

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS AUTOMATIZADOS E
MANUAIS PARA CONTAGEM DE PLAQUETAS EM
PACIENTES PLAQUETOPÊNICOS**

Raimundo Antônio Gomes Oliveira

**Dissertação para obtenção do grau de
Mestre**

Orientador:

Prof. Dr. Orlando Cesar de Oliveira Barretto

São Paulo

2000

16.330

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS AUTOMATIZADOS E
MANUAIS PARA CONTAGEM DE PLAQUETAS EM
PACIENTES PLAQUETOPÊNICOS**

Raimundo Antônio Gomes Oliveira

**Dissertação para obtenção do grau de
Mestre**

Orientador:

Prof. Dr. Orlando Cesar de Oliveira Barretto

**São Paulo
2000**

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

O48a Oliveira, Raimundo Antônio Gomes
Avaliação de métodos automatizados e manuais, para contagem
de plaquetas em pacientes plaquetopênicos / Raimundo Antônio
Gomes Oliveira. -- São Paulo, 2000.
127p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Barretto, Orlando Cesar de Oliveira

1. Hematologia 2. Método laboratorial : Medicina 3. Sangue :
Hemostasia 4. Plaqueta : Contagem : Fisiologia humana I. T. II.
Barretto, Orlando Cesar de Oliveira, orientador.

616.15 CDD

RAIMUNDO ANTÔNIO GOMES OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS AUTOMATIZADOS E MANUAIS PARA
CONTAGEM DE PLAQUETAS EM PACIENTES PLAQUETOPÊNICOS**

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Orlando Cesar de Oliveira Barretto

1^o Examinador

2^o Examinador

São Paulo, 20 de junho de 2000

Aos meus pais, Antonio Benedito de Oliveira e Maria do Socorro Gomes de Oliveira, que sempre me incentivaram nas lutas difíceis, os méritos desta conquista.

Aos meus avós, Benedito, Ziloca, Daniel e Elze, a meus irmãos Tadeu, Elze e Júnior. Ao irmão Maurício e ao pequeno grande Felipe, a mais nova benção da família.

*Nada te assuste, nada te perturbe,
pois tudo passa, só Deus não muda.
Quem a Deus tem, nada lhe falta. Só
Deus basta.*

Santa Tereza de Jesus.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Antônio Benedito, maior nome da Farmácia no Maranhão, e à Professora Socorro Oliveira, que sempre me ensinaram os caminhos corretos.

Ao professor Dr. Orlando Cesar de Oliveira Barretto, pela orientação tranquila e segura desta dissertação.

À Dra. Kimyo Nonoyama, Chefe da Seção de Hematologia do Instituto Adolfo Lutz, e à Dra. Marico Takadachi, Chefe do Laboratório de Hematologia do Hospital dos servidores do Estado de São Paulo, por terem me dado toda a estrutura laboratorial necessária à execução deste trabalho.

Ao Dr. Victório Maspes, à Dra. Primavera Borelli e ao Dr. Paulo Silveira, pelas sugestões dadas para o aprimoramento do nosso trabalho.

Ao Dr. Sérgio Malaman, por ter viabilizado a aprovação em Comitê de Ética, para utilização das amostras dos pacientes plaquetopênicos da nossa casuística.

À Dra Marina Maeda, Diretora da Divisão de Patologia Clínica do Instituto Adolfo Lutz, por todo o apoio recebido.

À Chefia, e a todas as pessoas do Laboratório de Hematologia e Hemoterapia da Fundação Pró-sangue, por também terem contribuído à realização deste estudo.

Ao Professor Dr. Mário Hirata, pela acolhida ao chegar neste Curso de Pós-graduação.

Ao Dr. Márcio e Dra. Kyoko, que nos encaminharam ao Laboratório de Hematologia do Hospital dos Servidores do Estado de São Paulo.

Aos Professores Ernani Garrido, José de Ribamar Gonçalves, Terezinha Rêgo, Jamile Oliveira e amigos da Faculdade de Farmácia, pelo incentivo constante.

À Chefia do Departamento de Farmácia e à Coordenação do Curso, pelo apoio recebido.

À Reitoria da Universidade Federal do Maranhão e à Direção do Hospital Universitário, pelo apoio recebido.

Às Doutoradas Neusa Melo, Beatriz Beitler, Juliana Pereira e Gracia Martinez, a quem devo parte da minha formação hematológica.

Ao Professor Dr. Wilker Ribeiro, pela minha iniciação na hematologia clínica.

A todos os meus Professores neste Curso de Pós-Graduação, por terem contribuído à minha formação científica.

