; 2001. 8: 77 - 85.
- DALE JC. Preanalytic variables in laboratory testing. *Lab Med* 1998; 29: 540-5.
- DAWSON B. *Basic & Clinical biostatistic*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2001.p 115-7.
- DUSSE LMS, VIEIRA LM, CARVALHO MG. Pseudotrombocitopenia. *J Bras Patol Med Lab* 2004 Oct; 40 (5): 321 – 4.
- DUTCHER TF. Automated differentials: a strategy. *Blood Cells* 1985; 11: 49 - 59.

- FALCÃO RP, CALADO RT. Heterogeneidade das células do sangue. Órgãos hematopoéticos e linfopoéticos. In: ZAGO MA, FALCÃO RP, PASQUINI R. editors. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. Produção, dinâmica e função das células sanguíneas. São Paulo: Editora Atheneu; 2001. 1: 03 - 13.
- FERRERO CV, SUDAKA I, JAMBOU D, VANHAEKE D, FISCHER F, BAYLE J. Evaluation of the ABX Cobas Veja automated hematology analyzer and comparison with the Coulter STKS. *Hematol Cell Ther* 1997 jun; 39: 149 - 58.
- FIORIN F, STEFFAN A, PRADELLA P, BIZZARO N, POTENZA R, DE ANGILIS V. IgG platelet antibodies in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia bind to platelet membrane glycoprotein IIb. *Am J Clin Pathol* 1998; 110(2): 178 - 83.
- GALLO ROCHA HHA, VIEGAS J, MARCHARETT S, BARRETO RM. Estudo da interferência do anticoagulante EDTA nos analitos do hemograma, relacionados ao tempo pós-coleta. *Laes & haes* 1997; (109): 126 – 32.
- GRIMALDI E., SCOPACASA F. Evaluation of the Abbott CELL-DYN 4000 hematology analyzer. *Am J Clin Pathol* 2000; 113(4): 497 - 505.
- HANDIN RI. Inherited platelets disorders. Am Soc of Hematol Educ Program 2005; 396 – 402. URL: <http://www.asheducationbook.org/cgi/content/full/2005/1/396>.
- HANSON SR, SLICHTER SJ. Platelet kinetics in patients with bone marrow hypoplasia: evidence for a fixed platelet requirement. *Blood* 1985; 66(5): 1105 - 9.
- HECKNER F, FREUND M. *Hematologia: Microscopia Prática*. 9 ed. São Paulo: Editora Santos; 2000 p13 – 17.
- HOEDEMAKERS RM, PENNING S JM, HOFFMAN JJ. Performance characteristics of blast flagging on the Cell Dyn 4000 haematology analyzer. *Clin Lab Haematol* 1999 Oct; 21(5): 347-51.
- ICSH Expert Panel on Citometry. Recommendations of the International Council for Standardization in Haematology for ethylenediaminetetraacetic acid anticoagulation of

bood for blood cell counting and sizing. *Am J Clinical Pathology* 1993 oct; 100(4): 372 - 2.

ITALIANO JJ, LECINE P, SHIVDASANI R, et al. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet process produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999 Dec 13; 147(6): 1299 - 312.

KOEPKE, JA . The white blood cell differential. *Blood Cells* 1985; 11: 1-150.

LANZA F, STIERLE A, FOURNIER D et al. A new variant of Glanzmann`s thrombasthemia (Strasbourg I). Platelets with functionally defective glicoprotein IIb – IIIa complexes and a glicoprotein IIIa 214 Arg – 214 Trp mutation. *Journal Clinical Invest* 1992; 89: 1995 – 2004.

MARTINEZ-POMARES L, PLATT N, MCKNIGHT AJ, et al. Macrophage membrane molecules: Markers of tissue differentiation and heterogenety. *Imuno Biology* 1996; 195: 407 – 16.

MATSUNO K, ISHIZUKA S. New technology of automated blood cell differential counting. *Rinsho Byori: Rinsho Byori* 1998 apr; 46(4): 361-6.

MULL JD, MURPHY WR. Effects of tourniquet – induced stasis on blood determinations. *Am J Clin Pathol* 1993; 39: 134 – 6.

NAKUL AD, SUDAKA SI, FERRERO VC, et al. Evaluation of the Sysmex xe 2100 hematology analyzer in hospital use. *Journal Clinical Anal* 2003; 17(4): 113 – 23.

NASCIMENTO MLP. Pentra 120 Ret ABX: Importância do alarme microcyte e os novos índices reticulocitário. *NewsLab* 2001; 47: 152-164.

NASCIMENTO MLP. Monócitos, os resultados da Automação e Amostras Hospitalares. *Labor News* 2002<sup>1</sup> Aug; 12 (118): 24 – 28.

NASCIMENTO MLP. Leucócitos e Automação: o Significado e a Interpretação das Contagens Diferenciais Relativa e Absoluta. *Laes & Haes* 2002<sup>2</sup> Aug/Set: 23 (138): 136 - 58.

- NICOLA NA. Hematopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem.* 1989; 58: 45 - 77.
- PENG L, GAO X, JIANG H, PENG Z, SU J. Laboratory evaluation of the Sysmex SE-9500 automated haematology analyzer. *Clin Lab Haematol* 2001 aug; 23(4): 237 - 42.
- REGO EM. Hematopoese. Regulação e microambiente. In ZAGO MA, FALCÃO RP, PASQUINI R editors. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. São Paulo: Editora Atheneu; 2001; 2: 15 – 21.
- RUE ML. Eosinofilia devida a parasitas. *RBAC* 2001; 33 (4): 221 - 3.
- RUMKE CL. The imprecision of the ratios of two percentages observed in differential white blood cell counts: a warning. *Blood Cells* 1985; 11: 137 – 40.
- RYAN DH. Automated Analysis of Blood Cells. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ & Silberstein LE eds. *Hematology – Basic Principles and Practice* 2<sup>nd</sup> ed. New York: Churchill Livingstone 1995, p 2223-35.
- SAVI LA, PALUDO R, MIRANDA ML, HAAS P. Colorações Hematológicas utilizadas em exames laboratoriais. *NewsLab* 2002; 51: pg 90 –103.
- SCHREZENMEIER H, MULLER H, GUNSILIUS E, HEIMPEL H, SEIFRIELD E. Anticoagulant-induced pseudothrombopenia and pseudoleukocytosis. *Thromb Haemost* 1995; 73: 506 –13.
- SIEKMEIER R, BIERLICH A, JAROSS W. The white blood cell differential: three methods compared. *Clin Chem Lab Med* 2001 may; 39(5): 432 – 45.
- SANDER HW, CONIGLIARI MF, MASDEU JC. Antecubital phlebotomy complicated by lateral antebrachial cutaneous neuropathy. *N Engl J Med* 1998; 339(27): 2024.
- TOLEDO AJO. Hemograma – interpretação técnica. São Paulo, [www.fleury.com.br](http://www.fleury.com.br) 2002: 1 – 5.
- VALLADA EP. *Manual de Técnicas Hematológicas*. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu 1988, p. 90

- VAN DER MEER W, ALLEBS W, SIMON A, VAN B, BERKEL Y, DE KEIJZER MH. Pseudothrombocytopenia: a report of a new method to count platelets in a patient with EDTA and temperature independent antibodies of the IgM type. *Eur J Haematol* 2002 Oct; 69 (4): 243-7.
- VAN KAMPEN EJ, ZIJLSTRA WG. Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives. *Adv Clinical Chemistry* 1983; 23: 139 - 43.
- VAN VLIET HH, KAPPERS-KLUNNE MC, ABELS J. Pseudothrombocytopenia: a cold auto-antibody against platelet glycoprotein GP IIb. *Br J Haematol* 1986; 62 (3): 501 - 11.
- YAMAMURA R, YAMANE T, HINO M, OHTA K, SHIBATA H, TSUDA I, TATSUMI N. Possible automatic cell classification of bone marrow aspirate using the Cell Dyn 4000 automatic blood cell analyzer. *J Clin Lab Anal* 2002; 16(2): 86-90.
- WENDLING F. Thrombopoietin: its role from early hematopoiesis to platelet production. *Haematologica* 1999 Feb; 84 (2): 158 - 66.
- WEISSMAN IL. Stem cell: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157 – 168.
- WILLIAMS WJ, BEUTLER E, ERSLEV AJ, RUNDLES RW. *Hematologia* 1 st ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1976, p70 – 71.
- WINTROBE MM, LEE GR, BITHELL, TC; BOGGS DR, ATHENS JW. *Hematologia Clínica* 4th ed,, Buenos Aires: Inter-Médica Editorial; 1979, p26 – 27.
- WITTEKIND D. On the nature of the Romanowsky dyes and the Romanowsky Giemsa effect. *Clin Lab Haematol* 1979; 1: 247 -62.
- ZAGO MA, FALCÃO RP, PASQUINI R. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. Produção, dinâmica e função das células sanguíneas. São Paulo: Editora Atheneu; 2001. 1: 3 - 13.
- ZAGO MA Eritropoese e eritropoetina. Produção e destruição das hemácias. In: ZAGO MA, FALCÃO RP, PASQUINI R. editors. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. Produção, dinâmica e função das células sanguíneas. São Paulo: Editora Atheneu; 2001. 3:23-31.

