

MARIA LAIRTE C. ALVES DE LIMA

ESTUDO DE 6 PARÂMETROS DO HEMOGRAMA  
UMA COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS

Trabalho apresentado como requisito final ao CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FORTALEZA - CEARÁ

1992

Se tu perderes o sol  
Não chores  
pois as lágrimas  
te impediram  
de ver as estrelas.

Exupéry

A MINHA FAMÍLIA

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Murilo Martins pela ampliação dos meus conhecimentos.

A Dra. Vânia F. Gomes pela oportunidade da minha participação no Curso.

Ao Dr. Carlos Ribeiro pela orientação no trabalho.

Ao Dr. Carlos Alberto e Dra. Nazarê pela prontidão oferecida para a realização deste trabalho.

Aos funcionários Sérgio e Sílvio do Laboratório Clementino Fraga pela colaboração no trabalho.

Aos funcionários do HEMOCE, Célia, Telma, Geovany e Clarisse pela ajuda no decorrer do curso.

Aos colegas de Curso, Luciana, Ana George, Francineide Márcia, Marta e George pela força amiga no percorrer do curso e pela agradável convivência.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	6
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
3. RESULTADOS .....	14
4. DISCUSSÃO .....	23
5. CONCLUSÃO .....	26
6. SUMMARY .....	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28

ESTUDO DE 6 PARÂMETROS DO HEMOGRAMA, UMA COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS\*

MARIA LAIRTE C. ALVES DE LIMA\*\*

Foram realizados 62 hemogramas de pacientes procedentes da rotina do Laboratório Clementino Fraga e estudado 6 parâmetros, comparando os resultados obtidos pelo analisador automático Coulter STKS com aqueles obtidos pelos métodos manuais e semi-automático. As amostras não apresentavam sinais de anormalidade.

Considerando a contagem das células sanguíneas o método semi-automático foi o que mais se aproximou do automático, onde se obteve as maiores contagens de células. O método manual contou o menor número de células.

Os resultados do hematócrito obtido pelo método automático apresentou um valor de 3% abaixo dos valores obtidos pelo método de centrifugação (microhematócrito).

Não houve variação nas concentração de hemoglobina obtidas pelos três métodos.

A contagem diferencial dos leucócitos mostrou uma boa correlação frente ao método óptico convencional para neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. Para a contagem de monócitos houve uma pobre correlação e para os basófilos foi estatisticamente insignificante.

11,3% dos esfregaços sanguíneos examinados apresentavam bastonetes (1 a 4%), das amostras sem sinalização de alarme pelo Coulter STKS.

---

(\*) Trabalho apresentado ao Curso de Especialização de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCE.

(\*\*) Farmacêutica-Bioquímica - aluna do Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia.

## 1. INTRODUÇÃO

Houve na década passada, uma grande expansão no campo das técnicas hematológicas (7,24,49).

Distintos equipamentos eletrônicos tem-se desenvolvido para a contagem automática das células sanguíneas, capazes de proporcionar um número cada vez mais elevado de parâmetros hematimétricos, além da contagem diferencial dos leucócitos. (7, 24, 40).

Os métodos eletrônicos de contagem de células sanguíneas mais amplamente usados hoje em dia são os métodos fundamentados em um dos princípios seguintes: (7, 13, 14, 24, 33, 38, 40).

1. As células passando através de um orifício provoca alteração na resistência elétrica, que são contados como pulsos de voltagem. Este princípio é utilizado nos sistemas Coulter counter (Coulter Diagnostics, Hialeah, Fls.) e Celloscope (Lars Ljungberg e Co., Estocolmo, Suécia).

2. As células passando através de uma célula de fluxo provocam deflexões num feixe luminoso, que são convertidas em pulsos elétricos mediante um tubo fotomultiplicador. Este princípio é o utilizado nos sistemas Auto Analyzer (Technicon Lc, Ardsliy, N.Y.) e Fisher Autocytometer (Fisher Scientific Co, Pittsburg, Pa).

Na atualidade a maioria dos autoanalisadores determina a contagem diferencial dos leucócitos com base na análise combinada de Citometria e Citoquímica (Sistemas Technicon) ou a medida da impedância incorporando novos métodos (radiofrequência, p. ex.) que permitem estudar as células sem necessidade de destruir a membrana citoplasmática (Sistemas Coulter e Sysmex).

A chegada e a aceitação dos contadores eletrônicos desenvolveram muito a exatidão e a precisão dos resultados laboratoriais, assim como aperfeiçoou a eficiência. (33)

Os contadores automáticos de células sanguíneas contam maior número de células quando comparados aos métodos ma-

nuais, permitindo conseqüentemente uma maior precisão.(33)

Até o advento dos métodos automáticos, constituía um procedimento extremamente falho, a contagem das células sanguíneas pelos métodos manuais, com deficiências relacionadas a problemas inerentes ao próprio método e, sobretudo a deficiência muito comum na sua execução como p. ex. a fadiga visual. (25, 33, 38).

