



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Adna dos Santos Caldas

**PRODUÇÃO DE PARACER TÉCNICO SOBRE A VALIDAÇÃO DA
CONTAGEM AUTOMATIZADA DE ERITROBLASTOS EM
CONTADOR HEMATOLÓGICO BC6000 PARA A ROTINA EM
LABORATÓRIOS DE ANÁLISES CLÍNICAS**

BELÉM-PARÁ

2021

ADNA DOS SANTOS CALDAS

**PRODUÇÃO DE PARACER TÉCNICO SOBRE A VALIDAÇÃO DA
CONTAGEM AUTOMATIZADA DE ERITROBLASTOS EM
CONTADOR HEMATOLÓGICO BC6000 PARA A ROTINA EM
LABORATÓRIOS DE ANÁLISES CLÍNICAS**

Dissertação apresentada como critério obrigatório ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito final para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Júnior

BELÉM-PARÁ

2021

- C145p Caldas, Adna dos Santos.
Produção de Parecer Técnico sobre a validação da contagem automatizada de eritroblastos em contador hematológico BC6000 para a rotina em laboratórios de Análises Clínicas : pesquisa metodológica de desenvolvimento / Adna dos Santos Caldas. — 2021.
40 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Lacy Cardoso Brito Jr
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, , ,
Belém, 2021.

1. automação laboratorial. 2. analisador de hematologia. 3. eritroblastos. 4. hematologia. I. Título.

CDD 612.11

ADNA DOS SANTOS CALDAS

**PRODUÇÃO DE PARACER TÉCNICO SOBRE A VALIDAÇÃO DA
CONTAGEM AUTOMATIZADA DE ERITROBLASTOS EM
CONTADOR HEMATOLÓGICO BC6000 PARA A ROTINA EM
LABORATÓRIOS DE ANÁLISES CLÍNICAS**

Local e data da defesa: Belém - PA, 30 de agosto de 2021.

Banca Avaliadora

Prof. Dr. LACY CARDOSO DE BRITO JÚNIOR
(Presidente - Orientador)

Prof.^a Dr.^a ANDRÉA NAZARÉ MONTEIRO RANGEL DA SILVA
(1^a Avaliadora)

Prof.^a Dr.^a MIONI THIELI FIGUEIREDO MAGALHÃES DE BRITO
(2^a Avaliadora)

Prof.^a Dr.^a CAROLINA HEITMAN MARES AZEVEDO RIBEIRO
(3^a Avaliadora)

Prof.^a Dr.^a RITA DE CÁSSIA MOUSINHO RIBEIRO
(4^a Avaliadora)

RESUMO

INTRODUÇÃO. A contagem diferencial de eritroblastos em amostras de sangue periférico por auto-analisadores hematológicos ainda apresenta limitações. Avanços tecnológicos nos equipamentos de hemograma tem proposto a contagem totalmente automatizada dessas células. Necessitando contudo de validação para seu uso clínico. **OBJETIVO.** Validar a contagem automatizada de eritroblastos em amostras de sangue periférico no aparelho de hematologia BC6000 (Mindray®) e verificar se existe correlação entre os estágios maturativos de eritroblastos com os gráficos do equipamento e elaborar um Parecer Técnico. **MATERIAL E MÉTODOS.** Estudo do tipo pesquisa metodológica de desenvolvimento de tecnologia em saúde a ser realizada em quadro fases: obtenção e análise de dados sobre as contagens de eritroblastos através das metodologias automatizada e manual (Padrão Ouro) no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo, Belém - Pará, no período de junho de 2019 a dezembro de 2020; levantamento bibliográfico; e identificação dos critérios técnicos para a construção da tecnologia em saúde (Parecer Técnico). **RESULTADOS.** Foram analisadas 17 amostras de sangue periférico de recém-nascidos (09/17 - 52,9%) e de pacientes com idade superior a 2 anos (08/17 - 47,1%) que apresentavam mais de 18% de eritroblastos após análise morfológica da amostra. A análise estatística das contagens de eritroblastos pelas duas metodologias mostrou que o contador hematológico BC6000 (Mindray®) tem uma boa reprodutibilidade, precisão e linearidade para a contagem de eritroblastos em sangue periférico. Não foi observada correlação entre os estágios maturativos de eritroblastos, imunofenotipados por citometria de fluxo, com os gráficos do equipamento, para isso foram utilizadas 20 amostras de medula óssea como controle positivo para a caracterização imunofenotípica das populações de eritroblastos. **CONCLUSÃO.** A validação proposta mostrou que o contador hematológico BC6000 da Mindray® apresenta bom desempenho analítico para a contagem de eritroblastos em sangue periférico. Porém, não guarda correlação entre os estágios maturativos de eritroblastos com os gráficos gerados pelo equipamento. Este estudo gerou um Parecer Técnico sobre o uso desse equipamento para a contagem de eritroblastos para orientação dos profissionais de saúde que utilizam este contador hematológico na rotina laboratorial.

PALAVRAS-CHAVE: Hematologia; eritroblastos; automação laboratorial; analisador de hematologia.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Differential counting of erythroblasts in peripheral blood by hematological autoanalyzers still has limitations. Technological advances in blood count equipment have proposed a fully automated counting of these cells. However, it needs validation for its clinical use. **OBJECTIVE.** Validate an automated count of erythroblasts in your peripheral blood using the BC6000 hematology device (Mindray®) and check whether there is a correlation between the maturation of erythroblasts with the equipment's graphics and prepare a Technical Opinion. **MATERIAL AND METHODS.** Study of the methodological research type of health technology development to be carried out in four phases: obtaining and analyzing data on erythroblast counts through automated and manual methodologies (Gold Standard) at the Clinical Pathology Laboratory Dr. Paulo C. Azevedo, Belém - Pará, from June 2019 to December 2020; bibliographic survey; and identification of technical criteria for the construction of health technology (Technical Advice). **RESULTS.** Seventeen peripheral blood from newborns (09/17 - 52.9%) and patients older than 2 years (08/17 - 47.1%) who had more than 18% of erythroblasts after morphological analysis of the sample were analyzed. A statistical analysis of erythroblast counts by the two methodologies revealed that the BC6000 hematology counter (Mindray®) has good reproducibility, precision and linearity for a peripheral blood erythroblast count. There was no correlation between the maturation stages of erythroblasts, immunophenotyped by flow cytometry, with the equipment's graphics, for this, 20 bone marrow samples were used as a positive control for the immunophenotypic characterization of erythroblast populations. **CONCLUSION.** A validation proposal presented that Mindray® BC6000 Hematology Counter has good analytical performance for a peripheral blood erythroblast count. However, there is no correlation between the maturation stages of erythroblasts with those generated by the equipment. This study generated a Technical Advice on the use of this equipment for an erythroblast count for guidance of health professionals who use this hematological counter in laboratory routine.

KEYWORDS: Hematology; erythroblasts; laboratory automation; hematology analyzer.

LISTA DE TABELAS

Quadro 1: Resultados da análise das amostras de sangue periférico selecionadas. (Pág. 24)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hematopoiese na fase embrionária.

Figura 2: Maturação eritróide.

Figura 3: Representação gráfica de dispersão celular do tipo Dot plots para a caracterização das populações de eritroblastos na medula óssea (A, B e C) por citometria de fluxo, onde: em roxo são eritroblastos ortocromáticos e reticulócitos (Fig de 1A até 1N); em verde são eritroblastos policromáticos (Fig 1A e 1B); em vermelho os eritroblastos basófilos (Fig 1A e 1B); em laranja os proeritroblastos (Fig 1C); e em azul os linfócitos (Fig 1A, 1B e 1C) em amostras de medula óssea. E nas figuras 1E, 1F, 1G, 1I, 1J, 1K, 1M, 1N e 1O estão representadas as populações de eritroblastos em sangue periférico por citometria de fluxo, onde: em roxo são eritroblastos ortocromáticos e reticulócitos; em vermelho são eritroblastos policromáticos; e em preto são prováveis restos celulares. Já os gráficos de complexidade (FS) X fluorescência nuclear (FL) são relativos as amostras de sangue periférico obtidos no equipamento BC6000 (D, H, L e P), onde: na Fig 1D são representados em verde os eritroblastos e em vermelho os linfócitos; e nas fig 1H, 1L e 1P estão representados em verde apenas os eritroblastos. (Pág. 25)

LISTA DE ABREVIACÕES

CTHs- Células Tronco Hematopoiéticas

Epo- Eritropoietina

Hb- Hemoglobina

Hbf- Hemoglobina fetal

DNA- Ácido Desoxiribonucleico

RNA- Ácido Ribonucleico

WBC- *White Blood Cells*

HGB- Concentração de Hemoglobina

MCHC- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

MCH- Hemoglobina Corpuscular Média

MCV- Volume Corpuscular Médio

Hto- Hematócrito

RDW- *Red Cell Distribution Width*

RBC- *Red Blood Cells*

NRBC- *Nuclear Red Blood Cells*

TCUD- Termo de Consentimento de Uso de Dados

TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

PBS- Perbarato de Sódio

SPSS- *Statistical Package for Social Sciences*

ICSH- Conselho Internacional para Padronização em Hematologia

BC- *Beckman Coulter*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. A medula óssea, o microambiente medular e a hematopoiese	12
2.2. A Eritropoiese	14
2.3. Caracterização morfológica e imunofenotípica dos precursores eritróides.	15
2.4. O Hemograma: Princípios e objetivos.	17
2.5. O Hemograma e a presença de eritroblastos.	18
3. PROBLEMATIZAÇÃO	19
4. OBJETIVOS	19
4.1. OBJETIVO GERAL	19
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. METODOLOGIA	20
5.1. CONFECÇÃO DE PARECER TÉCNICO	20
5.1.2. Tipo de Estudo	20
5.1.3. Fases do Estudo	20
5.1.4. Primeira Fase – Levantamento bibliográfico.....	21
5.1.5. Segunda Fase – Obtenção e análise de dados	21
5.1.6. Terceira Fase – Construção da Tecnologia em Saúde	21
5.2. Casuística.....	22
5.2.1. Critérios de inclusão e exclusão.....	22
5.2.2. Critérios Éticos	23
5.2.3. Riscos e benefícios.....	23
5.2.4. Caracterização das amostras	23
5.2.5. Caracterização da presença de eritroblastos pelo equipamento BC6000 (Mindray®)23	
5.2.6. Caracterização imunofenotípica dos eritroblastos	24

5.2.7. Análise Estatística	25
6. RESULTADOS	25
7. DISCUSSÃO	28
8. CONCLUSÃO	30
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXO I.....	36

1 INTRODUÇÃO

O hemograma é um teste de suporte diagnóstico muito útil na prática médica, sendo um dos exames mais solicitados aos laboratórios clínicos por não se restringir unicamente a investigação de doenças hematológicas, ou contagem de células do sangue, mas sim como uma importante ferramenta de estudo sobre as condições de homeostase de um paciente, através de uma análise quantitativa e qualitativa dos elementos figurados do sangue (QIAN et al, 2016).

