



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
CURSO DE FARMÁCIA**

LYNARA NEVES LEORNE

**ANÁLISE COMPARATIVA DO HEMOGRAMA ENTRE A METODOLOGIA
AUTOMATIZADA E A MICROSCOPIA ÓPTICA**

**FORTALEZA
2013**

LYNARA NEVES LEORNE

ANÁLISE COMPARATIVA DO HEMOGRAMA ENTRE A METODOLOGIA
AUTOMATIZADA E A MICROSCOPIA ÓPTICA

Monografia apresentada à Faculdade de
Farmácia, Odontologia e Enfermagem da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito para a obtenção do título de
Farmacêutico.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Alcínia Braga de
Lima Arruda

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- L612a Leorne, Lynara Neves.
 Análise comparativa do hemograma entre a metodologia automatizada e a
 microscopia óptica/ Lynara Neves Leorne. – 2013.
 51 f. : il.
- Monografia (Graduação) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia,
 Odontologia e Enfermagem. Curso de Farmácia, Fortaleza, 2013.
 Orientação: Prof^a. Dr^a. Alcínia Braga de Lima Arruda.
1. Contagem de Células Sanguíneas. 2. Contagem de Leucócitos. 3. Automação. 4.
 Microscopia. I. Título.
-

CDD 616.15

LYNARA NEVES LEORNE

ANÁLISE COMPARATIVA DO HEMOGRAMA ENTRE A METODOLOGIA
AUTOMATIZADA E A MICROSCOPIA ÓPTICA

Monografia apresentada à Faculdade de
Farmácia, Odontologia e Enfermagem da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito para a obtenção do título de
Farmacêutico.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alcínia Braga de Lima Arruda (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Iêda Pereira de Souza
Universidade Federal do Ceará – UFC

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter colocado tantas oportunidades e pessoas maravilhosas em meu caminho.

Aos meus pais por serem pessoas tão boas e compreensivas e por terem fornecido tudo o que necessitei durante todos esses anos.

Ao Fernando pelo seu companheirismo e apoio durante todos os meus momentos de alegrias e aflições, e por ser meu alicerce em tantos momentos da minha vida.

Às minhas irmãs Laís, Nayana e Lívia pelos momentos em família que foram de fundamental importância para me ajudar a aliviar a tensão das obrigações. Em especial à minha irmã Laís pela grande ajuda fornecida na elaboração desse trabalho.

Às minhas amigas, Juliana, Karine, Marília, Sophia, Pricila e Kalyane por todos os bons momentos juntas, pois sem esses encontros talvez não fosse possível aguentar todos os entraves que surgiram no decorrer desse curso tão árduo.

À professora Alcínia por ter me ajudado a construir este trabalho com tanta dedicação e empenho e juntamente com as professoras Romélia e Lêda ter fornecido todo o conhecimento que serviu de base na sua construção e que será sempre útil na minha vida profissional.

À toda a equipe do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Fortaleza pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade construída que foi de extrema satisfação para mim, em especial ao Dr. Helano Marinho Lopes que, como poucos, soube acolher e ser um grande pilar, fornecendo-me um amplo conhecimento e permitindo abrir caminhos e oportunidades para a minha vida profissional e também por acreditar sempre no meu potencial.

“Sabemos o que somos, mas não sabemos o
que poderemos ser.”

William Shakespeare

RESUMO

O hemograma é o exame que avalia quantitativa e qualitativamente os elementos celulares do sangue e é composto por três partes: eritrograma, plaquetograma e leucograma. Este último é constituído pela contagem global e diferencial (relativa e absoluta) e pela análise morfológica dos leucócitos. Essa técnica de avaliação hematológica constitui um dos principais exames laboratoriais mais solicitados na clínica, devido à grande quantidade de informações que ele fornece. Atualmente, este exame pode ser realizado por meio da microscopia óptica ou através da automação. Diante do exposto, o presente trabalho tem por objetivo realizar uma comparação entre os laudos do hemograma fornecidos pelo analisador automático Cell Dyn 3700 Abbott™ e os obtidos através da microscopia óptica. Foram utilizadas 120 lâminas de distensão sanguínea pertencentes ao Laboratório de Hematologia da Universidade Federal do Ceará e realizada a contagem diferencial (relativa e absoluta) e avaliada a morfologia das hemácias, leucócitos e plaquetas de todas essas lâminas através da microscopia, utilizando o microscópio óptico Olympus® CX31. De posse dos resultados obtidos pela microscopia e dos laudos emitidos pelo equipamento, foi realizada a análise entre os resultados de ambas as técnicas. Todos os dados obtidos foram tabulados em planilhas do software Microsoft Office Excel 2010® e avaliados por meio dos programas SPSS versão 19 e RGui 3.0.0. Para avaliar a significância dos resultados obtidos entre as duas técnicas, foi realizado o teste estatístico de Wilcoxon. Neutrófilos, segmentados, eosinófilos e linfócitos obtiveram resultados semelhantes tanto na contagem diferencial relativa quanto absoluta entre ambas as técnicas. Os bastões apresentaram contagem superior significativa na microscopia, enquanto que os basófilos foram significativamente superiores na automação e os monócitos se mostraram equivalentes entre as duas técnicas em relação à contagem relativa. No tocante à contagem absoluta, monócitos e bastões mostraram contagens superiores na microscopia enquanto que os basófilos apresentaram contagem superior na automação. Em relação à morfologia das hemácias, leucócitos e plaquetas, a microscopia mostrou-se superior à automação por detectar alterações que foram imperceptíveis ao equipamento automatizado ou que se mostraram numericamente inferiores neste último. Apesar da proximidade dos resultados das duas técnicas em relação à contagem diferencial, a avaliação por microscopia ainda é indispensável, especialmente na detecção de anormalidades morfológicas que podem ser subestimadas pelos analisadores automáticos, a fim de se garantir a qualidade dos resultados. Concluímos que todas as lâminas devem ser analisadas pela microscopia óptica independente do resultado fornecido pelo equipamento hematológico.

Palavras-chave: Contagem de Células Sanguíneas. Contagem de leucócitos. Automação. Microscopia.

ABSTRACT

The hemogram is the test that evaluates quantitatively and qualitatively the blood cellular elements and it is composed by three parts: red blood cells count, platelets count and white blood cells count. This latter one consisting of total and differential (relative and absolute) white blood cells count and leukocytes morphological analysis. This hematological evaluation is a major technique most requested in clinical laboratory tests, because it provides a large amount of information. Currently, this test may be performed by means of optical microscopy or through the automation. On the above, the purpose of this work is to make a comparison between the hemogram reports yielded by the automatic analyzer Abbott Cell Dyn 3700™ and those one performed by optical microscopy. Was used 120 blood distention glass slides belonging to the Laboratório de Hematologia da Universidade Federal do Ceará and performed differential white blood cell count (absolute and relative) and evaluated the red blood cell, leukocytes and platelets morphology of all these glass slides by the microscopy, using an optical Olympus microscope ® CX31. In possession with the results obtained by the microscopy and the reports issued by that equipment, the analysis was made with the results of both techniques. All data attained were engaged in a software Microsoft Office Excel 2010 ® spread sheets and analyzed using softwares SPSS® version 19 and Rgui 3.0.0. To assess the research results value reached using the two techniques, a Wilcoxon statistical test was done. Segmented neutrophils, eosynophils and lymphocytes obtained similar results on both relative and absolute differential white blood cell count techniques. The bands had a significantly higher counting in the microscopy, while the basophils were a significantly higher in the automation and the monocytes showed to be equivalent on both techniques considering the relative differential white blood cell count. Regarding the absolute differential white blood cell count, monocytes and bands showed higher scores on microscopy while basophils had top score in automation. Concerning about the red blood cells, leukocytes and platelets morphology, the microscopy was superior in comparison to the automation, which detect changes that were imperceptible to the automated equipment or that were numerically lower in the latter. Despite the proximity of the two techniques results in relation to the differential white blood cell count, the microscopy analisys still needful, especially in the detection of morphological abnormalities which may be overlooked by the automatic analyzers in order to ensure the quality of the results. We also concluded that all glass slides must be analyzed by the optical microscopy even though the results achieved using hematological equipment.

Keywords: Blood Cell Count. Leukocyte Count. Automation. Microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Primeiro microscópio.....	14
Figura 2 - Microscópio inventado por Antony van Leeuwenhoek	15
Figura 3 - Câmara de Neubauer.....	16
Figura 4 - Distribuição dos leucócitos (em porcentagem) via automação e microscopia.	27
Figura 5 - Número de leucócitos/mm ³ do hemograma via automação e microscopia	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Análise descritiva da morfologia das hemácias (%).....	39
Gráfico 2 - Análise descritiva da morfologia dos leucócitos (%).....	40
Gráfico 3 - Análise descritiva da morfologia das plaquetas (%)	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo descritivo do número de células (%) do hemograma	25
Tabela 2 - Resumo descritivo do número de células/mm ³ do hemograma	26
Tabela 3 - Nível descritivo do teste de comparação do número de células (%) do hemograma	34
Tabela 4 - Nível descritivo do teste de comparação do número de células/mm ³ do hemograma	35
Tabela 5 - Análise descritiva da morfologia das hemácias.....	38
Tabela 6 - Análise descritiva da morfologia dos leucócitos	40
Tabela 7 - Análise descritiva da morfologia das plaquetas	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Hemograma: definição e importância	11
1.2 Evolução da Hematologia.....	13
1.3 Contadores automatizados e seus princípios.....	17
1.4 Metodologia do analisador automático CELL DYN 3700 ABBOTT™	19
1.5 Benefícios e limitações da realização do hemograma pela metodologia automatizada.....	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Amostragem	23
3.2 Local do estudo	23
3.3 Período do estudo	23
3.4 Metodologia	23
3.5 Análise estatística	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Análise da contagem diferencial.....	25
4.2 Análise da morfologia das hemácias e leucócitos	38
4.3 Análise da morfologia das plaquetas.....	42
5 CONCLUSÃO.....	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hemograma: definição e importância

O hemograma é um exame laboratorial que quantifica e avalia morfológicamente as células do sangue periférico (VELOSO; ALENCAR; CARDOZO, 2011). Ele engloba um conjunto de testes laboratoriais que estabelece os aspectos quantitativos e qualitativos dos eritrócitos (eritrograma), dos leucócitos (leucograma) e das plaquetas (plaguetograma) no sangue (OLIVEIRA, 2007).

O eritrograma é composto pela contagem de eritrócitos, dosagem da hemoglobina, determinação do hematócrito e dos índices hematimétricos que são: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), e concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), dentre outros parâmetros (FAILACE, 2003). Auxilia no diagnóstico das doenças hematológicas, como também é útil para avaliar as alterações presentes no sangue de indivíduos com doenças de causa não hematológica (GOMES, 2005).

O leucograma engloba os testes laboratoriais que determinam o perfil hematológico da série branca (leucócitos) no sangue periférico. É constituído da contagem global e da contagem diferencial de leucócitos, incluindo a análise das respectivas alterações morfológicas no sangue. É expresso no resultado pela fórmula leucocitária (com valores relativos e absolutos) de cada subtipo leucocitário. É o exame que quantifica os leucócitos no sangue circulante. Essa avaliação, como parte do hemograma, é de considerável importância clínica, uma vez que alterações em seus números, na proporção entre seus diferentes subtipos celulares ou em suas estruturas morfológicas, são valiosos indicadores de mudanças patológicas no organismo (OLIVEIRA, 2007).

A melhoria da avaliação das plaquetas foi observada com mais frequência depois da existência dos equipamentos hematológicos automatizados, que através do plaguetograma liberam a contagem das plaquetas (PLT/mm³) e de novos índices plaquetários, tais como: volume plaquetário médio (MPV) que é a avaliação dos “tamanho” das plaquetas, ou seja, um exame semelhante ao valor médio do volume eritrocitário; plaguetócrito (PCT) que é a relação de percentagem da massa plaquetária com o plasma, semelhante ao hematócrito que é feito para as hemácias;

índice de variação do tamanho das plaquetas (PDW) o qual informa sobre a diversidade dos volumes plaquetários, sendo semelhante ao índice de variação dos volumes das hemácias (RDW) (NASCIMENTO, 2012).

Como a maioria dos testes laboratoriais, o hemograma avalia as condições fisiológicas em que se encontra certo indivíduo em um determinado momento. Quando os valores encontrados estão acima ou abaixo dos valores de referência, o resultado é considerado anormal, possibilitando ou não confirmar uma condição patológica. Na prática, porém, existem condições onde os resultados dos testes laboratoriais não se enquadram nos limites definidos como referência normal, e nem por isso o paciente apresenta uma condição patológica (BEUTLER; WAALEN, 2006).