## COMPARISON OF COUNTER ABX PENTRA 60<sup>®</sup> AUTOMATED ANALYSIS OF BLOOD CELLS AND BLOOD SMEAR MICROSCOPY EXAMINATION

Felipe Goulart Monteiro<sup>1,2</sup>, Lúcia Mariano da Rocha Silla<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

**Financial Support:** FIPE/HCPA

**Correspondence Address:** [gmfifo@hotmail.com](mailto:gmfifo@hotmail.com)

**Key Words:** Blood, Automated blood counting, optical microscopy.

## Abstract

The blood counting is a routine laboratorial test which is done to have a quantitative and qualitative evaluation of the elements present in the peripheral blood. The complete test should contain the eritrogram, the leucogram, the platelet counting, and a description of the observation of the blood smear. Nowadays the clinical laboratories would not be able to efficiently analyze the great volume of samples that they daily receive without the speed and ability of modern automated systems in hematology. The automated systems offer high sensibility and accuracy in the quantification of the blood cells. The aim of this study was to compare the results of blood counts obtained by the automated blood counter ABX Pentra 60<sup>®</sup>, broadly used in the routine of the clinical laboratories with the results obtained by the analysis of blood smear in the optical microscopy, and to determine the agreement between these two methods. A thousand blood samples from adults were used for the accomplishment of blood counts. Each sample was analyzed by the automated blood counter and by use of optical microscopy also. From all of the blood counts accomplished by the equipment, 40,1% were considered abnormal and the optical microscopy blood smear analysis revealed abnormalities in 39,9% of the blood smears. A very great agreement values were found for the counting of the white and red blood cells, and good agreement values for the platelets. The ABX Pentra 60<sup>®</sup> was shown satisfactory for the routine in the clinical laboratory; it is easy handling and it shows the main Flags in a safe way. We suggest that the results with normal blood counting and excellent agreement counting ( $Kappa > 0.93$ ) could be directly liberated from the automated system without a complementary evaluation by the professionals. From the managerial point of view this condition could to reduce 86% of worked hours in the clinical laboratory.

## Introduction

The blood cells counting is a routine laboratorial test commonly utilized in the clinical practice for qualitative and quantitative assessment of the cellular elements of peripheral blood, not only as a tool for diagnosis but also for the follow up of various illnesses. It accesses the red blood cells, white blood cells and platelets counts, and the microscopic examination of blood smear which is considered the gold standard for evaluation of the cells morphology. The leucocytes manual counting was used for a long time before the arrival of the automated systems for blood cell counting (1,2,3).

Several automated systems for blood counting was developed since the introduction of the automated technology for blood counting in 50's. These systems provided more accuracy and agility during the blood counting in the clinical laboratories. The most sophisticated models of automated blood counting systems were developed in 80's. These automated systems are fundamental for the analysis of the increased number of samples which is remit to the clinical laboratories. These systems offer high sensibility and accuracy for the blood counting and for the leucocytes differential counting (4,5).

Some samples analyzed by the automated systems require the evaluation of blood smear microscopy examination for evaluation of morphological abnormalities (4). The automated systems for blood counting were used in the majority of clinical laboratories, and the blood smear microscopy examination is only performed on selected situations which varies according to the protocols of each laboratory (6).

Even with the automated systems for blood counting the blood smear microscopy examination by clinical analyst is still necessary. The pathological cell elements can be registered by the equipment, however, some elements are not identified by the automated systems. Thus, the microscopy examination of blood smear requires a severe discipline and the association with the others parameters obtained in the automated analyzer also (7).

The automated systems printed some alarms or flags in the situations that occur possible abnormalities. Due to the large variability of flags and the dissemination of the use of automated systems for blood counting, it is recommended that each laboratory established some standard procedures in the situations that occur flags.

A new generation of automated systems has been used in the routine of the clinical laboratories, including the Sysmex SE- 9500<sup>®</sup> (Ramsey, Minnesota - USA), ABX Cobas Veja<sup>®</sup> (Montpellier - France), Cobas Argos 5 diff<sup>®</sup> (Roche - Switzerland), Coulter STKS<sup>®</sup> (Fullerton, California - USA), ABX Pentra 80<sup>®</sup> (Montpellier - France), Abbott CELL DYN 4000<sup>®</sup> (Illinois - USA), Bayer Advia<sup>®</sup> (Holliston, Massachusetts - USA) and ABX Pentra 120<sup>®</sup> (Montpellier - France) (7-13).

Siekmeier *et al.* (2001) investigated the association between ABX Pentra 120<sup>®</sup> (Montpellier - France), Coulter STKS<sup>®</sup> (Fullerton, California - USA) and microscopic examination of blood cells, and this study reported a agreement for neutrophiles, lymphocytes and eosinophiles. However, it was found Kappa = 0,581 for the correlation to monocytes. It was also observed a poor correlation for immature cells, including mielocytes, metamielocytes and promielocytes (8). A poor correlation to the basophiles was already described in literature (9,14).

Peng *et al.* (2001) reported a close correlation between the results of red blood cells, white blood cells and platelets counts obtained by the Sysmex SE-950<sup>®</sup> (Ramsey, Minnesota - USA) and obtained by the microscopic examination (9).

Arroyo *et al.* (2005) recently reported a good association between the results of relative counting of neutrophiles, lymphocytes, eosinophiles and immature cells obtained by ABX Pentra 80<sup>®</sup> (Montpellier - France) and obtained by the microscopic examination of blood smear (7).

The automated system CELL DYN 4000<sup>®</sup> (Illinois - USA) presented a good correlation with the microscopic examination of leucocytes differential counting (14). Some studies has been reported the association between the flags for blast cells and the presence of these cells in the microscopic examination. A high number of false positives was observed in the flags of automated systems. A careful microscopic examination of the blood smear increases the sensibility of these findings (10, 11).

Ferrero *et al.* (1997) investigated the association between the results obtained by ABX Cobas Veja<sup>®</sup> (Montpellier - France), Couter STKS<sup>®</sup> (Fullerton, California - USA) and the microscopic examination of blood film, and a good association between the parameters was observed, except eosinophiles and monocytes. A high value of false positive flags for blasts was reported (15).

A study investigated platelets counting using CELL DYN 4000<sup>®</sup> (Illinois - USA) reported 60 cases of thrombocytopenia. However, 17% of these results were false. The microscopic examination of platelets must be done to prevent errors during the investigation of thrombocytopenia (12).

The automated systems has been more used in the clinical laboratories around the world. The aim of this study was to establish a protocol for the direct liberation of results obtained by ABX Pentra 60<sup>®</sup> (Montpellier - France) without the microscopic examination of blood film. We also investigated the real necessity of qualified professionals at the hematology field.

## Materials and Methods

We studied 1000 blood samples (aleatoric) from adults collected during July and December of 2004. The samples of inpatients and outpatients were kindly given away by UNILAB - Laboratórios Unidos de Pesquisas Clínicas Ltda, Porto Alegre, RS, Brazil. These blood samples were analyzed in ABX Pentra 60<sup>®</sup> (Montpellier - France) which is an automated system manufactured by Horiba ABX that analyses samples through the principle of measurement Double Hydrodynamics Sequential System (DHSS) and Multi-Distribution Sample System (MDSS) which matches cytochemistry, impedance and flux cytometry. DHSS is a technology owned by ABX that makes possible to measure the volume and content of a cell in a single cell flow. MDSS ensures a perfect blend and homogenization between samples and reagents with just one small quantity of samples. This equipment provides 26 parameters of analysis with a complete differential in five parts, including atypical lymphocytes and large immature cells (16).