Alguns métodos automáticos sobretudo os aparelhos do tipo fluxo de células e modificação de impedância do meio, tornaram estas determinações bem mais precisas, descendo de um coeficiente de variação de  $\pm 11\%$  para o visual, para  $\pm 3\%$  para o eletrônico.(33)

O colégio Americano de Patologia (CAP) - 1976, mostra que o coeficiente de variação é menor do que 2,5% para hemoglobina e hematócrito determinados nos aparelhos automáticos de sangue total assim também como as contagens de eritrócitos. Entretanto a contagem de leucócitos, mostra CV'S em torno de 3 a 6%. (16,19).

No entanto, as técnicas de calibração para os aparelhos eletrônicos não têm guardado espaço para o melhoramento na precisão.(15) A exatidão e a precisão tem sido sempre a maior fonte de preocupação na contagem das células sanguíneas na câmara (contagem visual), que teoricamente fornece e possibilita calibração primária inerente.

Algumas técnicas manuais clássicas (micro-Het-Hb) ainda contribuem basicamente para redução dos problemas de exatidão.

Um padrão de calibração aceito habitualmente existe somente para a determinação da hemoglobina. O método recomendado pelo Congresso Internacional de Hematologia em 1966, e o método cianometahemoglobina que foi descrito por Van Kampem em 1961. (15,16)

O método de Wintrobe ou macrohematócrito é o método recomendado como padrão de calibração, por alguns autores(11). No entanto na rotina dos laboratórios se prefere o método microhematócrito por ser mais rápido, e de comparável exatidão, no entanto é preciso que se faça a correção, quando necessário de resíduo de plasma. Esta correção pode ser aplicada pela sub

tração de 3% do hematócrito observado. Deste modo o sangue fresco total pode ser usado para calibração primária.(15)

A contagem das células sanguíneas utilizando métodos visuais é ainda muito usado nos laboratórios de pequeno porte. A este método de contagem de células sanguíneas existem numerosas possibilidades de erros. Os erros podem ser devido a natureza da amostra, a técnica do operador e a inexatidão do equipamento.(38)

Erros devidos a características da amostra: A congelação parcial do sangue venoso é causa de erro, pelas variações da distribuição dos eritrócitos ou pela diminuição do seu número. O misturar do sangue completamente e imediatamente antes da diluição, introduz um erro que depende do grau de sedimentação.

Erros do operador: Erros devido a defeitos de técnica podem ocorrer na diluição da amostra, na montagem da câmara e quando as células são contadas. Uma causa de erro freqüente é a colocação incorreta da lamínula.

Erros devido ao equipamento: a falta de exatidão da graduação das pipetas e dos quadrículas e da profundidade da câmara de contagem são causas de erros freqüentes.

Erros inerentes ou erro de campo: mesmo com a amostra perfeitamente misturada, ocorre uma variação o número de células suspensas que estão distribuídas num dado volume, que se distribui no retículo da câmara.

Segundo a lei de distribuição de Poisson, estatisticamente o erro de campo é o erro mínimo.

Burkson (1940), determinou experimentalmente, para a contagem de eritrócito em hemocitômetro, coeficientes de variação expressos em percentagem. Experimentalmente, o erro de campo para as contagens de eritrócitos (mas não para os leucócitos), era ligeiramente menor que o dado pela distribuição de Poisson. (38, 39).

Por exemplo, quando se contam 500 eritrócitos para uma contagem de eritrócito, o coeficiente de variação (CV) é igual a 7,7%, se utilizarmos uma câmara e uma pipeta. Isto corresponde a um erro experimental de mais ou menos 15,4% (o dobro do CV). Usando duas pipetas e duas câmaras e contando o dobro dos eritrócitos, o erro experimental reduz-se a mais ou menos 11%.

Alguns autores (7, 38, 39) acreditam que estes erros possam ser minimizados por meio de uma técnica cuidadosa e contando grande número de células.

Existem também contadores eletrônicos que possuem diluidores acoplados ao sistema. São os aparelhos semi-automáticos ou instrumento digital.

Com o método semi-automático ou digital, a concentração das células é determinada diretamente pelo número de células num dado volume. Eles aspiram a amostra de sangue e expõem-na juntamente com o diluente. Em alguns instrumentos, os volumes são ajustados, ao passo que em outros, um ou ambos os volumes são fixos. Em qualquer dos casos o diluidor deve executar diluições a 1:250 e diluições a 1:500 com CV inferior a 1%. (39)

Este volume é um líquido calibrado entre a coluna de um sensor inicial e um sensor de parada.

A exatidão destes instrumentos depende principalmente da exata medida deste volume e do modelo de contagem, assim como na diluição das células, colocação do limiar, harmonia e correção de fundo.

Depois das amostras diluídas, a contagem é feita no contador eletrônico acoplado ao diluidor, que possui os mesmos princípios citados anteriormente. Também acoplado ao sistema existe um dosímetro para a dosagem da ~~hem~~oglobina. Usando a mesma diluição para a contagem de leucócitos, pode-se determinar a dosagem da hemoglobina.

Exemplos destes aparelhos são os Analys 134, Contraves 880, Coulter Models DM, ZB e ZF, Sysmes CC 108, 110 e 800 e Ultra Logic 800 (28).

Este trabalho tem como objetivo, o estudo de 6 parâmetros do hemograma comparando os resultados obtidos pelo método automático do Coulter STKS com aqueles detidos pelos métodos manuais e semi automático, nas amostras de sangue que não apresentavam nenhum sinal de anormalidade.