Aos amigos do Instituto Adolfo Lutz, Marilena, Daniela, Kellen, Poli, Vânia, Georgina, Vanda, Claudinha, Cecília, Maurício, Daniele, Káren, Dona Nair, Dona Jô, Cláudia, Cristiane, Najla, Patrícia, e todos os outros doadores voluntários das amostras de sangue de parte do nosso trabalho.

À Ângela, Angelina, Marisa, Valéria, Marisinha, Cristiana, Débora, Émerson e a todos os bons amigos do laboratório de Hematologia do Hospital dos Servidores do Estado de São Paulo, que sempre estiveram disponíveis a ajudar.

À Izabel, e a todos do Laboratório de Imunopatologia da Fundação Pró-sangue, por todo o conhecimento adquirido.

À Cecília, Henriete, Vânia e Rosa, pela coleta das amostras de sangue.

A Sidney Mesquita, Silvio Monteiro e Jorge Oliveira, pela valorosa ajuda nas análises estatísticas, confecção das tabelas, figuras e auxílio na parte de computação deste trabalho.

À Professora Maria de Jesus pela revisão ortográfica do texto.

À Adriana e Leila, pela revisão bibliográfica e sugestões para a normatização do texto; à Marina, pela ficha catalográfica. A todos da Biblioteca da Faculdade de Medicina, do ICB e do CQ, pela presteza.

À Sônia e Eliana, pelos importantes ensinamentos de Inglês para o meu ingresso neste Curso de Pós-Graduação.

À Graciete, Adamir, Dona Fabí, Ana Carla, Raquel e Allana, pela amizade e incentivos.

A Rogério, Renato, João Pedro, Rommel, Rafael, Omar, Carlinhos e Chiquinho, pelos exemplos de amizade.

A todos que direta ou indiretamente nos auxiliaram na realização desta dissertação.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	vi
SUMMARY	viii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Relevância clínica na contagem de plaquetas	3
1.2. Evolução histórica nas contagens de plaquetas	7
2. OBJETIVOS	16
3. CASUÍSTICA E METODOLOGIA	18
3.1. Casuística	18
3.2. Métodos utilizados	18
3.2.1. ADVIA-120 Hematology System, Bayer	19
3.2.2. Coulter STKS	21
3.2.3. Technicon H1 System.....	22
3.2.4. Coulter T-890.....	23
3.2.5. Brecher-Cronkite (método referência pelo ICSH 1984/1988).	25
3.2.6. Maspes-Jamra	26
3.2.7. "método indireto 1"	27
3.2.8. "método indireto 2"	28
3.3. Metodologia.....	29
3.3.1. 1ª fase: Estudo comparativo entre os contadores automáticos e método Maspes em relação ao método de referência, em amostras de indivíduos normais	29

3.3.2. 2ª fase: Avaliação da exatidão e precisão dos contadores automáticos em amostras plaquetopênicas produzidas em laboratório, que sofreram processo de diluição seriada, a partir de amostras de doadores voluntários com número normal de plaquetas, e que não tiveram acionado qualquer alarme nos aparelhos.	30
3.3.3. 3ª fase: Estudo comparativo entre os métodos automáticos e manuais (diretos e indiretos) em amostras de pacientes plaquetopênicos. Análise de alarmes nos contadores.....	32
3.4. Análise estatística	35
4. RESULTADOS.....	38
4.1. 1ª fase.....	38
4.2. 2ª fase	40
4.3. 3ª fase	47
4.4. Amostras com fragmentos de eritrócitos	61
5. DISCUSSÃO.....	64
5.1. Fatores que interferem na precisão e exatidão.....	65
5.2. Métodos manuais.....	66
5.2.1. Exatidão dos métodos manuais.....	67
5.2.2. Precisão dos métodos manuais	72
5.3. Métodos automáticos.....	78
5.3.1. Exatidão dos contadores automáticos	78
5.3.2. Contadores automáticos e os limites indicados para transfusão profilática de plaquetas.....	83
5.3.3. Precisão dos contadores automáticos	84
5.3.4. Os alarmes nos contadores automáticos	86
5.4. Métodos manuais versus automáticos	88
6. CONCLUSÃO.....	93
ANEXOS.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

LISTA DE FIGURAS

p.