The microscopic examination of blood smears were evaluated by the author. All samples were investigated, including the samples that presented flags during the automated analysis. On the first 100 samples the blind reading (accomplished with no access to the numerical data of automation) was compared to the reading made by other two professionals.

The peripheral blood samples were previously collected by an experienced professional. The collected of blood samples was realized according standard technique. It was used alcohol 70%, tourniquets and safety equipment in order to disinfect the site. The anticoagulant used for the service was EDTA to prevent some alterations (17).

After the collection, the samples were sent to the Hematology Department of UNILAB

to be processed. Firstly, the samples were put inside of an agitator, then they were processed on the electronic blood cell counter ABX Pentra 60<sup>®</sup> (Montpellier - France) and simultaneously numbered with their respective blades. Glass blades (24 x 76 mm) clean and degreased were used for a good blood distension. A drop of the blood sample was put in the blade with a capillary tube, leaving the distension under an angle of 25° to 40° with a fast movement.

Those blades were dyed according to the pattern of the UNILAB by the dye Panótipo Rápido that uses essential components of Romanowsky's (18) dye, a basic component (cationic) methylene blue, which gives a blue color to the nucleic acids (DNA and RNA) and to nucleoproteins, granules of basophiles and slightly to the granules of neutrophiles, besides an acid dye (anionic) like eosin which gives an orange color to hemoglobin and slightly to the granules of eosinophiles.

The smears were provided to the author for microscopic analysis without his acknowledgement about the results of automation ("blind microscopy"). The microscopic examination was performed through an Olympus<sup>®</sup> equipment with oculars of 10x and 40x and an immersion objective of 100x. The author followed a rigorous criterion of reading observing the 3 cell series, making numerical counting and observing possible morphological changes.

The manual microscopic examination started by the red blood cells with the analysis of the dying and possible morphological alterations. Later, the white blood cells were analyzed. The total counting of leucocytes was made through a manual counter evaluating 100 cells. Following, the morphology analysis of the white cells was accomplished with more attention to atypical neutrophiles, leucocytes and monocytes. Finally, the general counting of the platelets and their quality was evaluated. The fonio reading was used to compare the results of the equipment with microscopy. This method is based on a counting of

erythrocytes and platelets in fields. It is made an average of the quantity of erythrocytes and platelets by field and calculated a rule of three with the total values of erythrocytes.

A comparative study between normal blood counts and the main Flags of the automatic analyzer ABX Pentra 60<sup>®</sup> and the optical microscopy was performed.

Among the main flags are: RBC - red blood cells: macrocytosis (VCM > 100), microcytosis (VCM < 80) and hypochromy (HCM < 27); WBC - White blood cells: lymphocytosis (> 4500  $\mu$ L), lymphopenia (<1000  $\mu$ L), neutrocytosis (>8000  $\mu$ L), neutropenia (<1500  $\mu$ L), monocytosis (>1000  $\mu$ L), eosinophilia (>800  $\mu$ L), immature cells, leukocytosis (>11000  $\mu$ L) and atypical lymphocytes; and PLQ - platelets: thrombocytosis (> 500000  $\mu$ L), thrombocytopenia (< 100000  $\mu$ L), macroplatelets and platelets aggregate.

The statistical analysis was performed with the SPSS program, version 8.0, through an agreement measurement between two measures called "Kappa coefficient". This method will offer a value between zero and 1, so that as closer it is of 1 the agreement between the automation results and microscopy will be higher  $\alpha \leq 0,05$  was considered significant.

**Table I:** Values of concordance (Kappa).

<u>Kappa value</u>	<u>Concordance</u>
Negative - 0	Without
0,01 – 0,2	Poor
0,21 – 0,4	Weak
0,41 – 0,6	Reasonable
0,61 – 0,8	Good
0,81 – 0,92	Very good
0,93 – 1,00	Excellent

Adapted from Dawson 2001 (19).

The samples used in this study deriving from the laboratory routine and do not characterize any addition to behaviors, treatments or questionings close to the patients. So, it is not perceived the necessity of their consent. This research was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## Results

The correlation between the results obtained by the author in the optical microscopy and by the other two observers was satisfactory, and do not have any significant disagreement between them (table II).

**Table II:** Correlation between the three clinical analysts with the respective values of agreement.

<u>Variables</u>	<u>Kappa 1 vs 2</u>	<u>Kappa 1 vs 3</u>	<u>Kappa 2 vs 3</u>
<u>RBC</u>	0,852	0,740	0,651
Macrocytosis	**	**	**
<b>Microcytosis</b>	0,852	0,740	0,651
Hypochromy	**	**	**
<b>WBC</b>	0,890	0,865	0,796
Lymphocytosis	0,740	1,000	0,740
Lymphopenia	0,968	0,967	0,935
Neutrocytosis	0,964	0,962	0,926
Neutropenia	0,898	0,951	0,841
Monocytosis	0,880	0,842	0,769
Eosinophilia	1,000	0,795	0,795
LIC/RM	0,942	1,000	0,942
Leukocytosis	1,000	0,957	0,957
Atypical lymphocytes	1,000	1,000	1,000
<b>PLQ</b>	0,795	0,559	0,481
Thrombocytosis	**	**	- 0,15
Thrombocytopenia	1,000	1,000	1,000
Macroplatelets	1,000	0,662	0,662

\*\* The values were analyzed by agreement test and there was no discrepancy between them.

The frequency of normal and abnormal results obtained by the analysis in ABX Pentra 60<sup>®</sup> were 59,9% and 40,1%, respectively.

The abnormal findings in the red blood counting (RBC) occurred in 4,9% of those samples, the microcytosis being the most frequent (65,3%), followed by the macrocytosis (32,6%) and hypochromy (8,1%)\*. At the white blood counting (WBC) the automated system determined abnormalities in 37,6% of the samples, and the lymphopenia was the most frequent finding (table III).

The platelet counting was abnormal in 4,8% of the samples with thrombocytosis in 54,1%, thrombocytopenia in 33,3% and macroplatelets were seen in 10,4% of the platelet alterations. The equipment ABX Pentra 60<sup>®</sup> (Montpellier - France) revealed 15 cases of platelet aggregates.

The optical microscopy of red blood cells showed abnormalities in 39,9% of the smears, and 60,1% were normal. At the red blood count (RBC) occurred alterations in 4,7% of the samples, being the microcytosis the most frequent alteration (70,2%), followed by macrocytosis (29,7%) and hypochromy (10,6%)\*. \*In some samples it was observed more than one alteration, as it was expected. At the white blood count (WBC) the equipment determined abnormalities in 36,9% of the samples, being the lymphopenia the most frequent finding (table III).

**Table III.** Alterations of WBC in the automated and manual methods.

<b>WBC Alterations</b>	<b>Automatic Method % *</b>	<b>Manual Method %*</b>
Lymphocytosis	9,04%	10,84%
Lymphopenia	50,53%	51,49%
Leukocytosis	31,38%	32,79%
Neutrocytosis	48,13%	50,40%
Neutropenia	27,92%	27,10%
Monocytosis	40,95%	37,39%
Eosinophilia	12,50%	12,73%
Immature Cells (LIC)	18,08%	16,80%
Atypical Lymphocytes	8,24%	7,58%

The optical microscopy of platelets was abnormal in 4,7% of the smears with thrombocytosis in 53,1%, thrombocytopenia in 34,0% and macroplatelets were seen in 14,8% of the platelet alterations\*.

The statistical analysis comparing the results of red, white and platelet series obtained by the automation method and microscopy is represented in the table IV.

**Table IV:** Correlation between the results obtained by ABX Pentra 60<sup>®</sup> and by the optical microscopy. Kappa values were expressed.

Variables	Kappa	Kappa
<b>ABX Pentra 60 x Microscopy</b>		
<b><u>RBC</u></b>	0,912	Very good
<b>Macrocytosis</b>	0,932	Excellent
Microcytosis	0,920	Very good
Hypochromy	0,888	Very good
<b><u>WBC</u></b>	0,947	Excellent
Lymphocytosis	0,832	Very good
Lymphopenia	0,948	Excellent
Neutrocytosis	0,943	Excellent
Neutropenia	0,951	Excellent
Monocytosis	0,856	Very good
Eosinophilia	0,933	Excellent
LIC/RM	0,885	Very good
Leukocytosis	0,948	Excellent
Atypical Lymphocytes	0,878	Very good
<b><u>PLQ</u></b>	0,635	Good
Thrombocytosis	0,698	Good
Thrombocytopenia	0,619	Good
Macroplatelets	0,665	Good

\* Some samples presented more than one alteration.