## 2. MATERIAL E MÉTODO

### 2.1 - Amostras Estudadas:

Foram analisadas 62 amostras de sangue de pacientes procedentes da rotina do Laboratório Clementino Fraga. As amostras foram colhidas por punção venosa, tendo como anticoagulante o EDTA-K<sub>3</sub> (Vacuntainer, Becton Dickinson Corporation).

Os resultados de seis parâmetros do hemograma obtidos pelo analisador automático Coulter STKS, de uso rotineiro do mesmo laboratório, foram comparados com os obtidos pelos métodos manuais e semi-automático.

Das amostras processadas para a realização do hemograma pelo Coulter STKS na rotina do laboratório, 5 a 7 amostras processadas eram separadas por dia, para análise de 6 parâmetros do hemograma pelos métodos manuais: contagem de leucócitos, contagem de hemácias e contagem de plaquetas na câmara, cianometahemoglobina, microhematócrito e contagem diferencial dos leucócitos, e 3 parâmetros, contagem de hemácias, contagem de leucócitos e cianometahemoglobina pelo método semi automático.

As 62 amostras selecionadas não inclui amostras patológicas para o método automático Coulter STKS, e o período transcorrido entre a extração e a análise oscilou entre 2 a 6 horas.

Os resultados dos parâmetros do hemograma, obtido pelo método automático sô foram colhidos no final do estudo.

### 2.2 - Características dos Métodos:

#### a) MÉTODO 1: Método do hemocitômetro ou câmara de contagem.

A câmara de contagem consta de uma peça de vidro espesso contendo um rebaixamento na parte central que é separada das partes laterais por duas valetas. As melhores câmaras apresentam a parte central espelhado. Nesta parte está gravado o retículo. As câmaras podem ter de um a quatro retículos, todos separados

por valetas para impedir que as suspensões de células se misturem. O desnível da parte central corresponde à altura da câmara, que vem gravada ao lado, em cada peça.

O retículo varia com a fabricação. O tipo usado para este estudo foi o retículo de Neubauer. É formado por 9 quadrados de  $1\text{mm}^2$  de área e portanto tem  $9\text{mm}^2$  de superfície. A profundidade da câmara é de  $0,1\text{mm}$ . O volume total da câmara é de  $0,9\text{mm}^3$ . Cada um dos 9 quadrados é subdividido. Os quatro quadrados chamados externos (A, B, C, D) são divididos em 16 pequenos quadrados medindo cada um  $1/16$  de  $\text{mm}^2$ . O quadrado central é dividido em 25 pequenos quadrados medindo cada um  $1/25$  do  $\text{mm}^2$ . Cada um destes, por sua vez, é dividido em outros 16 quadrados medindo  $1/400$  do  $\text{mm}^2$ .

Os métodos manuais para contagem de células sanguíneas consistem geralmente em diluir o sangue em proporções adequadas com soluções diluidoras apropriadas. A amostra diluída é então introduzida na câmara de contagem e contada ao microscópio com oculo  $\times 10$  e objetiva de  $40\times$ .

#### a.1) Contagem de Hemácias:

A amostra de sangue foi diluída a 1:200. 20  $\mu\text{l}$  de sangue foi pipetado, utilizamos pipeta automática de 20  $\mu\text{l}$ , o sangue foi bem homogeneizado na hora da pipetagem e transferido para um tubo de ensaio contendo exatamente 4 ml da solução diluente. A contagem foi feita na câmara de Neubauer, em área igual a  $1/5 \text{mm}^2$ .

#### a.2) Contagem de Leucócitos:

A amostra de sangue foi diluída a 1:20. 20  $\mu\text{l}$  de sangue foi pipetado, utilizando pipeta automática de 20  $\mu\text{l}$ , o sangue foi bem homogeneizado na hora da pipetagem e transferido para um tubo de ensaio contendo exatamente 0,4 da solução diluente. A contagem foi feita na câmara de Neubauer, em área igual a  $4\text{mm}^2$ .

#### a.3) Contagem de Plaquetas:

A amostra de sangue foi diluída a 1:100, utilizando um

diluidor manual (Oxford). A contagem foi feita na câmara de Neubauer, em área igual a  $2\text{mm}^2$ .

O líquido diluidor para a contagem das hemácias deve ser isotônico para evitar a lise e a crenação dos eritrócitos, deve também conter um fixador para conservar a forma dos eritrócitos. A solução de Gower e o isoton (Coulter Diagnóstico, Hialcah, Fla), satisfaz estas exigências. O diluente para a contagem de leucócitos, provoca a lise dos eritrócitos, mas não as dos precursores dos eritrócitos nucleados. O líquido mais simples é a solução de ácido acético a 2% (solução de Turk). O líquido diluente para as plaquetas foi o reagente citrato de sódio a 3,8%.

#### a.4) Hematócrito:

Utilizado o método do microhematócrito. Foi usado capilares da marca Delta. O capilar foi enchido e centrifugado a 11 rpm, durante 3 minutos. (Centrífuga da marca Autocrit II). A leitura foi realizada no microhematócrito reader. (Sherwood - medial industries INC. Bridgeton no 63042).

