

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM ANÁLISES CLÍNICAS

MONYQUE BARBOSA RIBEIRO

ANÁLISE DE DESEMPENHO (LEUCOGRAMA E SCATTER) DOS
ANALISADORES HEMATOLÓGICOS BC-6800 (MINDRAY) E O
URIT 5500 PARA AMOSTRAS DE PACIENTES COM LEUCEMIAS
AGUDAS.

BELÉM

2017

MONYQUE BARBOSA RIBEIRO

ANÁLISE DE DESEMPENHO (LEUCOGRAMA E SCATTER) DOS
ANALISADORES HEMATOLÓGICOS BC-6800 (MINDRAY) E O
URIT 5500 PARA AMOSTRAS DE PACIENTES COM LEUCEMIAS
AGUDAS.

Artigo científico apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Análises clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito

BELÉM

2017

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”.

(Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me oferecer oportunidades grandiosas, e sempre me dar força e saúde para enfrentar as dificuldades.

A minha amada Mãe por todo o apoio, incentivo, e por não medir esforços em oferecer o melhor que pode as minhas irmãs e eu.

A todos os meus amigos pelas palavras de força nos momentos difíceis, e por me incentivar a não desistir.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Lacy Brito por toda ajuda e disponibilidade.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
1.1.1. O hemograma e a automação em hematologia.....	9
1.1.2. Caracterização dos equipamento de hematologia BC-6800 (Mindray) e URITT 5500	12
1.1.3 Leucemias agudas.....	14
1.1.4 Caracterização morfológica e diferencial de blastos mielóides e linfóides no hemograma.....	16
2 BIBLIOGRAFIA	19
ARTIGO CIENTÍFICO: ANÁLISE DE DESEMPENHO (LEUCOGRAMA E SCATTER) DOS ANALISADORES HEMATOLÓGICOS BC-6800 (MINDRAY) E O URIT 5500 PARA AMOSTRAS DE PACIENTES COM LEUCEMIAS AGUDAS	22

ABREVIATURAS

AH - Analisadores hematológicos

HCT – Hematócrito

HB – Hemoglobina

LLA - Leucemia linfoblástica aguda

LMA - Leucemia mieloblástica aguda

MCHC – Concentração de hemoglobina corpuscular média

MCV – Volume corpuscular médio

MHC – Hemoglobina corpuscular média

MPV – Volume plaquetário médio

PCT – Plaquetócrito

PDW – *Platelet distribution width*

PLT – Contagem de plaquetas

RBC -Contagem de eritrócitos

RDW – *Red cell distribution width*

WBC – Contagem de leucócitos

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - SCATTER LEUCOCITÁRIO DO URIT-5500

FIGURA 2 - SCATTER LEUCOCITÁRIO DO BC-6800

FIGURA 3 - SCATTER LEUCOCITÁRIO DO BC-6800 DE UM PACIENTE COM LEUCEMIA AGUDA

FIGURA 4 - FLAGS DO BC-6800 EM UM PACIENTE COM LEUCEMIA AGUDA

FIGURA 5 - BLASTOS LINFOIDES. COM CITOPLASMA ESCASSO E AGRANULAR, NUCLÉOLOS POUCO EVIDENTES

FIGURA 6 - BLASTO MIELÓIDE COM MAIS CITOPLASMA E PRESENÇA DE GRÂNULOS, NUCLÉOLOS MAIS EVIDENTES E PRESENÇA DE BASTONETES DE AUER.

1. INTRODUÇÃO

O hemograma é um dos exames mais requisitados em hospitais e nos laboratórios de médio e grande porte, tornando intensa a rotina diária de trabalho dos profissionais da área. Diante dessa crescente demanda de trabalho tornou-se necessário que os grandes laboratórios investissem cada vez mais na aquisição de equipamentos de hematologia mais robustos e com mais inovações tecnológicas para atender o grande volume de amostras e diminuir o tempo de liberação dos resultados (LEHNERA *et al.*, 2007).

Ao longo dos anos, o desempenho e a precisão dos analisadores hematológicos (AH) melhoraram consideravelmente, propiciando maior confiança na liberação direta de amostras com resultados dentro de certos limites de triagem, e sem a presença de alertas (*flags*) emitidos pelos AH. Esses alertas, sinalizam sobre a possível ocorrência de anormalidades quantitativas ou qualitativas nas amostras que estão sendo analisadas (DAVIS & BARNES, 2012; BRIGGS & BAIN, 2012).

Apesar dos grandes avanços observados na automação hematológica, ainda existem restrições associados com a análise de amostras que apresentam células anormais, como por exemplo, amostras de pacientes portadores de leucemias. De modo geral, os analisadores são projetados para reconhecer células normais, e os alertas suspeitos são emitidos na tentativa de suprimir limitações na identificação e quantificação de células anormais (COMAR & PASQUINI, 2013).

Qualquer alteração detectada por esses equipamentos pode ser crucial no diagnóstico e intervenção médica para estes pacientes. Assim, quando se trabalha com uma rotina em que grande parte das amostras provém de pacientes com patologias que apresentam diversas alterações hematológicas, é importante avaliar o desempenho dos equipamentos analisados para assegurar a fidelidade dos resultados reportados, além da devida capacitação dos profissionais para manuseio e interpretação dos resultados fornecidos (GULATI *et al.*, 2013)

1.1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1. O hemograma e a automação em hematologia

O hemograma é o exame de rotina laboratorial mais comum da prática médica e possui a finalidade de avaliar quantitativamente e qualitativamente os elementos figurados do sangue. Seus resultados podem fornecer diversas informações, embora em geral bastante inespecíficas. Este exame é fundamental na triagem clínico-laboratorial do paciente, sendo coadjuvante indispensável no diagnóstico e controle evolutivo de doenças crônicas em geral; emergências médicas, cirúrgicas e traumatológicas; assim como no acompanhamento de paciente submetidos a quimioterapia e radioterapia (GROTTO 2009; BORGES *et al.*, 2008).

Nos anos de 1850 o hemograma era realizado de forma manual, tornando as contagens de eritrócitos, leucócitos e plaquetas cada vez mais precisas e exatas graças a utilização de câmaras de contagem e/ou hemocítômetros. Nesta época o hematócrito era obtido por centrifugação específica (microhematócrito) e a hemoglobina por métodos colorimétricos (SILVA *et al.*, 2009).

Nos anos de 1950, os irmãos Coulter desenvolveram o método da impedância, amplamente utilizado para contar células sanguíneas e possibilitou que o hemograma começasse a ser realizado de forma mais automatizada. Sendo este método, junto com a citometria de fluxo, os estopins para o crescimento e desenvolvimentos dos atuais contadores automatizados de hemograma (FAILACE *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, os avanços em automação na hematologia laboratorial vem crescendo e tornando esta metodologia cada vez mais aperfeiçoada, de modo que, os fabricantes destes equipamentos estão oferecendo mais inovações com o intuito de aumentar o número de amostras analisadas em menor tempo com redução dos custos e do tempo de liberação dos resultados, aumento da capacidade de identificação de anormalidades quantitativas em populações celulares morfológicamente normais, e aumento da sensibilidade para identificar anormalidades morfológicas (COMAR & PASQUINI, 2013; BORGES *et al.*, 2008).

A maioria dos AH hoje utilizam uma combinação de tecnologias para o dimensionamento e para a contagem de células, como o princípio de dispersão óptica e da impedância elétrica. O princípio da dispersão óptica baseia-se no processo de citometria de fluxo em que as células são aspiradas por uma célula de fluxo em meio a solução salina. Sobre estas células em fluxo incide um feixe de luz emitido por um canhão de laser. À medida que as células passam através do laser a luz é dispersa e atinge a célula, muda de direção e atinge fotodetectores que convertem os sinais luminosos em sinais elétricos. O número de sinais indica o número de células, e o ângulo da luz dispersa quando atinge uma célula será capaz de representar o tamanho desta e / ou proporcionar informações sobre características celulares, como formato do núcleo e granulosidade citoplasmática (BORGES *et al.*, 2008; LEHNERA *et al.*, 2007)

O princípio da impedância elétrica, por sua vez, baseia-se na quantificação dos pulsos elétricos gerados pelas células ao passar por um orifício onde flui uma corrente contínua. Como as células sanguíneas não conduzem bem a eletricidade, estas ao passarem pelo orifício, onde flui uma corrente contínua, gera um aumento mensurável da impedância elétrica. Deste modo são contadas e medidas as células, uma vez que o pulso é proporcional ao tamanho da célula analisada (BROWN & WITTEWER 2000).