As alterações observadas neste exame permitem ao médico avaliar patologias relacionadas às séries vermelha (anemias, policitemia), branca (leucemias, infecções diversas) e plaquetas (púrpuras, trombocitopenias) e relacioná-las aos achados clínicos observados no paciente (BEUTLER; WAALEN, 2006).

Essa técnica de avaliação hematológica constitui um dos principais exames laboratoriais mais solicitados na clínica, devido à grande quantidade de informações que fornece, pela facilidade de sua realização e custo relativamente baixo (TOMOEDA *et al.*, 2011).

As metodologias usadas para obter a contagem diferencial de leucócitos podem ser divididas em dois grupos principais: contagem diferencial manual e contagem diferencial automatizada. A contagem diferencial manual foi introduzida por Paul Ehrlich no início do século XX e ainda é considerada pelos clínicos um valioso exame de rotina (PRINSLOO, 2001).

Essa técnica de contagem é obtida através da avaliação morfológica e identificação dos leucócitos na distensão sanguínea devidamente corada e examinada através de microscópio óptico (PRINSLOO, 2001). As colorações normalmente usadas são o Wright, o Giemsa, o Wright-Giemsa e o May –Grünwald – Giemsa (Pappenheim) (SILVA, 2011). A contagem é preferencialmente realizada utilizando-se a objetiva com aumento de 100X com o auxílio do óleo de imersão, mas também pode ser feita com objetivas de menor ampliação (aumentos de 40X e 50X) por um profissional experiente (PRINSLOO, 2001).

Para obter a informação necessária a partir de um esfregaço de sangue periférico, ele deve ser corretamente efetuado. Para um bom estudo das células sanguíneas, a distensão necessita ser uniforme, fina, bem corada e não cobrir a toda a lâmina (JANNINI, 1995).

A distensão sanguínea é formada por três partes: a cabeça que corresponde à parte inicial onde foi depositada a gota de sangue; o corpo que corresponde à porção média e a cauda que é a cremação final. Como um todo, a extensão sanguínea é formada por um aglomerado de células que se espalham uniforme e gradativamente até a porção média e final, onde os elementos são vistos isoladamente. Esse é o local adequado para o estudo e contagem das células (CARVALHO, 2008). Para uma fórmula diferencial confiável, a distensão não pode ser muito delgada, e a cauda deve ser homogênea e sem franjas (LEWIS, 2006).

As distensões sanguíneas fornecem distribuição irregular dos elementos celulares. As células maiores, correspondendo à série mielóide, acumulam-se nas margens e cauda da preparação. As menores, correspondendo à série linfóide, tendem a uma distribuição central (CARVALHO, 2008).

Esta contagem está sujeita a três tipos de erro: estatístico, na distribuição desigual das células no esfregaço e na identificação das células relativamente à interpretação subjetiva do observador (SILVA, 2011).

Atualmente as determinações que compõem o hemograma são realizadas em minutos, em instrumentos semi-automatizadas ou automatizados, com modificações das técnicas manuais ou tecnologias completamente novas (TOMOEDA *et al.*, 2011).

1.2 Evolução da Hematologia

Foi a partir da invenção do microscópio que foram descobertas as células sanguíneas. Muitos tipos diferentes de microscópios foram inventados e testados a partir do século 16 até os dias de hoje (BOLLER, 2008).

A criação do primeiro microscópio é atribuída a Zacharias Jansen em 1595, em Middleburg, Holanda (FIGURA 1).

Figura 1- Primeiro microscópio

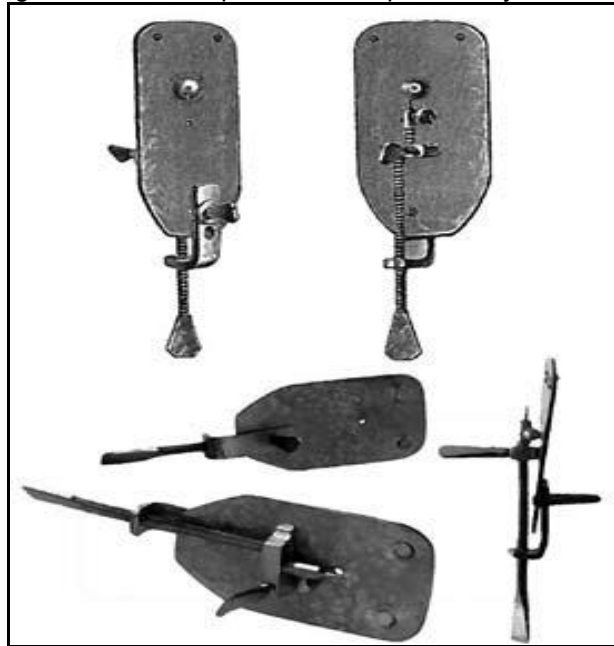


Fonte: Boller, 2008.

Este modelo de microscópio era composto por duas lentes e diafragmas entre os tubos. Quando totalmente fechado, ele teve uma ampliação de 3X e, quando completamente estendido uma ampliação de 9X.

Essa invenção foi aperfeiçoada pelo naturalista holandês Antony van Leeuwenhoek, que a utilizou na observação de seres vivos. Dotado apenas de uma lente de vidro, o microscópio primitivo inventado pelo pesquisador, permitia o aumento de percepção visual de até 300X e com razoável nitidez. Este primitivo microscópio foi construído em 1674 (FIGURA 2). Com este simples instrumento, o naturalista estudou os glóbulos vermelhos do sangue, constatou a existência dos espermatozoides e desvendou o mundo dos micro-organismos (VIEIRA; ANDRIOLO, 2009).

Figura 2 - Microscópio inventado por Antony van Leeuwenhoek

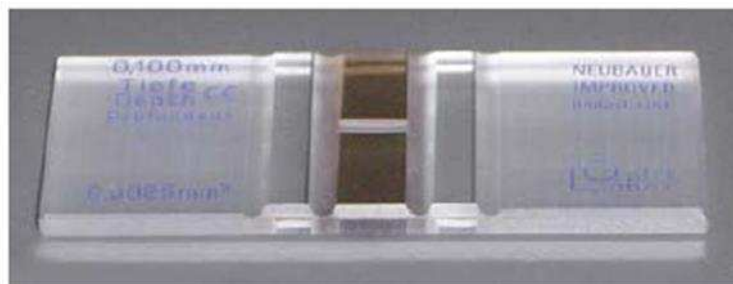


Fonte: Vieira; Andriolo, 2009.

Sahli no século passado desenvolveu um método para dosagem de hemoglobina, com base na propriedade pigmentar desta molécula (HOKAMA; MACHADO, 1997). Paul Ehrlich, através do uso do corante anilina, conseguiu obter células sanguíneas coradas e foi capaz de distinguir núcleo, citoplasma e pequenos detalhes celulares (BARNES *et al.*, 2005).

A Hematologia sofreu grande avanço na tecnologia automatizada, no passado uma das vidrarias mais utilizadas na hematologia era a câmara de Neubauer (FIGURA 3) conhecida também como hemocitômetro. A Câmara de Neubauer é uma lâmina grossa de uso microscópico, com formato retangular e normalmente de vidro, com uma depressão no centro, utilizada para fazer contagem de células por unidade de volume de uma suspensão. Podem ser contadas as células sanguíneas, tais como hemácias, leucócitos e plaquetas, assim como células oriundas de alguns procedimentos invasivos para investigação de determinadas patologias (NOGUEIRA NETO; OLIVEIRA JUNIOR, 2012).

Figura 3 - Câmara de Neubauer



Fonte: Nogueira Neto; Oliveira Junior, 2012

Durante a primeira metade do século XX, os métodos manuais de contagem dos glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas em câmaras de volume calibradas, em conjunto com medidas manuais de hemoglobina, foram amplamente usados na clínica. Eles eram quase invariavelmente acompanhados por exame microscópico da distensão do sangue em lâmina para diferenciação das células brancas do sangue, bem como a avaliação de glóbulos vermelhos e plaquetas em relação ao tamanho e à morfologia (BARNES *et al.*, 2005).

O desenvolvimento da automação da contagem e medição do tamanho das células sanguíneas parte das técnicas de contagem simples que foram descritas na segunda metade do século XIX e foram usadas durante muito tempo. Estas eram muito inexatas e até a década de 1950, teve poucos avanços tecnológicos (ENGLAND, 1996).

Foram feitas muitas tentativas iniciais e complexas para automatizar a contagem de células em câmaras de contagem (hematocitômetros), mesmo com técnicas que foram aperfeiçoadas; todavia, era difícil automatizar a diluição do sangue e o preenchimento da câmara. Também se achava impossível contar as células com exatidão mediante os métodos de estudo das propriedades elétricas ou ópticas das células em suspensão (FREITAS; FERNÁNDEZ, 2002).

Em 1970 foram introduzidos os primeiros autoanalisadores com capacidade de elaborar diferenciais em lâmina, e desde então o avanço vertiginoso da tecnologia tem buscado combinar diferentes princípios a fim de aperfeiçoar a identificação celular (FREITAS; FERNÁNDEZ, 2002).

Atualmente grandes progressos têm sido alcançados no campo da automação em hematologia, particularmente em relação ao sistema de contagem de células e, em especial, à contagem diferencial dos leucócitos (ZACCARIA *et al.*, 1990).

A contagem diferencial dos leucócitos por microscopia ainda é realizada por hematologistas, sendo indispensável em diagnósticos com suspeita de malignidade. Enquanto o seu valor como um método de referência para as amostras de sangue que contêm células anormais permanece indiscutível, ela é uma técnica lenta, subjetiva e de baixa reprodutibilidade. Portanto, a automação desta tarefa é muito útil para melhorar a avaliação hematológica, permitindo fornecer o diagnóstico de muitas doenças com maior rapidez (HIREMATH; BANNIGIDAD; GEETA, 2010).

Com o desenvolvimento tecnológico, o trabalho humano tem sido substituído por equipamentos cujo objetivo consiste em reduzir o custo operacional dos exames, garantir exatidão e precisão, aumentar o desempenho do laboratório e reduzir o tempo gasto na execução dos exames (CARVALHO, 2008).

1.3 Contadores automatizados e seus princípios

Wallace Coulter desenvolveu o primeiro analisador automático para contagem e dimensionamento de células e o apresentou em 1956. Este era um instrumento de canal único que revolucionou o tedioso e impreciso método de contagem manual em câmara (BARNES *et al.*, 2005).

A partir de 1960, com a introdução no mercado de aparelhos multiparamétricos capazes de realizar contagens celulares simultâneas e com diluição interna, tornou-se possível a realização do eritrograma, da contagem de plaquetas e de leucócitos usando canais separados para as contagens (SILVA; HASHIMOTO, 2003).

Os diversos contadores multiparamétricos do mercado baseiam-se em princípios elétricos, princípios ópticos ou em ambos, associados ou não a métodos químicos (coloração citoquímica ou destruição química direcionada, com preservação de tipos celulares específicos), citometria de fluxo (células analisadas em fluxo contínuo, avaliadas em relação às suas características de dispersão e/ou de absorção de luz), imunofluorometria (células marcadas com anticorpos monoclonais associados à fluorocromos), fluorometria (detecção de fluorocromos – intensidade de fluorescência nas células marcadas com fluorocromos sem a

intermediação dos anticorpos monoclonais), dentre outros, para a contagem dos diferentes tipos celulares do sangue (OLIVEIRA, 2007).

O primeiro princípio, o qual foi descrito por Coulter em 1956, denominado método elétrico ou impedância elétrica, depende do fato dos glóbulos vermelhos serem pobres condutores de eletricidade, enquanto certos diluentes são bons condutores; essa diferença forma a base desse sistema de contagem (BACAL, 2009).

De acordo com esse princípio, as alterações geradas em um campo óptico de frequência por uma célula são a base para o princípio de dispersão (*scatter*) ou de absorção de luz, no método óptico de contagem (OLIVEIRA, 2007).

Nesse método, dois eletrodos de platina mergulhados separadamente por um orifício de 60 a 100 micrometros de diâmetro, sendo um no interior do equipamento e outro no líquido contendo as partículas a serem contadas, permite que cada partícula que passe pelo orifício desloque o volume de líquido, modificando de forma mensurável a impedância proporcional ao volume deslocado. Esses pulsos são amplificados e contados em um volume de sangue predeterminado (BACAL, 2009).