#### a.5) Hemoglobina:

A metodologia usada foi cianometahemoglobina (HiCN). Usando reagentes da Labtest (sistemas para diagnóstico), com padrão para dosagem de hemoglobina, recomendado pelo Internacional Committer for Standartization in Hematology (ICSH) e do Nacional committer for clinical Laboratory Standards (NECLS). A leitura foi feita em espectrofotômetro (Colleman) em comprimento de onda de 540 nm.

#### a.6) Contagem Diferencial dos Leucócitos:

A contagem diferencial foi realizada através de esfregaços sanguíneos em lâminas coradas pelos métodos panóticos (May-Grunwald- Giemsa), sobre um total de 100 células, como é feito de maneira convencional na rotina dos laboratórios.

b) MÉTODO 2: Método semi-automático

Foi utilizado para as contagens globais hematimétricas, ou seja, hemácias e leucócitos, contadores eletrônicos semi-automáticos da Celm (Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos) - Celm CC-510 com diluidor DA-500 e seu respectivo dosímetro para hemoglobina HB-520, calibrados segundo protocolo do fabricante.

c) MÉTODO 3: Método automático. Coulter STKS:

O Coulter STKS é uma combinação de abertura de impedância com condutividade e raio laser, que produz contagem das células sanguíneas, incluindo contagem diferencial dos leucócitos dentro de uma análise automática.

O Coulter STKS é uma combinação dos analisadores STKR e CVS, incorporando um manuseio com frasco da amostra fechado, e 5 populações de contagem diferencial dos leucócitos. Hemácias, leucócitos e plaquetas são enumeradas e separadas no STKS usando método de impedância.

A contagem diferencial das células brancas do sangue é obtida usando uma corrente direta de baixa-freqüência e uma de alta freqüência eletromagnética combinada com luz laser, medindo o volume celular, condutividade e luz dispersa respectivamente. A diferencial é executada pelo fluxo celular em um canal triplo localizado na frente do aparelho.

O triplo canal analisa 8.192 células em cada amostra dentro de 20 segundos.

O aparelho possui um sistema de sinalização (flagging) que são específicos, tanto para os sinais suspeitos, como para os sinais definitivos de anormalidade.

Os dados instrumentais são manipulados pelo sistema governado de dados (Data management System - DMS), os quais consistem de um microcomputador com 40 megabyte fixado e 12 megabyte de disco. O sistema é capaz de armazenar todas as informações de umas 1.000 amostras.

### 3. RESULTADOS:

#### 3.1 - Modelo de Análise Estatística

Utilizou-se análise de variância no modelo com um fator em blocos totalmente ao acaso, para comparar as médias de contagem dos 3 métodos.

O modelo:

$$Y_{ij} = u + A_i + I_j + e_{ij}$$

$U_{ij}$  - contagem das células no  $i$ -ésimo aparelho na  $i$ -ésima amostra

$u$  - média geral populacional

$A_i$  - efeito do  $i$ -ésimo aparelho,  $i = 1, 2, 3$

$I_j$  - efeito da  $j$ -ésima amostra de sangue  $j = 1-----62$

$e_{ij}$  - erro aleatório

Suposições ao modelo:

$$e_{ij} \sim N(0, \sigma^2) \text{ independentes}$$

$$\sum A_i = 0$$

Hipóteses de interesse:

$H_0: A_1 = A_2 = A_3$  (os aparelhos contam em média o mesmo nº de células).

$H_1$ : Pelo menos um  $A_i$  é diferente,  $i = 1, 2, 3$  (pelo menos um dos aparelhos difere em média, na contagem das células).

Quando rejeitou-se  $H_0$ , fez-se comparações entre as médias de contagem de células dos aparelhos, pelo método de Dunnett, tomando-se o aparelho automático como padrão (controle). Neste método de comparação, a amplitude padrão é dada por:

$$\Delta_{5\%} = D_{(a-1, g\text{trs})} \sqrt{\frac{20ME}{62}}$$

Onde:

5% - nível de significância do teste

a - nº de aparelhos utilizados

OmE - quadrado médio do resíduo (na análise de variância).

Glrs - graus de liberdade do resíduo

62 - nº de amostras

D (a-1, gers) → valor na tabela de Dunnett.

Utilizou-se estimativas pontuais e intervalares para os parâmetros  $\mu$ , e  $\mu_i$ . (média populacional do aparelho i). Tal que:

$$\mu = \bar{y} \text{ (média geral amostral)}$$

$$\mu_i = \bar{y}_i \text{ (média amostral do aparelho i)}$$

$$\bar{y}_{..} \pm t(5\%; \text{glrs}) \frac{OmE}{186} \text{ (intervalo de confiança}$$

para  $\mu$  ao nível de 5%).

$$\bar{y}_i \pm t(5\%; \text{glrs}) \frac{OmE}{62} \text{ (intervalo de confiança}$$

para a média  $\mu_i$ . Ao nível de 5%).

NOTAÇÃO UTILIZADA -

\*\* - Significância a 1%

\* - Significância a 5%

n.s = não significante

gl - graus de liberdade

SIGN = significância (nível descritivo do teste).