FIGURA 1	- Diferença em valor absoluto (plaq/mm ³) entre os valores desejados e os valores obtidos para as amostras plaquetopênicas produzidas em laboratório, de cada um dos métodos automáticos (2ª fase)	40
FIGURA 2	- Análise de regressão linear e correlação entre o método de referência e o ADVIA, para as amostras com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm ³	50
FIGURA 3	- Análise de regressão linear e correlação entre o método de referência e o STKS, para as amostras com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm ³	51
FIGURA 4	- Análise de regressão linear e correlação entre o método de referência e o H1, para as amostras com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm ³	51
FIGURA 5	- Análise de regressão linear e correlação entre o método de referência e o T-890, para as amostras com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm ³	52
FIGURA 6	- Análise de regressão linear e correlação entre o método de referência e o método Maspes, para as amostras com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm ³	52
FIGURA 7	- Análise de regressão linear e correlação entre o método de referência e o "mét. ind. 1", para as amostras com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm ³	53
FIGURA 8	- Análise de regressão linear e correlação entre o método de referência e o "mét. ind. 2", para as amostras com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm ³	53

LISTA DE TABELAS

	p.
TABELA 1.1 - Comparação dos métodos automatizados e método Maspes em relação ao método de referência nas amostras de indivíduos normais. Teste "t" pareado (1ª fase)	38
TABELA 1.2 - Análise de variância entre os contadores automáticos e o método de referência nas amostras de indivíduos normais. Teste Tukey (1ª fase)	39
TABELA 1.3 - Análise de variância entre os métodos automatizados, o método Maspes e o método de referência nas amostras de indivíduos normais (1ª fase)	39
TABELA 1.4 - Comparação dos resultados entre o método Maspes e o método de referência, de acordo com níveis de hematócrito para as amostras da 1ª fase	39
TABELA 2.1 - Contagens pelo ADVIA-120 (Bayer), em amostras plaquetopênicas produzidas artificialmente em laboratório (2ª fase)	41
TABELA 2.2 - Contagens pelo Coulter STKS, em amostras plaquetopênicas produzidas artificialmente em laboratório (2ª fase)	42
TABELA 2.3 - Contagens pelo H1 Technicon, em amostras plaquetopênicas produzidas artificialmente em laboratório (2ª fase)	43
TABELA 2.4 - Contagens pelo Coulter T-890, em amostras plaquetopênicas produzidas artificialmente em laboratório (2ª fase)	44
TABELA 2.5 - Diferença em porcentagem e em valor absoluto (plaq/mm ³) entre os valores desejados e os valores obtidos para as amostras plaquetopênicas produzidas artificialmente em laboratório, em cada um dos métodos automáticos (2ª fase)	45
TABELA 2.6 - Análise de regressão linear e correlação dos contadores automáticos para contagens de plaquetas abaixo de 30.000 plaq/mm ³ , produzidas artificialmente em laboratório.(2ª fase)	45
TABELA 2.7 - Análise de precisão dos contadores automáticos em amostras com níveis normais de plaquetas (2ª fase)	46
TABELA 2.8 - Estudo comparativo da precisão dos contadores entre as amostras com níveis normais de plaquetas e as amostras plaquetopênicas obtidas artificialmente em laboratório a partir das próprias amostras normais (2ª fase)	47
TABELA 2.9 - Análise da precisão dos contadores automáticos para níveis de plaquetas de 50.000 a 800.000/mm ³ (2ª fase)	47