O princípio da dispersão de luz utiliza analisadores eletro-ópticos nos quais um detector sensível à luz quantifica a dispersão da luz. Uma célula, ao passar frente a um feixe luminoso dispersa a luz e esta pode ser detectada por sensores fotópticos dispostos lateralmente ao feixe. O feixe luminoso pode ser tanto uma luz branca como um laser de grande intensidade, este com qualidade óptica superior. O detector pode ser tanto um fotomultiplicador como um fotodiodo; ambos convertem a luz em impulsos elétricos que podem ser acumulados e contados (BAIN, 2004). O tamanho do pulso detectado é proporcional ao tamanho da partícula (eritrócito, leucócito ou plaqueta). A precisão dos instrumentos que empregam a metodologia óptica é equivalente àquela dos sistemas que utilizam impedância elétrica (HENRY, 2008).

A citometria de fluxo é uma técnica de identificação e caracterização de células ao fluírem através de uma tubulação delgada e passarem, uma a uma, frente a sensores multiparamétricos. Essa tecnologia faz parte dos contadores eletrônicos do hemograma, mas é especialmente desenvolvida em máquinas especializadas (*flow – cytometers* = citômetros de fluxo), nas quais a análise inclui marcação das células com anticorpos monoclonais conjugados a agentes capazes de fluorescer frente a um laser, focado na câmara de exame (*flow – cell*) do trajeto (FAILACE,

2003). Essa técnica permite a classificação rápida de grandes números de células além da capacidade dos métodos tradicionais, e fornece análise quantitativa da célula a nível de uma só célula (ABBOTT, 2000).

1.4 Metodologia do analisador automático CELL DYN 3700 ABBOTT™

O Cell Dyn 3700 Abbott™ é um aparelho totalmente automatizado que realiza hemograma completo incluindo contagem de reticulócitos e contagem diferencial da série branca por MAPSS (Multi Angle Polarization Scatter Separation). Além disso, relata informações adicionais sobre bastonetes, granulócitos imaturos, blastos, linfócitos atípicos e classificação de maturidade de reticulócitos (ABBOTT, 2000).

Os glóbulos vermelhos, os leucócitos e as plaquetas são contados e dimensionados pelo método de impedância elétrica. Este método é baseado na medida das mudanças de corrente elétrica que são produzidas por cada partícula, suspensa em um líquido condutor, à medida que ela passa por uma abertura de dimensões conhecidas. Um eletrodo é submerso no líquido em ambos os lados da abertura de forma a criar um caminho elétrico através dele. À medida que cada partícula passa através da abertura, uma mudança transitória na resistência entre os eletrodos é produzida. Esta mudança produz um pulso elétrico mensurável. O número de pulsos gerados é indicativo do número de partículas que atravessam a abertura. A amplitude de cada pulso é essencialmente proporcional ao volume da partícula que o produziu. Assim, os pulsos são classificados em vários canais de tamanho, de acordo com suas amplitudes (ABBOTT, 2000).

Para realizar a análise de leucócitos o aparelho conta cerca de 10.000 células através de duas diferentes tecnologias (impedância e MAPSS) e oferece o melhor de cada tecnologia para a obtenção de resultados mais precisos e específicos. A tecnologia de impedância elétrica para leucócitos (WIC) consiste na contagem total de leucócitos através da passagem de cada partícula pelo orifício que gera um pulso, sem a interferência de hemácias resistentes ou linfócitos frágeis (ABBOTT, 2000).

1.5 Benefícios e limitações da realização do hemograma pela metodologia automatizada

O método de contagem diferencial de leucócitos automatizado possui várias vantagens sobre o método manual (por microscopia óptica). Primeiramente, a maioria dos instrumentos automatizados conta milhares de células comparado com as 100 a 400 células contadas pelo método manual. Isso induz a uma considerável melhoria na precisão do método porque o erro devido ao acaso é muito menor (PRINSLOO, 2001).

Outra vantagem é o rápido rastreio de múltiplas amostras, levando a uma melhor eficiência. Alguns dos modernos analisadores automatizados são capazes de processar mais de 120 amostras por hora (PRINSLOO, 2001).

Uma vantagem adicional é o aumento da segurança que esses equipamentos fornecem já que a equipe técnica do laboratório tem menos contato direto com as amostras, logo, pequenas quantidades de volume de amostras são requeridas (PRINSLOO, 2001). Além do que, a pipetagem automatizada, a diluição e a contagem de um grande número de células determinam resultados com maior acurácia (OLIVEIRA, 2007; OLIVEIRA, 2008).

Sem a habilidade e a velocidade dos modernos contadores automatizados em hematologia, os laboratórios clínicos seriam incapazes de analisar eficientemente o grande volume de amostras que recebem diariamente. Os instrumentos automatizados oferecem alta sensibilidade e precisão na quantificação das células sanguíneas, bem como na contagem diferencial de leucócitos (FAILACE; PRANKE, 2004).

Os analisadores automáticos permitem uma economia de tempo considerável nas análises celulares rotineiras do laboratório de hematologia. Porém a ocorrência de falso positivo e falso negativo pode ocorrer e tem que ser analisadas muito cuidadosamente em cada laboratório que use estes tipos de equipamentos, para evitar falhas e distorções na análise final (CLARO *et al.*, 1997).

Apesar de a tecnologia eletrônica propiciar resultados confiáveis e análises de alta qualidade, tais aparelhos não são capazes de identificar algumas alterações hematológicas, que podem ser clinicamente significantes ou biologicamente relevantes (GRIMALDI; SCOPACASA, 2000).

Até o momento, o método manual/visual, apesar de sua variabilidade e demonstrada imprecisão, segue sendo o método de referência, o qual é atribuível, em grande parte, à capacidade de obter padrões para o adequado ajuste e/ou calibração dos auto-analisadores (FREITAS; FERNÁNDEZ, 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar os resultados obtidos do hemograma através da microscopia óptica e do analisador automático Cell Dyn 3700 Abbott™ para determinar a concordância entre ambos os laudos.

2.2 Objetivos específicos

Comparar os resultados obtidos da contagem diferencial relativa e absoluta de leucócitos através da microscopia óptica e da automação;

Verificar se há compatibilidade entre o laudo fornecido pelo equipamento e o resultado obtido pela microscopia com relação à contagem diferencial leucocitária e à morfologia dos leucócitos, hemácias e plaquetas;

Verificar se é necessária a revisão das lâminas na rotina laboratorial ou se os resultados fornecidos pelo aparelho automatizado são suficientes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Foram utilizadas 120 lâminas de distensão sanguínea pertencentes ao Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará (UFC). As lâminas foram confeccionadas a partir de amostras de sangue de pacientes atendidos pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE). As amostras utilizadas eram de indivíduos adultos, de ambos os sexos, alguns portadores de anemias e outros de doenças mieloproliferativas (leucemia mielóide, policitemia vera) ou linfoproliferativas (leucemia linfóide), dentre outras patologias.

3.2 Local do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará e no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

3.3 Período do estudo

O período de realização foi de agosto de 2012 a fevereiro de 2013.

3.4 Metodologia

As 120 amostras de sangue coletadas em tubo a vácuo contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foram homogeneizadas em homogeneizador automático e processadas pelo analisador automático Cell Dyn 3700 Abbott™. Após o processamento de todas as amostras foram impressos todos

os laudos fornecidos pelo equipamento. Essa etapa foi realizada no Laboratório de Hematologia do HEMOCE.

No Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFC foi confeccionada uma lâmina de distensão sanguínea para cada uma das 120 amostras. Após a secagem, as lâminas foram coradas pela coloração panótica rápida. Depois de ter sido escoado o excesso de água utilizada na última etapa da coloração, cada lâmina foi visualizada na objetiva de imersão (100X) no microscópio óptico Olympus® CX31.

A avaliação foi iniciada pela inspeção da série vermelha, em campos onde as hemácias se tocavam sem se sobreporem. Dessa forma foi observado o tamanho, a forma, a coloração, assim como a presença de inclusões eritrocitárias das hemácias vistas em cada campo. Foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos até ser contabilizado um total de 100 células. A contagem diferencial foi realizada no corpo da distensão sanguínea, baseada na avaliação das características morfotintoriais, evidenciando-se a morfologia do núcleo, citoplasma e coloração de cada célula de forma bastante criteriosa a fim de se evitar erros na identificação de cada tipo de leucócito. Atenção especial foi dada para a morfologia e possíveis anormalidades de neutrófilos e atípicas de linfócitos, evidenciando-se possíveis alterações na membrana e/ou no citoplasma dessas células. Durante a realização da contagem dos leucócitos também foi verificada a morfologia das plaquetas e o número de plaquetas distribuídas na lâmina, porém sem contá-las.

Partindo-se dos resultados obtidos pela microscopia óptica, foi realizada a comparação da contagem diferencial dos leucócitos, tanto relativa (número de leucócitos em porcentagem) quanto absoluta (número de leucócitos por mm^3) assim a avaliação morfológica das hemácias, dos leucócitos e das plaquetas com os laudos fornecidos pelo equipamento Cell Dyn 3700 Abbott™.

3.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados em planilhas do software Microsoft Office Excel 2010® e avaliados por meio dos programas SPSS versão 19 e RGui 3.0.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da contagem diferencial

Observamos na Tabela 1 o resultado da análise descritiva dos dados da contagem relativa dos leucócitos (em porcentagem). Essa tabela serviu como base para melhorar o entendimento do comportamento das variáveis consideradas.

Tabela 1 - Resumo descritivo do número de células (%) do hemograma

Célula	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-Padrão
Neutrófilos % Auto*	120	1	90	51,73	23,07
Neutrófilos % Micr**	120	0	90	52,06	23,14
Blastos % Auto	120	0	93	3,12	12,87
Blastos % Micr	120	0	94	2,67	12,25
Promielócitos % Auto	120	0	10	0,17	1,01
Promielócitos % Micr	120	0	9	0,13	0,88
Mielócitos % Auto	120	0	23	1,08	3,74
Mielócitos % Micr	120	0	24	1	3,68
Metamielócitos % Auto	120	0	14	0,76	2,23
Metamielócitos % Micr	120	0	13	0,68	2,17
Bastões % Auto	120	0	22	2,64	4,63
Bastões % Micr	120	0	23	3,05	4,67
Segmentados % Auto	120	1	86	47,09	21,89
Segmentados % Micr	120	0	89	47,36	21,7
Eosinófilos % Auto	120	0	50	3,93	6,55
Eosinófilos % Micr	120	0	47	4,05	6,89
Basófilos % Auto	120	0	12	0,96	1,64
Basófilos % Micr	120	0	9	0,6	1,32
Linfócitos % Auto	120	2	97	31,86	21,27
Linfócitos % Micr	120	3	97	31,2	21,2
Monócitos % Auto	120	0	36	8,48	7,34
Monócitos % Micr	120	0	38	8,65	7,3

Fonte: Laboratório de Hematologia, 2013.

Legenda: * Auto = automação; **Micr = microscopia

De forma análoga à Tabela 1, foi realizada a análise descritiva dos dados em relação à contagem diferencial absoluta dos leucócitos (leucócitos/mm³) cujos resultados estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Resumo descritivo do número de células/mm³ do hemograma

Célula	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-Padrão
Neutrófilos/ mm ³ Auto*	120	84	50559	6359,47	8154,54
Neutrófilos/ mm ³ Micr**	120	0	51446	6362,93	8218,14
Blastos/ mm ³ Auto	120	0	77097	1229,48	7602,28
Blastos/ mm ³ Micr	120	0	77097	1170,37	7443,05
Promielócitos/ mm ³ Auto	120	0	8870	91,21	813,34
Promielócitos/ mm ³ Micr	120	0	7983	75,88	730,06
Mielócitos/ mm ³ Auto	120	0	10644	288,43	1257,61
Mielócitos/ mm ³ Micr	120	0	8870	255,96	1091,79
Metamielócitos/ mm ³ Auto	120	0	12418	232,58	1211,84
Metamielócitos/ mm ³ Micr	120	0	11531	215,13	1129,7
Bastões/ mm ³ Auto	120	0	15079	553,22	1711,14
Bastões/ mm ³ Micr	120	0	15079	595,65	1737,13
Segmentados/ mm ³ Auto	120	61	27104	5304,34	5726,45
Segmentados/ mm ³ Micr	120	0	28556	5300,44	5771,67
Eosinófilos/ mm ³ Auto	120	0	5000	358,24	586,05
Eosinófilos/ mm ³ Micr	120	0	4747	361,65	591,42
Basófilos/ mm ³ Auto	120	0	2457	116,75	332,49
Basófilos/ mm ³ Micr	120	0	2808	79,03	293,37
Linfócitos/ mm ³ Auto	120	235	531560	8781,63	49777
Linfócitos/ mm ³ Micr	120	251	531560	8822,54	49770,7
Monócitos/ mm ³ Auto	120	0	8228	930,48	1391,26
Monócitos/ mm ³ Micr	120	0	8228	977,05	1369,46

Fonte: Laboratório de Hematologia, 2013.