Devido a toda esta tecnologia disponível hoje nos contadores de hematologia, o hemograma, no seu formato atual, permite uma avaliação eritrocitária sob parâmetros muito mais específicos que incluem a contagem de eritrócitos (RBC), determinação da concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT) e índices eritrocitários - volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MHC), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), e o índice de distribuição de amplitude de hemácias ou "*red cell distribution width*" (RDW). Permite ainda uma avaliação dos leucócitos (WBC) que vai muito além da contagem total e diferencial (relativa e absoluta) destas células, permitindo que o operador seja avisado para possíveis variações morfológicas das células em suas formar mais imaturas ou atípicas (*flags*); e também uma avaliação das plaquetas quanto ao seu número total (PLT), avaliação do plaquetócrito (PCT) e a determinação dos chamados índices plaquetários, volume plaquetário médio (MPV) e índice de distribuição de

amplitude de plaquetas “*platelet distribution width*” (PDW) (FAILACE *et al.*, 2009).

Na maioria dos equipamentos a contagem de eritrócitos é realizada pelo princípio da impedância. O registro simultâneo da amplitude (volume do eritrócito) e do número de eritrócitos contados fornece o volume corpuscular médio (VCM) que, multiplicado pelo número de eritrócitos, fornece o hematócrito. A hemoglobina, por sua vez, é dosada por espectrofotometria e fornece, por divisão eletrônica, a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (BACALL 2009).

Um subproduto da medida eletrônica do volume dos eritrócitos é conhecido como o RDW, obtido a partir do histograma de distribuição dos eritrócitos em relação ao volume destas células, definindo a presença ou não de anisocitose (VIVAS *et al.*, 2006). Um análogo do RDW é o PDW um parâmetro da série plaquetária que indica a heterogeneidade dos volumes plaquetários (VPM), indicando a presença de anisocitose plaquetária (BRIGGS, 2009).

A contagem de leucócitos e sua diferenciação leucocitária são medidos pelo princípio de citometria de fluxo, que se utiliza da dispersão lateral da luz, para caracterizar a estrutura interna das células (granulosidade), da dispersão frontal para determinar o tamanho celular (tamanho), e a intensidade de fluorescência celular para indicar o tamanho do núcleo (BACALL, 2009; BORGES *et al.*, 2008). A medição dessas características permite que esses equipamentos forneçam diagramas de dispersão leucocitária (*scatter*), que são representações gráficas bidimensionais relacionando granulosidade (localizada no eixo X) versus tamanho (localizada no eixo Y), onde a plotagem dos pontos representa a concentração de cada tipo celular (BORGES *et al.*, 2008; LENERA *et al.*, 2007; BROWN & WITTEWER, 2000).

Apesar dos grandes avanços tecnológicos já obtidos na realização do hemograma, ainda hoje, os equipamentos não são capazes de identificar com precisão várias alterações hematológicas relevantes em patologias graves como nas leucemias. Embora, muitas destas alterações morfológicas eritrocitária e leucocitária, inclusões, células imaturas, linfócitos atípicos, entre outros, sejam sinalizados ao operador através de *flags* que sugerem a necessidade de revisão de lâmina (BACALL, 2009; FAILACE & PRANKE, 2004).

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

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

1.1.2. Caracterização dos Equipamento de hematologia BC-6800 (Mindray) e URITT 5500

O equipamento URIT-5500 é um auto-analisador de hematologia com diferencial leucocitária em cinco partes (Figura 1) que utiliza como métodos de análise: (1) os métodos de impedância elétrica (WIC) e ótico (WOC) para detectar a quantidade de glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas; (2) o método colorimétrico para determinação do conteúdo de hemoglobina da amostra; e (3) o método de dispersão por laser de 4 ângulos para a determinação da diferencial leucocitária. Seu *scatter* leucocitário relaciona duas características celulares: tamanho no eixo y e granulosidade no eixo x (Manual de operação – MH LAB).

O equipamento BC-6800 é um auto-analisador hematológico que também propicia a contagem completa de glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas; diferencial leucocitária em 5 partes (Figura 2). Neste equipamento os princípios

utilizados são estabelecidos pelos métodos: (1) de impedância de fluxo de revestimento, para contagem de plaquetas e hemácias; (2) disseminação por laser e tecnologia de análise celular SF Cube (análise 3D utilizando informações da disseminação da luz do laser em dois ângulos e sinais fluorescentes) para diferenciação e contagem dos leucócitos; e (3) método colorimétrico para quantificação da hemoglobina. Seu *scatter* leucocitário relaciona as seguintes características celulares: intensidade de fluorescência no eixo y e granulosidade no eixo x (Manual de operação – Mindray).

A posição da diferencial leucocitária no *scatter* obedece as seguintes características: Os linfócitos têm tamanho menor, com o núcleo ocupando sua maior parte, possuem alta proporção de núcleo-citoplasma, mas seu conteúdo de ácido nucleico é baixo; portanto, estão em posição mais baixa no sentido da fluorescência e da disseminação lateral. Monócitos têm tamanho maior, com alta proporção de núcleo-citoplasma, alto conteúdo de ácido nucleico e estrutura menos complexa; portanto, estão em posição mais alta no sentido de fluorescência e apresentam disseminação lateral mais forte. Os neutrófilos e basófilos têm tamanho maior e possuem proporção média de núcleo-citoplasma e baixo conteúdo de ácido nucleico; portanto, estão em posição mais baixa no sentido de fluorescência, mas apresentam disseminação lateral mais forte. As características dos eosinófilos são semelhantes às dos neutrófilos, mas contêm muitas partículas alcalinas, de forma que apresentam disseminação lateral bastante forte. (Figura 1 e 2).

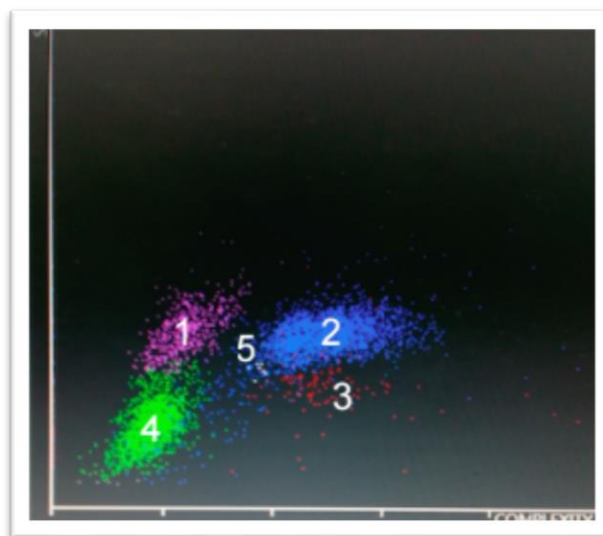


Figura 1. Scatter leucocitário do URIT-5500 (Manual de operação - MH LAB). 1. Monócitos; 2. Neutrófilos; 3. Eosinófilos; 4. Linfócitos; 5. Basófilos

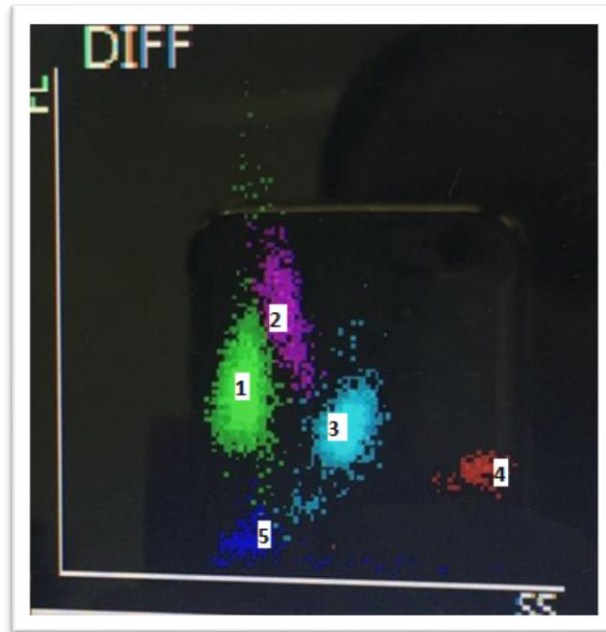


Figura 2. Scatter leucocitário do BC-6800 (Imagem própria). (1) Linfócitos, (2) Monócitos, (3) Neutrófilos, (4) Eosinófilos e (5) Basófilos.