TABELA 3.1	- Análise de exatidão. Teste "t" pareado: comparação dos métodos automatizados e métodos manuais diretos e indiretos em relação ao método de referência para amostras de pacientes plaquetopênicos com níveis de plaquetas abaixo de 100.000/mm ³ . Diferença entre a média das contagens de plaquetas de cada método e o método de referência. (3ª fase) ...	48
TABELA 3.2	- Análise de exatidão. Teste "t" pareado: comparação dos métodos automatizados e métodos manuais diretos e indiretos em relação ao método de referência para amostras de pacientes plaquetopênicos com níveis de plaquetas abaixo de 30.000/mm ³ . Diferença entre a média das contagens de plaquetas de cada método e o método de referência. (3ª fase)	48
TABELA 3.3	- Análise de regressão linear e correlação dos métodos automáticos e manuais (diretos e indiretos) em relação ao método de referência, para os pacientes plaquetopênicos com níveis abaixo de 100.000 plaq/mm ³ (3ª fase)	49
TABELA 3.4	- Análise de regressão linear e correlação dos métodos automáticos e manuais (diretos e indiretos) em relação ao método de referência, para os pacientes plaquetopênicos com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm ³ (3ª fase)	50
TABELA 3.5	- Teste "t" pareado e correlação entre a tecnologia 2D (volumetria e índice de refração) utilizada pelo ADVIA versus volumetria simples (1D) utilizada pelos contadores (STKS, H1 e T-890) nas amostras dos pacientes plaquetopênicos com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm ³ (3ª fase)	54
TABELA 3.6	- Teste "t" pareado e correlação entre os métodos indiretos nas 70 amostras dos pacientes plaquetopênicos com valores abaixo de 100.000 plaq/mm ³ e nas 43 amostras incluindo apenas os plaquetopênicos com contagens abaixo de 30.000 plaq/mm ³ (3ª fase)	55
TABELA 3.7	- Teste "t" pareado e correlação entre o "mét. ind..1" e o ADVIA, nas 70 amostras dos pacientes plaquetopênicos com valores abaixo de 100.000 plaq/mm ³ e nas 43 amostras dos pacientes plaquetopênicos com contagens abaixo de 30.000 plaq/mm ³ (3ª fase)	55
TABELA 3.8	- Análise de variância entre os métodos automáticos e manuais (diretos e indiretos) nas amostras dos pacientes plaquetopênicos com níveis abaixo de 100.000 plaq/mm ³ , tendo como variável o coeficiente de variação. Teste Tukey. (3ª fase) ..	56
TABELA 3.9	- Análise de variância entre os métodos automáticos e manuais (diretos e indiretos) nas amostras dos pacientes plaquetopênicos com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm ³ , tendo como variável o coeficiente de variação. Teste Tukey. (3ª fase)	56
TABELA 3.10	- Estudo comparativo dos coeficientes de variação em amostras de pacientes plaquetopênicos com níveis abaixo de 10.000 plaq/mm ³ , entre 10.000 e 20.000 plaq/mm ³ e entre 20.000 e 30.000 plaq/mm ³ , entre os métodos automáticos e manuais diretos e indiretos (3ª fase)	57

TABELA 3.11	- Métodos automáticos e manuais (diretos e indiretos) versus limites profiláticos para transfusão de plaquetas.	58
TABELA 3.12	- Métodos indiretos versus limites profiláticos para transfusão de plaquetas.....	59
TABELA 3.13	- Análise de alarmes ("flags") dos contadores automáticos, nas 70 amostras dos pacientes plaquetopênicos com valores abaixo de 100.000 plaq/mm ³ (3 ^a fase)	59
TABELA 3.14	- Análise de alarmes dos contadores automáticos. Percentual de amostras com alarmes e que apresentaram superestimação significativa de contagem (3 ^a fase)	60
TABELA 3.15	- Estudo comparativo entre os resultados obtidos pelo método Maspes e pelo método de referência, nas amostras da 3 ^a fase. ..	108
TABELA 3.16	- Estudo comparativo dos resultados obtidos pelo método de Maspes para obtenção do plasma rico em plaquetas, a partir de centrifugação a 1.000 rpm por 3 min versus centrifugação de 1.000 rpm por 1 min, nas amostras de número 24 a 38 da 3 ^a fase.	109

RESUMO / SUMMARY

OLIVEIRA, R.A.G. Avaliação de métodos automatizados e manuais para contagem de plaquetas, em pacientes plaquetopênicos. São Paulo, 2000. 127p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

RESUMO

É consenso que o advento da automação trouxe grande avanço na precisão e exatidão nas contagens de plaquetas em amostras normais. Entretanto, a correta contagem em amostras trombocitopênicas ainda é bastante controversa. A grande tendência em diminuir os limites de corte para se indicar transfusão de plaquetas, principalmente em função dos riscos de transmissão de doenças e do seu alto custo, impõe que a precisão e exatidão das contagens destes elementos sanguíneos tenham se tornado cada vez mais importantes. Desta forma, nosso trabalho procurou avaliar a exatidão e precisão de quatro contadores automáticos, o ADVIA (Bayer), o STKS (Coulter), o H1 (Technicon) e o T-890 (Coulter), dois métodos manuais diretos em câmara de contagem (Maspes-Jamra e Brecher-Cronkite- método de referência) e dois métodos indiretos. Em um destes foi utilizado o fator 20.000 para conversão de plaqueta por campo para plaqueta por mm^3 ("Mét. indireto 1") e o outro que obtém o número de plaquetas por mm^3 através da relação de equivalência entre o número de plaquetas por campo/eritrócitos por campo e o número de plaquetas por mm^3 /eritrócitos por mm^3 ("Mét. indireto 2"). Esta avaliação foi feita tanto em amostras normais quanto em amostras plaquetopênicas, tendo como parâmetro de referência os resultados obtidos pelo método preconizado pelo International Committee of Standardization in Haematology (ICSH 1984/1988). Nossos resultados demonstraram não haver diferenças significativas entre os aparelhos e o método de referência para amostras normais. Entretanto, o método de Maspes-Jamra apresentou resultados significativamente mais elevados em relação ao método ICSH com diferença de $+145.400 \text{ plaq}/\text{mm}^3$ ($p < 0,001$), provavelmente em função da retenção de plasma livre de plaquetas entre as hemácias. Os aparelhos automáticos apresentaram excelente precisão e exatidão dos aparelhos