Esta ferramenta, ao longo dos anos, tem passado por constantes avanços tecnológicos que trouxeram modernização à contagem das células do sangue por meio de sofisticados equipamentos laboratoriais. Atualmente os equipamentos de hematologia dispõem de estações de análises com esteiras e analisadores hematológicos que fazem a detecção de células anormais e sinalizam aos operadores através de alertas/alarmes (*flags*), confecção e coloração de lâminas, conferindo assim maior segurança na liberação dos resultados (REYES; SARRAF; RUISECO, 2015).

O processo de automação em hematologia porém não parou por aí, e hoje muitos desses equipamentos permitem também outras análises como: a contagem de reticulócitos, que é um analito básico na avaliação da resposta eritropoiética e complementar ao resultado do hemograma; a marcação e contagem diferencial de células mielóides jovens (mieloblastos) pela mieloperoxidase; e ainda a contagem diferencial de eritroblastos de forma automatizada (GODON et al, 2012).

A identificação e contagem diferencial de eritroblastos por auto-analisadores hematológicos, embora muito necessária para amostras de pacientes pediátricos (recém-nascidos) e portadores de anemias hemolíticas graves, ainda apresenta limitações principalmente pelo conflito que pode existir quando da contagem linfócitos já que, de modo geral, os eritroblastos são contados junto com a população de linfócitos na maioria dos equipamentos automatizados de hematologia (LEONART, 2009; BENTO, 2019).

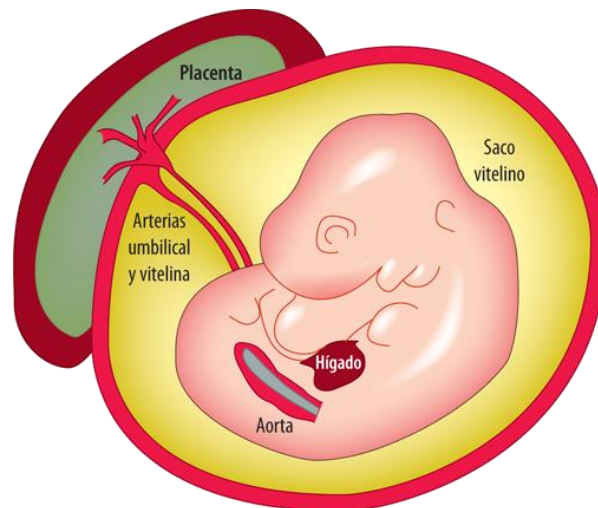
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A medula óssea, o microambiente medular e a hematopoiese

O sistema hematopoiético é responsável pela produção de uma ampla variedade de tipos de células que compõem o tecido sanguíneo, como: eritrócitos, plaquetas, granulócitos

(neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e linfócitos que, em conjunto, tem importante função na homeostase do indivíduo. Contudo, a produção de células sanguíneas no organismo humano só ocorre na medula óssea após o nascimento (AL-DREES et al, 2015).

Durante a embriogênese, por exemplo, a primeira estrutura responsável pela hematopoiese é o saco vitelino (figura 1), um tecido extraembrionário transitório, que contém as células tronco embrionárias em intenso processo de diferenciação para formar os diversos tipos de tecidos do nosso corpo. Nesse sentido as primeiras células sanguíneas a serem produzidas são os monócitos, os precursores de plaquetas (megacariócitos) e plaquetas, precursores de hemácias (eritroblastos) e hemácias, e os linfócitos (AL-DREES et al, 2015; BABOVIC; EAVES, 2014).



Fuente: Jesús A. Fernández-Tresguerres: *Fisiología humana*, 4e: www.accessmedicina.com
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

Figura 1: Hematopoiese na fase embrionária.

Em seguida a essa fase inicial que dura apenas 8 semanas, e após a formação do tubo neural e os diversos órgãos do corpo humano, as células tronco hematopoiéticas (CTHs) migram para o fígado e baço fetais onde multiplicam-se e diferenciam-se para a produção das células sanguíneas fetais. De modo que, somente próximo do nascimento é que essas CTHs migram para nichos (microambiente da medula óssea) em desenvolvimento da medula óssea, onde permanecem ao longo da vida adulta nos ossos chatos (BABOVIC; EAVES, 2014).

A diferenciação das CTHs residentes no microambiente da medula óssea é induzida através da estimulação dessas por interação célula-célula, com as células desse microambiente (macrófagos, adipócitos, células endoteliais e fibroblastos), e por fatores extrínsecos como citocinas, ineterleucinas, fatores estimuladores de colônias e hormônios que interagem com os receptores da superfície celular e iniciam as vias de sinalização para diferenciação celular (ASADA; TAKEISHI; FRENETTE, 2017).

Durante os primeiros dez anos de vida todos os ossos do corpo humano apresentam medula óssea ativa (medula vermelha). Porém, com o desenvolvimento humano, e por ação dos hormônios sexuais e do crescimento durante toda a segunda década de vida, essa medula vermelha dos ossos longos vai sendo gradual e progressivamente substituída por uma medula inativa (medula amarela ou gordurosa), que é necessária para nutrir as células ósseas envolvidas no crescimento endocondral (REINA; LARA; CLAVIJO, 2007).

No adulto, após a segunda década de vida, a produção de células sanguíneas pelas CTHs da medula óssea vermelha fica restrita aos ossos chatos como cristas ilíacas, esterno, corpos vertebrais e costelas; e ainda as epífises distais e proximais dos ossos longos (REINA; LARA; CLAVIJO, 2007; DZIERZAK; PHILIPSEN, 2013; ASADA; TAKEISHI; FRENETTE, 2017).

2.2 A Eritropoiese

Como vimos, a produção de precursores eritróides (eritroblastos) e hemácias maduras começam desde muito cedo no desenvolvimento humano. Essas células que têm uma vida útil média de 120 dias e representam o tipo celular mais abundante no sangue humano com aproximadamente 5×10^6 eritrócitos por microlitro, com intervalos de normalidade entre $4,7 \times 10^6$ a $6,1 \times 10^6$ para homens e $4,2 \times 10^6$ a $5,4 \times 10^6$ para mulheres (DZIERZAK; PHILIPSEN, 2013).

A eritropoiese, contudo, é um processo de múltiplas fases complexas que envolvem a diferenciação e maturação das células tronco hematopoiéticas em eritrócitos maduros. Este processo é mediado por vários fatores de crescimento e inibidores celulares, onde dentre esses o principal é o hormônio chamado eritropoietina (Epo) que é produzido em cerca de 85-90% nos rins e apenas 10-15% no fígado, sendo esse último o responsável pela produção de Epo durante o desenvolvimento fetal (VITTORI; CHAMORRO; NESSE, 2016; OSTA, 2014).

A estimulação da eritropoiese pela ação da Epo acontece através da ligação desse hormônio com os receptores de Epo presentes nos proeritroblatos na medula óssea, de modo a desencadear as vias de sinalização intracelular que favorecem a proliferação desses clones celulares. E que em fase tardia da diferenciação têm os eritroblastos ortocromáticos expulsando o núcleo de seu citoplasma, juntamente com as demais organelas intracitoplasmáticas, para gerar a última fase antes da formação das hemácias maduras que é a forma dos reticulócitos, que podem permanecer na medula óssea por cerca de 24 horas antes de serem liberados na corrente sanguínea onde irão concluir o seu amadurecimento celular e

completam a produção de hemoglobina (Hb) após mais um período igual de 24 a 48 horas (LI et al., 2018).

Essa produção de hemoglobina contudo começa já nos eritrócitos primitivos e emergentes do saco vitelino embrionário. Nessa fase a hemoglobina se caracteriza pela expressão de cadeias globinas embrionárias que formam uma variedade de tetrâmeros de hemoglobina (Gower 1, Gower 2 e Portland) presentes apenas na fase embrionária do desenvolvimento humano, e que é seguida pela expressão de outro tipo de hemoglobina, hemoglobina fetal (HbF), que vai persistir no desenvolvimento humano até o sexto mês após o nascimento, sendo em seguida silenciada até que prevaleça a hemoglobina adulta A1 (DZIERZAK; PHILIPSEN, 2013).

Resumidamente podemos dizer que a produção de hemácias e de hemoglobina é dependente de três fatores: da Epo como fator de diferenciação celular; da vitamina B12 e do ácido Fólico para a síntese de DNA; e do ferro para a hemoglobinizacão em todas as fases do desenvolvimentos dos eritócitos. Um indivíduo adulto tem no seu organismo de 4 a 5g de ferro, sendo cerca de 2,5g desse total são utilizados para a formação da Hb. E diferentemente do que acontece com as reservas de vitamina B12 e de ácido Fólico as quais são dependentes diretamente da alimentação, as reservas de ferro no organismo humano são vastas e diretamente relacionadas ao seu armazenamento no fígado, baço e medula óssea onde ocorre o fenômeno de recirculação do ferro, e também pela absorção é armazenado o ferro proveniente da alimentação nos enterócitos (GROTTO, 2008).