* Auto = automação; **Micr = microscopia

De acordo com os dados mostrados, visualizamos, através da mensuração do desvio-padrão, que existe pequena variabilidade nos valores obtidos entre as duas técnicas (manual versus automatizada), tanto na contagem relativa quanto absoluta dos leucócitos.

Com relação aos neutrófilos, blastos, segmentados e linfócitos, encontramos maior variabilidade que as demais. Dada essas informações e pela semelhança dos valores (mínimo, máximo, média e desvio-padrão) há indícios que existe similaridade nos resultados obtidos via automação e microscopia. Porém, esses resultados não

foram suficientes para comprovar essas hipóteses. Dessa forma, tornou-se necessária a utilização de testes estatísticos para comparar os resultados preliminares.

Para uma melhor visualização e compreensão dos dados obtidos, foram construídos gráficos de dispersão para cada tipo celular analisado. Esses gráficos estão dispostos a seguir (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Distribuição dos leucócitos (em porcentagem) via automação e microscopia

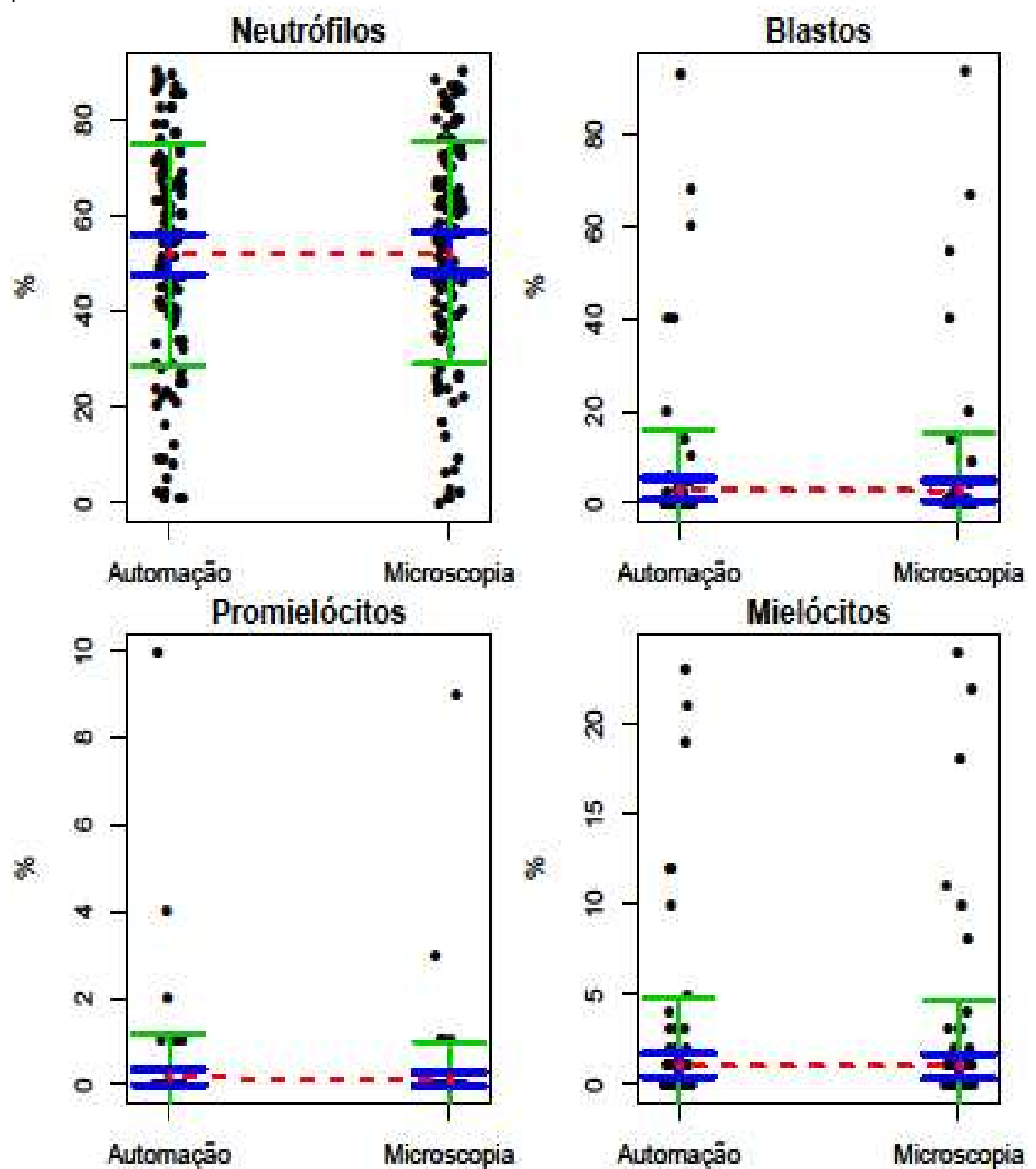


Figura 4 – Continuação

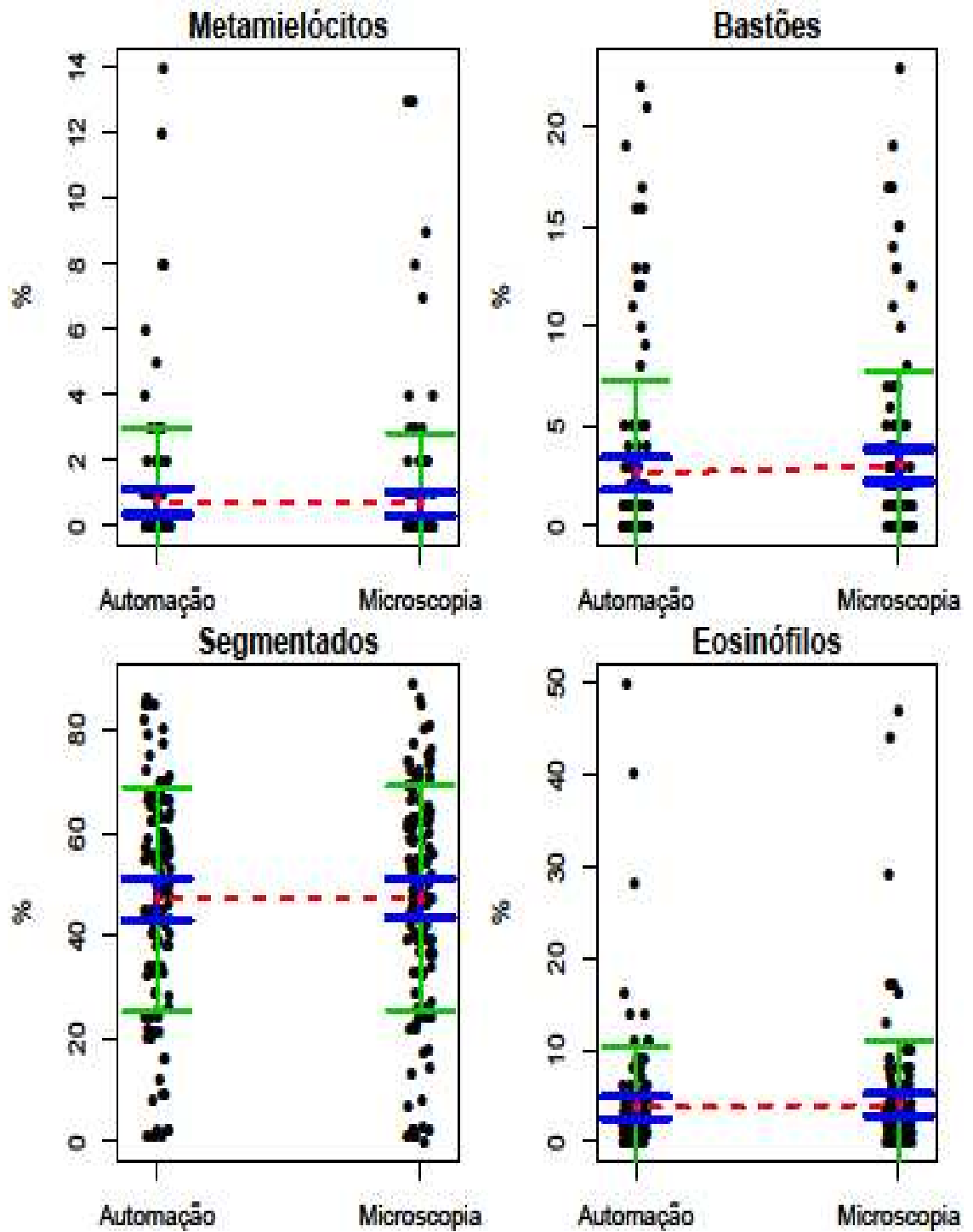
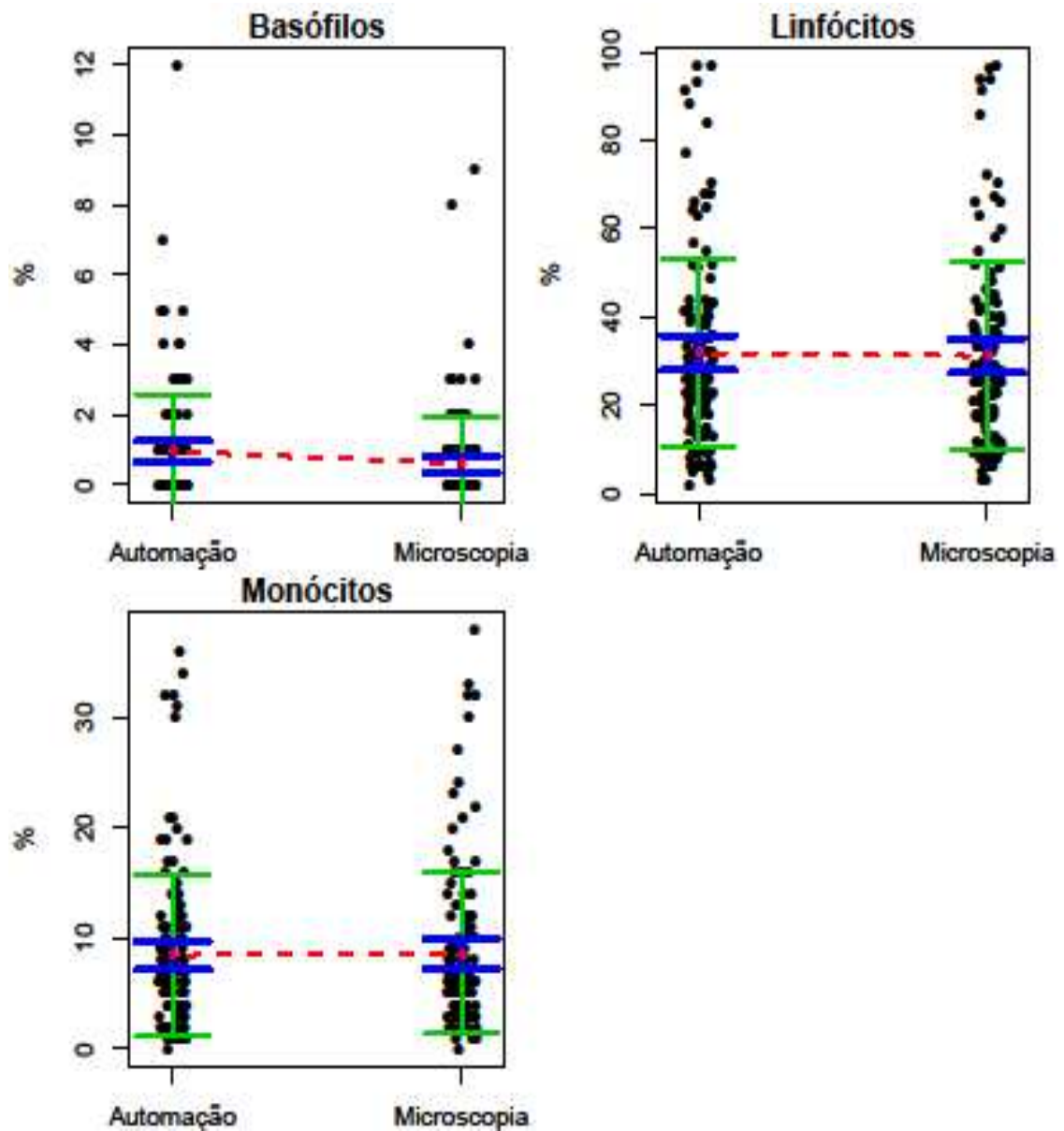


Figura 4 - Conclusão



Fonte: Laboratório de Hematologia, 2013.