SIGN - (nível descritivo do teste).

CV - coeficiente de variação.

## RESULTADOS OBTIDOS:

Hemácias

## QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

F.V.	gl	SQ	OM	F	SIGN
Aparelho	2	13.417.366,49	6.308.683,25	115,84	0,00**
Amostra	61	31.960.866,90	523.948,62	-	
Resíduo	122	7.065.716,17	57.915,71	-	
Total	185	52.443.949,46	-	-	CV = 5,47%

## ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS DOS APARELHOS

APARELHO	MÉDIAS	INTERVALO DE CONFIANÇA
Manual	3.970,68	(3.910,78; 4.030,58)
Semi-automático	4.579,52	(4.519,62; 4.639,42)
Automático	4.490,97	(4.431,07; 4.550,87)

- TESTE DE DUNNETT -

$$\Delta_{5\%} = 84,72$$

Desse modo, tanto o aparelho manual quanto o aparelho semi-automático difere do aparelho automático, na contagem média do número de hemácias.

## LEUCÓCITOS

## QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	Ge	SQ	OM	F	SIGN
Aparelho	2	64.700,04	32.350,02	17,08	0,00**
Amostra	61	2.935.350,67	48.120,50		
Resíduo	122	231.082,62	1.894,12		
Total	185	3.801.133,33	-		CV= 6,51%

## ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS DOS APARELHOS

APARELHO	MÉDIAS	INTERVALOS DE CONFIANÇA
Manual	654,84	(644,01; 665,67)
Semi-automático	656,13	(645,30; 666,96)
Automático	695,03	(684,20; 705,86)

## TESTE DE DUNNETT

$$\Delta_{5\%} = 15,32$$

Podemos dizer que a contagem média dos leucócitos, tanto para o método manual quanto o semi-automático difere do aparelho automático.

## HEMOGLOBINA

## QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	gl	SQ	OM	F	SIGN
Aparelho	2	0,00097	0,00048	0,0025	0,998 n:s
Amostra	61	349,27	5,7257		
Resíduo	122	23,60	0,1534		
Total	185	372,87	-		CV=3,15%

Pelos resultados da análise de variância, os três métodos não diferem quanto a dosagem de hemoglobina. Desse modo, podemos estimar a média das dosagens de hemoglobina pela média geral de amostra:

$$g = 13,95$$

e o intervalo de confiança para a média  $\mu$ : (13,89; 14,01)

## PLAQUETAS

## QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	gl	SQ	OM	F	SIGN
Aparelho	1	53.141,04	53.141,04	260,05	0,00**
Amostra	61	391.514,11	6.418,26		
Resíduo	61	12.465,46	204,35		
Total	123	457.120,61			CV = 5,08%

## ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS DOS APARELHOS

APARELHO	MÉDIAS	INTERVALOS DE CONFIANÇA
Manual	240,24	(236,65; 243,83)
Automático	323,05	(319,46; 326,64)

O método manual difere do método automático na contagem média das plaquetas.

## HEMATÓCITO

## QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	gl	SQ	OM	F	SIGN
Aparelho	1	69,75	69,75	59,30	0,00**
Amostra	61	1.880,85	30,83	-	
Resíduo	61	71,75	1,18	-	
Total	123	2.022,35	-	-	CV=2,69%

## ESTIMATIVAS DAS MÉDIAS DOS APARELHOS

APARELHOS	MÉDIAS	INTERVALOS DE CONFIANÇA
Manual	41,82	(41,55; 42,09)
Automático	38,82	(38,55; 39,09)

O aparelho manual difere do aparelho automático na média dos valores do hematócrito.

## SEGMENTO

## QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	gl	SQ	OM	F	SIGN
Aparelho	1	14,91	14,91	1,59	0,21 n.s.
Amostra	61	9.233,72	151,37	-	
Resíduo	61	571,59	9,37	-	
Total	123	9.820,22	-	-	CV=5,58%

A eficiência do aparelho manual é a mesma que a do aparelho automático na contagem de segmentado. Neste caso, pode-se estimar a contagem média das células, pela média amostral geral,  $\bar{y} = 54,89$ , tendo-se obtido um intervalo de confiança de: (54,35; 55,43).

## EOSINÓFILO

## QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA(\*)

FV	gl	SQ	OM	F	SIGN
Aparelho	1	0,03	0,03	0,39	0,54 n.s.
Amostra	61	30,61	0,50	-	-
Resíduo	61	4,92	0,08	-	-
Total	123	35,59	-	-	CV= 14,37%

(\*) A análise foi feita com a variável transformada.

O método manual não difere do aparelho automático na contagem média das células eosinofílicas.

## LINFÓCITOS

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	gl	SQ	OM	F	SIGN
Aparelho	1	0,65	0,65	0,05	0,83 n.s.
Amostra	61	7.722,62	126,60	-	-
Resíduo	61	803,85	13,18	-	-
Total	123	8.527,12	-	-	CV = 10,00%

O método manual não difere do aparelho automático quanto ao número médio de linfáticos contados. Assim, podemos estimar o número médio de linfáticos contados pela média amostral geral  $\bar{g} \dots = 36,29$  com um intervalo de confiança (31,30; 41,28).