nas amostras plaquetopênicas obtidas em laboratório a partir de diluições das próprias amostras normais. De modo distinto, nos pacientes plaquetopênicos, apenas o ADVIA que utiliza dois princípios de contagem (volumetria por dispersão da luz laser e índice de refração), demonstrou boa correlação ($r = 0,947$ em relação ao método ICSH nas amostras com menos de 30.000 plaq/mm^3). Os demais aparelhos, que se utilizam apenas da volumetria como princípio de contagem, não apresentaram resultados satisfatórios. Entretanto, a análise de alarmes demonstrou, em todos os aparelhos, grande capacidade de acusar resultados passíveis de erros. Os dois métodos indiretos com $CV = 26,02$ demonstraram ser bem menos precisos do que todos os demais ($p < 0,001$). Além disso, o "mét. indireto 1" obteve resultados significativamente mais elevados do que os obtidos pelo método ICSH ($p < 0,001$). Assim, podemos afirmar que a contagem exata de plaquetas em níveis baixos continua sendo um grande problema. A falta de concordância de resultados entre os contadores, de um modo geral, pode dificultar o estabelecimento e uniformização dos limites de contagem de plaquetas para a indicação de transfusão. O uso do método de referência ICSH para amostras severamente plaquetopênicas sujeitas a erros pelos contadores, apesar de menos prática que as estimativas indiretas, ainda é o procedimento mais prudente. A utilização das mais novas gerações de aparelhos tende a tornar mais segura a tomada de decisões para transfusões terapêuticas em pacientes com risco de sangramento.

OLIVEIRA, R.A.G. Avaliação de métodos automatizados e manuais para contagem de plaquetas, em pacientes plaquetopênicos. São Paulo, 2000. 127p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

SUMMARY

The advent of the automated cell counting analyses which has brought a great improvement in the precision and accuracy in the counting of the blood cells in normal samples, is a consensus. However the counting of the platelets exact number in thrombocytopenic patients is still quite controversial. Due to the great tendency today of reducing the threshold of the platelets prophylactic transfusion for avoiding risks of transmitting diseases and diminishing high costs both for the patients and the institutions, we have urged more than never that methods should be reaching a more precise and accurate counting of these blood elements. Therefore our study tried to evaluate how precise and accurate are four blood cell counters; the ADVIA (Bayer), the STKS (Coulter), the H1 (Technicon) and the T-890 (Coulter), and two count chamber methods (Maspes-Jamra and the reference method, Brecher-Cronkite) as well as two indirect methods. One of these last mentioned, using the 20.000 conversion factor for transforming platelets per field into platelets per microliters (indirect method 1); and the other through comparing the field platelets/ field erythrocytes proportion to the platelets per microliters/erythrocytes per microliters (indirect method 2). This evaluation was performed both in normal samples as in severe thrombocytopenic ones, having as the reference parameter the results obtained by the method of the International Committee of Standardization in Haematology (ICSH 1984/1988). The results we have reached showed there was no significant differences between the automated blood counters and the ICSH method concerning the normal samples. However the Maspes-Jamra direct method has showed significantly higher counting results presenting average values of + 145.400 plt / μ L ($p < 0,001$) compared to the ICSH reference method. This is probably due to the free platelet plasma retention among the erythrocytes. It was also shown the excellent accuracy and precision of the counters concerning the target thrombocytopenic samples reached in

laboratory using diluting normal samples. Unlike these results, only the ADVIA counter, which uses two basis for counting platelets (volumetric measure and refractive index) has shown good correlation with the reference method results for samples with less than 30.000 plt/ μ L ($r = 0,947$). The other counters which uses only volumetric measuring as basis for platelets counting have not presented satisfactory results. Nevertheless, every counter has shown to be reliable in flagging results that could be exposed to counting errors. The results for the two indirect methods (CV = 26,02% with $p < 0,001$) have shown to be the less precise ones when compared to all the other methods, both automatic and counting chamber methods in thrombocytopenic samples. Therefore, we can infer that the precise counting of platelets in low levels is still a serious problem. The lack of the results correlation among counters can, in general, come to turn difficult to establish and to standardize of the prophylactic threshold of platelet transfusion. Although less practical than the indirect methods, the utilization of the reference method still is the most prudent way of verifying the possibility of automation spurious counting concerning the severely thrombocytopenic sample. The use of other associated basis besides volumetric measuring brought by the new generations of counters for platelets counting tends to turn safer the therapeutic decision to be taken in case of patients having bleeding risks.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO:

As plaquetas são elementos sanguíneos provindos dos megacariócitos na medula óssea, cuja função está intimamente relacionada ao processo hemostático.