Legenda: A linha tracejada vermelha conecta as médias obtidas via automação e via microscopia, o intervalo em azul corresponde ao intervalo de confiança de 95% para a média amostral e o intervalo em verde descreve o intervalo onde se encontra a maioria dos dados.

De acordo com a Figura 4 verificamos que em relação aos neutrófilos, encontramos leve dispersão entre os valores obtidos, porém com fortes indícios de similaridade devido à pequena diferença das médias obtidas via automação e microscopia (ambas encontram-se no mesmo nível de mensuração), como também pelo fato de o erro amostral da média (intervalo em azul) ser praticamente o mesmo e pela maioria dos valores numéricos se encontrarem em um mesmo intervalo (intervalo verde).

Com relação às células jovens (blastos, promielócitos, mielócitos e metamielócitos), encontramos grande quantidade de dados numéricos igual ou próximo a zero, não havendo muita variabilidade nessas células. Este fato provavelmente ocorreu em virtude do número reduzido de amostras analisadas (quantidade de lâminas) contendo esses quatro tipos de células, não se tendo, portanto, um número significativo de dados. As demais células mostradas (bastões, segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos) seguem o padrão das análises descritas para os neutrófilos totais.

Figura 5 - Número de leucócitos/mm³ do hemograma via automação e microscopia

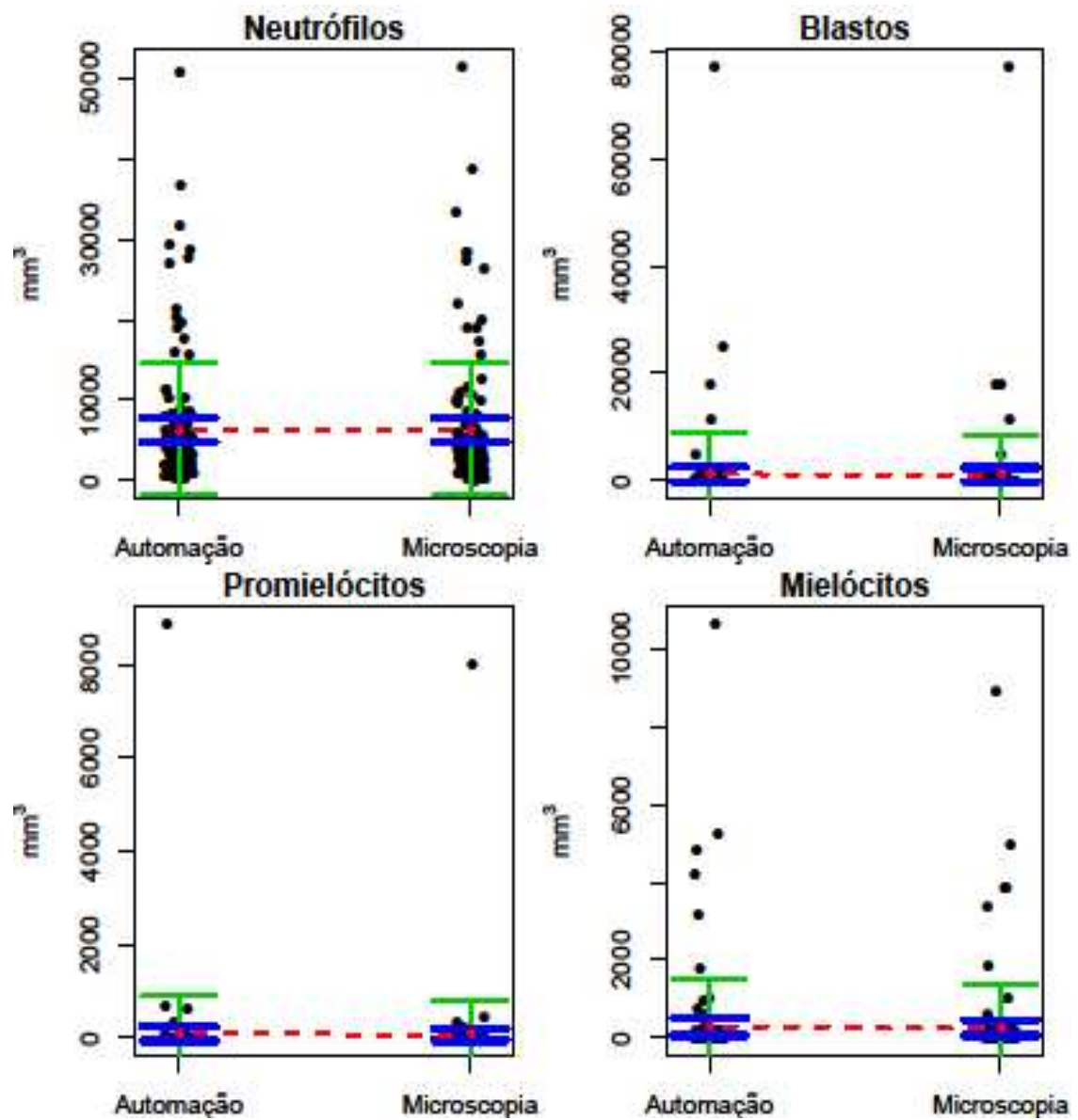


Figura 5 – Continuação

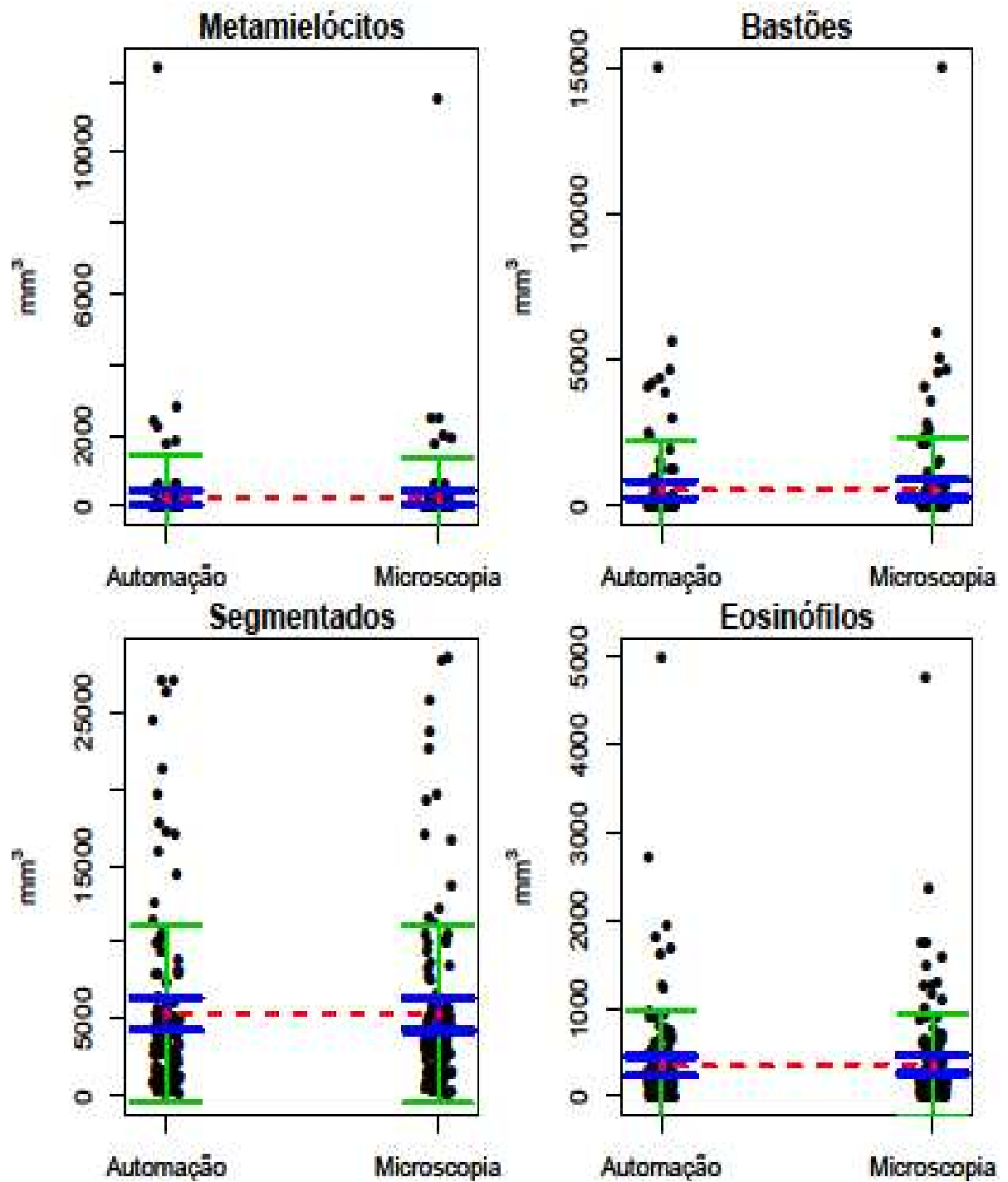
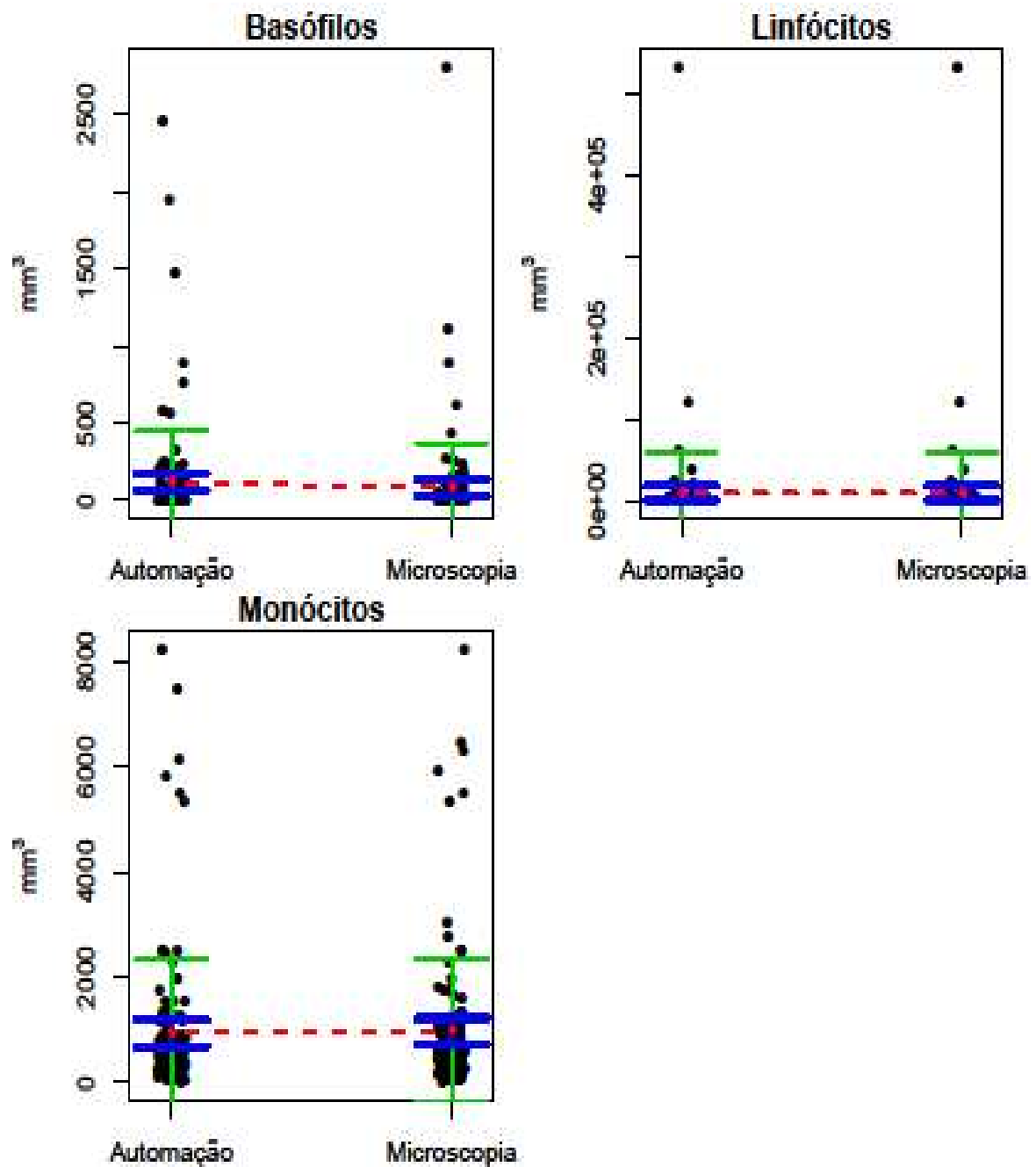


Figura 5 – Conclusão



Fonte: Laboratório de Hematologia, 2013.