## Discussion

In this study we evaluated the performance of the automated system ABX Pentra 60<sup>®</sup> and compared these results with the results obtained by microscopic examination. This allow us to test the protocols for direct liberation of results without the microscopic exam, and we can to establish the necessity of professionals for the hematology department.

In this study excellent values of agreement were found for the counting of eosinophiles, neutrophiles and lymphocytes, corroborating Grimaldi and Scopacasa studies in 2000 (14), who showed an excellent correlation to another equipment.

We also found good results with a good value of agreement for the pathologic alarm of the immature cells (LIC/RM) different of the one found by Hoedemarkers and collaborators in 1999 (10), with an equipment Cell Dyn 4000<sup>®</sup> (Illinois - USA), and Ferrero in 1997 (15), with ABX Cobas Veja<sup>®</sup> (Montpellier - France), and Couter STKS<sup>®</sup> (Fullerton, California - USA). These researchers observed an erroneous indication for the presence of blasts.

A false low counting of platelets (pseudothrombocytopenia) may occur in blood samples collected with EDTA. This reduction on the counting is consequent to the agglutination of platelets or, more rarely, to the formation of platelet roses around the neutrophiles, a phenomenon referred to as *platelet satellitism* (13). Some authors have been proposing that self-antibodies existent in the plasma recognize and attach, at the presence of EDTA, to an epitope of glycoprotein IIb (GPIIb), an integrant to the complex GPIIb/IIIa of the platelet surface promoting platelets aggregates (20-22). The agglutination of platelets may result at the formation of aggregates of similar size to the leucocytes, and the automated counter is unable to distinguish such aggregates, recognizing them as leucocytes and providing a falsely elevated counting or a pseudoleukocytosis (23). This fact was not observed in this study.

The awareness about the clinical data of patient presents high importance to prevent the liberation of incorrect results. The careful assessment of the blood smear is vital for the characterization of pseudothrombocytopenia cases, since through it will be evident the presence of platelet aggregates that, in general, are more frequent at the end of the blood smear tail. The critical observation of histogram may also suggest a condition of pseudothrombocytopenia (24). The diagnostic may be confirmed through the platelets counting at sodium citrate at 3,8% immediately after the collection (25).

At the present study it was observed 15 cases of flags of platelet aggregates on the automated system. Only 3 of those cases were also followed by thrombocytopenia flags. When analyzed microscopically, the platelet aggregates in smears were proved in 100% of those cases, corroborating the works of Dusse in 2004 (24), Cohen in 2000 (12), and Van Der Meer in 2002 (25), who observed pseudothrombocytopenia in their studies. Cohen, in 2000 (12), still emphasizes that a good microscopic inspection may prevent the mistake of a diagnostic of pseudothrombocytopenia.

The other 12 cases of platelet aggregates found by the automation may be up to the configuration of the equipment's sensibility for this parameter (16), as platelet aggregates were not found in those cases.

The reports with no alteration issued by the automation equipment do not have a careful microscopic inspection and are automatically liberated in the majority of clinical laboratories. The intervention of a qualified professional only happens when the equipment inform some pathologic alarms (Flags), then the observation of the blood smear becomes mandatory, so that the laboratories are able to guarantee quality and reliance in their final report. Usually the laboratories associated to hospitals that have a elevated volume of tests in their routine must have a special care, since many blood tests are likely to be associated to any alteration. Nevertheless, some laboratories analyze a large volume of blood tests

daily and need many professionals to review all this process, being economically unfeasible, so, with a protocol of direct liberation of normal results of blood counting the laboratories will have more agility with the service and, from the managerial point of view, a reduction at the fixed costs with professionals of this area.

ABX Pentra 60<sup>®</sup> showed to be satisfactory for the routine of the clinical laboratory because it is easy handling and safely indicates the main Flags. The statistical analysis of the 1000 blood samples showed an excellent correlation between the pathological alarms of the equipment ABX Pentra 60<sup>®</sup> and microscopy, with a good correlation to the platelets.

From the managerial point of view we can establish a protocol for direct liberation of blood tests, thus reducing the fixed costs with dyes, blades, capillary tubes, among others. We suggest the direct liberation without reviewing the smear in the cases of normal values for all parameters. We will make revision of the smear whenever we have results from the equipment with the following Flags: platelet aggregates, immature cells, thrombocytosis, thrombocytopenia and leukocytosis. We should revise samples either when they come from hospitals, or the patient have an historical of hematological sickness, or when the results surpass the value stipulated by the department for a better final report.

The Laboratory UNILAB has a monthly routine of 3.000 blood cells counting, and approximately 14% of them needed be revised according the criterion listed above. Approximately 14 blood smears needed be revised by microscopic examination every day. Approximately 100 blood smears should be revised by microscopic examination every day without the automated system for blood cell counting. Considering that a qualified professional must evaluate approximately 100 blood smears by day, this condition could to reduce 86% of worked hours and to propitiate a reduction in the number of professionals.

## **Aknowledgement**

The authors thank Alan Birk for his important collaboration at the statistical analysis. We also thank Celito Luiz Diel, Rafael Failace and Alzira do Carmo Aquino for their colaboration.

## References

1. RUMKE CL. The imprecision of the ratios of two percentages observed in differential white blood cell counts: a warning. *Blood Cells* 1985; 11: 137 – 40.
2. DUTCHER TF. Automated differentials: a strategy. *Blood Cells* 1985; 11: 49 - 59.
3. NAKUL AD, SUDAKA SI, FERRERO VC, et al. Evaluation of the Sysmex xe 2100 hematology analyzer in hospital use. *Journal Clinical Anal* 2003; 17(4): 113 – 23.
4. RYAN DH. Automated Analysis of Blood Cells. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ & Silberstein LE eds. *Hematology – Basic Principles and Practice* 2<sup>nd</sup> ed. New York: Churchill Livingstone 1995, p 2223 - 35.
5. MATSUNO K, ISHIZUKA S. New technology of automated blood cell differential counting. *Rinsho Byori: Rinsho Byori* 1998 apr; 46(4): 361
6. TOLEDO AJO. Hemograma – interpretação técnica. São Paulo, [www.fleury.com.br](http://www.fleury.com.br) 2002: 1 – 5, 12 jan 2005.
7. ARROYO ME, TABERNERO MD, GARCIA MMA, ORFAO A. Analytic performance of the Pentra 80 automated blood cell analyzer for the evaluation for normal and pathologic WBCs. *Am J Clin Pathol* 2005 Feb; 123(2):206 - 14.
8. SIEKMEIER R, BIERLICH A, JAROSS W. The white blood cell differential: three methods compared. *Clin Chem Lab Med* 2001 may; 39(5): 432 – 45.
9. PENG L, GAO X, JIANG H, PENG Z, SU J. Laboratory evaluation of the Sysmex SE-9500 automated haematology analyzer. *Clin Lab Haematol* 2001 aug; 23(4): 237 - 42.

10. HOEDEMAKERS RM, PENNING S JM, HOFFMAN JJ. Performance characteristics of blast flagging on the Cell Dyn 4000 haematology analyzer. Clin Lab Haematol 1999 Oct; 21(5): 347 - 51.
11. YAMAMURA R, YAMANE T, HINO M, OHTA K, SHIBATA H, TSUDA I, TATSUMI N. Possible automatic cell classification of bone marrow aspirate using the Cell Dyn 4000 automatic blood cell analyzer. J Clin Lab Anal 2002; 16(2): 86 - 90.
12. COHEN AM, CYCOWITZ Z, MITTELMAN M, LEWINSKI UH, GARDYN J. The incidence of pseudothrombocytopenia in automatic blood analyzers. Haematologia (Budap) 2000; 30(2):117 - 21.
13. HANDIN RI. Inherited platelets disorders. Am Soc of Hematol Educ Program 2005; 396 – 402. URL: <http://www.asheducationbook.org/cgi/content/full/2005/1/396>.
14. GRIMALDI E., SCOPACASA F. Evaluation of the Abbott CELL-DYN 4000 hematology analyzer. Am J Clin Pathol 2000; 113(4): 497 - 505.
15. FERRERO CV, SUDAKA I, JAMBOU D, VANHAEKE D, FISCHER F, BAYLE J. Evaluation of the ABX Cobas Veja automated hematology analyzer and comparison with the Coulter STKS. Hematol Cell Ther 1997 jun; 39: 149 - 58.
16. ABX Diagnostics - Pentra 60 - User Manual. Montpellier, France, 1999.
17. BAIN JB. Diagnosis from the blood smear. N Engl J Med 2005 aug 4; 353(5):498 - 507.
18. SAVI LA, PALUDO R, MIRANDA ML, HAAS P. Colorações Hematológicas utilizadas em exames laboratoriais. Newslab 2002; 51: pg 90 – 103.
19. DAWSON B. Basic & Clinical biostatistic. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2001.p 115 - 7.