1.1.3 Leucemias Agudas

As leucemias agudas são doenças malignas caracterizadas pela proliferação clonal de células hematopoiéticas jovens sem diferenciação (blastos) na medula óssea, podendo acometer tanto células do clone mielóide como linfóide. Os principais sintomas decorrentes de uma leucemia aguda estão associados ao acúmulo de blastos na medula óssea, prejudicando ou impedindo a produção dos glóbulos vermelhos (causando anemia), dos glóbulos brancos (causando infecções) e das plaquetas (causando hemorragias) (SILVEIRA & ARRAES, 2008).

Atualmente identificam-se certos fatores atribuídos como leucemogênicos, envolvidos na ativação de proto-oncogênes ou na inativação de genes supressores tumorais. Assim como em diversas outras formas de câncer vários agentes ambientais estão implicados na etiologia das leucemias e linfomas. Exposições a radiações ionizantes, produtos químicos, infecções,

anormalidades genéticas constitucionais e imunológicos são indicados como etiopatogênicos das leucemias (POMBO-DE- OLIVEIRA et al., 2008; BACHIREDDY et al., 2012).

As leucemias agudas são divididas nas seguintes categorias: leucemias linfoblásticas agudas (LLA) de células B ou de células T; leucemias mieloides agudas (LMA), leucemias agudas bilinhagem e leucemias agudas de linhagem indeterminada. Sendo o diagnóstico diferencial de cada uma destas categorias e seus subtipos de extrema importância na escolha da terapia a ser adotada, melhor resposta ao tratamento, bem como seu prognóstico (Lackritz, 2003).

As leucemias linfoblásticas agudas (LLA) são derivadas de proliferação de células indiferenciadas da linhagem linfóide e de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) podem ser classificadas em LLA, segundo a ontogenia de linfócitos B, Pro-B, Pré-Pré-B, Pré-B ou B Maduras, ou ainda segundo a ontogenia de linfócitos T em T imaturas, T intermediárias ou T maduras; e segundo o grupo French American British (FAB) subdivididas morfológicamente em L1, L2 e L3 (FARIAS & CASTRO, 2004; SILVEIRA & ARRAES, 2008). Já as leucemias mieloides agudas (LMA) são um grupo heterogêneo de doenças que se caracterizam pela proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mielóide, a qual segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do grupo FAB podem ser classificadas nos seguintes subtipos: M0/M1 e M2 (mieloblásticas), M3 (promielocítica), M4 (monoblástica), M5 (promonocítica), M6 (eritoblástica) e M7 (megacarioblástica) (SILVA *et al.*, 2006; SILVEIRA & ARRAES, 2008).

Segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) as leucemias agudas podem ser ainda classificadas em bilinhagem pela co-expressão de antígenos das linhagens de mieloides e linfóides B, mieloides e linfóides T, ou das linhagens linfóides B e T consecutivamente; já as leucemias agudas de linhagem indeterminada são assim classificadas por apresentarem a co-expressão de antígenos das três linhagens celulares (DANTAS *et al.*, 2015). Contudo, independente da classificação das leucemias agudas, no hemograma não é possível a identificação da linhagem celular envolvida, sendo possível apenas a referência a presença de blastos na amostra. Assim, cabe ao médico hematologista a solicitação de metodologias mais avançadas como

imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular para a definição exata do tipo de leucemia aguda (PUI *et al.*, 2008).

1.1.4 Caracterização morfológica e diferencial de Blastos mieloides e linfóides no Hemograma.

O hemograma nas leucemias agudas se revela pela presença de anemia normocítica e normocrômica, trombocitopenia (Figura 4), contagem de leucócitos ocasionalmente muito alta, podendo ainda apresentar-se normal ou diminuída, com a contagem diferencial de células brancas associada a neutropenia e presença de blastos, raros ou ausentes em pacientes leucopênicos, ou abundantes em caso de leucocitose. Estas células geralmente são plotadas dentro da população de células de pequeno e/ou médio tamanho e de baixa e/ou moderada complexidade interna (Figura 3), sendo sinalizados pelos aparelhos de hematologia como *flags* indicativos da presença de blastos, linfócitos atípicos ou ainda monocitose (BAIN, 2003; DANTAS *et al.*, 2015).

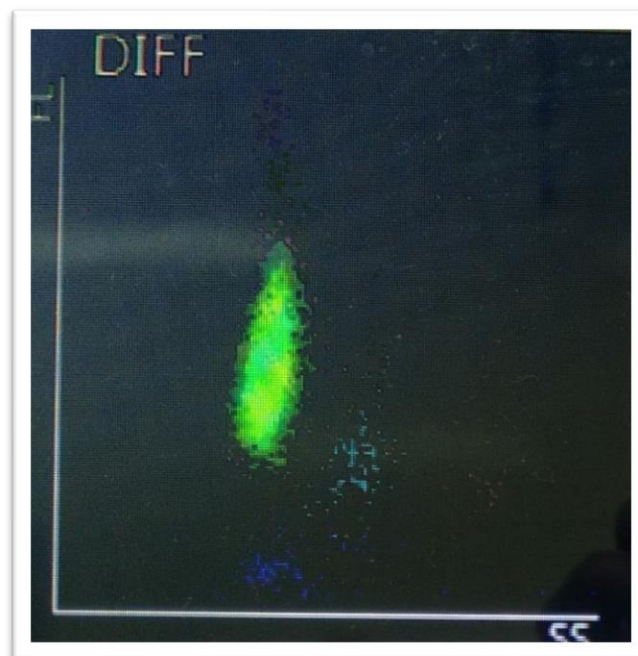


Figura 3. Scatter leucocitário do BC-6800 de um paciente com leucemia aguda (Imagem própria). Blastos, linfócitos atípicos e granulócitos imaturos possuem alto conteúdo de ácido nucleico, de forma que ficam em posição mais alta no sentido de fluorescência no gráfico de dispersão.

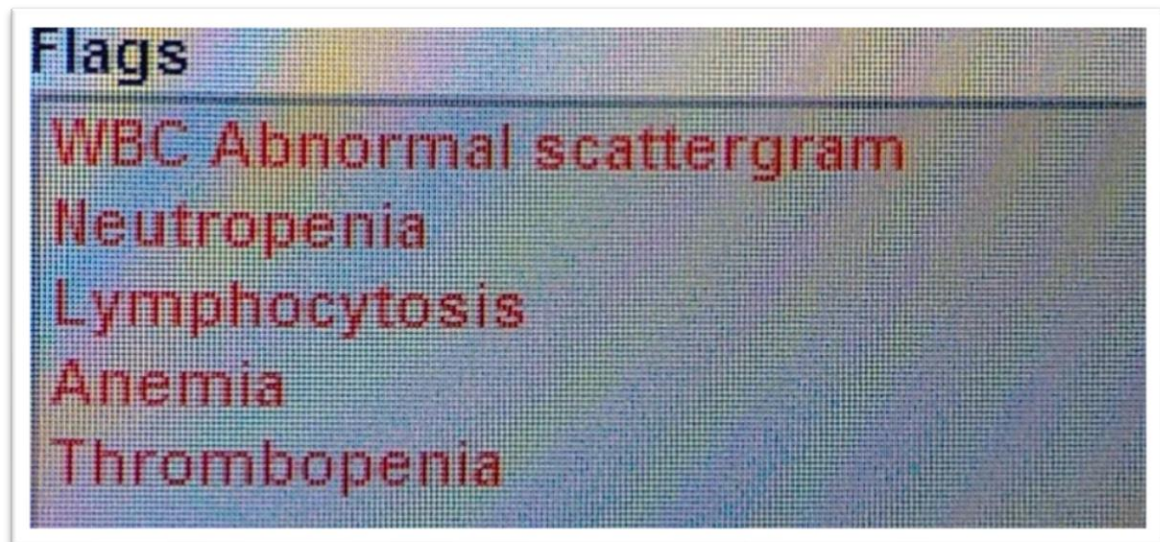


Figura 4. Flags do BC-6800 em um paciente com leucemia aguda.