2.3 Caracterização morfológica e imunofenotípica dos precursores eritróides

Como já comentado anteriormente os precursores eritróides nucleados (proeritroblastos e eritroblastos) passam por seu amadurecimento todo dentro da medula óssea, ficando apenas os reticulócitos com o seu amadurecimento em parte ocorrendo na medula óssea e em parte na corrente sanguínea (LI et al., 2018).

O processo de diferenciação eritróide medular envolve cinco fases de amadurecimento celular que estão associadas a alterações nucleares e citoplasmáticas, ligadas ao aumento progressivo da produção de hemoglobina, e que vão desde os proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblasto policromático, eritroblastos ortocromático, e por fim o reticulócito (SANTOS, 2014).

Essa maturação, como comentado, é seguida por maturação nuclear com condensação da cromatina e nucléolos, e diminuição dos núcleos em aproximadamente 20% do tamanho

original, seguido de diminuição do tamanho celular até a enucleação para formação dos reticulócitos; além de maturação citoplasmática com aumento da hemoglobinizacão. Essas modificações morfológicas são seguidas de alterações na expressão de diversos antígenos celulares, como exemplo, podemos citar a expressão do antígeno conhecido como CD71. Esse antígeno CD71 representa os receptores da transferrina que são expressos em altos níveis na membrana dos proeritroblastos e eritroblastos, e que tem a sua expressão diminuída em função do amadurecimento celular e final do processo de hemoglobinizacão até que esteja ausente nas células eritróides maduras anucleadas (figura 3) (BARON, 2013; FIGUEIRA; SOUZA, 2018).

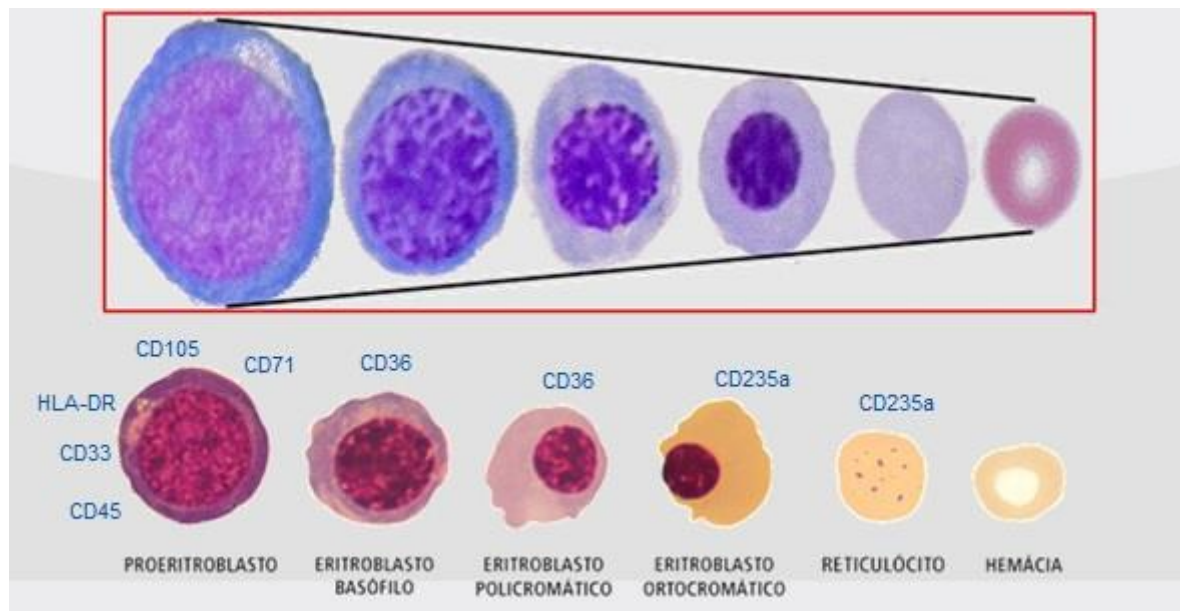


Figura 2: Maturação eritróide.

Outros antígenos porém também podem ser observados ao longo dos vários estágios de maturação dos precursores eritróides como os antígenos: CD34 (antígeno geral de imaturidade celular); CD117 (antígeno de imaturidade mielóide); HLA-DR (antígenos de histocompatibilidade presente em proeritroblastos); CD33 (antígeno de imaturidade mielóide); CD105 (antígeno de imaturidade eritróide, fortemente expresso em proeritroblastos); CD45 (antígeno pan-mielóide, fortemente expresso em proeritroblastos) e CD36 (antígeno de maturidade eritróide, fortemente expresso em eritroblastos basófilos e policromáticos) (FIGUEIRA; SOUZA, 2018).

Já nos estágios finais de maturação eritróide (eritroblastos ortocromáticos, reticulócitos e eritrócitos maduros) a maioria dos antígenos de superfície celular supracitados deixam de ser expressos e então aumenta a expressão do antígeno CD235a também conhecido como

Glicoforina A que é específico das células eritróides conforme a figura 1 (WANGEN et al, 2013).

2.4 O Hemograma: Princípios e objetivos

O hemograma completo é o exame laboratorial mais solicitado da rotina médica e se destina a análise quali quantitativa das células do sangue periférico de um indivíduo, através da análise de parâmetros, fisiológicos ou patológicos, associados a contagem de hemácias, concentração de hemoglobina e hematócrito, além dos índices hematimétricos; leucócitos e a diferencial leucocitária através da morfologia das células; e a contagem de plaquetas e dos índices plaquetários (QIAN et al, 2016; BAKRIM et al, 2018).

Ao longo dos anos muitos foram os avanços tecnológicos na área da hematologia do laboratório, e em especial em relação ao hemograma e a análise automatizada da morfologia das células do sangue durante a realização desse exame. Hoje os contadores hematológicos automatizados mais modernos utilizam várias metodologias de análise (impedância, citometria de fluxo, fluorescência e espectrofotometria). Contudo, de modo geral, a determinação da concentração da hemoglobina é feita por método colorimétrico e a contagem global de leucócitos, hemácias e plaquetas, por impedância elétrica (WIC) e ótica (WOC). Por sua vez, a contagem diferencial em cinco partes (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos) da diferencial leucocitária pode seguir princípios de análise quanto: a complexidade e o tamanho celular ou de complexidade celular e sinais de fluorescência do conteúdo de DNA/RNA do núcleo celular (FAILACE, PRANKE, 2004; BUTTARELLO, PLEBANI, 2008; BRIGGS et al.2011; FORD, 2013; CHABOT-RICHARDS, GEORGE, 2015; SUAREZ, 2015).

Especificamente em relação ao analisador hematológico BC6000 da empresa Mindray® esse é um aparelho muito robusto que fornece resultados de hemograma completo com a contagem diferencial de leucócitos em cinco parâmetros (linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos), além de fornecer outros analitos com contagem de leucócitos (WBC), concentração de hemoglobina (HGB), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), hemoglobina corpuscular média (MCH), volume corpuscular médio (MCV), hematócrito (Hto), RDW (*Red Cell Distribution Width*), plaquetas e eritrócitos (RBC). E como diferencial esse equipamento oferece a contagem diferencial de eritroblastos (NRBC) e capacidade de análise de outros fluidos corporais como líquidos pleural e sinovial (MINDRAY®, 2019).

Para a contagem da diferencial leucocitária em 5 parâmetros e a contagem diferencial de eritroblastos esse equipamento utiliza como princípios os métodos de impedância elétrica (WIC) e dispersão ótica (WOC), além da tecnologia de análise de células SF *Cube* que permite a análise 3D das células usando informações de dispersão de luz a laser em dois ângulos e sinais de fluorescência de DNA/RNA do núcleo das células (MINDRAY®, 2019).

2.5 O Hemograma e a presença de eritroblastos

Estes contadores, porém, são projetados para a identificação de células maduras do sangue e, conforme as características de granulosidade/complexidade interna e tamanho ou sinais de fluorescência do conteúdo de DNA/RNA das células, são representadas em gráficos bidimensionais de dispersão leucocitária em 5 partes (*scatter/citograma*); onde cada população de leucócitos, de acordo com suas características, possui uma área específica de plotagem dentro do *scatter*. Assim, qualquer alteração na plotagem celular no *scatter* leucocitário pode gerar a emissão de *flags* (alertas) por estes analisadores e, dependendo do tipo de alarme emitido (presença de células grandes imaturas como blastos e granulócitos imaturos, linfócitos atípicos, blastos, ou eritroblastos), determina critério para a conferência morfológica do esfregaço sanguíneo (BRIGGS et al. 2011; BRIGGS, 2009; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; CHABOT-RICHARDS; GEORGE, 2015; SMITH; NOWAK; FOWLER, 2018).

Em especial em relação a presença de eritroblastos em uma amostra de sangue periférico o que se observa é que a maioria dos equipamentos de automação em hematologia costumam plotar essas células no *scatter* leucocitário junto com os linfócitos e, portanto, incluídas na contagem total dos leucócitos. Contudo, nem sempre esses equipamentos conseguem sinalizar ao operador do equipamento a presença de eritroblastos na amostra sanguínea, e por vezes a observação dessas células acaba por ser um achado eventual após a revisão morfológica da amostra (SHELAT; CANFIELD; SHIBUTANI, 2010).

O analisador hematológico BC6000 da empresa Mindray®, além de outros analisadores que utilizam a mesma metodologia, prometem a contagem diferencial de eritroblastos (NRBC) em amostras de sangue periférico através da tecnologia de análise de células SF *Cube* que permite a análise 3D das células usando informações de dispersão de luz a laser em dois ângulos e sinais de fluorescência de DNA/RNA do núcleo das células. Permitindo assim a contagem diferencial de eritroblastos na amostra em níveis de segurança de NRBC > 1% e de NRBC > 0.01 células /mm³ (MINDRAY®, 2019).

3 PROBLEMATIZAÇÃO

Mesmo com os avanços tecnológicos na área de automação em hematologia, em especial em relação ao hemograma, ainda hoje os contadores hematológicos automatizados apresentam certas limitações na contagem diferencial quando o assunto é caracterização e contagem de células imaturas da medula óssea presentes no sangue periférico. De modo que, muitos fabricantes introduziram nos sistemas de análise diferencial de células alertas/alarmes (*flags*) sobre a presença dessas células que não podem ser diferenciadas pelos equipamentos. Obrigando assim o operador a realizar a confecção e coloração de lâminas para confirmar os achados sugeridos pelos contadores hematológicos (REYES; SARRAF; RUISECO, 2015).