Foram inicialmente descritas por Bizzozero (1882), que demonstrou sua adesividade, sua participação na trombose e seu papel na coagulação do sangue.

São estruturas heterogêneas em relação ao tamanho, densidade e características de coloração. Sua morfologia varia bastante dependendo do método empregado para análise, do anticoagulante e da temperatura (Maupin, 1969). Nos líquidos diluentes, "in vitro", as plaquetas são corpúsculos incolores, moderadamente refringentes, discóides ou elípticos. Em esfregaço de sangue corado pelos derivados do Romanovsky, aparentam forma arredondada ou mais alongada, com grânulos azurofílicos no citoplasma azul-claro.

Seu volume, para indivíduos sadios, varia entre 4 a 8 fentolitros (Bull et al., 1965; Frojmovic et al., 1982). Em alguns distúrbios caracterizados por acelerada destruição plaquetária (por ex. trombocitopenia auto-imune), trombocitopenias associadas a disfunção plaquetária, pós-esplenectomias, mielofibrose, policitemia vera, etc., pode haver aumento no seu diâmetro (Bithell, 1998). Por outro lado, plaquetas anormalmente pequenas podem estar associadas por exemplo a anemias aplásticas e hiperesplenismo (Frojmovic et al., 1982).

Assim como para os leucócitos e eritrócitos, a acurada contagem do número de plaquetas é de fundamental importância na prática médica. É a partir destas determinações que decorrem grande parte do diagnóstico e conduta terapêutica apropriada.

Além do seu uso como um dos parâmetros mais importantes na avaliação clínica, para evitar risco de sangramento em pacientes pré-cirúrgicos ou pacientes em unidades de terapia intensiva, como monitorizador durante as transfusões maciças de sangue, no diagnóstico diferencial e conduta terapêutica de alguns estados trombocitopênicos, como nas púrpuras trombocitopênicas idiopáticas

(PTI) (George et al., 1996), na púrpura trombocitopênico trombótica (PTT) (Sarode et al., 1997) e em outras coagulopatias de consumo como por coagulação intravascular disseminada (CIVD) ou trombocitopenias induzidas por drogas como a heparina (Chong et al., 1993; Nand et al., 1997; Warkentin, 1997), a determinação do real número de plaquetas no sangue periférico se torna crucial no controle de quimioterapias e de transfusões em pacientes onco-hematológicos (Gmur et al., 1991; Dickerhoff et al., 1995; Lawrence et al., 1995; Hanseler et al., 1996; Rebullá et al., 1997; Finazi, 1998; Navarro et al., 1998).

1.1. Relevância clínica das contagens de plaquetas:

A importância clínica da exatidão e da precisão das contagens de plaquetas se torna tanto mais crítica quanto maior for o grau de plaquetopenia. Ela é essencial quando as contagens atingem valores abaixo de 50.000 /mm³, onde o sangramento pós-traumatismos ou cirurgias pode ocorrer. Nas contagens inferiores a 20.000/ mm³, por estarem associadas a sérias tendências a sangramento espontâneo e principalmente quando valores estão abaixo de 5.000/ mm³, pode ocorrer sangramentos fatais no cérebro e no trato gastrointestinal (Cornbleet et al., 1985).

Apesar de ser uma prática comum em pacientes com leucemias agudas e trombocitopenias severas consequentes à terapia mielosupressora, o estabelecimento de um limite para transfusão profilática de plaquetas ainda continua bastante controverso (Finazzi, 1998).