Os blastos da linhagem mieloide normalmente tem tamanho médio, núcleos ovais ou elípticos, cromatina delicada e cinco a seis nucléolos evidentes. O citoplasma pode variar de moderado a abundante, de basófilo a levemente eosinofílico, podendo apresentar bastonete de Auer (Figura 6) e granulações evidentes as quais marcam a diferenciação morfológica das células em direção a linhagem granulocítica. Já os blastos da linhagem linfoide apresentam núcleo redondo, cromatina frouxa, nucléolos em número de três a cinco pouco evidentes, com citoplasma escasso, levemente basófilo e grânulos ausentes (Figura 5) (POMBO-DE- OLIVEIRA *et al.*, 2008)

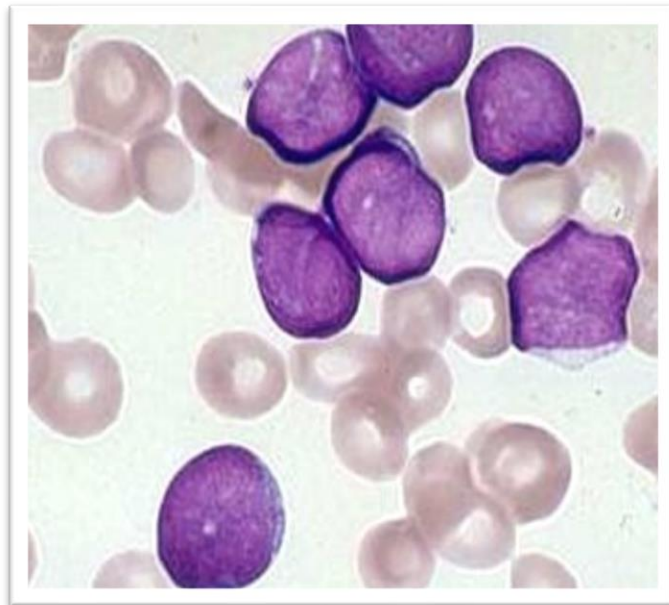


Figura 5. Blastos linfóides. com citoplasma escasso e agranular, nucléolos pouco evidentes (Imagem própria)

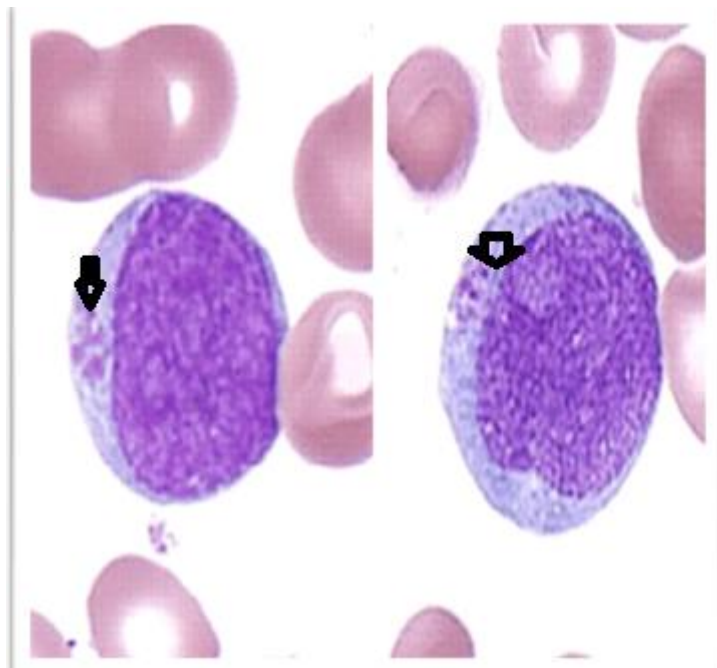


Figura 6. Blasto mielóide com mais citoplasma e presença de grânulos, nucléolos mais evidentes e presença de bastonetes de Auer (setas) (Imagem própria).

2 BIBLIOGRAFIA

LEHNERA J, GREVEB B, CASSENSA U. Automation in Hematology. Transfusion Medicine and Hemotherapy. 2007; 34:328-39.

DAVID DH; BARNES PW. Automated cell analysis. In: KOTTKE-MARCHANT, K.; DAVIS, B. H. (Ed.). Laboratory hematology practice. Singapore: Wiley-Blackwell, 2012; 26-32.

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

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

GULATI GL, SONG J, FLOREA AD, GONG J. Purpose and criteria for blood smear scan, blood smear examination, and blood smear review. Annals of Laboratory Medicine, Seoul, 2013; 33 (1): 1-7.

GROTTO HZW. O hemograma: importância para a interpretação da biópsia. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009; 31(3): 178-182.

BORGES LF, SIQUEIRA LO. Validação de tecnologia 5diff do analisador hematológico Sysmex XS-1000i para laboratório de pequeno/médio porte. Rev. Bras. Hematol. Hemoter 2008.

SILVA PH, HASHIMOTO Y, ALVES HB. Hematologia Laboratorial. Revinter, 2009.

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

BROWN M, WITTEWER C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry* 2000; 46:1221-9.

BACALL NS. Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 2009; 31(4):218-220.

VIVAS, WLP. et al. Manual prático de hematologia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006; 28(4): 284-7.

BRIGGS C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *International Journal of Laboratory Hematology.* Oxford 2009; 31(3): 277-297.

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

CORNBLEET PJ; MYRICK D; JUDKINS S; LEVY R. Evaluation of the Cell-Dyn 3000 differential. *American Journal of Clinical Pathology.* Chicago 1992; 98(6): 603-614.

SILVEIRA NA, ARRAES SMAA. A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. *Arq Mudi.* 2008;12(1):5-14.

POMBO-De-OLIVEIRA MS. Leucemias Infantis: Abordagem imuno-molecular no diagnóstico e nas pesquisas. INCA, MS, Rio de Janeiro, 2008.

BACHIREDDY P; RAKHRA K.; FELSHER DW. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: multiple roles for the immune system in oncogene addiction. *Clinical & Experimental Immunology,* 2012; 167(2):188-194.

LACKRITZ B. Leukemia Introduction. *CancerLynx,* 2003. Disponível em: <http://www.cancerlynx.com/leukemia.html>. Acesso em 05.05.2008.

FARIAS MG, CASTRO SM. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. J. Bras. Patol. Med. Lab, 40(2): 91-98.

SILVA GC, PILGER DA, CASTRO SM, WAGNER SC. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. J Bras Patol Med Lab 2006; 42(2): 77-84.

DANTAS GKS, SILVA LTA, PASSOS XS, CARNEIRO CC. Diagnóstico diferencial da leucemia linfóide aguda em pacientes infanto-juvenis. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações 2015; 13(2): 3-18.

PUI CH, ROBSON LL, LOOK AT. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 2008; 371:103043

BAIN JB. Diagnóstico em Leucemias. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

ANÁLISE DE DESEMPENHO (LEUCOGRAMA E SCATTER) DOS ANALISADORES HEMATOLÓGICOS BC-6800 (MINDRAY) E O URIT 5500 PARA AMOSTRAS DE PACIENTES COM LEUCEMIAS AGUDAS.