A presença de eritroblastos em amostras de sangue periférico gera na grande maioria dos equipamentos de automação em hematologia confusão na contagem de linfócitos e de leucócitos totais. E mesmo quando algum desses equipamentos consegue sinalizar e mesmo contar de forma diferencial esses eritroblastos, ainda assim isto exige que os responsáveis pelo uso desses equipamentos promovam a validação dos mesmos (SHELAT; CANFIELD; SHIBUTANI, 2010; SHEN, 2019).

O processo de validação de um novo equipamento a ser implantado na rotina laboratorial deve permitir a análise de amostras com precisão, exatidão, comparabilidade, transição, histórico e linearidade do resultado esperado. Ainda assim o estabelecimento de intervalos de referência pelo fabricante ou pelo laboratório que hospeda um destes equipamentos por vezes pode ser também desafiador até que seja possível determinar os limites de melhor resolução de reconhecimento dos diversos tipos celulares da amostra até a sua utilização na rotina laboratorial (VIS; HUISMAN, 2016).

Assim, neste estudo buscou-se estabelecer a validação da contagem automatizada de eritroblastos feita pelo equipamento BC6000 da Mindray® de modo a torná-la de uso na rotina do Laboratório de Patologia Clínicas Dr. Paulo C. Azevedo que é referência em hematologia e recebe amostras ricas em eritroblastos provenientes de maternidades e de pacientes portadores de diversas patologias.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Produzir um Parecer Técnico informativo sobre a validação dos dados obtidos da contagem automatizada de eritroblastos em contador hematológico BC6000, da marca Mindray®, através de método comparativo com a técnica manual (Padrão Ouro).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a contagem automatizada de eritroblastos no contador hematológico BC6000 por método comparativo com a técnica manual;
- Verificar a existência de correlação entre os achados de imunofenotipagem dos diferentes estágios maturativos de eritroblastos, por citometria de fluxo, com os resultados gráficos do equipamento de automação de hematologia BC6000;
- Produzir um Parecer Técnico sobre a validação da contagem automatizada de eritroblastos no contador hematológico BC6000 da marca Mindray®.

5 METODOLOGIA

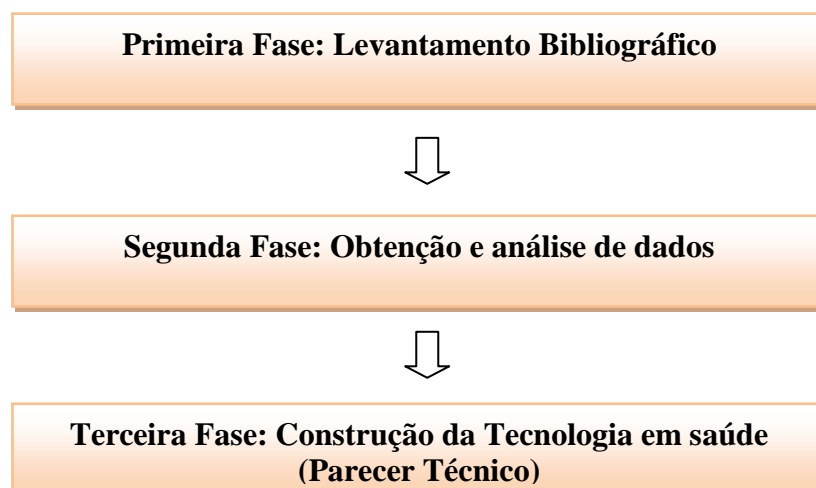
5.1 CONFECCÃO DE PARECER TÉCNICO

5.1.2 TIPO DE ESTUDO

Estudo do tipo pesquisa metodológica de desenvolvimento que, segundo Polit, Beck e Hungler (2011), é aquela que investiga, organiza e analisa dados para construir, validar e avaliar instrumentos e técnicas de pesquisa centrada no desenvolvimento de ferramentas específicas de coleta de dados com vistas a melhorar a confiabilidade e validade desses instrumentos.

Para tanto esta pesquisa foi desenvolvida em três fases: levantamento bibliográfico; obtenção e análise de dados sobre as contagens de eritroblastos através de metodologias automatizadas e manuais; e identificação dos critérios técnicos para a construção da tecnologia em saúde (Parecer Técnico).

5.1.3 FASES DO ESTUDO



5.1.4 Primeira fase – Levantamento bibliográfico

Foi baseado no levantamento da literatura de artigos originais e de revisão, notas técnicas e manuais existentes sobre estudos relacionados a contagem automatizada de eritroblastos por equipamentos hematológicos que dispõe de diferentes metodologias ou mesmo semelhantes a metodologia do equipamento que está sendo validado. Para tanto foi realizada busca ativa desses dados nas bases de dados SciELO, Medline/PubMed e Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); e ainda nos sites oficiais do Ministério da Saúde do Brasil e de nosocômios de reconhecida competência científica, utilizando-se os descritores presentes no Descritores em Ciência da Saúde/Medical Subject Headings (DeCS/MeSH): “**Automação laboratorial**” (“*Laboratory automation*”), “**Hematologia**” (“Hematology”), “Células do sangue nucleadas” (“*Nuclear Red Blood Cell*”), “**Eritroblastos**” (“*Erythroblasts*”), e “**Analisador de Hematologia**” (“**Analyser Hematology**”) associado por meio do operador booleano *AND* aos descritores supracitados.

Para a seleção das publicações incluídas na revisão, foram adotados como critérios de inclusão: artigos originais e de revisão, diretrizes, portarias, protocolos, notas técnicas e manuais que tenham ligação direta com o tema; que estiverem disponíveis na íntegra. Foram excluídos: capítulos de livros, teses, dissertações, monografias, relatórios técnicos e artigos que, após leitura do resumo, não convergiam com o objeto deste estudo, além das publicações que se repetiam nas bases de dados e bibliotecas virtuais.

5.1.5 Segunda fase – obtenção e análise de dados

Estudo prospectivo foi realizado com amostras de sangue periférico da rotina do Laboratório de Patologia Clínicas Dr Paulo C. Azevedo, situado na cidade de Belém, Pará, ou de medula óssea do mesmo laboratório, oriundas de um hospital oncológico, independente da faixa etária e gênero, para caracterização do perfil imunofenotípico dos eritroblastos presentes nessas amostras e validação da contagem automatizada de eritroblastos no contador hematológico BC6000, da marca Mindray®, no período de junho de 2019 até dezembro de 2020.

5.1.6 Terceira fase – identificação dos critérios técnicos e construção da tecnologia

Seguido da revisão bibliográfica e da obtenção dos dados laboratoriais foi realizada a análise estatística dos dados e em seguida a identificação dos principais critérios técnicos

(clínicos e laboratoriais) que deveriam compor a confecção da tecnologia em saúde (Parecer Técnico) a ser criada.

Para a construção da tecnologia em saúde, primeiro foram definidos de forma clara os objetivos a que se destinam o Parecer Técnico de tal modo a não correr o risco deste se transformar em um artefato meramente informativo. Posteriormente foi realizado um *brainstorming* para a construção do corpo do Parecer Técnico quanto aos itens: (1) assunto (orientações preliminares sobre a análise dos resultados laboratoriais); (2) análise das informações em consonância com a literatura; (3) objetivos do Parecer Técnico; (4) conclusão; e (5) referências bibliográficas. Sempre com linguagem simples e acessível, estrutura de diagramação que permita o fácil acesso às informações, e ainda a definição de situações-chave.

5.2 Casuística

Estudo prospectivo com amostras de sangue periférico e medula óssea da rotina do Laboratório de Patologia Clínicas Dr. Paulo C. Azevedo, situado na cidade de Belém, Pará, ou de medula óssea do mesmo laboratório, oriundas de um hospital oncológico, independente da faixa etária e gênero, para caracterização do perfil imunofenotípico dos eritroblastos presentes nessas amostras e validação da contagem automatizada de eritroblastos no contador hematológico BC6000, da marca Mindray®, no período de junho de 2019 até dezembro de 2020.

Para tanto foram analisadas 20 amostras de medula óssea de pacientes portadores de leucemias agudas, livres da doença, em acompanhamento terapêutico, isto é, em recuperação medular pós-tratamento específico com 15 ou 30 dias pós-quimioterapia, como controle positivo para a definição das populações de eritroblastos em diferentes estágios de maturidade. E ainda 17 amostras de sangue periférico de pacientes que realizarem hemograma de rotina, oriundos de demanda espontânea ou hospitalar, no referido laboratório de patologia clínicas particular para a verificação se seria possível caracterizar na plotagem gráfica do equipamento BC6000 (Mindray®) o estágio de maturação dos eritroblastos do sangue periférico.

5.2.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas amostras de sangue periférico ou medula óssea de pacientes de ambos os gêneros, de qualquer faixa etária, anticoaguladas, com volume igual ou superior a 2ml, e com mais de 18% de eritroblastos após análise morfológica da amostra.

E foram excluídas do estudo amostras de sangue periférico ou medula óssea coaguladas, com volume inferior a 2ml, com menos de 18% de eritroblastos após análise morfológica, ou ainda for de pacientes portadores de leucemia aguda em atividade.

5.2.2 Critérios Éticos

Por se tratar de um estudo prospectivo, porém, sem envolvimento dos pesquisadores com os sujeitos da pesquisa ou ainda envolver a utilização de quaisquer dados pessoais dos mesmos sujeitos, os responsáveis pela pesquisa assinaram um Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD), e de solicitação de Dispensa de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) em conformidade com o que prevêem as diretrizes e normas regulamentadoras descritas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012, complementada pelo artigo 17, inciso VII da Resolução 510/2010.

5.2.3 Riscos e benefícios do estudo

Esta pesquisa não acarretou qualquer tipo de risco ou prejuízo aos sujeitos da pesquisa ou ainda de perda de quebra de sigilo de dados, pois se baseia apenas na análise de células presentes em amostras biológicas. Sem qualquer uso de dados pessoais, resultados completos de exames, identificação individual ou identificação de intervenções clínicas em curso.