20. FIORIN F, STEFFAN A, PRADELLA P, BIZZARO N, POTENZA R, DE ANGILIS V. IgG platelet antibodies in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia bind to platelet membrane glycoprotein IIb. *Am J Clin Pathol* 1998; 110(2): 178 - 83.
21. VAN VLIET HH, KAPPERS-KLUNNE MC, ABELS J. Pseudothrombocytopenia: a cold auto-antibody against platelet glycoprotein GP IIb. *Br J Haematol* 1986; 62 (3): 501 - 11.
22. LANZA F, STIERLE A, FOURNIER D et al. A new variant of Glanzmann's thrombasthemia (Strasbourg I). Platelets with functionally defective glycoprotein IIb – IIIa complexes and a glycoprotein IIIa 214 Arg – 214 Trp mutation. *Journal Clinical Invest* 1992; 89: 1995 – 2004.
23. SCHREZENMEIER H, MULLER H, GUNSILIUS E, HEIMPEL H, SEIFRIELD E. Anticoagulant-induced pseudothrombopenia and pseudoleukocytosis. *Thromb Haemost* 1995; 73: 506 – 13.
24. DUSSE LMS, VIEIRA LM, CARVALHO MG. Pseudotrombocitopenia. *J Bras Patol Med Lab* 2004 Oct; 40 (5): 321 – 4.
25. VAN DER MEER W, ALLEBS W, SIMON A, VAN B, BERKEL Y, DE KEIJZER MH. Pseudothrombocytopenia: a report of a new method to count platelets in a patient with EDTA and temperature independent antibodies of the IgM type. *Eur J Haematol* 2002 Oct; 69 (4): 243 - 7.

**COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE HEMOGRAMAS DO CONTADOR ELETRÔNICO  
ABX PENTRA 60® COM A MICROSCOPIA.**

Felipe Goulart Monteiro<sup>1,2</sup>, Lúcia Mariano da Rocha Silla<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

**Apoio financeiro:** FIPE/HCPA

**Endereço para correspondência:** [gmfifo@hotmail.com](mailto:gmfifo@hotmail.com)

**Palavras-chave:** hemograma, contador automático, microscopia ótica.

## Resumo

O hemograma é o exame laboratorial universalmente utilizado para avaliação quantitativa e qualitativa dos elementos figurados do sangue periférico. O exame completo deve conter o eritrograma, o leucograma, a contagem de plaquetas e uma descrição da observação da lâmina ou esfregaço sanguíneo. Atualmente os laboratórios clínicos seriam incapazes de analisar eficientemente o grande volume de amostras que recebem diariamente sem a velocidade e habilidade dos modernos contadores automatizados em hematologia. Os instrumentos automatizados oferecem alta sensibilidade e precisão na quantificação das células sanguíneas. O objetivo deste estudo é comparar no nosso meio, os resultados dos hemogramas do analisador automático ABX Pentra 60<sup>®</sup> (Montpellier – França), largamente utilizado na rotina dos laboratórios de análises clínicas, com a microscopia ótica e determinar a concordância entre os dois métodos. Foram utilizadas 1000 amostras sanguíneas de adultos para realização de hemogramas. Cada amostra foi analisada pelo contador eletrônico e pela microscopia ótica. De todos os hemogramas realizados pelo equipamento, foram considerados anormais 40,1%, a hematoscopia ótica revelou anormalidades em 39,9% das lâminas. Muitos bons valores de concordância foram encontrados para a contagem das séries branca e vermelha, e bons valores de concordância para a série plaquetária. O equipamento ABX Pentra 60<sup>®</sup> (Montpellier – França) mostrou-se satisfatório para a rotina de um laboratório de análises clínicas, é de fácil manuseio e aponta de forma segura as principais alterações patológicas. No nosso meio sugerimos liberação direta de hemogramas normais e com excelentes valores de concordância ( $Kappa > 0,93$ ). No ponto de vista gerencial, traduziria em uma diminuição de 86% de horas trabalhadas.

## Introdução

O hemograma é o exame laboratorial de rotina para avaliação qualitativa e quantitativa dos elementos figurados do sangue periférico, sendo um dos exames mais solicitados para obtenção de diagnósticos, avaliações clínicas e acompanhamento evolutivo das diversas patologias humanas. O exame completo deve conter o eritrograma, o leucograma, a contagem de plaquetas e uma descrição da observação da lâmina ou esfregaço sanguíneo. O hemograma é um coadjuvante útil em todos os setores da clínica, e um toque final do especialista o transforma numa abrangente lista de dados e valores para o diagnóstico final do médico. A metodologia manual para contagem dos leucócitos foi utilizada isoladamente por um longo período. Após o advento da Automação, surgiram trabalhos científicos questionando tanto os métodos de automação quanto o manual.(1,2,3).

Desde a introdução da tecnologia com automação na década de 50, surgiram vários equipamentos que permitiram aos laboratórios agilidade para a liberação de resultados. Isto culminou na década de 80, na fabricação de modelos altamente sofisticados que permitiam aspirar, diluir e fornecer toda a série de parâmetros numéricos. A partir de então, abriu-se uma nova era em Hematologia. Sem a velocidade e habilidade dos modernos contadores automatizados em hematologia, os laboratórios clínicos seriam incapazes de analisar eficientemente o grande volume de amostras que recebem diariamente. Os instrumentos automatizados oferecem alta sensibilidade e precisão na quantificação das células sanguíneas, bem como na contagem diferencial de leucócitos, sendo que desde 1980 o uso da análise diferencial de leucócitos automatizada tem se tornado comum em grande número de laboratórios (4, 5).

No entanto, algumas amostras analisadas pelos contadores automatizados de células ainda requerem avaliação através do esfregaço de sangue periférico para permitir a observação de anormalidades morfológicas (4). Atualmente, na maioria dos laboratórios que

utilizam contadores eletrônicos, a microscopia só é realizada em casos selecionados, de acordo com o protocolo local. (6).

Mesmo com a tecnologia eletrônica a observação do analista clínico ao microscópio ainda é indispensável. Os elementos celulares patológicos chegam a ser registrados pelo aparelho, porém não são identificados sob o ponto de vista qualitativo. Começa aqui o campo do diagnóstico visual através do microscópio. O exame junto ao microscópio exige uma rigorosa disciplina, deve-se relacionar os dados da automação com os da microscopia e julgar se são condizentes (7).

Alarmes patológicos ou *flags* são avisos de anormalidades impressos no laudo do aparelho, alertando o analista de possíveis alterações. Devido a disseminação do uso da automação para contagem e análise das células sanguíneas, é desejável que dentro de cada serviço se estabeleça um procedimento operacional padrão, no sentido de determinar quais as amostras que devem ser analisadas pelo microscópio óptico e, por conseguinte, desencadear um *flag*.

Uma nova geração de equipamentos automatizados tem sido usada em rotina de grandes laboratórios, entre eles Sysmex SE- 9500<sup>®</sup> (Ramsey, Minnesota – USA), ABX Cobas Veja<sup>®</sup> (Montpellier – França), Cobas Argos 5 diff<sup>®</sup> (Roche – Suíça), Coulter STKS<sup>®</sup> (Fulerton, Califórnia – USA), ABX Pentra 80<sup>®</sup> (Montpellier – França), Abbott CELL DYN 4000<sup>®</sup> (Illinois – USA), Bayer Advia<sup>®</sup> (Holliston, Massachusetts – USA) e ABX Pentra 120<sup>®</sup> (Montpellier – França) (7 - 13).

Uma comparação entre ABX Pentra 120<sup>®</sup> (Montpellier – França), Coulter STKS<sup>®</sup> (Fulerton, Califórnia – USA) e a microscopia sugeriu ótimos valores de concordância para neutrófilos, linfócitos e eosinófilos. Porém, para a correlação com monócitos foi encontrado Kappa = 0,581. Também foi observada pobre correlação com as células jovens, pois no histograma a banda de células imaturas (mielócitos, metamielócitos e prómielócitos) ficam muito próximas, não proporcionando uma boa leitura das células imaturas. (8)

Uma correlação pobre em relação ao basófilos já foi descrita na literatura (14, 9),

Em estudo apresentado por Peng em 2001 (9) foi encontrada ótima correlação dos parâmetros de série branca, vermelha e plaquetas do equipamento Sysmex SE-950<sup>®</sup> (Ramsey, Minnesota – USA) com a microscopia.