MONYQUE BARBOSA RIBEIRO¹ & LACY CARDOSO DE BRITO JUNIOR²

1Biomédica. Mestranda do Programa de Pós-graduação Mestrado Profissional em Análise Clínicas pela Universidade Federal do Pará (UFPA) – Belém-PA.

2Biomédico. Doutor. Professor Associado III do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA. Responsável técnico pelo Laboratório de Patologia Geral – Imunopatologia e Citologia da UFPA. Trabalho desenvolvido no Laboratório de Patologia Geral – Imunopatologia e Citologia da UFPA em parceria com o Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo.

Correspondência: Dr Lacy Cardoso de Brito Júnior

Universidade Federal do Pará – Instituto de Ciências Biológicas - Laboratório de Patologia Geral -Imunopatologia e Citologia

Av. Augusto Corrêa°1 – Bairro Guamá

66075-900 – Belém-PA – Brasil

Tel.:55 91 3201 71 02

E-mail: lcdbrito@ufpa.br ou lcdbrito@bol.com.br

RESUMO

INTRODUÇÃO. Apesar dos avanços na automação hematológica, utilizam combinação de tecnologias, estes não evitam a necessidade de revisão morfológicas para amostras patológicas, sinalizadas por alarmes (*flags*). **OBJETIVO.** Comparar a performance dois analisadores hematológicos quanto ao leucograma e *scatter* leucocitário, para amostras de portadores de leucemias agudas. **MATERIAL E MÉTODOS.** Analisadas 13 amostras, imunofenotipadas para leucemias agudas mieloides ou linfoides, de pacientes de ambos os gêneros e idade de zero e 17 anos, de um laboratório vinculado ao hospital oncológico infantil de Belém - Pará, no período de agosto a dezembro de 2016, para determinação da performance dos equipamentos BC-6800 (Mindray) e URIT 5500 quanto ao leucograma, *scatter* leucocitário e sinalização de blastos (*flags*). **RESULTADOS.** A análise de Correlação Intraclasse de Fleiss para hemácias, hemoglobina, leucócitos e plaquetas demonstrou boa replicabilidade ($p < 0,05$) entre os equipamentos. Não foi realizada análise estatística de desempenho entre os dois equipamentos para a contagem diferencial leucocitaria em função de alguns analitos não terem sido registrados pelo equipamento BC 6800. Os dois equipamentos geraram *flags* quantitativos e qualitativos. Análise do *scatter* leucocitário mostrou que o equipamento BC 6800 foi o único a sinalizar a presença de populações celulares indefinidas por cores (cinza), independente do tipo de leucemia. **CONCLUSÃO.** Nossos resultados sugerem que os dois equipamentos apresentam boa equivalência para parâmetros quantitativos e *flags*. Porém, que o BC 6800, na presença de blastos, por não identificar monócitos e linfócitos no *scatter* leucocitário obriga o observador a análise microscópica da amostra, sendo este mais um importante recurso de análise.

Palavras-chave: *Flags*. Analisadores hematológicos. *Scatter*. Leucemias.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Despite the hematology automation advances, the use of combination technologies, these do not avoid the need for morphological revision for pathological samples, signaled by flags. **OBJECTIVE:** To compare the performance of two hematology analyzer about the leukogram and leukocyte scatter for patients samples with acute leukemia. **METHODS:** We analyzed 13 samples, immunophenotyped for acute myeloid or lymphoid leukemias, of patients of both genders and age of zero to 17 yearsm, from a laboratory linked to the childhood oncology hospital of Belém - Pará, from August to December 2016, for determination of the performance of the BC-6800 (Mindray) and URIT 5500 for leukogram, leukocyte scatter and flag signals. **RESULTS:** The intraclass correlation (Fleiss) for red cells, hemoglobin, leukocytes and platelets showed good replicability ($p < 0.05$) between the devices. No statistical analysis of performance was realized between the two equipments for differential leukocyte counting because some analytes were not registered by the BC 6800 equipment. The two equipments generated quantitative and qualitative flags. Analysis of the leukocyte scarter showed that the BC 6800 device was the only one to signal the presence of undefined cell populations by color (gray), regardless of the type of leukemia. **CONCLUSION:** Our results suggest that the two devices have good equivalence for quantitative parameters and flags. However, BC 6800, in the presence of blasts, does not identify monocytes and lymphocytes in the leukocyte scatter, and needs the observer to perform a microscopic analysis of the sample, which is an important feature of the analysis.

Keywords: Flags. Hematology Analyzer. Scatter . Leukemias.

INTRODUÇÃO

O hemograma é um dos principais exames na triagem clínico-laboratorial do paciente e um coadjuvante indispensável no diagnóstico e controle evolutivo de doenças crônicas em geral, emergências médicas, cirúrgicas e traumatológicas e no acompanhamento de paciente submetidos a quimioterapia e radioterapia^{1,2,3,4,5,6}.

Nos últimos anos, muitos foram os avanços em automação na hematologia laboratorial o que tornou esta metodologia mais aperfeiçoada, através da combinação de vários métodos para a identificação celular em um mesmo equipamento, além de robustez com melhor desempenho no processamento das amostras e precisão dos resultados. Diante disso, foi possível o aumento do número de amostras analisadas em menor tempo, com redução dos custos e do tempo de liberação dos resultados, e ainda aumentando a capacidade de identificação e sinalização (*flags*) de anormalidades quantitativas em populações celulares morfológicamente normais e a sensibilidade para identificar anormalidades morfológicas^{2,3,4,7,8,9}.

Estes avanços têm garantido aos operadores maior segurança na liberação direta de resultados de amostras não-patológicas, que se encontram dentro de certos limites de triagem e sem a presença de alertas (*flags*) emitidos pelos equipamentos^{4,6,7,8}. Contudo, diante do surgimento de marcas de equipamentos ainda desconhecidas do mercado e de rotinas de trabalhos em centros de referência em oncologia, nos quais a grande maioria das amostras são patológicas, torna-se primordial a escolha de equipamentos que apresentem as melhores estratégias de análise e que façam a seleção de amostras para confirmação dos resultados através de análise microscópica, e ainda a validação destes equipamentos^{10,11,12,13,14,15,16,17}.

Os princípios utilizados na maioria dos equipamentos de automação em hematologia é a impedância, Citometria de fluxo, fluorescência e espectrofotometria. São utilizados em combinações pelas principais empresas fabricantes destes equipamentos, como a Beckman Coulter, Sysmex Corporation, Roche Products Ltd, Abbott Diagnostics, Siemens Healthcare Diagnostics/Bayer, Horiba Diagnostics/Horiba ABX entre outros^{8,11,14,16,18}.

Todos estes equipamentos já foram testados e validados mundialmente ^{2,3,8,11,14,16,18,19}, contudo, muitas outras marcas, menos conhecidas, tem sido lançadas no mercado empresarial e estão disponíveis para serem adquiridas pelos laboratórios de análises clínicas oferecendo menores custos operacionais, maior margem de lucro por exame realizado e as mesmas tecnologias disponíveis das grandes marcas. Tornando a decisão sobre a aquisição destes equipamentos uma grande aventura caso não se tenha base científica que comprove a eficiência dos mesmos.

Neste estudo optou-se pela análise de parâmetros de contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas, concentração de hemoglobina e diferencial leucocitária em cinco partes, obtidas no equipamento URIT-5500 que utiliza como métodos de análise: (1) colorimétrico para a determinação da concentração da hemoglobina; (2) impedância elétrica (WIC) e citometria de fluxo (WOC), para a contagem global de leucócitos, hemácias e plaquetas; e (3) citometria de fluxo com dispersão ótica por laser em 4 ângulos, para a determinação da diferencial leucocitária em neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos de acordo com seus tamanhos e complexidade. Semelhante ao descrito para os equipamentos Coulter ^{3,8,14}.