Como benefícios deste estudo foi possível mostrar o impacto da implantação da contagem automatizada de eritroblastos, presentes nas amostras biológicas de sangue periférico, na rotina laboratorial. E as vantagens dessa contagem celular no tempo de liberação dos resultados e na segurança e garantia da qualidade dos hemogramas gerados.

5.2.4 Caracterização das amostras

Todas as amostras analisadas, de medula óssea ou sangue periférico, foram coletadas em tubos cônicos e anticoaguladas com EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético), com 2ml a 5ml de volume, posteriormente foi realizada a coloração das lâminas com corante de May Grunwald e análise morfológica em lâmina para confirmação da presença de mais de 18% eritroblastos por profissional especializado do referido laboratório através de análise por microscopia de luz comum com objetiva de imersão.

5.2.5 Caracterização da presença de eritroblastos pelo equipamento BC6000 (Mindray®)

Com as amostras já selecionadas pelo quantitativo de eritroblastos, após análise morfológica por hematoscopia, as mesmas foram submetidas a aquisição no equipamento de

automação em hematologia BC6000 da marca Mindray® que tem em seus dispositivos, segundo o fabricante, a capacidade de identificar e quantificar a presença de eritroblastos em amostras de sangue periférico.

5.2.6 Caracterização imunofenotípica dos eritroblastos

Para a caracterização imunofenotípica das várias fases de desenvolvimento dos eritroblastos nas amostras de sangue periférico, inicialmente foi realizada a identificação das fases dos eritroblastos nas amostras de medula óssea. Para tanto, primeiro foi realizada a separação das células mononucleares das amostras de sangue periférico ou de medula óssea por gradiente de concentração Histopaque-1077®.

Em um tubo cônico de centrifugação foi adicionado 2ml (2.000µl) de Histopaque-1077® e posteriormente com o tubo inclinado a 45° foi adicionado suavemente 2ml (2.000µl) da amostra de sangue periférico ou medula óssea, utilizando-se de uma pipeta Pasteur. Em seguida, foi feita a centrifugação da amostra em 1.500 rpm por 30 minutos. Posteriormente com o uso de outra pipeta Pasteur estéril foi feita a retirada cuidadosa da camada de células mononucleares de interface que ficou entre o gradiente de Histopaque e as hemácias, as quais foram transferidas para outro tubo cônico de centrifugação estéril contendo 10ml de PBS (Perbarato de Sódio Euroimun a 0,10%).

Em seguida, esse tubo foi submetido à nova centrifugação em 1.500 rpm por 10 minutos com posterior desprezo do sobrenadante por inversão e ressuspensão do sedimento celular em 5ml de PBS, nova homogeneização para que agora fosse transferido 100µL dessa solução para cada tubo cônico de citometria de fluxo previamente identificados. Posteriormente foram acrescentados de 5µL de diferentes combinações de anticorpos monoclonais comerciais, pan-hematopoiético, CD34 e CD45, ou mielóides, CD33, CD117 e CD235a (Glicoforina A), marcados com os fluorocromos FITC, PE, Percyp e APC,. Seguido de adição de 200µL solução de lise de hemácias (Facslysing BD 1:10), incubação no escuro por 10 minutos, e posterior adição de 1ml (1.000µL) de água em cada tubo. Para posterior análise após aquisição de 10.000 eventos em citômetro de fluxo da BC Coulter DxFlex®, com CytExpert for DxFlex® *software* (BC, Indianápolis, Indiana, EUA), para treze cores.

5.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos para a validação da metodologia de contagem de eritroblastos feita pelo equipamento de hematologia BC6000 da marca Mindray® e da contagem manual feita em lâmina foram incluídos em um banco de dados para posterior estudo estatístico através do software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 26 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Dentre os testes propostos primeiro foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para verificar se os dados tinha distribuição normal; em seguida foram realizados os testes de estatística descritiva de média, desvio padrão, mediana referentes as contagens de eritroblastos pelos métodos automatizado e manual; e por fim foi realizado o teste de Mann-Whitney para comparar as medianas da quantidade de eritroblastos contados entre os métodos automatizado e manual. Para todos os testes foram adotados como nível de significância $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

Para o processo de validação da contagem automatizada de eritroblastos pelo equipamento BC6000 foi realizada a análise de 17 amostras de sangue periférico de 09/17 (52,9%) pacientes recém-nascidos e de 08/17 (47,1%) pacientes com idade superior a 2 anos de idade que apresentavam na contagem manual das lâminas selecionadas mais de 18% de eritroblastos a cada 100 leucócitos contados, conforme preconizado pelo Conselho Internacional para Padronização em Hematologia (ICSH) (Quadro 1).

Quadro 1. Resultados da análise das amostras de sangue periférico selecionadas.

Identificação das amostras	Sexo	Idade (anos)	Material	Contagem de Eritroblastos		Caracterização Imunofenotípica dos Eritroblastos por Citometria de Fluxo (%)		
				Automatizada (%)	Manual (%)	Eritroblastos Basófilos CD34+CD45fracCD117+CD235a-	Eritroblastos Policromáticos CD34-CD45fracCD117+CD235a+	Eritroblastos Ortocromático CD235a+CD45-
RN SLA	F	0	SP	22	26	0	2,36	18,93
RN VN	F	0	SP	15	18	0	3,63	63,91
RN GD	F	0	SP	93	93	0,7	1,62	68,7
RN VN	F	0	SP	119	120	2,71	3,05	8
RN FBF	M	0	SP	79	75	1,5	3,24	26,37
RN JV	M	0	SP	474	546	0	3,2	64,29
RN ACL	M	0	SP	363	363	1,46	3,45	68,52
RN TK	F	0	SP	283	284	0	3,11	59,7
RN CG	F	0	SP	19	19	3,71	2,39	50,11
MFL	F	75	SP	27	26	1,71	1,77	9,23
FBA	M	63	SP	18	20	9,73	4,71	53,36
SPK	M	3	SP	17	17	0	21,81	85,26
BNCS	M	11	SP	26	25	4,75	8,66	36,28
MCL	F	63	SP	25	27	0	36,47	11,71
LSGM	F	2	SP	21	20	0	0,92	88,94
PGCG	M	9	SP	23	23	0	3,31	35,85
KVSR	F	2	SP	516	516	1,14	1,39	77,89

Legenda: SP: sangue periférico; RN: recém-nascido; CD: cluster de diferenciação; F: feminino; M: masculino.

Como observado 09/17 (52,9%) dos pacientes eram recém-nascidos, 05/17 (29,4%) pacientes tinham idades entre 2 e 11 anos e 03/17 (17,7%) eram adultos com idades entre 63 e 75 anos. Desses 10/17 (58,8%) pacientes eram do sexo feminino e 07/17 (41,2%) do sexo masculino. Das amostras de pacientes recém-nascidos 08/09 eram formadas por populações de eritroblastos ortocromáticos (entre 18,92% e 68,7%), conforme caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo.

Como era esperado, também nessas amostras de recém-nascidos, foram observadas as maiores médias (X) e desvios padrões (S) em relação as contagens automatizada ($X=163,0$; $S=159,0$) e manual ($X=171,5$; $S=175,0$) de eritroblastos. Enquanto que para as demais amostras de pacientes com idades superior a 2 anos (8/17) as médias e desvios padrões em relação as contagens automatizada foi de $X=84,1$; $S=163,2$ e manual foi de $X=84,2$; $S=163,2$.

Em seguida foram realizadas as caracterizações imunofenotípicas dos diferentes estágios de diferenciação dos eritroblastos obtidos de amostras controle de medula óssea (Figuras 1A, 1B, 1C) e do sangue periférico (Figuras 1E, 1F, 1G, 1I, 1J, 1K, 1M, 1N e 1O).

Para posterior análise a distribuição gráfica de eritroblastos de sangue periférico obtida a partir do equipamento de automação em hematologia BC6000 - Mindray® (Figuras 1D, 1H, 1L e 1P) em comparação com a respectiva caracterização imunofenotípica dos eritroblastos da mesma amostra de sangue periférico.