Baseados nos estudos de Gaydos et al. (1962), boa parte das instituições tradicionalmente indica transfusão de plaquetas quando as contagens se situam em torno de 20.000/mm³ (Finazzi, 1998). Outros entretanto, questionam este valor e, na maioria dos casos, a preconizam quando os níveis de plaquetas atingem valores em torno de 10.000/mm³. (Slichter et al., 1978; Solomon et al., 1978; Gmur et al., 1991; Lawrence et al., 1995; Gil-Fernandes et al., 1996; Beutler et al., 1997; Kruskall et al., 1997; Barbui et al., 1998). Os valores de 20.000 plaq/mm³ estariam restritos apenas a pacientes com outras intercorrências clínicas simultâneas. Em 1991, Gmur et al., apesar de terem utilizado como parâmetro

para a administração rotineira de plaquetas o valor de 5.000 plaq/mm³, para pacientes sem manifestações hemorrágicas, reconhecem que este limite de contagem pode variar de paciente para paciente, aumentando ainda mais a importância da correta contagem de plaquetas. Dados de Navarro et al. (1998), sugerem que o limite profilático pode ser estabelecido seguramente em 10.000/mm³ durante a fase de indução e consolidação do tratamento de pacientes adultos com leucemia mielóide aguda *de novo*.

Com base nos mais recentes estudos publicados, a "American Society of Hematology" (Sherrill et al., 1996), se refere às contagens de plaquetas maiores que 10.000/mm³ como de muito pequeno risco de sangramentos. Entretanto, com níveis menores que 10.000/mm³ afirma não existirem dados suficientes para estabelecer em que intensidade os riscos de sangramentos aumentam à medida que os níveis de plaquetas se situem abaixo de 10.000/mm³ ou quando isto ocorre com níveis menores que 5.000/mm³. Apesar de haver uma tendência cada vez maior de os novos protocolos utilizarem limites profiláticos cada vez menores para indicação de transfusão.

Segundo Lawrence et al. (1995), o uso generalizado do limite de 20.000 plaq/mm³ pode refletir a falta de confiança na exatidão das contagens em amostras plaquetopênicas.

O desenvolvimento de métodos para avaliar a função plaquetária, requer exata e precisa contagem de plaquetas como requisito fundamental. A segurança na quantificação da bolsa de plaquetas preparadas para transfusão sanguínea também requer acurados procedimentos de contagem para viabilizá-la (Wertz et al., 1977).

A grande maioria dos principais sistemas de "escore" para tempo de sobrevivência de pacientes com mielodisplasias tem na determinação de plaquetas por mm³ de sangue um de seus importantes fatores de prognóstico (Mufti et al., 1985; Varela et al., 1985; Aul et al., 1988; Sanz et al., 1989; Goasguen et al., 1990; Aul et al., 1992; Velloso, 1992; Morel et al., 1993; Passmore et al., 1995). Alguns dos quais (Varela et al., 1985; Sanz et al., 1989) atribuem sistema de pontuação distinto em função do grau de plaquetopenia.

A determinação segura de plaquetas também é importante no controle de terapia para diminuição do número de plaquetas circulantes em pacientes com altas contagens destas células, como por exemplo no tratamento da fase crônica de pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) (Kunicka et al., 1998).

De um modo geral, a trombocitopenia é um achado comum em doentes graves. De 25 a 40% dos pacientes que requerem cuidados em unidades de terapia intensiva (UTI) possuem contagem de plaquetas abaixo de $100.000/\text{mm}^3$, e 2 a 3% apresentam valores abaixo de $20.000 \text{ plaq}/\text{mm}^3$. Casos de trombocitopênicos mais críticos estão associados a estados graves ou àqueles de longa duração nas UTI (Baughman et al., 1993; Bonfiglio et al., 1995; Chakraverty et al., 1996). Segundo Chamberland et al. (1995), de 20 a 40% das crianças admitidas em UTI possuem trombocitopenia; aproximadamente 30% dos recém-nascidos com trombocitopenia severa abaixo de $50.000 \text{ plaq}/\text{mm}^3$, relacionadas a infecções bacterianas, coagulação intravascular disseminada e plaquetopenias imuno-moduladas, sob o risco de hemorragia intracranial, recebem transfusão plaquetária. Transfusões profiláticas são dadas usualmente para crianças com menos de $20.000 \text{ plaq}/\text{mm}^3$. A duração da trombocitopenia, bem como a avaliação dos níveis de plaquetas de pacientes em UTI, podem definir a etiologia da doença (Alving et al., 1996).

Segundo a "American Society of Hematology", estados como de coagulação intravascular disseminada, púrpura trombocitopênico trombótica ou trombocitopenia induzida por heparina (TIH), que estão sujeitos a rápidas e perigosas depleções de plaquetas no sangue periférico, requerem um cuidado todo especial na contagem de plaquetas. Pacientes com estas patologias frequentemente podem reduzir suas contagens a valores abaixo de $10.000/\text{mm}^3$.