E ainda a obtenção dos mesmos dados no equipamento BC-6800 que utiliza como métodos: (1) colorimétrico para a determinação da concentração da hemoglobina; e (2) impedância elétrica (WIC) e citometria de fluxo (WOC) para a contagem global de leucócitos, hemácias e plaquetas; e (3) de detecção da diferencial leucocitária em cinco partes por citometria de fluxo e tecnologia de análise celular SF Cube que, após reação com reagentes patenteados, as células sanguíneas marcadas conforme o seu conteúdo de DNA/RNA passam por análise 3D utilizando informações de disseminação de luz de laser em dois ângulos, complexidade e tamanho, e sinais de fluorescência para determinar a diferencial leucocitária com elevado grau de exatidão para células maduras e imaturas. Semelhante ao descrito para os equipamentos Sysmex ^{2,3,8,11,14,16,18,19}.

A medição dessas características permite que esses equipamentos forneçam diagramas de dispersão leucocitária (*scatter*), que são representações gráficas bidimensionais relacionando granulocidade (eixo X) versus tamanho (eixo Y), onde a plotagem dos pontos representa a concentração de cada tipo celular. Com isso, o *scatter* leucocitário acaba sendo utilizado como um dos

critérios de análise da população de células presentes em uma determinada amostra^{2,27,28}.

Neste estudo optou-se por analisar o hemograma de portadores de leucemias agudas que freqüentemente se caracterizam pela presença de anemia normocítica e normocrômica, trombocitopenia, com leucócitos normais, aumentados ou diminuídos, e contagem diferencial de leucócitos associada a neutropenia e presença de blastos. Nos quais os blastos geralmente são plotados dentro da população de células de pequeno e/ou médio tamanho e de baixa e/ou moderada complexidade interna, sendo sinalizados pelos aparelhos de hematologia como *flags* indicativos da presença de blastos, linfócitos atípicos ou ainda monocitose^{5,7,10,12,13,20,21,22,23,24}.

Assim, o objetivo deste estudo foi comparar a performance do leucograma e do *scatter* leucocitário de dois analisadores hematológicos, BC-6800 (Mindray) e URIT 5500, para amostras de sangue periférico de pacientes portadores de leucemias mieloides agudas ou leucemias linfoblásticas agudas, previamente imunofenotipadas por citometria de fluxo, no período de agosto a dezembro de 2016.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística e Amostras.

Foram estudadas 13 amostras de pacientes, ambos os gêneros, com idade entre zero e 17 anos, previamente diagnosticados com leucemias agudas por citometria de fluxo, em um laboratório particular vinculado ao Hospital Oncológico Infantil Octávio Lobo localizado na cidade de Belém - Pará, no período de agosto a dezembro de 2016. São 2 pacientes com leucemia mieloide e 11 pacientes com leucemia linfoide.

As amostras utilizadas foram de sangue periférico, coletadas ao diagnóstico dos pacientes, e processadas em até duas horas após a coleta nos equipamentos BC-6800 e URIT-5500 para comparação dos resultados numéricos e do *scatter* leucocitário, com confirmação das alterações leucocitárias através análise microscópica. Para a análise dos *scatter's* leucocitários foram adotados dois critérios: alteração na localização das populações de leucócitos e sobreposição de populações de leucócitos.

Critérios de Exclusão

Foram excluídos pacientes com idades superiores a 17 anos, portadores de outros tipos leucemias que não leucemias agudas, doenças não leucêmicas, ou portadores de leucemias agudas sem a presença de blastos no sangue periférico.

Aspectos Éticos.

Por tratar-se de estudo em que não envolveu contato direto entre os pesquisadores e os sujeitos da pesquisa, visto que estes últimos estavam realizando exames de rotina para diagnóstico, sem a aplicação de nenhuma metodologia diferente as suas amostras ou mesmo intervenção ao paciente, não foi realizada a submissão do referido projeto a um comitê de ética em pesquisa com seres humanos.

Ainda assim, para resguardar a integridade moral e identidade dos sujeitos desta pesquisa, os pesquisadores assinaram termo de compromisso junto a direção do referido laboratório dando fé de que seriam resguardadas as identidades de todos os sujeitos da pesquisa, assim como resguardando os direitos dos fabricantes de cada equipamento, sem que os dados obtidos possam causar qualquer dano a imagem de suas empresas. Ficando então os pesquisadores submetidos as leis vigentes do código civil Brasileiro.

Análise Estatística.

As análises estatísticas foram realizadas através do Correlação Intraclasse de Fleiss no programa BioEstat 5.0²⁵ para a analisar a diferença entre os dados brutos dos equipamentos.

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão representadas as análises de Correlação Intraclasse de Fleiss para o quantitativo de hemácias, plaquetas e a concentração de

hemoglobina, na qual fica demonstrada uma média a boa replicabilidade para estes analitos, e ainda a excelente replicabilidade entre os dois equipamentos (BC 6800 x URIT 5500) para quantificação de leucócitos totais.

Tabela 1. Análise estatística da avaliação comparativa da quantificação de hemácias, plaquetas, leucócitos, e concentração de hemoglobina entre os equipamentos BC 6800 e URIT 5500.

	BC 6800 x URIT 5500 (p)
HEMÁCIAS	p = 0,0031*
PLAQUETAS	p = 0,0063*
HEMOGLOBINA	p = 0,0029*
LEUCÓCITOS	p < 0,0001**

Resultados significativos para uma média a boa*, ou excelente**, correlação Intraclasse de Fleiss, com $p < 0.05$

A mesma análise estatística de desempenho entre os dois equipamentos não foi possível de ser realizada para a contagem da diferencial leucocitária visto que o equipamento BC 6800 não realizou a contagem completa para 53,8% (07/13) dos pacientes (Tabela 2). Em contrapartida, o equipamento URIT 5500 realizou a diferenciação leucocitária em cinco partes para todos os treze pacientes analisados. Em relação aos flags gerados, os dois equipamentos sinalizaram flags quantitativos para linfocitose, neutropenia, leucocitose, trombocitopenia, entre outros. Porém, como flag qualitativos o equipamento BC 6800 gerou um *flag* do tipo “*WBC Abnormal scattergram*”, e o equipamento URIT 5500 um *flag* do tipo “*WBC?*”.

Tabela 2. Dados brutos da quantificação da diferencial leucocitária pelos equipamentos BC 6800 e URITT 5500.

PACIENTE S	LINFÓCITO S (%)		NEUTRÓFILO S (%)		MONÓCITO S (%)		EOSINÓFILO S (%)		BASÓFILO S (%)	
	BC	URIT	BC	URIT	BC	URIT	BC	URIT	BC	URIT
1	94,3	84,94	3,5	8,78	1,6	3,3	0,3	2,9	0,3	0,08
2	***	61,22	13,9	19,35	***	17,04	1,4	2,25	0,2	0,14
3	***	16,71	67,8	76,42	***	5,27	0	0,36	0,7	1,24
4	22,6	69,18	30,4	20,46	46,7	7,36	0	2,94	0,3	0,08
5	94,2	82,94	2,4	5,06	2,8	11,64	0,1	0,32	0,5	0,04
6	***	67,16	14,2	23,89	***	5,83	5,5	3,0	0,6	0,12
7	***	70,26	1,8	18,11	***	10,68	0,03	0,77	0,1	0,18
8	***	70,94	3,9	16,78	***	11,52	0	0,74	0,6	0,02
9	***	82,83	6,8	13,63	***	2,22	0,5	1,08	0,9	0,24
10	92,7	86,26	4,7	8,52	1,4	3,41	0,7	1,79	0,7	0,02
11	***	88,79	***	3,19	***	7,78	***	0,24	***	0
12	97,6	91,66	1,2	4,16	0,8	3,6	0,2	0,58	0,2	0
13	90	82,29	5,7	6,17	3,6	10,68	0,2	0,82	0,5	0,04

Quanto a análise visual dos *scatter's* leucocitários o equipamento BC 6800 foi o único a sinalizar a presença de populações celulares indefinidas (cinza), ou seja, em sua maioria não houve definições dos tipos de leucócito por cores como ocorre nos *scatter* de pacientes normais (Figuras 5 e 6), tanto para pacientes portadores leucemia mieloide aguda, como para portadores de leucemias linfoides agudas de células T ou de leucemias linfoides agudas de células B. Diferente do observado no equipamento URIT 5500 que teve em todos os seus *scatter's* as definições dos tipos de leucócito por cores semelhante ao observado em pacientes normais, independente do tipo de leucemia, mas com sobreposição de classes diferentes de leucócitos.