## MONÓCITO

QUADRO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	gl	SQ	OM	F	SIGN
Aparelho	1	0,87	0,87	7,00	0,01**
Amostra	61	22,90	0,38	-	-
Resíduo	61	7,58	0,12	-	-
Total	123	-	-	-	CV = 15,35%

(\*) A análise foi feita com a variável transformada.

O método manual difere do aparelho automático na contagem média de células monocíticas.

#### 4. DISCUSSÃO:

Os métodos do hemocitômetro (Câmara de contagem), ainda que se tornando em desuso para as contagens de rotina de células sanguíneas, será durante anos a prática de escolha nos laboratórios pequenos, e todo o técnico em hematologia deve ser capaz de executá-lo, assim como conhecer suas limitações para verificar a validade das contagens eletrônicas em casos de grandes leucopenias e leucemias e como método de retaguarda.

Estudos acerca dos erros nos métodos manuais de contagem de células sanguíneas demonstram que são resultante de diversas variáveis. A principal origem mostrou ser inerente os procedimentos tais como: diluição de sangue com líquidos diluídos, enchimento da câmara de contagem e distribuição das células na câmara. As técnicas de diluição em tubo e as micropipetas pré-calibradas suplantaram o uso das pipetas de Thoma e de Sahli e são as recomendadas, pois além da simplicidade da execução e facilidade de etiquetagem, elas permitem maior precisão na diluição. (25)

Uma câmara de contagem e uma lamínula limpas e isentas de gorduras permitem um preenchimento apropriado por capilaridade.

O erro inerente ou de campo depende da distribuição de células na câmara de contagem e é, portanto, inevitável. Ele pode ser reduzido contando-se um grande número de células.

Os resultados obtidos na contagem de hemácias pelo método visual teve uma tendência a fornecer números mais baixos.

Pelo fato do método manual para contagem de hemácias, existir numerosas possibilidades de erros, alguns autores (25, 32) desencorajam este método em favor do hematócrito e hemoglobina.

A hemoglobina e contagem de eritrócitos pode ser estimada pela leitura do microhematócrito (25), entretanto esta estimativa só poderá ser efetuada em amostras de sangue normal.

Na anemia por deficiência de ferro, o número de eritrócitos é variável, mas relativamente alto em relação ao volume globular encontrado. Com o avanço dos aparelhos automáticos pacientes com hematócrito de 25% pode apresentar cifras eritrocitá-

rios de até 4.000.000. Tais cifras não eram encontradas com frequência na prática clínica, possivelmente pelo uso de métodos visuais para a contagem dos eritrócitos que fornecem números mais baixos que os reais.

A margem tão ampla nas cifras encontradas nos indivíduos normais, deva-se talvez à impressão dos métodos hematiméticos utilizados para sua determinação.

Se observou uma excelente correlação para a dosagem de hemoglobina frente aos três métodos. Quanto ao hematócrito a média dos resultados obtidos pelo Coulter STKS apresentou um valor de 3% abaixo dos valores encontrados pelos métodos mecânicos (microhematócrito), que sempre deixam resíduos de plasma entre os eritrócitos (15, 16, 33).

A determinação do hematócrito por centrifugação é um procedimento altamente reprodutivo. E os resíduos de plasma podem ser estimados em torno de 3% tanto para amostra de sangue normal, como em certas condições anormais, principalmente na deficiência de ferro, talassemia, esferocitose. Enquanto que na prática da rotina clínica isto não constitui sérios problemas, a não ser quando se necessita de uma apurado mais preciso, como por exemplo quando se quer estimar o volume de sangue ou calibração de aparelhos automático para contagem de células sanguíneas ou quando parâmetros na contagem de células sanguíneas estão envolvidas com desordem na qual há excessivamente grande quantidade de plasma.

O método manual difere do método automático na contagem média das plaquetas com intervalos de confiança de 236,65 a 243,83 para o método manual e 319,46 a 326,64 para o método automático. As contagens de plaquetas são ao menos reprodutíveis das contagens de células sanguíneas e o técnico deve manter uma vigilância constante para assegurar a sua exatidão.

O método de referência para contagem de plaquetas é usado o microscópio de contraste de fase usando o hemocitômetro. O coeficiente de variação (CV) é cerca de 8%.

Os aparelhos eletrônicos semi-automáticos para contagem de plaquetas, o Autocounter (Techicon Corporation, Tanytown, N. Y.) utiliza o sistema de microscopia óptica em fundo escuro. Es-

te aparelho conta plaquetas com uma precisão maior do que a dos contadores de pulsos de voltagem (CV = 1 a 3% contra 4 a 6% para o método de Coulter Counter).(38)

Qualquer que seja o método utilizado para a contagem de plaquetas, o esfregaço sanguíneo (preparado com sangue colhido com EDTA), deve ser desviado para confirmar o valor obtido na contagem.

A contagem total dos leucócitos mostrou uma análise de variância significativa com coeficiente de variação igual a 6,51%. Entretanto a contagem médias dos leucócitos tanto para o método manual, semi-automático e automático foram muito próximos e o semi-automático se aproximou mais do aparelho automático.