A performance do equipamento ABX Pentra 80<sup>®</sup> (Montpellier – França) foi testada com a microscopia por Arroyo em 2005 (7), com bons resultados de contagem relativa de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e células imaturas.

Uma boa correlação do diferencial de leucócitos foi encontrada no analisador automático CELL DYN 4000<sup>®</sup> (Illinois – USA) quando comparado com a microscopia (14). Um outro estudo investigou a performance dos *flags* para células blásticas liberados pelo mesmo aparelho quando comparada ao método manual. Um número alto de falsos positivos foi observado na liberação de *flags* de blastos pela automação, uma cuidadosa observação junto ao microscópio aumenta significativamente a sensibilidade dos achados em células blásticas (10, 11).

A correlação dos resultados entre os aparelhos ABX Cobas Veja<sup>®</sup> (Montpellier – França), Couter STKS<sup>®</sup> (Fulerton, Califórnia – USA) e a microscopia mostrou-se adequadas em todos os parâmetros, exceto para eosinófilos e monócitos, destacando um número alto de falsos positivos de *flags* de blastos (15).

Para a avaliação de plaquetas usando CELL DYN 4000<sup>®</sup> (Illinois – USA) notou-se que em 60 casos de trombocitopenia, 17% eram falsas. Para evitar erros de diagnóstico de trombocitopenia a inspeção microscópica deve ser realizada (12).

A metodologia de automação tem sido cada vez mais utilizada nos laboratórios de análises clínicas. Este estudo vem contribuir com os já existentes sobre o analisador automático ABX Pentra 60<sup>®</sup> (Montpellier – França), estabelecendo um protocolo de liberação direta, ou seja, sem análise microscópica para esse equipamento e quantificar a necessidade de profissionais habilitados no setor de hematologia.

## **Materiais e métodos**

Foram utilizadas 1000 amostras sanguíneas (aleatórias) de adultos para realização de hemogramas entre os meses de julho a dezembro de 2004. As amostras de pacientes ambulatoriais e hospitalares foram gentilmente cedidas pela Unilab – Laboratórios Unidos de Pesquisas Clínicas Ltda. Porto Alegre, RS, Brasil e contadas no contador eletrônico ABX Pentra 60<sup>®</sup> (Montpellier – França) (automação para hemogramas). O ABX Pentra 60<sup>®</sup> (Montpellier – França) é um equipamento fabricado pela Horiba ABX e analisa amostras pelo princípio de medida DHSS (Sistema Seqüencial Hidrodinâmica Duplo) e MDSS (Sistema de Multi-distribuição de amostras) que combina citoquímica, impedância e citometria de fluxo. O DHSS é uma tecnologia de propriedade da ABX que permite medir o volume e o conteúdo da célula em um único fluxo celular. O MDSS garante uma perfeita mistura e homogeneização das amostras e reagentes com uma pequena quantidade de amostra. Ele mostra além de dados numéricos, gráficos, histogramas e *Flags* (avisos de anormalidades impressos no laudo do aparelho, alertando o analista de possíveis alterações ou alarmes patológicos). Este equipamento fornece acesso direto a um diagnóstico completo do estado hematológico do paciente, através de 26 parâmetros de análises, com uma diferencial completa em cinco partes, incluindo linfócitos atípicos e grandes células imaturas (16).

Tanto para os hemogramas normais quanto para os hemogramas alterados (com *Flags*) a distensão da lâmina e o exame microscópico foram feitos pelo autor. Nas primeiras 100 amostras a leitura cega (realizada sem acesso aos dados numéricos da automação), foi comparada à realizada por dois outros profissionais.

As amostras de sangue periférico foram previamente coletadas por um profissional experiente. Para este procedimento o profissional utilizou agulhas de 0,9 a 0,8 mm

nos adultos e a coleta normalmente aconteceu na veia cubital. A fim de desinfetar o local, utilizou-se álcool 70%, garrotes e (EPIs) equipamentos de proteção individual. O anticoagulante utilizado pelo serviço foi o (EDTA) Etilenodiaminotetracético da Laborclin®, a fim de que não ocorressem alterações artefatuais (17).

Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Setor de Hematologia para serem processadas. Primeiramente foram colocadas em um agitador, para então serem processadas no contador eletrônico ABX Pentra 60® (Montpellier – França) e numeradas com seus respectivos esfregaços em lâminas. Para uma boa distensão sanguínea foram utilizadas lâminas de vidro (24 X 76 mm) limpas e desengorduradas. Colocou-se uma gota de sangue da amostra com tubo capilar, procedendo-se a distensão sob um ângulo de 25° a 40° com um movimento rápido. A olho nu, a distensão deveria estar bem distribuída.

Essas lâminas foram coradas, segundo o padrão do Laboratório Unilab, pelo corante Panótico Rápido que utiliza componentes essenciais dos corantes de Romanowsky (18), um componente básico (catiônico), como azul de metileno que confere cor azul aos ácidos nucléicos (DNA e RNA) e às nucleoproteínas, aos grânulos dos basófilos e, fracamente, aos grânulos dos neutrófilos, além de um corante ácido (aniônico), como a eosina, que confere cor laranja à hemoglobina e aos grânulos dos eosinófilos.

Após a coloração, as lâminas foram fornecidas ao autor para análise microscópica, sem que o mesmo conhecesse os resultados da automação (“microscopia cega”). A microscopia foi realizada através de um equipamento da Olympus® com oculares de 10 e 40 aumentos e objetiva de imersão de 100 aumentos. O autor seguiu um critério rigoroso de leitura na observação das 3 séries celulares, fazendo contagens numéricas e observando possíveis alterações morfológicas.

A leitura manual começou pela série vermelha, focalizando os eritrócitos, analisando a coloração e possíveis alterações morfológicas dessa série. Posteriormente a série branca foi analisada. A contagem total de leucócitos foi feita através de um contador manual

avaliando 100 células. Em seguida foi realizada a análise da morfologia da série branca, com maior atenção para atipias de neutrófilos, leucócitos e monócitos. Finalmente foi avaliado a contagem geral das plaquetas e a qualidade da mesma. A leitura de fônio foi utilizada para comparar os resultados do equipamento com a microscopia. Este método baseia-se em uma contagem das plaquetas e eritrócitos em campos. Faz-se uma média da quantidade de eritrócitos e de plaquetas por campo e calcula-se em uma regra de três com os valores totais de eritrócitos.

Foi realizado um estudo comparativo entre os hemogramas normais e os principais *Flags* do analisador automático ABX Pentra 60<sup>®</sup> e a microscopia ótica.

Estão entre os principais *Flags*: RBC – *red blood cells*: macrocitose (VCM > 100), microcitose (VCM < 80) e hipocromia (HCM < 27), WBC – *White blood cells*: linfocitose (> 4500 $\mu$ L), linfopenia (<1000 $\mu$ L), neutrocitose (>8000 $\mu$ L), neutropenia (<1500 $\mu$ L), monocitose (>1000 $\mu$ L), eosinofilia (>800), células imaturas, leucocitose (>11000 $\mu$ L) e linfócitos atípicos e PLQ – *platelets*: trombocitose (> 500000 $\mu$ L), trombocitopenia (< 100000 $\mu$ L), macroplaquetas e agregados plaquetários.

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS versão 8.0, através de uma medida de concordância entre duas mensurações chamada "coeficiente Kappa". Esse método nos oferecerá um valor entre zero e 1, sendo quanto mais perto de 1 maior a concordância entre os resultados da automação e a microscopia (tabela 3). Foi considerado significativo  $\alpha \leq 0,05$ .

**Tabela I:** Valores de concordância (Kappa).

<u>Valor Kappa</u>	<u>Concordância</u>
Negativo – 0	Sem
0,01 – 0,2	Pobre
0,21 – 0,4	Fraca
0,41 – 0,6	Razoável
0,61 – 0,8	Boa
0,81 – 0,92	Muito boa
0,93 – 1,00	Excelente

Tabela modificada de Dawson 2001 (19).