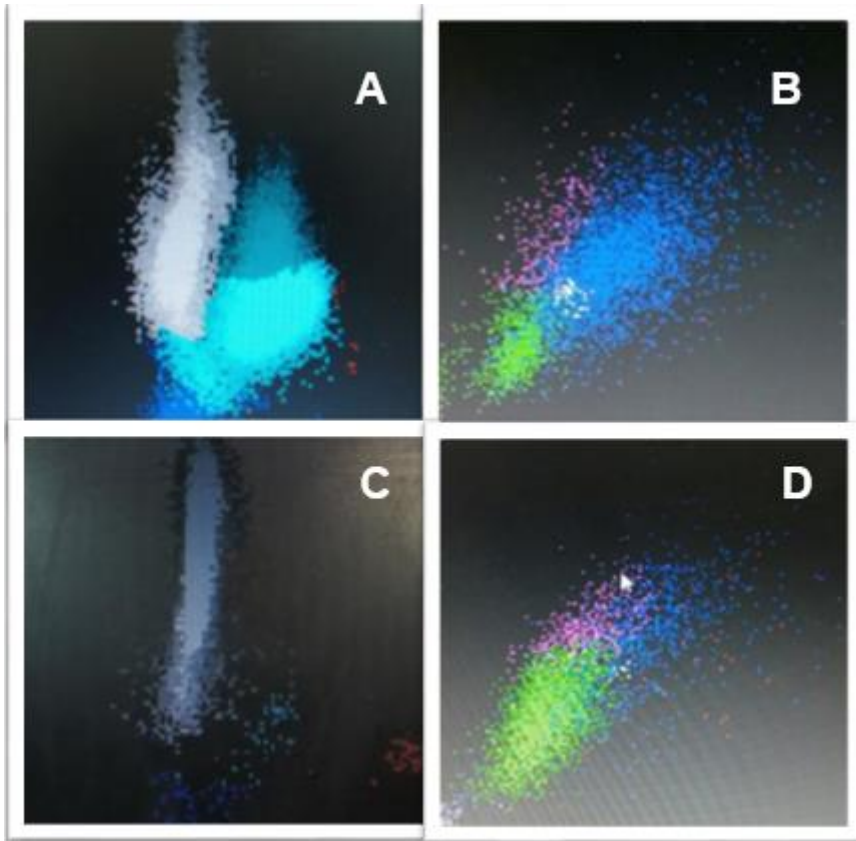


Figura 1. Scatter leucocitário de pacientes com Leucemia Mielóide Aguda. A e C (BC 6800), B e D (URIT 5500)

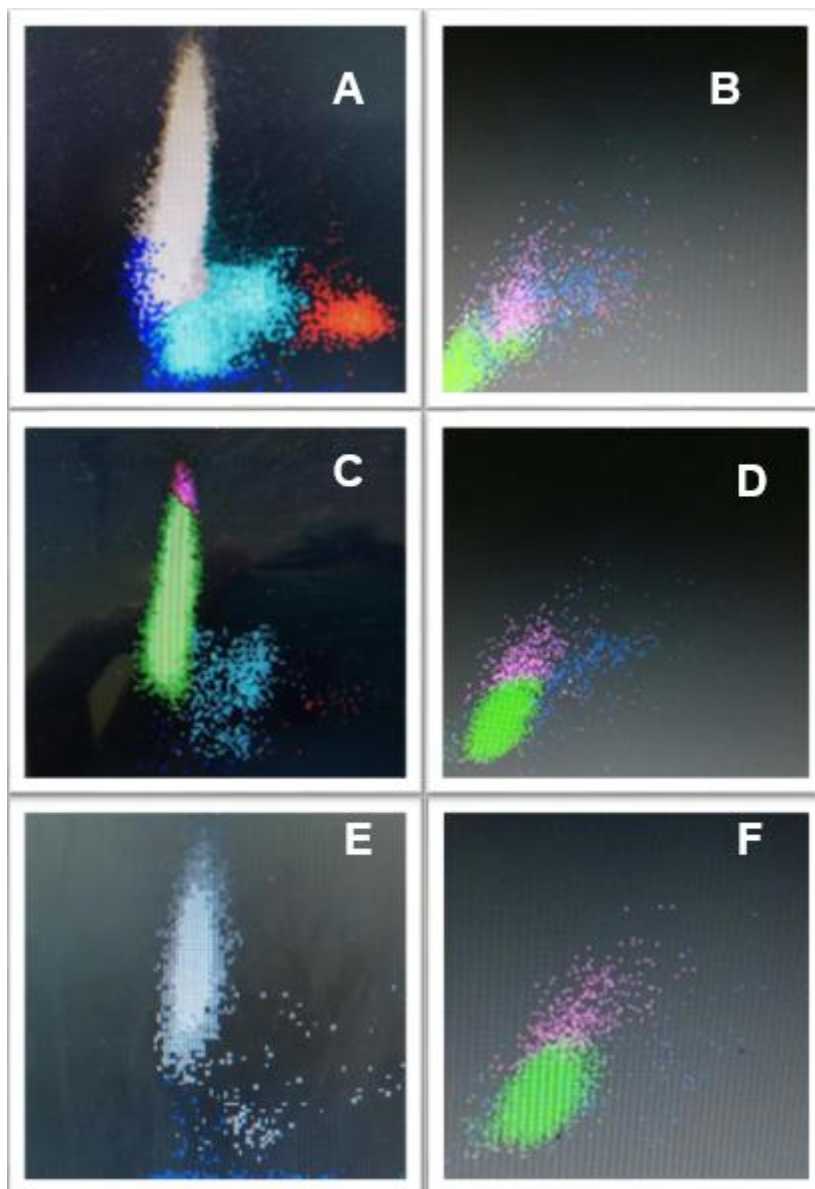


Figura 2. Scatter leucocitário de pacientes com Leucemia Linfóide. A, C e E (BC 6800), B, D e F (URIT 5500).

DISCUSSÃO

Os contadores hematológicos utilizados nesta pesquisa, BC-6800 e URIT-5500, embora utilizem combinações de metodologias diferentes para contagem e identificação da diferencial leucocitária em cinco partes, mostraram boa reprodutibilidade estatística para hemácias, plaquetas, leucócitos e concentração de hemoglobina. Estes dados são também semelhantes aos

descritos na literatura para outros modelos de equipamentos similares de automação em hematologia ^{2,3,8,11,14,16,18,19}.

Diante do fato de que a maioria dos equipamentos de hematologia são fabricados para identificar amostras não-patológicas ^{4,5,6,10,12,13,16,17}, a escolha destes equipamentos foi estabelecida também para possibilitar a avaliação da capacidade dos mesmos em realizar a diferencial leucocitária em cinco partes e de alertar o operador, de forma numérica, gráfica (*scatter*) ou através de flags quanto a presença de alterações leucocitárias em amostras de pacientes portadores de leucemias agudas.

Neste sentido observou-se que apenas o equipamento URIT 5500 realizou a diferenciação leucocitária em cinco partes para todos os pacientes analisados, enquanto que o equipamento BC 6800 realizou a mesma contagem para apenas 46,2% dos pacientes. Mostrando que a não realização da contagem diferencial leucocitária em cinco partes é uma importante ferramenta de bloqueio de amostra e alerta numérico para a necessidade de revisão morfológica das células em esfregaços sanguíneos.

Outro importante alerta emitido por estes equipamentos ao observador são os flags, em nossos estudos não foram observados flags falso-negativos, ou seja, alterações não detectadas pelo aparelho no roll amostral, o que denota uma boa especificidade dos equipamentos analisados. Sendo esta mais uma boa ferramenta para reduzir as chances de erros na liberação direta de um laudo de hemograma automatizado. Estes dados são corroborados também por outros autores quando da análise de equipamentos que utilizam as mesmas metodologias ^{2,3,4,5,6,10,11,12,13,16,17,19}.