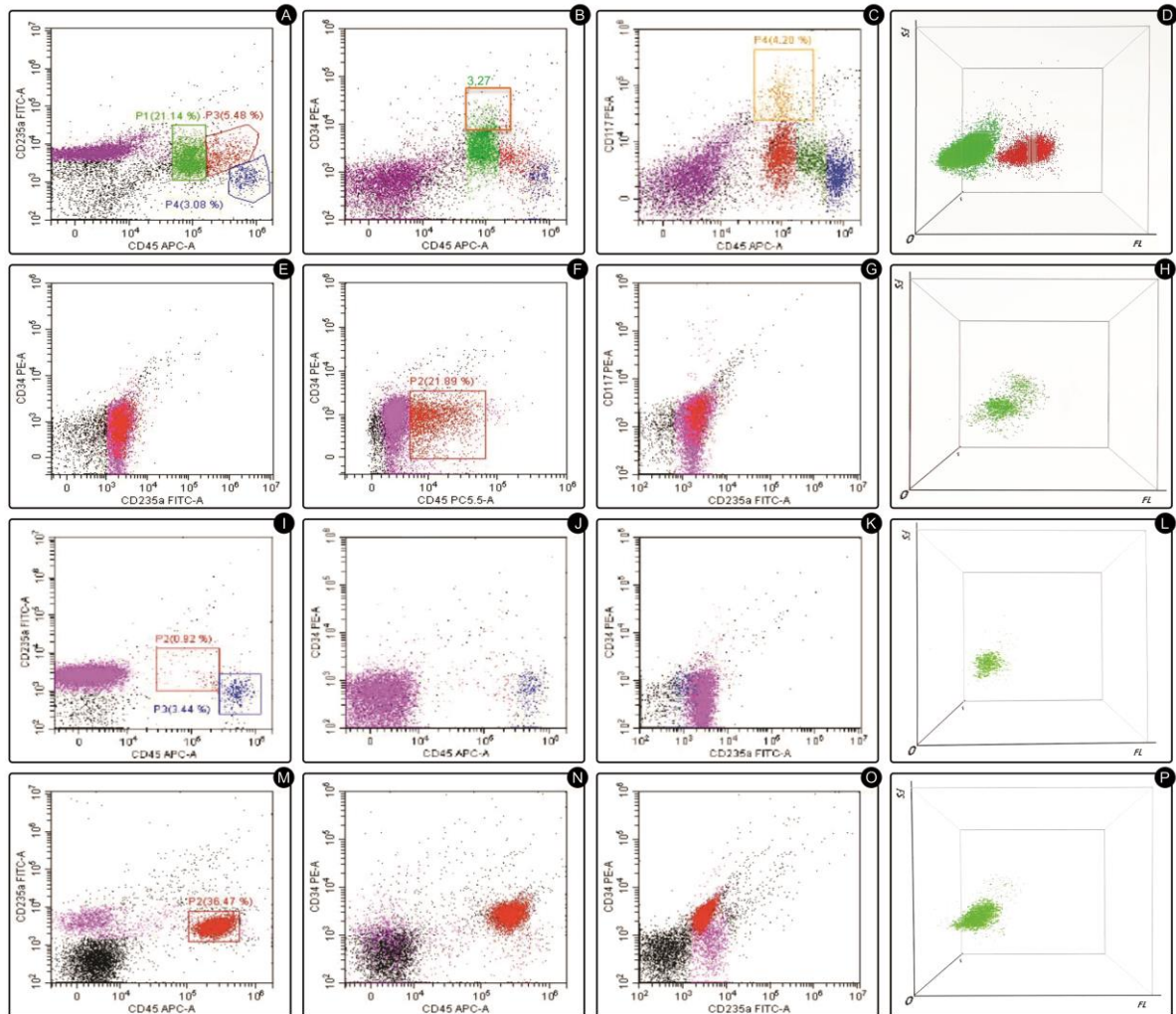


Figura 3. Representação gráfica de dispersão celular do tipo Dot plots para a caracterização das populações de eritroblastos na medula óssea (A, B e C) por citometria de fluxo, onde: em roxo são eritroblastos ortocromáticos e reticulócitos (Fig de 1A até 1N); em verde são eritroblastos policromáticos (Fig 1A e 1B); em vermelho os eritroblastos basófilos (Fig 1A e 1B); em laranja os proeritroblastos (Fig 1C); e em azul os linfócitos (Fig 1A, 1B e 1C) em amostras de medula óssea. E nas figuras 1E, 1F, 1G, 1I, 1J, 1K, 1M, 1N e 1O estão representadas as populações de eritroblastos em sangue periférico por citometria de fluxo, onde: em roxo são eritroblastos ortocromáticos e reticulócitos; em vermelho são eritroblastos policromáticos; e em preto são prováveis restos celulares. Já os gráficos de complexidade (FS) X fluorescência nuclear (FL) são relativos as amostras de sangue periférico obtidos no equipamento BC6000 (D, H, L e P), onde: na Fig 1D são representados em verde os eritroblastos e em vermelho os linfócitos; e nas fig 1H, 1L e 1P estão representados em verde apenas os eritroblastos.

Neste sentido foi observado que não há relação entre o estágio de diferenciação dos eritroblastos, observados no sangue periférico de uma amostra, com a respectiva dispersão dessas células nos gráficos obtidos a partir do equipamento de automação em hematologia BC6000 - Mindray®. Como podemos observar, por exemplo, nas figuras E, F e G, onde observa-se a presença de 78,11% de eritroblastos ortocromáticos (rosa) e 21,89% de eritroblastos policromáticos (vermelho), essas até podem sugerir a existência de correlação com a respectiva dispersão gráfica pelo equipamento BC6000 - Mindray®. Contudo, quando a análise é feita em relação as figuras M, N e O onde tem-se o predomínio de eritroblastos policromáticos (36,47%) observa-se que, mesmo assim, a dispersão gráfica do equipamento BC6000 - Mindray® não se altera em relação a sua distribuição especial.

No que tange a análise de existência de correlação entre as contagens de eritroblastos pelos métodos manual e automatizado, através do equipamento de automação em hematologia BC6000 - Mindray®, após a realização do teste de normalidade de distribuição de dados esse mostrou que não existia distribuição normal entre as duas metodologias. Diante desse resultado foi realizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney o qual revelou um valor de $p = 0,78$, isto é, superior ao valor de nível de significância esperado ($p \leq 0,05$), demonstrando assim que os valores da contagem automatizada de eritroblastos quando comparados com a contagem manual são iguais. Sendo então validada estatisticamente a metodologia automatizada da contagem de eritroblastos no equipamento em hematologia BC6000 - Mindray® e confeccionado o parecer técnico deste projeto conforme descrito no Anexo I.

7 DISCUSSÃO

O Conselho Internacional para Padronização em Hematologia (ICSH) define como precisão a medida de concordância entre a estimativa do valor de um determinado analito e o seu valor verdadeiro obtidos usando-se técnicas independentes (MORITZ, 2000). Assim, a garantia da qualidade analítica através da precisão dos resultados é crítica em laboratórios de análises clínicas que operam com analisadores hematológicos automatizados, por isso estabelecer métodos de comparação e validação para esses equipamentos são fundamentais para manter qualidade dos resultados emitidos (PARK et al., 2014).

Neste sentido esta pesquisa se consistiu na avaliação do desempenho do analisador hematológico BC6000 (Mindray®) para a contagem automatizada de eritroblastos quando comparada com a contagem manual em lâmina (padrão ouro). E como resultado observou-se

que a metodologia automatizada analisada mostrou-se capaz de realizar a contagem de eritroblastos com precisão, e foi por isso validada para uso na rotina do laboratório de análises clínicas que apoiou a pesquisa. Garantindo assim precisão, segurança e rapidez na liberação dos resultados.

Ressalta-se que em virtude da pandemia provocada pelo novo Coronavírus (COVID-19), este estudo se ancorou em um N amostral reduzido, devido às mudanças ocorridas no curso da pesquisa.

Os dados gerados por esta pesquisa corroboram com outros estudos da literatura que comparam a contagem de eritroblastos no sangue periférico através de metodologias não automatizadas e automatizadas e que também não demonstraram diferença estatística entre essas metodologias (BORGES; SIQUEIRA, 2009; FAILACE; PRANKE, 2004; MORESCO et al., 2003, NAOUM, 2008).

Sabe-se, porém, que existe hoje no mercado um grande número de analisadores hematológicos automáticos disponíveis para uso na rotina dos laboratório de análises clínicas, contudo, cada um utilizando uma variedade de tecnologias para as análises de amostra de sangue periférico. Esse fato porém obriga que cada laboratório, antes de colocar um desses aparelhos na sua rotina diagnóstica, possa promover a validação previa dos mesmos. Contudo, certamente após a validação desses a tendência é que ocorram a redução da contagem manual de eritroblastos através de revisões em lâmina, e diminua o tempo de liberação dos resultados (WOODEL-MAY et al., 2005; BACALL, 2009; PARK et al., 2014).

TAN, NAVA e GEORGE (2011) em seus estudos sobre a capacidade dos equipamentos de hematológicos Cell-Dyn Sapphire (Abbott®) e UniCel DxH 800 (Beckman Coulter) em contar e diferenciar eritroblastos de outros tipos celulares, mostraram que o equipamento Cell-Dyn Sapphire (Abbott®) apresentou 93,5% de sensibilidade para a contagem de eritroblastos, enquanto que o equipamento UniCel DxH 800 (Beckman Coulter) teve 73,0% de especificidade para a mesma contagem, quando comparados a metodologia padrão ouro (manual). Sugerindo assim que a contagem de eritroblastos através de equipamentos que utilizam metodologias semelhantes a do Cell-Dyn Sapphire (Abbott®), como o BC6000 (Mindray®), têm maior sensibilidade para a contagem dessas células.

SHEN et al. (2019) em seus estudos, por sua vez, comparou as contagens automatizada e manual de eritroblastos em amostras de sangue periférico de diversos pacientes. Nessa validação o equipamento utilizado para essa contagem foi o BC6000 (Mindray®) e, semelhante ao que foi observado em nosso estudo, não houve diferença significativa nos resultados obtidos quando comparados com a contagem manual ($p > 0,05$).

Esses autores sugerem então que esse equipamento apresenta 80.0% de sensibilidade e 96.9% de especificidade para a contagem de eritroblastos.

Ainda em nossos estudos porém buscamos identificar se a plotagem gráfica da contagem de eritroblastos gerada pelo equipamento seria capaz de diferenciar estágios maturativos dos eritroblastos presentes na amostra de sangue periférico. Para tanto, como já apresentado, realizou-se a imunofenotipagem dos eritroblastos das amostras de sangue periférico, por citometria de fluxo, e posterior análise dos gráficos de plotagem do equipamento BC6000 (Mindray®) onde observou-se que, embora o equipamento reproduza a contagem de eritroblastos com precisão, a projeção gráfica gerada não permite diferenciar em qual estágio de maturação encontram-se os eritroblastos. Esse resultado porém não trás consequências ao paciente visto que o estágio maturativo dos eritroblastos em sangue periférico, até o momento, não parece ter implicação no tratamento ou prognóstico do mesmo.

Um estudo semelhante realizado por GRIMALD e SCOPACASA (2000) com amostras de pacientes que possuíam alguma doença hematológica com a presença de células imaturas da linhagem mielóide e eritroblastos adquiridas no analisador de hematológico CELL-DYN 4000 (Abbott®), que utiliza a tecnologia semelhante a do equipamento BC6000 (Mindray®), mostrou resultados também semelhantes quanto a precisão para a contagem de eritroblastos e a mesma dificuldade na identificação gráfica dos estágios de maturação dessas células.