As amostras utilizadas neste estudo são oriundas de materiais clínicos da rotina do laboratório e não caracterizam qualquer acréscimo de condutas, tratamentos ou questionamentos junto aos pacientes. Logo, não há necessidade de consentimento por parte destes. Esta pesquisa foi aceita pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## **Resultados**

A correlação entre os resultados da microscopia ótica obtidos pelo autor e os outros dois observadores foi satisfatória, não havendo discordância significativa entre eles (tabela II)

Tabela II: **Correlação entre três analistas clínicos, com os respectivos valores de concordância.**

<u>Variáveis</u>	<u>Kappa</u> 1 vs 2	<u>Kappa</u> 1 vs 3	Kappa 2 vs 3
<b>RBC</b>	0,852	0,740	0,651
<b>Macrocitose</b>	**	**	**
<b>Microcitose</b>	0,852	0,740	0,651
Hipocromia	**	**	**
WBC	0,890	0,865	0,796
Linfocitose	0,740	1,000	0,740
Linfopenia	0,968	0,967	0,935
Neutrocitose	0,964	0,962	0,926
Neutropenia	0,898	0,951	0,841
Monocitose	0,880	0,842	0,769
Eosinofilia	1,000	0,795	0,795
LIC/RM	0,942	1,000	0,942
Leucocitose	1,000	0,957	0,957
Linfócitos atípicos	1,000	1,000	1,000
PLQ	0,795	0,559	0,481
Trombocitose	**	**	- 0,15
Trombopenia	1,000	1,000	1,000
Macroplaquetas	1,000	0,662	0,662

\*\* foram analisados por teste de concordância e não houve discordância entre eles

De todos os hemogramas realizados pelo ABX Pentra 60<sup>®</sup> (Montpellier – França): a freqüência de resultados normais foi de 59,9% e de resultados anormais, 40,1%.

Os achados anormais para a série vermelha (RBC) ocorreram em 4,9% destas amostras, sendo a microcitose a alteração mais freqüente (65,3%), seguido pela macrocitose (32,6%) e hipocromia (8,1%)\*. Na série branca (WBC) o equipamento determinou anormalidades em 37,6% dos exames, sendo a linfopenia o achado mais freqüente (tabela III).

A série plaquetária esteve anormal em 4,8% das amostras, com trombocitose em 54,1%, trombocitopenia em 33,3% e macroplaquetas foram vistas em 10,4% das alterações plaquetárias. O equipamento ABX Pentra 60<sup>®</sup> (Montpellier – França) revelou 15 casos de agregados plaquetários.

A hematoscopia ótica revelou anormalidades em 39,9% das lâminas, estavam normais 60,1%. Na série vermelha (RBC) ocorreram alterações em 4,7% das amostras, sendo a microcitose a alteração mais freqüente (70,2%), seguidas pela macrocitose (29,7%) e hipocromia (10,6%). \*Em algumas amostras foram observados como seria de se esperar mais de uma alteração. Na série branca o equipamento determinou anormalidades em 36,9% dos exames, sendo a linfopenia o achado mais freqüente (tabela III).

**Tabela III:** Alterações de WBC do método automático e do método manual

Alterações WBC	Método automático % *	Método manual %*
Linfocitose	9,04%	10,84%
Linfopenia	50,53%	51,49%
Leucocitose	31,38%	32,79%
Neutrocitose	48,13%	50,40%
Neutropenia	27,92%	27,10%
Monocitose	40,95%	37,39%
Eosinofilia	12,50%	12,73%
Células Imaturas (LIC)	18,08%	16,80%
Linfócitos Atípicos	8,24%	7,58%

A série plaquetária na microscopia ótica esteve anormal em 4,7% das lâminas, com trombocitose em 53,1%, trombocitopenia em 34,0% e macroplaquetas foram vistas em 14,8% das alterações plaquetárias\*.

A análise estatística das avaliações comparativas de cada série entre o método de automação e a microscopia está representada na tabela IV.

**Tabela IV:** Correlação entre ABX Pentra 60® (Montpellier – França) e a microscopia óptica. Mostrando valores de correlação (Kappa).

<b>Variáveis</b>	<b>Kappa</b>	<b>Kappa</b>
	<b>ABX Pentra 60 x Microscopia</b>	
<b><u>RBC</u></b>	0,912	Muito boa
<b>Macrocitose</b>	0,932	Excelente
Microcitose	0,920	Muito boa
Hipocromia	0,888	Muito boa
<b><u>WBC</u></b>	0,947	Excelente
Linfocitose	0,832	Muito boa
Linfopenia	0,948	Excelente
Neutrocitose	0,943	Excelente
Neutropenia	0,951	Excelente
Monocitose	0,856	Muito boa
Eosinofilia	0,933	Excelente
LIC/RM	0,885	Muito boa
Leucocitose	0,948	Excelente
Linfócitos atípicos	0,878	Muito boa
<b>PLQ</b>	0,635	Boa
Trombocitose	0,698	Boa
Trombocitopenia	0,619	Boa
Macroplaquetas	0,665	Boa

\* Algumas amostras apresentaram mais de uma alteração.

## **Discussão**

Neste estudo buscamos avaliar a desempenho do equipamento ABX Pentra 60<sup>®</sup> quando comparado à microscopia ótica. Isso nos permitirá testar, em nosso meio, os protocolos para liberação automática de hemogramas, sem necessidade de exame microscópico, e programar a necessidade de profissionais no setor de hematologia.

Na presente pesquisa excelentes valores de concordância foram encontrados para a contagem de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos, corroborando os estudos de Grimaldi e Scopacasa em 2000 (14), que mostraram essa excelente correlação com outros equipamentos.

Também encontramos resultados com bom valor de concordância para o alarme patológico das células imaturas (LIC/RM) diferente do encontrado por Hoedemarkers e colaboradores em 1999 (10), com equipamento Cell Dyn 4000<sup>®</sup> (Illinois – USA) e Ferrero em 1997 (15), com ABX Cobas Veja<sup>®</sup> (Montpellier – França) e Couter STKS<sup>®</sup> (Fulerton, Califórnia – USA). Estes pesquisadores observaram uma indicação errônea para a presença de blastos.

Uma falsa contagem baixa de plaquetas (pseudotrombocitopenia) pode ser notada em amostras de sangue colhidas com EDTA. Essa diminuição de contagem é conseqüente à aglutinação das plaquetas ou, mais raramente, à formação de rosetas de plaquetas em torno dos neutrófilos, um fenômeno referido como *satelitismo plaquetário* (13). Tem sido proposto que auto-anticorpos presentes no plasma, na presença de EDTA, reconhecem e se ligam a um epitopo da glicoproteína IIb (GPIIb), integrante do complexo GPIIb/IIIa da superfície plaquetária, promovendo grumos plaquetários (20 - 22). A aglutinação das plaquetas pode resultar na formação de grumos de tamanho similar aos dos leucócitos, e o contador automático é incapaz de distinguir tais grumos, reconhecendo-os como leucócitos e fornecendo contagem falsamente elevada ou pseudoleucocitose (23). Fato este não observado neste estudo.

O conhecimento dos dados clínicos do paciente é de grande importância para se evitar a liberação de resultados incorretos. A avaliação cuidadosa do esfregaço sangüíneo é imprescindível para a caracterização de casos de pseudotrombocitopenia, pois nele será evidente a presença de grumos de plaquetas que, em geral, são mais freqüentes na porção final da cauda do esfregaço sangüíneo. A observação criteriosa do histograma pode também sugerir um quadro de pseudotrombocitopenia (24). O diagnóstico pode ser confirmado fazendo-se a contagem de plaquetas em citrato de sódio a 3,8% imediatamente após a coleta (25).

No presente estudo foram observados 15 casos de flags de agregados plaquetários no sistema automatizado. Somente 3 destes casos também vinham acompanhados de *flags* de trombocitopenia. Ao serem analisados microscopicamente foram comprovados em 100% desses casos os agregados plaquetários em lâmina. Corroborando com os trabalhos de Dusse em 2004 (24), Cohen em 2000 (12); Van Der Meer, em 2002 (25) que observaram pseudotrombocitopenia em seus estudos. Cohen em 2000 (12) ainda ressalta que, uma boa inspeção microscópica pode evitar o erro de diagnóstico de pseudotrombocitopenia.

Os outros 12 casos de agregados plaquetários encontrados pela automação, provavelmente deve-se pela configuração da sensibilidade do equipamento para esse parâmetro (16), pois não foram encontrados agregados plaquetários em tais casos.