A falta da contagem da diferencial leucocitária em cinco partes pelo equipamento BC-6800 gerou também como consequência *scatter's* leucocitários indefinidos por cores e com sobreposição de linfócitos e monócitos, sendo esta última também presente nos *scatter's* do URIT5500, independente do tipo de leucemia (mieloides ou linfoides). Mostrando que estes comportamentos são importantes ferramentas de análise indireta da presença de células jovens (blastos) na amostra, e de bloqueio da mesma para a revisão morfológica das células em esfregaços sanguíneos. Esta sobreposição de populações celulares

de monócitos e linfócitos no *scatter* leucocitário, contudo, não é específica para a identificação de células jovens (blastos), sendo observada também quando há presença de linfócitos atípicos ou prolinfócitos. Já tendo sido descritas estas situações desde 1998²⁶ por vários autores^{2,4,5,10,11,12,13,16,17,19,21}.

As células jovens (blastos) de amostras analisadas em equipamentos que utilizam as metodologias de citometria de fluxo com sinais fluorescentes se localizam na região de monócitos ou linfócitos, podendo haver sobreposição dessas classes de leucócitos dentro do *scatter* leucocitário, em função das características de tamanho, granulosidade citoplasmática e quantidade de DNA/RNA dos blastos leucêmicos ser semelhante a destas populações celulares^{3,8,14,19}.

Este padrão do *scatter* leucocitário, de sobreposição de células, se mostrou com extrema importância na análise inicial do hemograma, pois eles fornecem a primeira informação de quais tipos de células podem ser encontradas na visualização microscópica do esfregaço sanguíneo. De modo que, os blastos da linhagem mieloide normalmente vão apresentar-se de tamanho médio, núcleos ovais, cromatina delicada, nucléolos de cinco a seis evidentes e citoplasma moderado podendo apresentar bastonete de Auer e granulações²². Já os blastos da linhagem linfóide se apresentarão com núcleo redondo, cromatina frouxa, nucléolos de três a cinco pouco evidentes, com citoplasma escasso e sem grânulos^{23,24}.

CONCLUSÃO

Para os parâmetros avaliados quantitativamente os dois equipamentos apresentaram resultados equivalentes, e os *flags* igualmente indicadores de anormalidade. Porém, quando foram analisados os parâmetros qualitativos, o BC 6800 apresentou um desempenho melhor que o U RIT 5500, pois por não separar corretamente monócitos e linfócitos, na presença de blastos, torna obrigatória a revisão da contagem celular por microscopia. Sendo a análise do *scatter* leucocitário uma importante ferramenta como critério de revisão em

lamina para o reconhecimento celular, aliado sempre a outros parâmetros do hemograma fornecido pelos contadores automáticos.

É importante salientar que o manuseio e interpretação dos dados fornecidos pelos contadores automáticos de hemograma são dependentes da qualificação do profissional da área. Então o analista precisa estar devidamente treinado para o manuseio técnico do equipamento, reconhecimento celular na microscopia e também relacionar seus conhecimentos teóricos em hematologia.

BIBLIOGRAFIA

1. Grotto HZW. O hemograma: importância para a interpretação da biópsia. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009; 31(3): 178-182.
2. Borges LF, Siqueira LO. Validação de tecnologia 5diff do analisador hematológico Sysmex XS-1000i para laboratório de pequeno/médio porte. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 2008; 31(4):247-251.
3. Briggs C, Linssen J, Longair I; Machin SJ. Improved flagging rates on the Sysmex XE-5000 compared with the XE-2100 reduce the number of manual film reviews and increase laboratory productivity. *American Journal of Clinical Pathology.* 2011; 136 (2): 309-316.
4. Failace R, Pranke P. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de hemogramas através de contadores eletrônicos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2004; 26(3): 159-166.
5. Tseng V, Morgan AS, Leith CP, Yang DT. Efficient assessment of peripheral blood lymphocytosis in adults: developing new thresholds for blood smear review by pathologists. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2014; 52 (12): 1763-1770.
6. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *International Journal of Laboratory Hematology.* Oxford 2009; 31(3): 277-297.
7. Pratumvinit B, Wongkrajang P, Reesukumal K, Klinbua C, Niamjoy P. Validation and optimization of criteria for manual smear review following automated blood cell analysis in a large university hospital. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine.* 2013; 137(3): 408-14.
8. Kang SH, Kim HK, Ham CK, et al. Comparison of four hematology analyzers, CELL-DYN Sapphire, ADVIA 120, Coulter LH 750, and Sysmex XE-2100, in terms of clinical usefulness. *Int Jnl Lab Hem.* 2008; 30: 117-123.

9. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *American Journal of Clinical Pathology*. 2008; 130 (1): 104-116.
10. Comar SR, Malvezzi M, Pasquini R. Are the review criteria for automated complete blood counts of the International Society of Laboratory Hematology suitable for all hematology laboratories? *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2014a; 3: 219-225.
11. Comar SR, Malvezzi M, Pasquini R. The usefulness of suspect flags on the Sysmex XE-2100D hematology analyzer. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2014b; 36(1): 110-115.
12. Galloway MJ, Charlton A, Holland D, Trigg G, Gibson R. An audit of the implementation of the international consensus group's guidelines on reporting of blood films. *Journal of Clinical Pathology*. 2010; 63(4): 351-354.
13. Hoffmann JJ. Criteria for microscopic review following automated hematology analysis. *Chinese Medical Journal*. 2011; 124(7): 1119-21.
14. Bacall NS. Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 2009; 31(4):218-220.
15. Froom P, Havis R, Barak M. The rate of manual peripheral blood smear reviews in outpatients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2009; 47(11): 1401-1405.
16. Sun S, Weng Y, Li G. Establishment and evaluation the review criteria for Sysmex KX21 blood cell analyzer. *International Journal of Laboratory Medicine*. 2010; 31(5): 436-437.
17. Bandeira R, Magalhães AF, Aquino HBS. Interpretação dos critérios de liberação dos resultados de hemograma através de contadores automatizados em laboratório de urgência. *Revista Saúde e Pesquisa*. 2014; 7(3): 403-408.
18. Maciel TES, Comar SR, Beltrame MP. Performance evaluation of the Sysmex® XE-2100D automated hematology analyzer. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2014; 50(1): 26-35.
19. Stamminger G, Auch D, Diem H, Sinha P. Performance of the XE-2100 leukocyte differential. *Clinical and Laboratory Haematology*. 2002; 24(5): 271-280.
20. Woo HY, Shin SY, Park H, Kim YJ, Kim HJ, Lee YK, Chae SL, Chang YH, Choi JR, Han K, Cho SR, Kwon KC. Current status and proposal of a guideline

for manual slide review of automated complete blood cell count and white blood cell differential. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*. 2010; 30(6): 559-566.

21. Gulati GL, Bourne S, El Jamal SM, Florea AD, Gong J. Automated lymphocyte counts vs. manual lymphocyte counts in chronic lymphocytic leukemia patients. *Laboratory Medicine*. 2011; 42(9): 545-548.

22. Silva GC, Pilger da, Castro SM, Wagner SC. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *J Bras Patol Med Lab*. 2006; 42(2): 77-84.

23. Pui CH, Robson LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008; 371(9617):1030-43.

24. Farias MG, Castro SM. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfoides agudas. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. 2004; 40(2): 91-98.

25. Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AAS. *Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: IDSM, 2007.364p

26. SpadA C, Treitinger A, Ramos LFM, Moritz E, Ferreira SC, Steinwandter MM, Steinwandter ST, Cezarott FS, Souza NMA, Silva MVPF. Avaliação da contagem diferencial de células sanguíneas por metodologia automatizada e microscopia óptica. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 1998; 30 (4): 191-193.

27. Lehnera J, Greveb B, Cassensa U. Automation in Hematology. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2007; 34:328-39.

28. Brown M, Wittwer C. *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology*. *Clinical Chemistry* 2000; 46:1221-9