Os resultados observados na contagem diferencial dos leucócitos pelo Coulter STKS mostrou uma boa correlação frente ao método para neutrófilos, linfócitos e eosinófilos. Para a contagem de monócitos observou uma correlação muito pobre. O método manual difere do aparelho automático na contagem média dos monócitos, com coeficiente de variação igual a 15,35%.

A comparação das duas técnicas para os basófilos foi estatisticamente inválido.

Ao analisar os esfregaços sanguíneos pelo método óptico convencional pode se observar falsos negativos inexplicamente não detectado pelo aparelho automático. Das 62 amostras analisadas 11,3% tenham bastonetes (1 a 4%) presentes nos esfregaços sanguíneo. O Coulter STKS não fornece o valor de bastonetes, mas indica sua presente travês do sistema de sinalização.

Uma contagem visual cuidadosa é um método científico, embora com coeficiente de variação elevado. Entretanto a contagem de células sanguíneas utilizando métodos automáticos, não é isenta de erros, se não for corretamente operado. Também é essencial uma manutenção de controle de qualidade.

A rapidez da execução, a eliminação da fadiga visual do técnico e a melhora da precisão, são vantagens decisivas dos contadores eletrônicos sobre o hemocitômetro.

## 5. CONCLUSÃO

- Pelos resultados obtidos na contagem das células sanguíneas hemácias e leucócitos o aparelho semi-automático é o que mais se aproxima das contagens obtidas pelo método automático.

- A contagem das plaquetas na câmara em microscópio óptica difere da contagem do aparelho automático.

- Os resultados do hematócrito pelo método de centrifugação apresentou um valor de 3% abaixo dos valores obtidos pelo método automático.

- Não houve variação nas concentrações de hemoglobina obtida pelos três métodos.

- A contagem diferencial dos leucócitos mostrou uma boa correlação frente ao método óptico convencional para neutrófilos, eosinófilo e linfócitos, com uma pobre correlação para os monócitos. Os basófilos foi estatisticamente insignificante.

11.3% dos esfregaços examinados apresentavam bastonetes (1 a 4%), das amostras sem sinalização de alarme pelo Coulter STKS. Por esses dados é necessário também que se examine os esfregaços sanguíneos das amostras que não apresentam sinal de alarme pelo aparelho automático na contagem diferencial das células sanguíneas.

Todos os dados obtidos no estudo assemelham-se aos da literatura revisada.

## 6. SUMMARY

We had done the hemogram of 62 patients from the Laboratório Clementino Fraga and studied 6 parâmetros; comparing the results from the Coulter STKS with those obtained by the manual and semi-automatic methods. All the specimens without flagging.

Considering the blood cells count, the semi-automatic method was nearness to the automatic that found the highest number of cells. The manual technics found the lowest number of cells and differed from the automatic method when we consider the platelet count.

The hemoglobin levels didn't vary among the three methods.

The result of the haematocrit levels obtained by the automatic method were 3% lowest than the values from the centrifugation method (microhaematocrit).

The white blood cell differential count showed a good correlation with the optical conventional method for neutrophils, eosinophils and lymphocytes. For monocytes the correlations was very poor and for basophils it had no statistical significance.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARNARD, D.F. et al. Detection of important abnormalities of the differential Count using the Coulter STKR blood Counter. J. Clin Pathol. 1989: 772-776.
2. BEHREMS, J.A. et al. Whole - blood hemoglobin determinations- (A Comparion of Methologies). AM J. CLIN PATHOL. 72: 904-908, 1979.
3. BEZERRA, T.M.M. e DANTAS, M.F.A.. Estudo comparativo dos métodos de contagens de células sanguíneas. Rev. Bras. Patol. Clin. vol. 19, N. 2 - 1983.
4. BULL, B.S. et al. A study of various estimators for the derivation of quality control from patient erythrocyte indices. Am J. Clin Pathol. 01: 473-481, 1974.
5. CARVALHO, W.F. Técnicas médicas de heumotologia e imuno-hematologia. Coop. ed. Cult Médica, 3a. ed. 1983.
6. CAMPESTRINI, Selma. Laboratório Sangue e de Rotina, Módulo de ensino. Curitiba - Educa ed. Universitária. Champagnat - UCP - 1983, 78p.
7. DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. Hematologia Prática. 2a. ed. Barcelona, Ed. Toray, p. 27 a 78.
8. DORLHIAC, P. e OSTRONOFF, M. Hemograma. Rev. Bras. Med. vd 40, n. 11, 12, nov-dez. 1983, p. 426-430.
9. DANTAS, M-F.A. e BEZERRA, I.M.M. Estudo comparativo dos métodos manuais de contagem de células sanguíneas. Rev. Bras. Anal Clin. Vol. 18, n. 2 Abri/Jun - 1986, 44-46.
10. DREWINKO, B.; BELLINGER, P.; ROUNTREE, M. et al. Eight parameter automated hematology analyzers: Comparison of two cytometric system. Am J. Clin. Pathol. 1982: 78:738-47.
11. ENGLAND, J.M. et al. Recommendation for reference method for determination by centrifugation of packed cell volume of blood. (International committee for standardization in haematology expert panel no blood cell sizing). J. Clin. Pathol. Vol. 33, n. 01, jan.1980, p. 1-2.