8 CONCLUSÃO

A validação proposta mostrou que o contador hematológico BC6000 da Mindray® apresenta bom desempenho analítico para a contagem de eritroblastos em sangue periférico. Porém, não guarda correlação entre os estágios maturativos de eritroblastos com os gráficos gerados pelo equipamento. Este estudo gerou um Parecer Técnico sobre o uso desse equipamento para a contagem de eritroblastos e o uso imediato do mesmo na rotina do laboratório de análises clínicas que hospedou a pesquisa.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DREES, Mohammad A. et al. Making Blood: The Haematology Niche throughout Ontogeny. **Stem Cells International**, [S.l.] vol. 2015, p. 1-14, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/571893> Disponível em:<
<https://www.hindawi.com/journals/sci/2015/571893/>> Acesso em: 18 Abr 2020.

ASADA, Noboru; TAKEISHI, Shoichiro; FRENETTE, Paul S. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. **International Journal of Hematology**, [S.l.], v. 106, n. 1, p. 45-54, 2017. DOI: 10.1007 / s12185-017-2262-9. Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28534115/>> Acesso em: 12 Nov 2020.

BABOVIC, S; EAVES, C. J. Hierarchical organization of fetal and adult hematopoietic stem cells. **Experimental Cell Research**, [S.l.], vol. 329, n. 2, p. 185-191, 2014. DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.08.005 Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25128815/>> Acesso em: 04 Mai 2020.

BAKRIM, Saad et al. Establishment of the hematology reference intervals in a healthy population of adults in the Northwest of Morocco (Tangier- Tetouan region). **The Pan African Medical Journal**, [S.l.] vol. 29, n. 169, [s.p] 2018. DOI: 10.11604/pamj.2018.29.169.13042 Disponível em:<
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6057597/>> Acesso em: 13 Set 2020.

BARON, Margaret H. Concise Review: Early Embryonic Erythropoiesis: Not so primitive after all. **Stem Cells**, [S.l.], vol. 31, n. 5, p. 849-856, 2013.

BENTO, Lais C. et al. Desempenho do citômetro de fluxo Aquios CL na quantificação automatizada de subpopulações de linfócitos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, vol. 55, n. 4, p. 378-389, Jul/Ago, 2019.

BORGES, L.F.; SIQUEIRA, L.O. Validação de tecnologia 5diff do analisador hematológico Sysmex XS-1000i para laboratório de pequeno/médio porte. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.l.], v.31, n.4, p. 247-51, 2009.

BUTTARELLO M, PLEBANI M. Automated blood cell counts: state of the art. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.l.], v. 130, n. 1, p. 104-116, 2008. DOI:10.1309/EK3C7CTDKNVPXVTN Disponível em:<
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18550479/>> Acesso em: 25 Mai 2020.

BRIGGS C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. **International Journal Laboratory Hematology**, [S.l.], n. 31, p.277-297, 2009. DOI: 10.1111/j.1751-553x.2009.01160.x. Disponível em:<

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19452619/#:~:text=Recently%20several%20parameters%20have%20been,detection%20of%20functional%20iron%20deficiency.>> Acesso em: 12 Out 2020

BRIGGS CJ. et al. Improved flagging rates on the Sysmex XE-5000 compared with the XE-2100 reduce the number of manual film reviews and increase laboratory productivity. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.l.], vol. 2, n. 136, p. 309-316, 2011. DOI: 10.1309/AJCPDLR4KGKAFW4W. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21757605/>> Acesso em: 18 Out 2020.

CHABOT-RICHARDS DS, GEORGE TI. White Blood Cell Counts: Reference Methodology. **Clinics in Laboratory Medicina**, [S.l.], v. 35, n. 1, p. 11-24. DOI: 10.1016/j.cll.2014.10.007 Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25676369/>> Acesso em: 20 Out 2020.

DZIERZAK, Elaine; PHILIPSEN, Sjaak. Erythropoiesis: Developmente an Differentiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S.l.], vol. 3, n. 4, p. 1-17, 2013.

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

FORD, Jason. Red blood cell morphology. **International Journal of Laboratory Hematology**, [S.l.], vol. 35, p. 351-357, 2013.

GODON, Alban et al. Automated hematology analysers and spurious counts Part 3. Haemoglobin, red blood cells, cell count and indices, reticulocytes. **Annales de Biologie Clinique**, [S. l.], vol. 70, n. 2, p. 155-168, 2012.

GRIMALD, E.; SCOPACASA, F. Evaluation of the Abbott CELL-DYN 4000 Hematology Analyzer. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.l.], v. 113, n. 4, p. 497-505, 2000.

GROTTO, Helena ZW. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São Paulo, v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.

LEONART, Maria Suely Soares. A importância do controle de qualidade para a contagem de reticulócitos por método visual e automatizado. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São Paulo, v. 31, n. 5, p. 303, 2009.

LI, He et al. Cytoskeleton remodeling induces membrane stiffness and stability changes of maturing reticulocytes. **Biophysical Journal**, [S.l.], v. 114, n. 8, p. 2014-2023, Apr, 2018.

MORESCO, R.N. Análise comparativa das técnicas manual e automatizada (ADVIA tm 120) para contagem de reticulócitos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [S.l.], v.35, n.1, p.17-18, 2003.

MORITZ, A. The use of automated laser-based multiparameter hematology systems in veterinary medicine, v.1, p. 138-157, ed. Büchse der Pandora, Wetzlar, Germany, 2000.

NAOUM, P.C. Academia de ciência e tecnologia. Disponível em: <<http://www.ciencianews.com.br/cien-news/inter-lab-hemo.htm>> Acesso em: 26 abr. 2021.

OSTA, Viviana et al. Estudio de deficiência y sensibilidade de alarmas de dos analizadores hematológicos en um hospital pediátrico. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**. La Plata, v. 48, n. 1, p. 71-79, 2014.

PAES, Angela Tavares. Por dentro da estatística. Educação Continuada em Saúde Einstein, [S.l.], v. 10, n. 4, p. 165-166, 2012.

PALMER, L. et al. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. **International Journal of Laboratory Hematology**, [S.l.], v. 37, [S.n.], p. 287-303, 2015.

PARK, S. H. et al. Development and Validation of Effective Real-Time and Periodic Interinstrument Comparison Method for Automatic Hematology Analyzers. *American Journal of Clinical Pathology*, [S.l.] vol. 142, n. 6, p. 777-787, 2014.

QIAN, Qing-Zeng et al. Analysis of Hemogram of Radiation Workers in Tangashan, China. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [S.l.] vol. 30, n. 5, p. 682-688, 2016. DOI: 10.1002/jcla.21922 Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6807249/>> Acesso em: 21 Jun 2020.

REINA; Claudia Mera; LARA, Angélica Roa; CLAVIJO, Sandra Ramirez. Células madres hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación. **Revista Ciencias de la Salud**. Bogotá, vol. 5, n. 1, p. 67-69, Jan/Apr, 2007.

REYES, Laser H. Hernández; SARRAFF, Teresa A. Fundora; RUISECO, Mabel Andrade. El conteo automático de reticulócitos: una herramienta de uso diagnóstico, clínico e

investigativo. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, Ciudad de La Habana, v. 31, n. 4, [s.p], Out/Dez, 2015.

SANTOS, Fabiano de Jesus; FIGUEIRA, Dayse de Oliveira; SOUZA, Joyce Eliza de Oliveira. Prevalence of discordant microscopic changes with automated CBC analysis. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 50, n. 6, p. 398-401, Nov/Dez, 2014.

SUAREZ, Vianed Marsán et al. Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo en la inmunofenotipificación de leucemias agudas. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología e Hemoterapia**. Havana City, vol. 31, n. 03, p. 242-253, Jul/Set, 2015.

SHELAT, S. G.; CANFIELD, W.; SHIBUTANI, S. Differences in detecting blasts between ADVIA 2120 and Beckman-Coulter LH750 hematology analyzers. **International Journal of Laboratory Hematology**, [S.l.], vol. 32, n. 1 Pt 2, p. 113-116, 2010.

SHEN, Yimin et al. Clinical performance evaluation of the new hematology analyser Mindray BC-6000. **International Journal of Laboratory Hematology**. China, vol. 5, n. 41, p. 622-634, 2019.

SHENZHEN MINDRAY® BIO-MEDICAL ELECTRONICS CO. LTD. BC6000/BC6000 Plus Auto Hematology. **Manual do fabricante**, 258 p., 2019.

SMITH, Alyson S.; NOWAK, Roberta B.; FOWLER, Velia M. High-Resolution Fluorescence Microscope Imaging of Erythroblast Structure. **Methods in Molecular Biology**, Estados Unidos, v. 1698, [s.n], p. 205–228, Jan, 2018.

TAN, B.T.; NAVA, A.J.; GEORGE, T.I. Evaluation of the Beckman Coulter UniCel DxH 800, Beckman Coulter LH 780, and Abbott Diagnostics Cell-Dyn Sapphire Hematology Analyzers on Adult Specimens in a Tertiary Care Hospital. **American Society for Clinical Pathology**, [S.l.], v. 135, n. 6, p. 929-938, 2011.

TAN, B.T.; NAVA, A.J.; GEORGE, T.I. Evaluation of the Beckman Coulter UniCel DxH 800 and Abbott Diagnostics Cell-Dyn Sapphire Hematology Analyzers on Pediatric and Neonatal Specimens in a Tertiary Care Hospital. **American Society for Clinical Pathology**, [S.l.], v. 135, n. 6, p. 939-951, 2011.

VIS, J. Y.; HUISMAN, Albert. Verification and quality control of routine hematology analyzers. **International Journal of Laboratory Hematology**, [S.l.], v. 38, [s.n], p. 100-109, Maio, 2016.

VITTORI, Daniela; CHAMORRO, Maria Eugenia; NESSE, Alcira. Eritropoyetina como agente eritropoyético y no eritropoyético: consideraciones terapéuticas. **Acta bioquímica clínica latino-americana**, La Plata, vol. 50, n. 4, p. 773-782, Dic, 2016.

WANGEN, J.R. et al. Assessment of normal erythropoiesis by flow cytometry: important considerations for specimen preparation. **International Journal of Laboratory Hematology**, [S.l.], v. 2, n. 36, p. 184-196, Apr, 2013.