Legenda: A linha tracejada vermelha conecta as médias obtidas via aparelho e via microscópio, o intervalo em azul corresponde ao intervalo de confiança de 95% para a média amostral e o intervalo em verde descreve o intervalo onde se encontra a maioria dos dados.

De forma análoga à exibida na Figura 4, também foi demonstrada a distribuição dos leucócitos em relação à contagem diferencial absoluta (leucócitos/mm³) via automação e microscopia (Figura 5). Os resultados encontrados foram semelhantes aos obtidos na contagem diferencial relativa.

Para confirmar os resultados obtidos anteriormente, foi necessária a utilização de teste estatístico. O teste escolhido foi o de Wilcoxon pareado o qual é baseado em duas hipóteses: a primeira em que não há evidências para que um dos resultados seja maior ou menor que o outro e a segunda em que há evidências para um dos resultados ser maior ou menor que o outro. A primeira hipótese é rejeitada se o *p-valor* for menor que 0,05. Rejeitando-se esta hipótese, pode-se inferir que há evidências de que existem diferenças de mensuração entre os dois métodos. Na Tabela 3 são encontrados os resultados obtidos da contagem diferencial relativa após a aplicação desse teste.

Tabela 3 - Nível descritivo do teste de comparação do número de células (%) do hemograma

Célula	Wilcoxon
Neutrófilos % Micr* - Neutrófilos % Auto**	0,236
Blastos % Micr - Blastos % Auto	-
Promielócitos % Micr - Promielócitos % Auto	-
Mielócitos % Micr - Mielócitos % Auto	-
Metamielócitos % Micr-Metamielócitos % Auto	-
Bastões % Micr - Bastões % Auto	<0,001
Segmentados % Micr - Segmentados % Auto	0,354
Eosinófilos % Micr - Eosinófilos % Auto	0,312
Basófilos % Micr - Basófilos % Auto	<0,001
Linfócitos % Micr - Linfócitos % Auto	0,229
Monócitos % Micr - Monócitos % Auto	0,153

Fonte: Laboratório de Hematologia, 2013.

*Micr = Microscopia **Auto = Automação

Estão destacados em amarelo os casos em que foram obtidas diferenças na contagem diferencial relativa das células via automação e microscopia. Baseando-se nesses dados, pôde-se concluir:

Com relação às células bastões ($p < 0,001$) foram obtidas diferenças na contagem para os dois métodos. De acordo com o teste de Wilcoxon, foi obtida contagem superior significativa na microscopia do que na automação.

Nas células neutrófilos ($p = 0,236$), segmentados ($p = 0,354$), eosinófilos ($p = 0,312$), linfócitos ($p = 0,229$) e monócitos ($p = 0,153$) não foram obtidas diferenças na contagem entre os dois métodos.

Nas células basófilos ($p < 0,001$) foram obtidas diferenças na contagem para os dois métodos. Neste caso, de acordo com o teste aplicado, foi obtida contagem superior significativa na automação do que na microscopia.

Com relação às células jovens (blastos, promielócitos, mielócitos e metamielócitos) não houve quantidade satisfatória de dados para serem analisados, pois houve grande quantidade de diferenças nulas nas contagens. Logo, a análise estatística não se mostrou eficaz.

No que diz respeito à contagem diferencial absoluta (células/mm³), após a aplicação dos testes, os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Nível descritivo do teste de comparação do número de células/mm³ do hemograma

Célula	Wilcoxon
Neutrófilos mm ³ Micr* - Neutrófilos mm ³ Auto**	0,3
Blastos mm ³ Micr - Blastos mm ³ Auto	-
Promielócitos mm ³ Micr - Promielócitos mm ³ Auto	-
Mielócitos mm ³ Micr - Mielócitos mm ³ Auto	-
Metamielócitos mm ³ Micr - Metamielócitos mm ³ Auto	-
Bastões mm³ Micr - Bastões mm³ Auto	0,001
Segmentados mm ³ Micr - Segmentados mm ³ Auto	0,652
Eosinófilos mm ³ Micr - Eosinófilos mm ³ Auto	0,329
Basófilos mm³ Micr - Basófilos mm³ Auto	0,008
Linfócitos mm ³ Micr - Linfócitos mm ³ Auto	0,429
Monócitos mm³ Micr - Monócitos mm³ Auto	0,024

Fonte: Laboratório de Hematologia, 2013.

*Micr = Microscopia **Auto = Automação

Da mesma forma que demonstrada na Tabela 3, os resultados em destaque representam os casos onde foram encontradas diferenças significativas na contagem diferencial absoluta das células via microscopia e automação. De acordo com os dados exibidos, pôde-se concluir:

Com relação às células bastões ($p = 0,001$) e monócitos ($p = 0,024$) foram obtidas diferenças na contagem nos dois métodos, sendo exibida contagem superior significativa na microscopia do que via automação para ambas as células.

Em relação aos neutrófilos ($p = 0,236$), segmentados ($p = 0,354$), eosinófilos ($p=0,329$) e linfócitos ($p = 0,229$) não obtivemos diferenças na contagem entre os dois métodos.

No que diz respeito aos basófilos ($p = 0,008$) obtivemos diferenças na contagem para os dois métodos sendo a contagem superior significativa via automação do que pela microscopia.

Com relação às células jovens (blastos, promielócitos, mielócitos e metamielócitos) não houve quantidade satisfatória de dados para serem analisados, pois houve grande quantidade de diferenças nulas nas contagens. Dessa forma a análise estatística não se mostrou eficaz.

De acordo com os resultados anteriormente citados, verificou-se uma maior predominância de bastões (contagem relativa e absoluta) via microscopia que automação. Segundo Silva e Hashimoto, (2003), o bastonete é, sem dúvida, a célula que mais causa controvérsias na contagem diferencial, muitas vezes devido a critérios pessoais de classificação. Em um trabalho realizado por Grimaldi e Scopasa (2000) o equipamento utilizado (CellDyn 4000 Abbott™) não emitiu sinal de alarmes (*flags*) para células imaturas, porém seis bastões foram encontrados na revisão de lâmina. Estes autores observaram que o equipamento somente emite *flags* de bastões quando o percentual de contagem destas células está acima de 12,5%, com margem de erro de 50%. Como a contagem acima de 5% destas células possui relevância clínica (OLIVEIRA, 2007), faz-se necessário a modificação do limiar percentual destas células para a geração deste *flag* pelo equipamento através da solicitação de assistência técnica e científica para que casos isolados como esse não ocorram.

Com relação à contagem diferencial tanto relativa quanto absoluta dos neutrófilos,segmentados, eosinófilos e linfócitos, verificamos que há concordância estatística entre as duas técnicas analisadas.

Pesquisa realizada por Monteiro (2005), na qual foram comparados os resultados dos hemogramas do analisador automático ABX Pentra™ com a microscopia óptica, utilizando-se 1000 amostras sanguíneas de adultos, foram encontrados excelentes valores de concordância para a contagem de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos, resultados esses condizentes com os obtidos no nosso trabalho.

Suljevic *et al.* (2003), em um trabalho avaliando o analisador hematológico Cell Dyn 3700 SL Abbott™, concluíram que o programa de contagem diferencial de leucócitos do aparelho pode ser usado para a pesquisa e separação da contagem de amostras normais e patológicas com adição do método por microscopia para a confirmação da distribuição ou de alterações da morfologia leucocitária.

Em relação à contagem absoluta dos monócitos, foram observadas diferenças entre as duas técnicas avaliadas. Costa *et al.* (1996), em um estudo comparativo da fórmula leucocitária do contador automático Cell Dyn 3500 com a técnica manual (via microscopia óptica), utilizando 506 amostras de pacientes hospitalizados, obtiveram excelente correlação para os neutrófilos e linfócitos e muito boa correlação para os monócitos e eosinófilos. Isto evidencia que pode haver, de fato, uma pequena diferença entre ambas as técnicas em relação à contagem dos monócitos.

Grotto *et al.* (1998), em um trabalho que avaliou quatro sistemas de automação comparativamente à microscopia óptica em relação à contagem diferencial dos leucócitos, verificou que somente o aparelho Cell Dyn 3000 Abbott™ revelou uma certa limitação na identificação dos monócitos, o que, no entanto, não representou um prejuízo significativo do ponto de vista clínico.

A contagem de basófilos obtida pelo nosso trabalho mostrou-se superior via automação do que pela microscopia. Veloso, Alencar e Cardozo (2011) em um estudo comparando a metodologia manual e a automática realizada através dos equipamentos Cell Dyn Ruby e Cell Dyn Sapphire Abbott™, realizado com 118 amostras de sangue venoso de pacientes ambulatoriais, concluíram que a contagem de basófilos não mostrou concordância entre os dois métodos utilizados.

Os dados obtidos por Grimaldi e Scopasa (2000) corroboram com os resultados por nós encontrados visto que classificaram como não satisfatório a comparação entre os valores encontrados pelas duas técnicas em relação à contagem de basófilos. Costa *et al.* (1996) atribuem a fraca correlação para os basófilos, à baixa percentagem destas células no esfregaço de sangue e ainda à contagem de maior número de células pelo analisador automático visto que o equipamento tem muito mais chance de analisar um basófilo em 10.000 células contadas contra 100 vistas pela microscopia.

Buttarelli e Plebani (2008), analisam a tecnologia em relação aos novos e aos tradicionais parâmetros de contadores hematológicos automáticos, entre eles o

Cell Dyn Sapphire Abbott™. Estes autores observaram que a performance foi satisfatória para a maioria dos parâmetros, tais como: contagem global de leucócitos e hemácias, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio e contagem diferencial dos neutrófilos e linfócitos. Os resultados foram aceitáveis para outros parâmetros, como a contagem de reticulócitos e eosinófilos, mas foram distantes do ideal para a contagem de basófilos e monócitos.

4.2 Análise da morfologia das hemácias e leucócitos

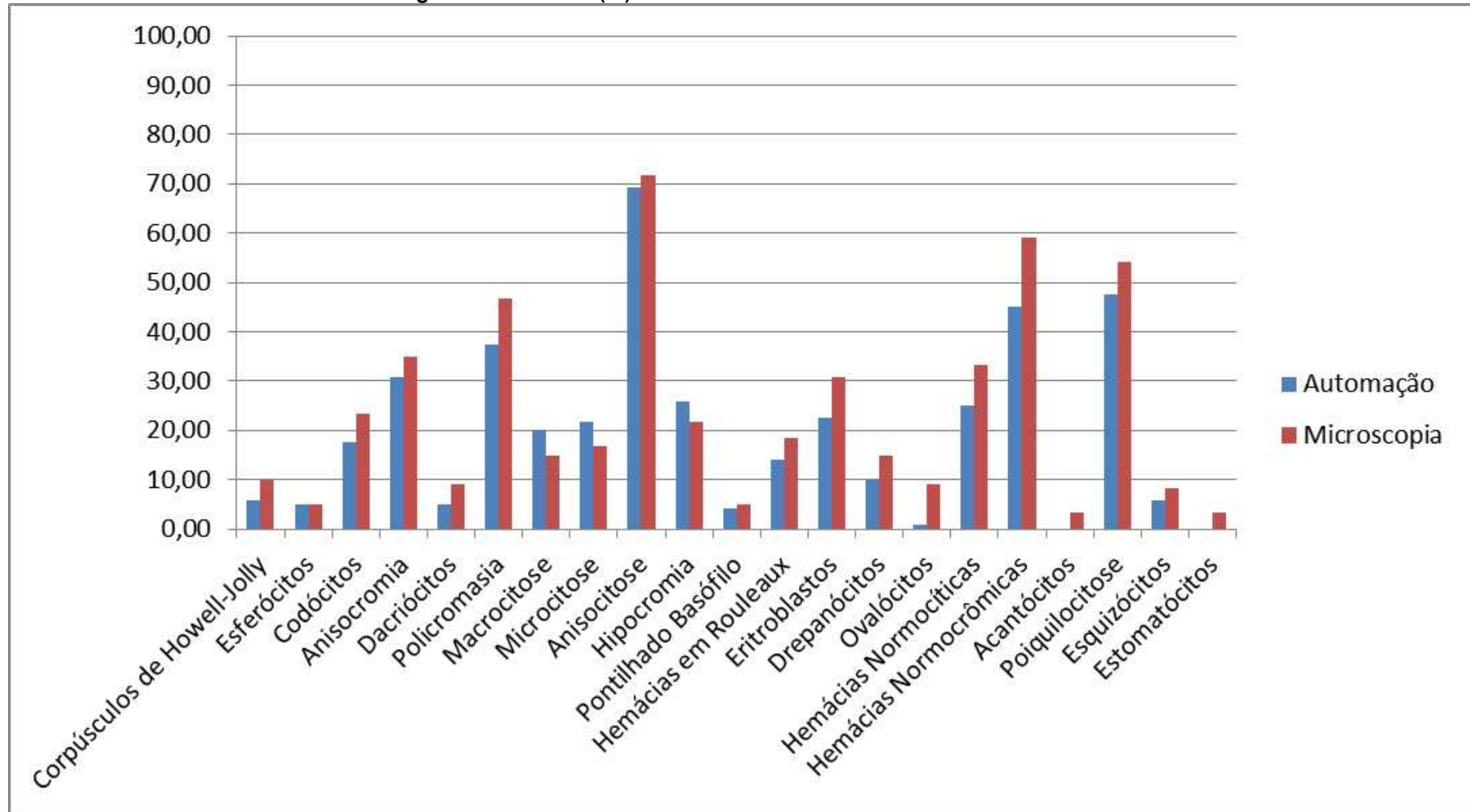
As tabelas abaixo (Tabelas 5 e 6) mostram a descrição dos resultados encontrados em relação à morfologia das hemácias e dos leucócitos, considerando-se as 120 amostras analisadas por meio da microscopia e da automação. Em seguida é mostrado o gráfico (em porcentagem) comparativo das duas metodologias em relação à morfologia eritrocitária e leucocitária (Gráficos 1 e 2).

Tabela 5 - Análise descritiva da morfologia das hemácias

	Automação		Microscopia	
	Nº de laudos	%	Nº de laudos	%
Corpúsculos de Howell-Jolly	7	5,83	12	10
Esferócitos	6	5	6	5
Codócitos	21	17,5	28	23,33
Anisocromia	37	30,83	42	35
Dacriócitos	6	5	11	9,17
Policromasia	45	37,5	56	46,67
Macrocitose	24	20	18	15
Microcitose	26	21,67	20	16,67
Anisocitose	83	69,17	86	71,67
Hipocromia	31	25,83	26	21,67
Pontilhado Basófilo	5	4,17	6	5
Hemácias em Rouleaux	17	14,17	22	18,33
Eritroblastos	27	22,5	37	30,83
Drepanócitos	12	10	18	15
Ovalócitos	1	0,83	11	9,17
Hemácias Normocíticas	30	25	40	33,33
Hemácias Normocrômicas	54	45	71	59,17
Acantócitos	0	0	4	3,33
Poiquilocitose	57	47,5	65	54,17
Esquizócitos	7	5,83	10	8,33
Estomatócitos	0	0	4	3,33

Fonte: Laboratório de Hematologia, 2013.

Gráfico 1 - Análise descritiva da morfologia das hemácias (%)

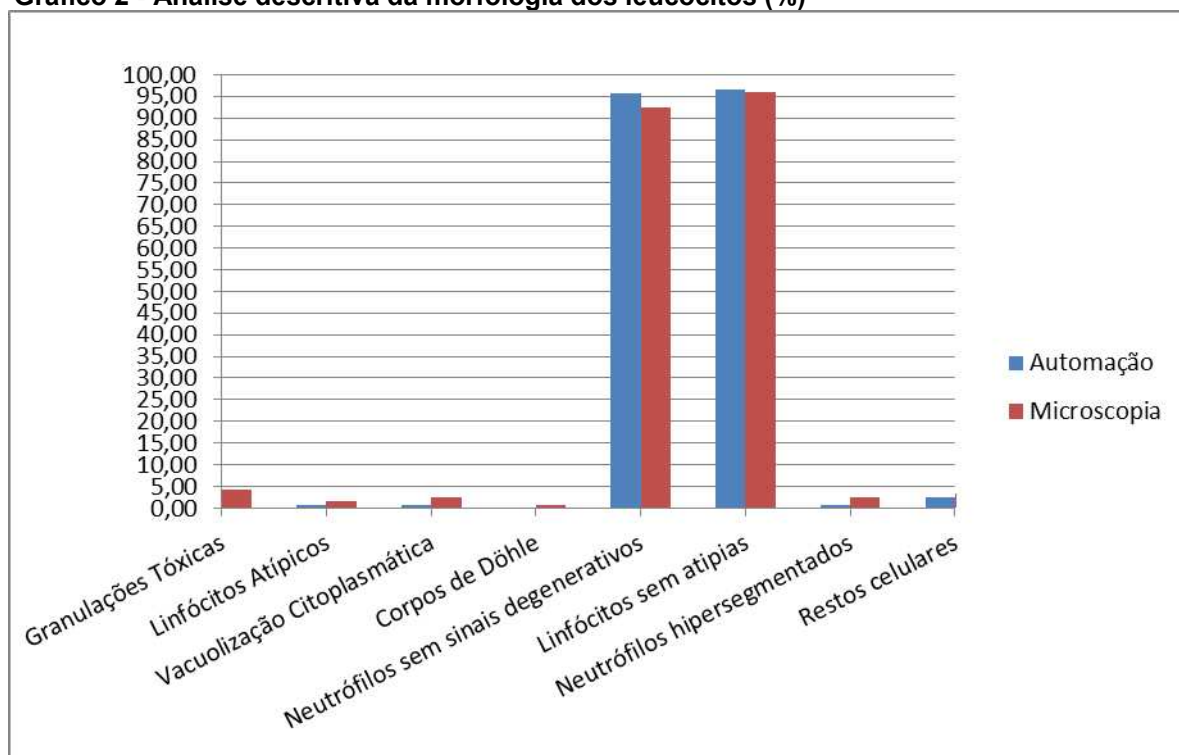


Fonte: Laboratório de Hematologia, 2013.

Tabela 6 - Análise descritiva da morfologia dos leucócitos

	Automação		Microscopia	
	Nº de laudos	%	Nº de laudos	%
Granulações Tóxicas	4	3,33	5	4,17
Linfócitos Atípicos	1	0,83	2	1,67
Vacuolização Citoplasmática	1	0,83	3	2,5
Corpos de Döhle	0	0	1	0,83
Neutrófilos sem sinais degenerativos	115	95,83	111	92,5
Linfócitos sem atipias	116	96,67	115	95,83
Neutrófilos hipersegmentados	1	0,83	3	2,5
Restos celulares	3	2,5	4	3,33

Fonte: Laboratório de Hematologia, 2013.

Gráfico 2 - Análise descritiva da morfologia dos leucócitos (%)

Fonte: Laboratório de Hematologia, 2013.

Com relação à análise morfológica dos eritrócitos e leucócitos (Tabelas 5 e 6), observamos que as alterações foram discretamente mais frequentes através do uso da microscopia do que através do uso do aparelho Cell Dyn 3700 Abbott™. As mesmas alterações morfológicas foram observadas por Failace (2007).

Failace (2007) descreve que a presença de poiquilocitose, inclusões eritrocitárias (ponteados basófilos, corpos de Howell-Jolly), rouleaux, granulações tóxicas, corpos de Döhle na distensão sanguínea costumam passar despercebidas pela tecnologia. Muitas dessas alterações morfológicas e inclusões eritrocitárias são imperceptíveis ao equipamento, no entanto deve-se avaliar a real importância clínica associando sempre que possível às alterações quantitativas, pois anomalias como eliptocitose e presença de esquizócitos são curiosas, mas se isoladas apresentam pouca importância.

Veloso, Alencar e Cardozo (2011), através da análise de 118 hemogramas realizados pela automação, selecionaram 21 deles para a revisão de lâminas. Desses 21 hemogramas avaliados pela microscopia óptica, em 18 foram encontradas alterações morfológicas com relevância clínica.

Hyun, Gulati e Ashton (1991) em seu artigo de revisão no qual argumentam os prós e contras das metodologias automatizada e manual na contagem diferencial dos leucócitos, afirmam que, hoje em dia, apesar da contagem diferencial de leucócitos pela automação ser superior à manual em vários aspectos, ela é falha no fornecimento de algumas informações que o método por análise da distensão sanguínea proporciona. Eles atestam que a informação em relação à morfologia dos glóbulos vermelhos fornecida pelos analisadores automatizados é inadequada em termos de identificação de anormalidades específicas, de importância diagnóstica como, por exemplo, o achado de drepanócitos, codócitos, dacriócitos, esquizócitos, corpúsculos de Howell-Jolly e de Pappenheimer.

No presente trabalho, encontramos número de eritroblastos maior através da avaliação microscópica do que através da automatização.

Grotto *et al.* (1998), obtiveram sensibilidade insuficiente para identificar amostras com eritroblastos. Dentre os aparelhos avaliados, o Cell Dyn 3000 Abbott™ obteve o pior nível de concordância.

Segundo o National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992 (NCCLS H20-A), quando se avalia a sensibilidade clínica dos equipamentos, um valor acima de 2% de eritroblastos na contagem diferencial de leucócitos deve ser

considerada como indicativo de anormalidade, devendo ser detectada pelo aparelho que emitirá um alarme sugestivo da presença de eritrócitos nucleados (KOEPEKE, 1992).

Sachse, Jahns-Streubel e Henkel (1999), em um trabalho que avaliaram a precisão e a acurácia do analisador hematológico Cell Dyn 3200 Abbott™, obtiveram 24,7% de resultados falso negativos em relação à análise morfológica dos leucócitos, resultado esse considerado um pouco acima da média da avaliação de outros instrumentos.

Oliveira (2007), no que se refere à contagem diferencial automatizada de leucócitos de amostras que apresentam alterações, assegura que o instrumento automatizado é incapaz de estabelecer alguns parâmetros indispensáveis para interpretação, tais como: a ineficácia do escalonamento dos neutrófilos; a não avaliação de alterações displásicas na série leucocitária, como, por exemplo, a presença de neutrófilos de aspecto pelgeróide (pseudo-Pelger) ou Pelger verdadeiro, hipogranulação ou hipersegmentação neutrófila, dentre outros.

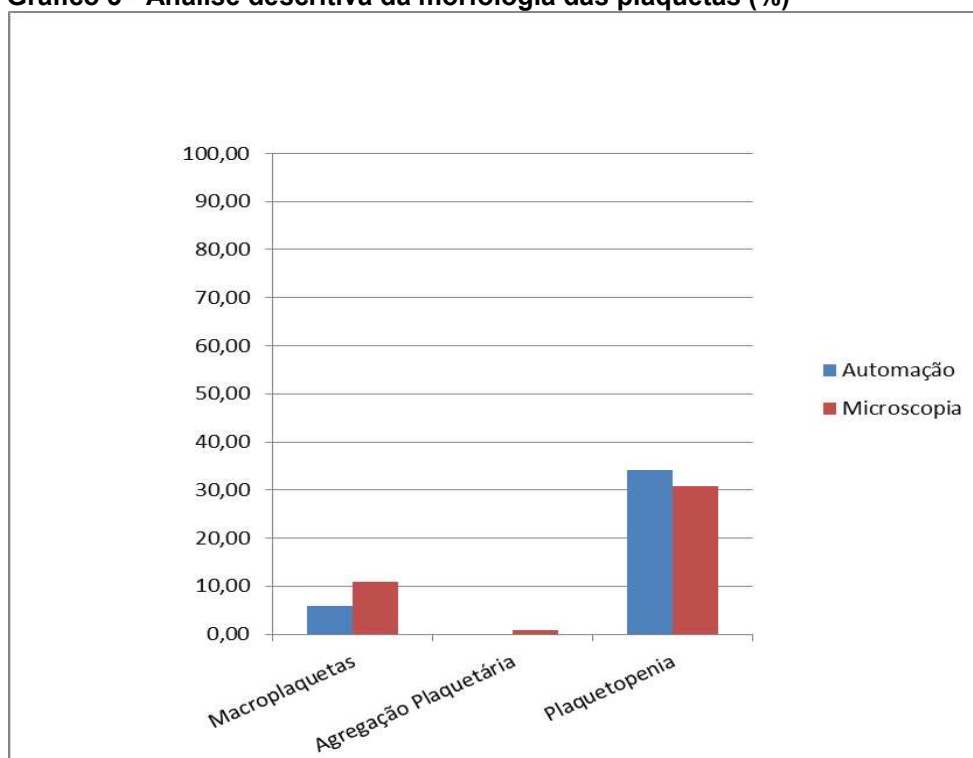
4.3 Análise da morfologia das plaquetas

Os resultados obtidos em relação à morfologia das plaquetas estão dispostos na Tabela 7, da mesma forma como foram exibidos os da morfologia das eritrocitária e leucocitária, seguidos de seu respectivo gráfico (Gráfico 3) que representa a análise descritiva das plaquetas em porcentagem.

Tabela 7 - Análise descritiva da morfologia das plaquetas

	Automação		Microscopia	
	Nº de laudos	%	Nº de laudos	%
Macroplaquetas	7	5,83	13	10,83
Agregação Plaquetária	0	0	1	0,83
Plaquetopenia	41	34,17	37	30,83

Fonte: Laboratório de Hematologia, 2013.

Gráfico 3 - Análise descritiva da morfologia das plaquetas (%)

Fonte: Laboratório de Hematologia, 2013.

Das 120 amostras de sangue analisadas, o equipamento detectou plaquetopenia em 41 amostras, enquanto que através da observação da distensão sanguínea foi observada esta alteração em 37 lâminas. Cohen (2000) citou em seu trabalho que dos 60 casos de trombocitopenia detectados pelo analisador automático, 17% eram falsos.

A presença de agregação plaquetária e macroplaquetas foi mais freqüente no esfregaço sanguíneo. Estes resultados estão de acordo com Oliveira (2007). Este autor afirma que a maioria das plaquetopenias obtidas em contadores automatizados merecem análise do esfregaço de sangue para comparação de resultados, pois a observação de macroplaquetas e de possíveis agregados de plaquetas interferem diretamente na contagem das mesmas.

Failace e Pranke (2004) através de uma pesquisa correlacionando os contadores automáticos Cell Dyn 4000 Abbott™ e Sysmex SE 9500™ com a microscopia obtiveram um alarme do tipo *Plt Clumps* (plaquetas agregadas) que mostrou ser relevante, reforçando a necessidade de ser confirmado através da microscopia, invalidando a contagem de plaquetas fornecida pela automação.

Handin (2005) afirma que uma falsa contagem baixa de plaquetas (pseudotrombocitopenia) pode ser notada em amostras de sangue colhidas em

EDTA. Essa diminuição de contagem é consequente à aglutinação das plaquetas ou, mais raramente, à formação de rosetas de plaquetas em torno dos neutrófilos, um fenômeno referido com satelitismo plaquetário (esta última alteração não foi observada no nosso estudo).

De acordo com Schrezenmeier *et al.* (1995), a aglutinação das plaquetas pode resultar na formação de grumos de tamanho similar aos dos leucócitos, e o contador automático é incapaz de distinguir tais grumos, reconhecendo-os como leucócitos e fornecendo contagem falsamente elevada ou pseudoleucocitose . Este fato não foi visto no presente trabalho.

Conforme Dusse *et al.* (2004), a avaliação cuidadosa da extensão sanguínea é imprescindível para a caracterização de casos de pseudotrombocitopenia, pois nele será evidente a presença de grumos de plaquetas que, em geral são mais frequentes na porção final da cauda do esfregaço sanguíneo.

Os resultados obtidos por este trabalho em relação ao percentual de macroplaquetas encontrado são concordantes com os mesmos achados por Monteiro (2005), que também obteve contagem superior via microscopia óptica que através do contador automatizado.

Santos, Bandeira e Siqueira (2009) relataram em seu trabalho que mesmo que a contagem eletrônica seja mais precisa por avaliar um maior número de células, esta pode induzir a um elevado número de falso-positivos que devem ser confirmados pela microscopia, para garantia de um resultado reproduzível. Também afirmam que os resultados obtidos em seu estudo permitem concluir que a automação é indispensável no laboratório de análises clínicas, fornecendo resultados sensíveis, reproduzíveis e precisos para alterações quantitativas e que, no entanto, as técnicas manuais, particularmente de concentrado de leucócitos, mostram-se insubstituíveis para alterações qualitativas e continuam úteis na rotina laboratorial, pelo fato de que algumas alterações hematológicas só podem ser diferenciadas pela microscopia.

Sachse, Jahns-Streubel e Henkel (1999), estabelecem que os instrumentos automáticos para a contagem diferencial de leucócitos não podem ser trocados pela microscopia porque nenhum analisador automático está apto a identificar a grande variedade de anormalidades morfológicas possivelmente encontradas nas distensões sanguíneas. Entretanto, os métodos automático e por microscopia podem ser combinados como uma estratégia diagnóstica.

5 CONCLUSÃO

Com relação à contagem diferencial dos leucócitos (neutrófilos, segmentados, eosinófilos e linfócitos) não foi vista diferença estatística significativa entre os laudos fornecidos pelas duas metodologias.

Em relação à contagem diferencial relativa e absoluta dos bastões e basófilos, foi visto diferença estatística significativa entre os laudos das duas metodologias utilizadas. A contagem dos bastões foi superior através do uso da microscopia, enquanto que a contagem de basófilos foi maior utilizando o aparelho Cell Dyn 3700 Abbott™.

Houve discordância em relação ao laudo fornecido pelo equipamento e o visto através da microscopia no tocante à morfologia das hemácias, dos leucócitos e das plaquetas, sendo a frequência de alterações observadas maior através da metodologia pela microscopia óptica.

Concluimos que todas as lâminas devem ser analisadas pela microscopia óptica independente do resultado fornecido pelo equipamento hematológico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados por este trabalho corroboram com o conceito que cada laboratório deve estabelecer os seus critérios para a revisão microscópica do sangue, pois esses critérios não devem se limitar apenas à presença de alarmes fornecidos pelos aparelhos. Amostras com leucocitose, leucopenia, anemia, plaquetose ou plaquetopenia, obrigatoriamente devem ser revistas, independentemente da presença ou não das observações referentes aos alarmes qualitativos ou quantitativos.

Esses resultados sugerem que, apesar da agilidade dos métodos automatizados, a análise por microscopia óptica ainda é indispensável a fim de minimizar as limitações na contagem diferencial e na avaliação morfológica das células sanguíneas realizadas em aparelhos automatizados e assim garantir a qualidade dos resultados.

REFERÊNCIAS

ABBOTT LABORATORIOS. **Manual do usuário do equipamento Cell Dyn® 3700 e acessórios**. São Paulo, 2000.

BACAL, N. S. Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, n. 4, p. 218-220, jul./ago. 2009.

BAIN, B. J. **Células sanguíneas: um guia prático**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

BARNES, P. W. *et al.* The International Consensus Group for Hematology Review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. **Lab. Hematol.**, v. 11, p. 83-90, 2005.

BEUTLER, E.; WAALLEN, J. The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration? **Blood**, v.107, p. 1747-1750, 2006.

BOLLER, F. History of dementia. **Handb. Clin. Neurol.**, v. 89, p. 3-13, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0072975207012018>>. Acesso em: 27 abr. 2013.

BUTARELLO, M.; PLEBANI, M. Automated blood cell counts: state of the art. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 130, p.104-116, 2008.

CARVALHO, W. F. **Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia**. 8. ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2008.

CLARO, A. *et al.* Avaliação do H-3 RTX e sua comparação com o STKS e o CellDyn. **NewsLab**, v. 21, p. 60-67, 1997.

COHEN, A. M. The incidence of pseudothrombocytopenia in automatic blood analyzers. **Haematologia**, v. 30, n. 2, p. 117–121, 2000.

COSTA, M. J. A. *et al.* Avaliação do CellDyn 3500. **Acta Med. Port.**, v. 9, p. 309-318, 1996.

DUSSE, L. M. S. *et al.* Pseudotrombocitopenia. **J. Bras. Pat. Med. Lab.**, v. 40, n. 5, p. 321-324, 2004.

ENGLAND, J. M. Automated blood cell counters. **Rec. Adv. Haem.**, v. 7, p. 39-45, 1996.

FAILACE, R.; PRANKE, P. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de hemogramas através de contadores eletrônicos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 26, n. 3, p. 159-166, 2004.

FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

FREITAS de L., M.; FERNÁNDEZ, L. E. Evaluación del diferencial leucocitario realizado por el Coulter STKS y el Coulter MAXM. **Rev. Fac. Med.**, v. 25, n.2, p. 189-201, 2002.

GOMES, I. B. S. **Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de voluntários sadios da unidade de farmacologia clínica da UFC**. 2005. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

GRIMALDI, E.; SCOPACASA, F. Evaluation of the Abbott CELL-DYN 4000 Hematology Analyzer. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 113, p. 497-505, 2000.

GROTTO, H. Z. W. *et al.* Automação em hematologia: avaliação de quatro sistemas. **NewsLab**, Campinas, v. 28, 1998.

HANDIN, R. I. Inherited platelets disorders. **Hematology**, n. 1, p. 396-402, Jan. 2005.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20. ed. São Paulo: Manole, 2008.

HIREMATH, P. S.; BANNIGIDAD, P.; GEETA, S. Automated identification and classification of white blood cells (leukocytes) in digital microscopic. **IJCA**, n. 2, Spec. Issue, p. 59-63, 2010.

HOKAMA, N. K.; MACHADO, P. E. A. Interpretação clínica do hemograma nas infecções. **JBM**, v. 72, n. 3, mar. 1997.

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

JANNINI, P.; JANNINI FILHO, P. **Interpretação clínica do hemograma**. 10. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

KOEPKE, J. A. *et al.* **Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods**. Villanova, PA: NCCLS, 1992.

LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. **Hematologia prática de Dacie e Lewis**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

MONTEIRO, F. G. **Comparação dos resultados de hemogramas do contador eletrônico ABX Pentra 60® com a microscopia**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

NASCIMENTO, M. L. P. Infância e os valores de ferritina nas trombopenias e trombocitoses através das avaliações do plaquetograma, eritrograma e reticulocitograma. **NewsLab**, v. 19, n. 113, p. 202-218, ago./set. 2012.

NOGUEIRA NETO, J. F.; OLIVEIRA JUNIOR, R. B. **Novas tecnologias em patologia clínica**. Rio de Janeiro: Telessaude UERJ, 2012. Disponível em: <<http://www.telessaude.uerj.br/resource/goldbook/pdf/49.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2013.

OLIVEIRA, R. A. G. **Hemograma: como fazer e interpretar**. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2007.

OLIVEIRA, M. M. S. **Avaliação da exatidão do equipamento Cell Dyn 3700 utilizando amostras de pacientes normais da população de Fortaleza**. 2008. Monografia (Especialização em Hematologia Clínica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

PRINSLOO, T. **The evaluation of a new haematological cell counter, the Cell Dyn 3500, on canine leukocyte differential counts**. 2001. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de Pretória, Pretória, 2001.

SACHSE, C.; JAHNS-STREUBEL, G.; HENKEL, E. Evaluation of leukocyte differential count information from the CELL-DYN 3200 hematology analyzer. **Labor. Hematol.**, v. 5, n.1, p.1-12, 1999.

SANTOS, A. P.; BANDEIRA, M. B.; SIQUEIRA, L.O. Comparação entre diversos métodos de contagem diferencial de leucócitos em pacientes leucopênicos **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, n.3, p. 203-205, 2009.

SCHREZENMEIER, H. *et al.* Anticogulant induced pseudothrombopenia and pseudoleukocytosis. **Thromb. Haemost.**, v. 73, p. 506-513, 1995.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y. **Interpretação laboratorial do leucograma**. São Paulo: Robe, 2003.

SILVA, C.M.F. **Contagem de neutrófilos em doentes leucopênicos: comparação do autoanalisador hematológico XE-2100 com o sistema de análise de imagem CELLAVISION DM96**. 2011. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Católica Portuguesa, Porto, 2011.

SULJEVIĆ, E. *et al.* Evaluation of haematology analyzer CELL-DYN 3700 SL. **Bosn. J. Basic. Med. Sci.**, v. 3, n. 2, p. 35-41, May 2003.

TOMOEDA, L. Y. *et al.* Influência da alimentação sobre o hemograma. **RBAC**, v. 43, n. 2, p. 121-124, 2011.

VELOSO, W. A.; ALENCAR, S. M. F.; CARDOZO, S.V. Avaliação dos critérios adotados no interfaceamento dos resultados dos hemogramas automatizados. **Saúde & Amb. Rev.**, v. 6, n. 1, p. 4-10, jan./jun. 2011.

VIEIRA, L. M.; ANDRIOLO, A. Antony van Leeuwenhoek: inventor do microscópio. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 45, n. 2, abr. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v45n2/v45n2a01.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2013.

ZACCARIA, A. *et al.* Comparative evaluation of differential leukocyte counts by Coulter VCS cytometer and direct microscopic observation. **Haematologica**, v. 75, p.412-419, 1990.