12. FORADDRI, A. et al. El hemograma de una poblacion Chilena de referência. Rev. Med. Chile, 1989: 117: 495-500.
13. FERNANDEZ, M.C. e Cal. Valores de los parâmetros hematolôgicos básicos. Sangre. Vol. 33, n. 3, junho/1988, p- 188 a 195.
14. FERNANDEZ, M.C. et al. Evolução del autoanalizador hematolôgico sysmex NE-800. Sangre. 1991: 36 (5): 369-376.
15. GILMER, P. JR. et al. Calibration methods for automatid hematology instruments. Am J. Clin. Pathol. Vol. 68, n. 1, July 1977, p. 185-190.
16. GILMER, P. JR and WILLIAMS, L. The status fo methods of calibration in hematology. Am J. Clîn. Pathol. Vol. 74, n. 4, 1980, p. 600-605.
17. GOFTFRIED El. Erythrocyte indexes with the eletronic counter. New Engl. J. Med. 1979: 300:1277,. (LETTER).
18. GUIMARÃES, R.X.; GUERRA, C.C. Clínica e Laboratôrio (Interpretação clínica das provas laboratoriais). 3a. edição. São Paulo, Servier, 1983.
19. GILMER, P.R.; WILLIAMS, L.J.; KOCPKE, J.A.; BULL, B.S. Calibration methods for automated hemotology instruments. A report from the Hematology Resource Committee of the college of American Pathologists. Am J. Clin. Pathol. 1977, 68: 185-90.
20. HAYNES, J.L. High - Resolution Partiele analysis - Its application to platelet counting and Suggestions for further application in blood cell analysis. Blood Cells. Vol. 6, n. 2, 201-213, 1980.
21. INTERNACIONAL Committer for standardization in Hematology: Recommendation for hemoglobinometry in human blood. Br. J. Haematol. 13, suppl 71, 1967.
22. KOEPKE, J.A. Rationale for the NCCLS standart H20-T for differential leukocyte counting. Blood Cells. Vol. 11, n. 2 - 1985. The white Blood Cell differential II, p.161-171.

23. KOEPKE, J.A. The calibration of automated instruments for accuracy hemoglobinometry. Am. J. Clin Pathol. 68: 180-184. 1977.
24. JOU, J.M. et al. Evaluacion del analizador sysmex NE-800. Sangre. 1991: 36(5): 387-393.
25. LYNCH: Técnicas de Laboratório, Raphael - Hyde - Melhor - Spencer - Inwood - Thombom - Buyant, 4a. ed. Editora Manole, 1986, p. 836 a 859.
26. LIMA, O.A. e ed. Métodos de Laboratório aplicados a Clínica. 4a. ed. Editora Guanabara Koogan S/A, RJ, 1969.
27. LEWIS, S.M. The who International external quality assesement schene for haematology. Bulletin of the World Health organization. 66 (33:283-290, 1988).
28. LOMBARTS, Koevoet and Leijnse. Basis principles and problems of Haemocytometry. Ann Clin Biochem. 1986: 23: 390-404.
29. LEWIS, S.M. Visual Hemocytometry in: Van assen delft on, England J.M, eds Advances in Hematological Methods: The Blood Count. Boca Raton, Florida: CRC press, 1982: 40-7.
30. LEWIS, S.M. Clinical implications of automation in counting sustems. Chin Lab. Haemat. 1979: 1: 1-12.
31. MOURA, R.A.A. Técnicas de Laboratório. 2a. ed. Rio de Janeiro, Livraria Atheneu, p. 578-583, 1982.
32. MIALE, J.B. Laboratory Medicine Hematology. CV Mosby St. Louis, 1972.
33. OLIVEIRA, H.P. Hematologia Clínica. 3a. edição, Livraria Atheneu. RJ-SP, 1985.
34. PENN, D. et al. Comparison of hematocrito determinations by microhematocrit and Eletronic Particle Counter. Am J. Clin. Pathol. Vol. 72, n. 1, july 1979, p. 71-74.
35. PIERRE, R.V. et al. Comparison of four leukocyte differential methods with the national committee for clinical laboratory standards (MCCLS). Referência Method. Am J. Clin. Pathol. Vol. 87. n. 2, 201-209.

36. PEARSON THC,; GUTHRIE, D.L. Trapped plasma in the miero-  
matovit. Am. J. Clin. Pathol. 1982: 78:770-2.
37. RAPAPORT, S.J., M.D. Introdução a Hematologia. Ed. Harger e  
Row do Brasil Ltda., 1978.
38. TODD e SANFORD e DAVIDSOHN - Diagnósticos Clínicos e Conduta  
Terapêutica por exames de Laboratório. 16a. ed. Editora  
Mande Ltda., 1982, vol. 1.
39. THREATTE et al. Mean Platelet Volume: The need for a refe-  
rence method. Am J. Clin Pathol. Vol. 81, n. 06, jun-  
1984, p. 769-772.
40. WARNER, B.A. and REARDON, D.M. A Field Evaluation of the  
Coulter, STKS. Am J. Clin. Pathol. Vol. 95, n. 2, 1991,  
p. 207-217.