Na maioria dos laboratórios de hematologia os laudos sem alteração emitidos pelo equipamento de automação não passam por uma cuidadosa inspeção microscópica e são liberados automaticamente. A intervenção do profissional habilitado só acontece quando o equipamento libera alarmes patológicos (*Flags*), então, a observação do esfregaço sangüíneo torna-se obrigatória, assim os laboratórios garantem a qualidade e a confiança no seu laudo final. Normalmente serviços com grande volume e que tem hospitais associados a sua rotina, devem ter um cuidado especial, pois possivelmente muitos hemogramas podem estar associados com alguma alteração. Porém laboratórios de grande porte analisam diariamente um volume enorme de hemogramas e necessitam de muitos profissionais na área para rever toda essa gama de amostras, tornando-se economicamente inviável, assim

com um protocolo de liberação direta de hemogramas normais os laboratórios terão uma maior agilidade no serviço e do ponto de vista gerencial uma diminuição dos custos fixos com profissionais da área.

O equipamento ABX Pentra 60<sup>®</sup> (Montpellier – França) mostrou-se em nossas mãos, satisfatório para a rotina de um laboratório de análises clínicas, é de fácil manuseio e aponta de forma segura os principais Flags. A análise estatística das 1000 amostras mostrou excelente correlação entre os alarmes patológicos do equipamento ABX Pentra 60<sup>®</sup> com a microscopia, com uma correlação boa para as plaquetas.

Do ponto de vista gerencial e baseados em nossos dados, podemos estabelecer um protocolo de liberação direta de hemogramas diminuindo os custos fixos com corantes, lâminas, tubos capilares entre outros. Sugerimos liberar automaticamente, sem a revisão do esfregaço, quando tivermos valores normais para todos os parâmetros e para aqueles com excelentes valores de concordância ( $Kappa > 0,93$ ), tais como: macrocitose, linfopenia, neutrocitose, neutropenia, eosinofilia e leucocitose. Faremos revisão do esfregaço quando não tivermos resultados excelentes de concordância ( $Kappa < 0,93$ ), tais como: microcitose, hipocromia, linfocitose, monocitose, células imaturas, linfócitos atípicos, trombocitose, trombopenia e macroplaquetas. Revisamos também amostras provenientes de hospital ou quando o paciente tiver cadastro como portador de doença hematológica.

O laboratório UNILAB tem uma rotina mensal de 3000 hemogramas, aproximadamente 14% destes hemogramas precisam ser revistos, baseado nos critérios descritos acima. O que significa que aproximadamente uma média 14 lâminas precisam de revisão microscópica diariamente. Sem o método de automação são necessárias 100 leituras diárias. Tendo em vista que um profissional habilitado deve ler com qualidade aproximadamente 100 lâminas por dia, em nosso meio, isso se traduziria em uma diminuição de 86% de horas trabalhadas; em um laboratório de grande porte, em uma diminuição de mão de obra especializada.

## **Agradecimentos**

Os Autores agradecem a Alan Birk por sua importante colaboração na análise estatística. Nos também agradecemos Celito Luiz Diel, Rafael Failace e Alzira do Carmo Aquino por suas colaborações.

## Referências

1. RUMKE CL. The imprecision of the ratios of two percentages observed in differential white blood cell counts: a warning. *Blood Cells* 1985; 11: 137 – 40.
2. DUTCHER TF. Automated differentials: a strategy. *Blood Cells* 1985; 11: 49 –
3. NAKUL AD, SUDAKA SI, FERRERO VC, et al. Evaluation of the Sysmex xe 2100 hematology analyzer in hospital use. *Journal Clinical Anal* 2003; 17(4): 113 – 23.
4. RYAN DH. Automated Analysis of Blood Cells. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ & Silberstein LE eds. *Hematology – Basic Principles and Practice* 2<sup>nd</sup> ed. New York: Churchill Livingstone 1995, p 2223 - 35.
5. MATSUNO K, ISHIZUKA S. New technology of automated blood cell differential counting. *Rinsho Byori. Rinsho Byori* 1998 apr; 46(4): 361
6. TOLEDO AJO. Hemograma – interpretação técnica. São Paulo, [www.fleury.com.br](http://www.fleury.com.br) 2002: 1 – 5, 12 jan 2005.
7. ARROYO ME, TABERNERO MD, GARCIA MMA, ORFAO A. Analytic performance of the Pentra 80 automated blood cell analyzer for the evaluation for normal and pathologic WBCs. *Am J Clin Pathol* 2005 Feb; 123(2):206 - 14.
8. SIEKMEIER R, BIERLICH A, JAROSS W. The white blood cell differential: three methods compared. *Clin Chem Lab Med* 2001 may; 39(5): 432 – 45.
9. PENG L, GAO X, JIANG H, PENG Z, SU J. Laboratory evaluation of the Sysmex SE-9500 automated haematology analyzer. *Clin Lab Haematol* 2001 aug; 23(4): 237 - 42.

10. HOEDEMAKERS RM, PENNINGS JM, HOFFMAN JJ. Performance characteristics of blast flagging on the Cell Dyn 4000 haematology analyzer. *Clin Lab Haematol* 1999 Oct; 21(5): 347 - 51.
11. YAMAMURA R, YAMANE T, HINO M, OHTA K, SHIBATA H, TSUDA I, TATSUMI N. Possible automatic cell classification of bone marrow aspirate using the Cell Dyn 4000 automatic blood cell analyzer. *J Clin Lab Anal* 2002; 16(2): 86 - 90.
12. COHEN AM, CYCOWITZ Z, MITTELMAN M, LEWINSKI UH, GARDYN J. The incidence of pseudothrombocytopenia in automatic blood analyzers. *Haematologia (Budap)* 2000; 30(2):117 - 21.
13. HANDIN RI. Inherited platelets disorders. Am Soc of Hematol Educ Program 2005; 396 – 402. URL: <http://www.asheducationbook.org/cgi/content/full/2005/1/396>.
14. GRIMALDI E., SCOPACASA F. Evaluation of the Abbott CELL-DYN 4000 hematology analyzer. *Am J Clin Pathol* 2000; 113(4): 497 - 505.
15. FERRERO CV, SUDAKA I, JAMBOU D, VANHAEKE D, FISCHER F, BAYLE J. Evaluation of the ABX Cobas Veja automated hematology analyzer and comparison with the Couter STKS. *Hematol Cell Ther* 1997 jun; 39: 149 - 58.
16. ABX Diagnostics - *Pentra 60 - User Manual*. Montpellier, France, 1999.
17. BAIN JB. Diagnosis from the blood smear. *N Engl J Med* 2005 aug 4; 353(5):498 - 507.
18. SAVI LA, PALUDO R, MIRANDA ML, HAAS P. Colorações Hematológicas utilizadas em exames laboratoriais. *NewsLab* 2002; 51: pg 90 – 103.
19. DAWSON B. Basic & Clinical biostatistic. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2001.p 115 - 7.

20. FIORIN F, STEFFAN A, PRADELLA P, BIZZARO N, POTENZA R, DE ANGILIS V. IgG platelet antibodies in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia bind to platelet membrane glycoprotein IIb. *Am J Clin Pathol* 1998; 110(2): 178 - 83.
21. VAN VLIET HH, KAPPERS-KLUNNE MC, ABELS J. Pseudothrombocytopenia: a cold auto-antibody against platelet glycoprotein GP IIb. *Br J Haematol* 1986; 62 (3): 501 - 11.
22. LANZA F, STIERLE A, FOURNIER D et al. A new variant of Glanzmann's thrombasthemia (Strasbourg I). Platelets with functionally defective glycoprotein IIb - IIIa complex and a glycoprotein IIIa 214 Arg - 214 Trp mutation. *Journal Clinical Invest* 1992; 89: 1995 - 2004.
23. SCHREZENMEIER H, MULLER H, GUNSILIUS E, HEIMPEL H, SEIFRIELD E. Anticoagulant-induced pseudothrombopenia and pseudoleukocytosis. *Thromb Haemost* 1995; 73: 506 - 13.
24. DUSSE LMS, VIEIRA LM, CARVALHO MG. Pseudotrombocitopenia. *J Bras Patol Med Lab* 2004 Oct; 40 (5): 321 - 4.
25. VAN DER MEER W, ALLEBS W, SIMON A, VAN B, BERKEL Y, DE KEIJZER MH. Pseudothrombocytopenia: a report of a new method to count platelets in a patient with EDTA and temperature independent antibodies of the IgM type. *Eur J Haematol* 2002 Oct; 69 (4): 243 - 7.