WOODELL-MAY, J.E. et al. Producing Accurate Platelet Counts for Platelet Rich Plasma: Validation of a Hematology Analyzer and Preparation Techniques for Counting. **Journal of Craniofacial Surgery**, [S.l.], v. 16, n. 5, p. 749-756, 2005.

ANEXO I



Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas

PARECER TÉCNICO

1. ASSUNTO

1.1. Validação da contagem automatizada de eritroblastos através do uso do equipamento hematologia BC6000 da marca Mindray® para a prática de rotina em laboratórios de análises clínicas.

2. ANÁLISE

2.1. O hemograma completo é o exame laboratorial mais solicitado da prática médica e se destina a analisar e contar as células do sangue periférico de um indivíduo. Nesse sentido as análises envolvem a visualização de parâmetros como: a contagem de hemácias, concentração de hemoglobina e hematócrito, e dos índices hematimétricos; contagem de leucócitos totais e da diferencial leucocitária, através da caracterização morfológica das células; e contagem de plaquetas e determinação dos índices plaquetários (QIAN et al, 2016; BAKRIM et al, 2018).

2.2. Determinantes esses que, ao longo dos anos, ganharam maior precisão com os avanços tecnológicos na construção de analisadores hematológicos que fazem a detecção de células anormais e sinalizam ao operador, através de alertas/alarmes (*flags*), a necessidade de confirmação dos achados morfológicos em lâmina. E ainda outros equipamentos que já permitem a contagem com precisão de reticulócitos, eritroblastos e ainda de células mielóides jovens (mieloblastos) (REYES; SARRAF; RUISECO, 2015; BRIGGS et al. 2011; BRIGGS, 2009; BUTTARELLO; PLEBANI, 2008; CHABOT-RICHARDS; GEORGE, 2015; SMITH; NOWAK; FOWLER, 2018).

2.3. A identificação e contagem diferencial de eritroblastos por analisadores hematológicos automatizados, embora muito necessária em amostras de pacientes pediátricos (recém-nascidos) e portadores de anemias hemolíticas graves, ainda apresenta limitações em alguns equipamentos de menor precisão que acabam por contar essas células como sendo linfócitos. Sendo assim necessária a validação de qualquer equipamento de hematologia quanto a utilização e confiabilidade do mesmo no ambiente laboratorial (LEONART, 2009; BENTO, 2019).

2.4. O analisador hematológico automatizado BC6000 da Mindray® é assim um desses equipamentos robustos que além dos parâmetros habituais propostos para o hemograma completo dispõem-se como tendo a capacidade de analisar outros fluidos corporais como líquidos sinovial e pleural; e ainda de contar eritroblastos com precisão (TAN, NAVA e GEORGE, 2011; SHEN et al, 2019) .

2.5. No que tange então a contagem automatizada de eritroblastos pelo analisador hematológico BC6000 da Mindray® foi realizada a validação do referido equipamento hematológico no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo, situado na cidade de Belém-Pa.

2.6. Para tanto primeiro foi feita a contagem manual de eritroblastos presente em uma amostra de sangue periférico em lâmina (Padrão Ouro), em seguida a mesma amostra foi submetida a contagem automatizada pelo equipamento BC6000 da Mindray® para que fosse verificada a correlação entre as duas metodologias, além disso, foi feita a fenotipagem dos eritroblastos dessas amostras e também de amostras da medula óssea de pacientes em recuperação medular pós-quimioterapia, por citometria de fluxo, para avaliação dos gráficos gerados pelo referido analisador hematológico para a definição precisa dos estágios de maturação dos eritroblastos.

2.7. De acordo com os resultados estatísticos gerados pelas duas metodologias verificou-se que o BC6000, em comparação com o método de contagem manual de eritroblastos em lâmina (Padrão Ouro), apresenta boa reprodutibilidade, linearidade e precisão, não havendo diferenças estatística entre as duas contagens.

2.8. No que tange aos gráficos gerados pelo equipamento para a dispersão e plotagem das populações de eritroblastos observou-se que não é possível identificar o estágio de maturação dessas células apenas pela projeção gráfica, e ainda, que este equipamento não é capaz de analisar amostras de medula óssea mesmo após lavagem e diluição.

2.9. Tendo então a contagem automatizada de eritroblastos, presentes em amostras de sangue periférico de pacientes em diferentes faixas etárias, sido validada para o contador hematológico BC6000 (Mindray®). Demonstrando assim que esse equipamento é confiável e seguro para a determinação da quantidade dessas células.

2.10. Objetivo:

2.10.1. Orientar outros operadores e laboratórios quanto a validação do contador hematológico BC6000 da marca Mindray® para a contagem automatizada de eritroblastos em amostras de sangue periférico em laboratórios de análises clínicas.

2.11. Definição de amostra com quantidade elevada de eritroblastos:

2.11.1. Para esta validação foram utilizadas 20 amostras de medula óssea como controle imunofenotípico dos estágios de maturação dos eritroblastos, e 17 amostras de sangue periférico para a validação da contagem dessas células no equipamento BC6000 da marca Mindray® e análise gráfica dos estágios de maturação das mesmas. Todas as amostras foram coletadas em tubos cônicos e anticoaguladas com EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético), com 2ml a 5ml de volume. Foi realizada a coloração das lâminas de todas as amostras com corante de May Grunwald e análise morfológica dessas células em lâmina para a confirmação da presença de mais de 18% de eritroblastos por amostra a ser analisada.

2.11.2. Seguindo a recomendação do Conselho Internacional para Padronização em Hematologia (ICSH) os resultados obtidos da contagem de eritroblastos, após validação do equipamento BC6000 da marca Mindray®, foram reportados no laudo do hemograma quanto ao seu valor relativo presente em 100 leucócitos contados durante a contagem da diferencial leucocitária.

3. CONCLUSÃO

3.1. A validação realizada mostrou que o contador hematológico BC6000 da marca Mindray® apresenta bom desempenho analítico para a contagem de eritroblastos em amostras de sangue periférico, embora não guarde correlação entre os estágios maturativos de eritroblastos com os gráficos gerados pelo equipamento e não seja capaz de realizar em nenhuma hipótese análise em amostras de medula óssea.

4. REFERÊNCIAS

- 4.1. BAKRIM, Saad et al. Establishment of the hematology reference intervals in a healthy population of adults in the Northwest of Morocco (Tangier- Tetouan region). *The Pan African Medical Journal*, [S.l.] vol. 29, n. 169, [s.p] 2018. DOI: 10.11604/pamj.2018.29.169.13042 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6057597/>> [Acessado em: 13 Set 2020].
- 4.2. BENTO, Lais C. et al. Desempenho do citômetro de fluxo Aquios CL na quantificação automatizada de subpopulações de linfócitos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, vol. 55, n. 4, p. 378-389, Jul/Ago, 2019.
- 4.3. BUTARELLO, M.; PLEBANI, M. Automated blood cell counts: state of art. *American Journal of Clinical Pathology*, [S.l.], vol. 130, n. 1, p. 104-116, 2008. DOI: 10.1309/EK3C7CTDKNVPTN Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18550479/>> [Acessado em: 25 Mai 2020].
- 4.4. BRIGGS CJ. et al. Improved flagging rates on the Sysmex XE-5000 compared with the XE-2100 reduce the number of manual film reviews and increase laboratory productivity. *American Journal of Clinical Pathology*, [S.l.], vol. 2, n. 136, p. 309-316, 2011. DOI: 10.1309/AJCPDLR4KGKAFW4W. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21757605/>> [Acessado em: 18 Out 2020].
- 4.5. BRIGGS C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *International Journal Laboratory Hematology*, [S.l.], n. 31, p.277-297, 2009. DOI: 10.1111/j.1751-553x.2009.01160.x. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19452619/#:~:text=Recently%20several%20parameters%20have%20been,detection%20of%20functional%20iron%20deficiency.>> [Acessado em: 12 Out 2020].
- 4.6. CHABOT-RICHARDS, DS.; GEORGE TI. White Blood Cell Counts: Reference Methodology. *Clinics in Laboratory Medicina*, [S.l.], v. 35, n. 1, p. 11-24. DOI: 10.1016/j.cll.2014.10.007 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25676369/>> [Acessado em: 20 Out 2020].
- 4.7. LEONART, Maria Suely Soares. A importância do controle de qualidade para a contagem de reticulócitos por método visual e automatizado. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 303, 2009.
- 4.8. QIAN, Qing Zeng et al. Analysis of Hemogram of Radiation Workers in Tangashan, China. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, [S.l.], v. 30, n. 5, p. 682-688, 2016. DOI: 10.1002/jcla.21922 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6807249/>> [Acessado em: 21 Jun 2020].
- 4.9. REYES, Laser H. Hernández; SARRAF, Teresa A. Fundora; RUISECO, Mabel Andrade. El conteo automático de reticulócitos: una herramienta de uso diagnóstico, clínico e investigativo. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, Ciudad de La Habana, v. 31, n. 4, [s.p], Out/Dez, 2015.
- 4.10. SHEN, Yimin et al. Clinical performance evaluation of the new hematology analyser Mindray® BC6000. *International Journal of Laboratory Hematology*, China, vol. 5, n. 41, p. 622-634, 2019.
- 4.11. SMITH, Alyson S.; NOWAK, Roberta B.; FOWLER, Velia M. High-Resolution Fluorescence Microscope Imaging of Erythroblast Structure. *Methods in Molecular Biology*, Estados Unidos, v. 1698, [s.n], p. 205-228, Jan, 2018.
- 4.12. TAN, B.T.; NAVA, A.J.; GEORGE, T.I. Evaluation of the Beckman Coulter UniCel DxH 800, Beckman Coulter LH 780, and Abbott Diagnostics Cell-Dyn Sapphire Hematology Analyzers on Adult Specimens in a Tertiary Care Hospital. *American Society for Clinical Pathology*, [S.l.], v. 135, n. 6, p. 929-938, 2011.

5. ORGANIZAÇÃO

- 5.1. Universidade Federal do Pará/ UFPA
- 5.2. Instituto de Ciências Biológicas/ ICB
- 5.3. Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas/ PPGAC

6. COLABORAÇÃO

6.1. Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo

