

Artigo / Article

Validação de tecnologia 5diff do analisador hematológico Sysmex XS-1000i para laboratório de pequeno/médio porte

Validation of 5diff technologies of the Sysmex XS-1000i hematology analyzer for small and medium laboratories

Luiz F. Borges¹

Luciano O. Siqueira²

O Sysmex XS-1000i® é um novo e compacto analisador hematológico com tecnologia 5diff e citometria de fluxo fluorescente, tecnologias até então presentes em equipamentos de grande porte e disponíveis apenas para equivalentes rotinas laboratoriais. Neste estudo avaliamos seu desempenho com equipamento de análise de impedância (Coulter T-890®) e à contagem diferencial de 200 leucócitos em microscópio. Foram analisadas 100 amostras paralelamente nos dois equipamentos e submetidas à contagem diferencial de 200 células em distensão sanguínea. Os resultados foram analisados mediante análise de correlação de Spearman para dados não paramétricos, mostrando correlação superior a 95% para os parâmetros WBC, RBC, hemoglobina, hematócrito e neutrófilos; correlação entre 90% e 94,9% para VCM, HCM, linfócitos e eosinófilos; correlação inferior a 89,9% para CHCM, monócitos e basófilos. Os resultados obtidos sugerem que a tecnologia embarcada neste equipamento é uma versátil ferramenta para o analista na rotina de pequeno e médio porte. No entanto, em caso de emissão de "flags" não dispensa totalmente a confirmação ao microscópio para garantia da qualidade final do exame. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31(4):247-251.

Palavras-chave: Sysmex XS-1000i®; automação; hemograma.

Introdução

O hemograma é o exame complementar mais requerido nas consultas médicas, o que denota sua preferência universal como coadjuvante indispensável no diagnóstico das doenças infecciosas, das doenças crônicas em geral, das emergências médicas, cirúrgicas e traumatológicas e no acompanhamento de quimio e radioterapia.¹⁻³

Atualmente, a rapidez e a qualidade tornaram-se itens importantíssimos na liberação de laudos de exames laboratoriais. A realização do hemograma automatizado com contagem diferencial de leucócitos aumentou a capacidade

de produção do laboratório, permitindo maior agilidade na entrega de resultados ao paciente.³⁻⁷ Vale ressaltar também que os equipamentos atuais utilizam metodologias combinadas para diferenciação e quantificação celular, trabalhando com menor volume de amostra, analisando uma maior quantidade de parâmetros em menor tempo. Nos últimos anos houve um grande desenvolvimento no diagnóstico laboratorial de doenças hematológicas, iniciando-se assim estudos sobre as diferentes metodologias empregadas para realização do hemograma.⁵⁻⁹

Os atuais analisadores de células sanguíneas totalmente automatizadas aspiram e diluem uma amostra de sangue e

¹Farmacêutico Bioquímico do Laboratório Prontoclínica – Passo Fundo-RS.

²Professor de Bioquímica Clínica – Universidade de Passo Fundo – Passo Fundo-RS.

Universidade de Passo Fundo, Instituto de Ciências Biológicas, Curso de Farmácia – Programa de Especialização em Hematologia e Hemoterapia

Correspondência: Luciano de Oliveira Siqueira

Curso de Farmácia (ICB)

BR 285 KM 171 Campus I – Bairro São José

Cx. Postal 611

99052-900 – Passo Fundo-RS – Brasil

E-mail: lsiqueirabr@yahoo.com.br

Doi: 10.1590/S1516-84842009005000059

determinam de 8 a 23 parâmetros relacionados com os eritrócitos, leucócitos e plaquetas.^{5-7,9-12}

A expiração de patentes tecnológicas promoveu um grande avanço na tecnologia de equipamentos hematológicos com diferentes propostas de contagem global e diferencial de células, garantindo uma maior facilidade de acesso a estes por parte de laboratórios de porte médio.⁹⁻¹³

A tecnologia de Análise de Impedância foi desenvolvida por Wallace Coulter e baseia-se na quantificação dos pulsos gerados pelas células ao passar por um orifício onde flui uma corrente contínua. Pelo fato das células sanguíneas não conduzirem bem a eletricidade, ao passar por esta pequena abertura ocorre um aumento mensurável da impedância elétrica. Deste modo são contadas e medidas as células, uma vez que o pulso é proporcional ao tamanho da célula analisada.^{3,5,9,12}

Desde a década de 80, a tecnologia empregada na realização do hemograma vem sofrendo profundas alterações, em particular: a contagem diferencial de leucócitos automatizada por equipamentos chamados de "4ª geração". O princípio de citometria de fluxo baseia-se no direcionamento dos elementos celulares por uma tubulação delgada, envoltos em um solvente até passar pelo ponto de análise ou *flow cell*, onde serão aplicadas as demais tecnologias para quantificação e diferenciação celular, como o laser, corrente contínua para impedância e corrente em radiofrequência para determinar a estrutura interna das células.^{2-5, 9-14}

A validação destes equipamentos nas rotinas laboratoriais apresenta algumas vantagens como: diminuição no tempo para emissão de laudos, contribuindo efetivamente, nos serviços de urgências e emergências médicas; liberação de resultados consistentes podendo contribuir com a diminuição da iatrogenia e diagnósticos duvidosos; importante ferramenta para a triagem de hemogramas normais e emissão de uma análise mais detalhada de hemogramas suspeitos e patológicos.^{3,4,7,8,13}

Fatores como rapidez, sensibilidade e especificidade podem contribuir com uma elucidação precoce e correta de estados patológicos, direcionando ao correto tratamento e evitando ou reduzindo a internação hospitalar. No entanto, todas as tecnologias empregadas nestes analisadores ainda geram grande desconfiança por parte dos profissionais da área, principalmente no que se refere à reprodutibilidade e confiabilidade frente ao método tradicional de contagem de células.^{3,4,7,8,13}

Na maioria das determinações mensuradas (diretas), a contagem de eritrócitos é realizada em equipamentos automáticos pelo princípio de impedância, no mesmo canal de contagem das plaquetas. A hemoglobina é dosada por espectrofotometria na câmara de contagem de leucócitos utilizando-se de agentes líticos com cianeto (Coulter T-890®), ou livres de cianeto, como o lauril-sulfato (Sysmex XS 1000i®). O Volume Corpuscular Médio (VCM) é determinado mediante contagem e medição dos eritrócitos por impedância

nos equipamentos Coulter® e por cálculo nos equipamentos Sysmex®.⁹⁻¹⁷

O equipamento de análise de impedância Coulter T-890® determina HCM (Hemoglobina Corpuscular Média – fornece a quantidade média de hemoglobina em cada eritrócito), o CHCM (Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média – que fornece a concentração média de hemoglobina por eritrócito) e o hematócrito (que corresponde à porcentagem de eritrócitos no volume total de sangue) através de cálculos partindo-se dos parâmetros mensurados diretamente como eritrometria e VCM. No entanto, no Sysmex XS 1000i®, o CHCM é obtido diretamente por impedância.⁹⁻¹⁷

A fórmula leucocitária emitida pela tecnologia 5diff no analisador Sysmex XS 1000i® divide-se basicamente em cinco partes (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos) e baseia-se no processo de citometria de fluxo fluorimétrica usando um semiconductor laser.⁴ Conforme Bain (2004), os neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos são analisados em canal diferencial através do conjunto de caracteres de cada grupo, após a interação com um corante fluorescente. São medidas: dispersão lateral da luz (indica a estrutura interna das células), dispersão frontal (indica o tamanho celular) e intensidade de fluorescência (indica o tamanho do núcleo). Ainda, em outro canal (leucócitos/basófilos), ocorre a lise de todas as células, menos dos basófilos, de modo que estes podem ser diferenciados dos demais leucócitos usando-se a dispersão da luz frontal e lateral.^{10,14,16}

Por sua vez, a contagem diferencial manual de células envolve a confecção de lâminas com distensão sanguínea que, depois de coradas, são analisadas sob microscopia para a sua diferenciação morfológica. Alguns itens, como a má distribuição das células durante a confecção da lâmina, podem induzir a erros de identificação ao realizar o diferencial, gerando resultados inexatos e pouco reprodutíveis. Contudo, estes aspectos não tornam o procedimento manual insatisfatório, apenas geram algumas discordâncias que podem ser resolvidas pela avaliação de profissionais experientes na realização do exame.¹⁻⁴

Apesar do grande avanço tecnológico da área da hematologia, na maioria das vezes a observação microscópica da distensão sanguínea é necessária, tendo em vista que alguns equipamentos ainda não diferenciam determinados tipos ou alterações celulares, como neutrófilos mais jovens ou "bastonetes"; anomalia de "Pelger-Huët"; inclusões citoplasmáticas e vacuolizações citoplasmáticas, dentre outras alterações onde estes limitam-se apenas a emitir alarmes ou *flags* sobre possíveis ocorrências.^{1,2,3,7,13,15}

Partindo destes princípios, o objetivo do presente estudo foi avaliar a confiabilidade de resultados de hemogramas automatizados (tecnologia 5 diff - Sysmex XS 1000i®) quando comparado com outras duas metodologias (análise de impedância – Coulter T890®) e contagem diferencial manual de 200 células.

Material e Método

Foram coletadas, assepticamente, 100 amostras de sangue da fossa antecubital de pacientes atendidos no Prontolab – Laboratório de Análises Clínicas em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, no período de 09 a 26 de junho de 2008. As coletas foram realizadas em tubo vácuo BD Vacutainer® de uso único, com anticoagulante EDTA/K2 e capacidade de 2 mL.

O Projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade de Passo Fundo, segundo o regulamento 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde.

Protocolo experimental

As amostras foram selecionadas aleatoriamente e processadas simultaneamente nos equipamentos Sysmex XS 1000i® e Coulter T-890®. Anteriormente à análise eletrônica de células, os equipamentos foram submetidos aos controles internos específicos e calibração original de cada fabricante. As distensões sanguíneas foram realizadas no momento da coleta (sem adição de anticoagulante) e coradas pelo princípio de Romanowsky (corante rápido panótico Newprov®). A contagem diferencial manual foi realizada por profissional experiente, mediante análise de 200 células por lâmina, em campo de 400 x de um microscópio Zeiss® modelo Primo Star.

Análise estatística

Os dados foram testados quanto à sua normalidade mediante análise de Kolmogorof-Smirnoff. A seguir, os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de correlação de Spearman para dados não paramétricos no pacote estatístico do SPSS 10.0, considerando $p < 0,05$ como nível mínimo de significância. Os resultados foram expressos em valores absolutos da correlação (r), onde "0" indica uma total ausência de correlação linear e "1" uma relação linear perfeita. Os resultados foram expressos por estatística descritiva.

Resultados

A análise dos resultados das 100 amostras processadas nos equipamentos Sysmex XS 1000i®, Coulter T-890® e submetidas à avaliação microscópica manual de contagem diferencial de leucócitos foram separados e comparados em quatro grupos conforme as tabelas 1, 2, 3 e 4.

Discussão

A avaliação estatística dos resultados dos analisadores, mostra um índice de correlação superior a 95% entre a contagem global de leucócitos, eritrócitos e hemoglobina. Fato já descrito na literatura para outros modelos Sysmex®.^{10,11,14} Ainda dentro desta faixa de avaliação podemos

Tabela 1. Resultados dos valores absolutos da correlação (r) da análise de correlação de Spearman para parâmetros hematológicos obtidos pelo princípio da citometria de fluxo tecnologia 5 diff (Sysmex XS 1000i®) e de análise de impedância (Coulter T-890®)

Parâmetro	Correlação
Leucometria	0,9896
Linfócitos (µL)	0,9294
Linfócitos (%)	0,9644
RBC	0,9883
Hematócrito	0,9647
Hemoglobina	0,9919
VCM	0,9251
HCM	0,9231
CHCM	0,3892

Tabela 2. Resultados dos valores absolutos da correlação (r) da análise de correlação de Spearman para parâmetros hematológicos obtidos pelo princípio da citometria de fluxo tecnologia 5 diff (Sysmex XS 1000i®) e de contagem manual ao microscópio de distensão sanguínea corada

Parâmetro	Correlação
Neutrófilos (µL)	0,9827
Neutrófilos (%)	0,953
Linfócitos (µL)	0,9216
Linfócitos (%)	0,9627
Monócitos (µL)	0,6328
Monócitos (%)	0,3029
Eosinófilos (µL)	0,8996
Eosinófilos (%)	0,9324
Basófilos (µL)	0,00001
Basófilos (%)	0,00001

Tabela 3. Resultados dos valores absolutos da correlação (r) da análise de correlação de Spearman para contagem diferencial de linfócitos obtidos pelo princípio da análise de impedância (Coulter T-890®) e de contagem manual ao microscópio de distensão sanguínea corada

Parâmetro	Correlação
Linfócitos (µL)	0,9348
Linfócitos (%)	0,9259

verificar também uma boa correlação nos diferenciais de neutrófilos (fórmula relativa e absoluta) e linfócitos (relativa) emitidos pelo analisador Sysmex XS 1000i® frente à contagem diferencial manual.

A correlação de 92,59% na contagem de linfócitos, quando na comparação do equipamento Coulter T-890® frente à contagem manual, provavelmente é reflexo da análise celular por impedância, onde o linfócito é identificado apenas

Tabela 4. Análise dos "flags" emitidos pelo equipamento Sysmex XS 1000i® e comprovados pela microscopia

Flags	Concordantes	Não concordantes	Total
Neutrófilos jovens	7 (17,07%)	34 (82,93%)	41
Linfócitos atípicos	0	10 (100%)	10
Linfócitos anormais/ Blastos	0	5 (100%)	5
Granulócitos imaturos	0	5 (100%)	1
Eritroblastos (NRBC)	0	1 (100%)	1
Total	7 (11,25)	55 (88,7)	62

pelo seu tamanho, enquanto no equipamento Sysmex XS 1000i® este parâmetro de volume é aditado de uma análise mais complexa de sua estrutura mediante citometria de fluxo fluorescente, resultando assim em dados mais precisos.^{5,9,10,11,14,16,17} Um dos parâmetros com maior diferença na comparação entre o diferencial automatizado e o manual foram os monócitos, onde se observou uma correlação de 63,28% para contagem absoluta e 30,29% para contagem percentual. Corroborando dados já descritos na literatura, os quais sugerem como causas principais a má distribuição destas células durante a preparação do filme sanguíneo e a dificuldade de diferenciação de pequenos monócitos de grandes linfócitos.^{2,4,7,13}

O presente estudo também evidenciou uma baixa correlação na análise de basófilos, como em outros trabalhos na literatura, com diferentes equipamentos que realizam diferencial de cinco partes (5diff). Este fato é atribuído à pequena quantidade destas células no sangue, o que dificulta muito sua observação e quantificação manual com base em apenas 200 células por lâmina. Em contrapartida, um analisador automatizado pode avaliar de dez mil a trinta mil células em um único processo, tornando este muito mais sensível uma vez que o encontro de células raras torna-se mais frequente.

Além disso, a análise da distensão sanguínea não só consome tempo, mas requer também intensa carga de trabalho de profissionais altamente treinados. A necessidade de um diagnóstico consistente requer a necessidade de um analista experiente durante tempo integral, uma vez que a classificação manual é subjetiva, com significativa variação inter e intralaboratorial, o que poderia justificar o alto coeficiente de variação nas contagens manuais.

O resultado obtido para análise de correlação de CHCM entre o Coulter T-890® e o Sysmex XS 1000i® foi de 38,92%. Como a metodologia empregada na dosagem de hemoglobina e de contagem eritrocitária é semelhante em ambos e diferenciando-se apenas no agente lítico, tal diferença provavelmente esteja vinculada ao hematócrito emitido por cada

equipamento, onde, no primeiro é obtido por cálculo e no segundo por medição através da metodologia de impedância.^{5,9,10,11,14,16,17}

Na avaliação de *flags* ou avisos emitidos pelo equipamento Sysmex XS 1000i® foram observados apenas aqueles predefinidos pelo fabricante quanto à morfologia celular. Foram ignorados os alarmes manipulados ou calibrados pelo operador, como valores de referência para macro ou microcitose (VCM), hipocromia (HCM e CHCM) e outros, como as contagens globais de leucócitos, eritrócitos e plaquetas. Para neutrófilos bastonetes foram considerados os valores de referência descritos na literatura de até 5%.¹ Constatou-se que aproximadamente 11,3% dos *flags* emitidos foram confirmados pela observação ao microscópio da distensão sanguínea, gerando assim um índice 88,7% de laudos com avisos falso-positivos, fato que pode ser considerado como um aliado do analista na avaliação deste para efetuar ou não a revisão de lâminas.¹⁸ Não foram observados *flags* falso-negativos no rol amostral, o que denota uma boa especificidade do equipamento utilizado, reduzindo assim as chances de erros na liberação direta de um laudo. Estudos prévios com um número de amostras maiores relatam a presença de resultados falso-negativos, ou seja, alterações não detectadas pelo aparelho, porém em índices muito baixos.

A sensibilidade das automações na detecção de anormalidades, bem como a frequência e a incidência das mesmas, apontam para a necessidade de se conhecerem os níveis de confiabilidade dos resultados, que podem variar conforme os modelos de equipamentos disponíveis no mercado, cabendo ao laboratório estabelecer critérios para a utilização da automação e liberação de resultados em seu estabelecimento.

Segundo Ferreira, Vieira e Bastos, a implantação de um programa de garantia da qualidade para hemogramas automatizados permite ao setor de hematologia manter o desempenho para a realização deste dentro dos parâmetros de aceitabilidade clínica recomendados.¹⁸

Conclusão

A análise dos resultados obtidos no presente estudo permite concluir que a nova metodologia do equipamento Sysmex XS 1000i® traz alguns benefícios quando comparada com a tradicional do Coulter T-890® e a contagem diferencial manual, pois é confiável e perfeitamente aplicável na rotina do laboratório de pequeno/médio porte como uma ferramenta ágil e segura para a realização do hemograma. No entanto, mesmo com esta superioridade tecnológica, a liberação direta somente é possível para hemogramas normais, ou seja, sem *flags*. Os resultados com *flags* de anormalidades não dispensam a visualização da distensão sanguínea por profissionais experientes e capacitados para a liberação destes.

Apesar desta limitação parcial, o contador Sysmex XS 1000i torna-se um importante aliado na liberação de laudos não patológicos com maior rapidez e precisão, fazendo com que o profissional envolvido no setor dispense maior tempo de sua atenção às amostras possivelmente patológicas.

Abstract

The Sysmex XS-1000i® is a new and compact blood analyzer with 5diff technology and fluorescent flow cytometry, technologies hitherto only present in large equipment and available only for laboratory equivalent routines. In this study its performance was compared with equipment for impedance analysis (Coulter T-890®) and the microscopic counting of 200 differential leukocytes. One hundred samples were evaluated in parallel by both apparatuses and subjected to differential counts of 200 cells. The results were analyzed using the Spearman correlation for parametric data showing no correlation greater than 95% for white blood cells, red blood cells, hemoglobin, hematocrit and neutrophils,; correlations between 90% and 94.9% for VCM, MCH, lymphocytes and eosinophils, and correlations lower than the 89.9% for MCHC, monocytes and basophils. The results suggest that this apparatus is a versatile tool for routine analyses in small and medium laboratories. However, in the case of flags, confirmation under a microscope is important to guarantee the quality of the final results. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009; 31(4):247-251.

Key words: Sysmex XS-1000i®; hematologic analyzer; hemogram.

Referências Bibliográficas

- Andrade SR, Kramer DG, *et al*. Estudo comparativo entre os procedimentos manual e automatizado na contagem diferencial dos leucócitos. Rev. Bras. Anal. Clin. 2001;33(1):35-37.
- Bain BJ. Células sanguíneas: um guia prático. 3ª ed., Artmed, 2004, Porto Alegre, p. 26-59
- Failace R. Hemograma: manual de interpretação. 4ª ed., Artmed, 2003, Porto Alegre, p.16.
- Failace R, Pranke P. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de hemogramas através de contadores eletrônicos. Rev. Bras Hematol Hemoter. 2004;26(3):159.
- Freitas ML, Fernandez LE. Evaluación del diferencial leucocitario realizado por el Coulter STKS® y el Coulter MAXM®. RFM. 2002;25(2):1-17.
- Grimaldi E, Scopacasa F. Evaluation of the Abbott CELL-DYN® 4000 hematology analyzer. Am J Clin Pathol. 2000;113(4):497-505.
- Grotto HZW, Gilberti MFP, Dezotti BHC, *et al*. Avaliação laboratorial do analisador hematológico Cobas Argos 5 Diff: parâmetros globais e contagem diferencial leucocitária. J Bras Patol Med Lab. 1995;31(3):88-95.
- Guerra-Shinohara EM, Santos HG. Estudo morfológico do hemograma: variação inter-observadores em um painel de casos. Rev. Bras. Anal. Clín. 1998;30(2):41-4.
- Lopez R, Marcarena, Barrientos Q, *et al*. Evaluacion del auto-analizador Coulter MAX-M®: recuento diferencial leucocitario y alarmas morfológicas en pacientes onco-hematológicos. Rev Chil Tecnol Med. 2004;24(2):1147-54.
- Nagai T, Tanaka C. Summary of the automated hematology analyser: XS-1000i/XS-800i. Sysmex J Int. 2006;16(suppl. 1):29-36.
- Peng L, Gao X, Jiang H, Peng Z, Su J. Laboratory evaluation of the Sysmex SE-9500 automated haematology analyser. Clin Lab Haematol. 2001;23(4):237-42.
- Picard F, Guesnu M, Levy JP, Flandrin G. Use of the new Coulter MAXM for leucocyte differentials. Nouv Rev Fr Hematol. 1992; 34(4):309-14.
- Spada C, Treitinger A, Ramos LFM, *et al*. Avaliação da contagem diferencial de células sanguíneas por metodologia automatizada e microscopia. Rev. Bras. Anal. Clin. 1998;30(4):191-3.
- Sysmex Corporation. Instructions for use: XS-1000i/XS-800i, capítulo 4, p. 2, Kobe, Japão, 2006.
- Briggs C, Longair I, Slavik M, Thwaite K, Mills R, Thavaraja V, *et al*. Can automated blood film analysis replace the manual differential? An evaluation of the CellaVision DM96 automated image analysis system. Int J Lab Hematol. 2009;31(1):48-60.
- Aller R, Hematology analyzers. Cap Today, 2008; 12: 22-38.
- Coulter B. Coulter® Ac•T™ 5diff AL (Autoloader). Hematology Analyzer. Bulletin 9309.
- Ferreira MFR, Vieira LMF, Bastos M. Garantia da qualidade do hemograma automatizado. Rev Bras Anal Clin. 2002;34(3):121-9.

Avaliação: Editor e dois revisores externos

Conflito de interesse: sem conflito de interesse

Recebido: 28/10/2008

Aceito após modificações: 22/01/2009