Há várias publicações abordando os limites hemostáticos mínimos de plaquetas em função de condições clínicas distintas. Embora não haja uma uniformidade entre os diversos "guidelines", de um modo geral, a manutenção dos níveis de plaquetas, para pacientes recebendo transfusões maciças, em valores acima de $50.000 \text{ plaq}/\text{mm}^3$ demonstra significativa diminuição de sangramento microvascular (Counts et al., 1979). Em situações não urgentes requerendo procedimentos invasivos, a contagem de plaquetas entre 30.000 e $50.000/\text{mm}^3$

pode prover ao paciente condições hemostáticas seguras. Esta conduta é comumente utilizada em pacientes com coagulopatias de consumo com pequeno risco de sangramento. (Foster et al., 1992; DeLoughery et al., 1996; Doefer et al., 1996).

Além da história clínica do paciente a fim de excluir outras causas de trombocitopenias, a contagem de plaquetas é primordial para diagnóstico, tratamento e monitorização terapêutica em pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática (PTI), sejam crianças, adultos ou mulheres grávidas (George et al., 1996). Os limites de corte para mudança de procedimentos terapêuticos são bastante próximos e a níveis muito baixo de plaquetas (George et al., 1996).

A ausência de transfusão, quando ela é necessária, é prejudicial ao paciente, por aumento do risco de sangramentos. Isto pode ocorrer em casos de superestimação de resultados. Por outro lado, transfusões desnecessárias acarretam elevação do custo para o paciente e a instituição (Ault, 1996). Além disso, podem aumentar o risco de transmissão de doenças virais, bacterianas (Goldman et al., 1991; Blajchman et al., 1992) ou por protozoários (Grant et al., 1989; Dodd, 1990; Schmunis, 1991), imunossupressão, reação enxerto versus hospedeiro, além da prevenção do desenvolvimento de aloimunização plaquetária (Consensus conference, 1987; Ault, 1996). Atualmente, várias estratégias visando reduzir a necessidade de plaquetas têm sido estudadas no sentido de diminuir os riscos de aloimunização e transmissão de doenças associadas com transfusão de hemoderivados. Dentre elas, a diminuição do limite de transfusão profilática de 20.000 para 10.000 plaq/mm³ (Sherrill et al., 1996).

Deste modo, é pertinente uma análise crítica das técnicas e métodos automatizados e manuais utilizados na determinação de plaquetas, em comparação com método de referência, com vistas à sua utilização, substituição, padronização ou adequação às exigências de segurança clínica, eficácia e relação custo/benefício, e ao atual estágio de desenvolvimento científico e tecnológico do nosso país.

1.2. Evolução histórica na contagem de plaquetas:

No processo evolutivo das determinações das células sanguíneas, dois procedimentos analíticos podem ser claramente definidos: os manuais e os automatizados.

Independentemente da tecnologia utilizada, os métodos de contagem de células podem ser divididos em dois grupos distintos: diretos e indiretos. Os métodos diretos, são baseados na determinação do número absoluto de células por volume, sem a dependência de correlação com qualquer outro fator ou método. Neste grupo se encontram as determinações manuais de plaquetas em hemocítômetro (câmara de Neubauer) e as contagens automatizadas. De modo distinto, os métodos indiretos necessitam de outras determinações para obter o valor de células por volume. As estimativas de plaquetas em extensão sanguínea corada, seja por correlação com o valor absoluto de hemácias, seja pelo uso de fator de conversão de plaqueta por campo para plaqueta por mm^3 , são exemplos típicos.

No que se refere particularmente à contagem de plaquetas, deve-se reportar inicialmente os métodos indiretos de contagem. Introduzidos por Rabl em 1896, sofreram algumas modificações por Gottlieb em 1908, por Fônio em 1912, por Stahl em 1921, Leschke em 1925, Hittmair em 1928, dentre outras (Olef, 1930; Tocantins, 1937). De um modo geral, suas contagens de plaquetas por volume de sangue eram determinadas a partir de estimativas em extensões coradas obtidas de sangue capilar. Para isso, era feita uma proporção entre o número de eritrócitos e de plaquetas por campo microscópico. Ao final da contagem do total de plaquetas por eritrócitos e, tomando por base a determinação global de hemácias em hemocítômetro, era obtido o número de plaquetas por mm^3 de sangue. Assim, as plaquetas eram determinadas indiretamente. Para níveis em torno de $250.000 \text{ plaq}/\text{mm}^3$, por mais que seja feito efetivamente, este procedimento está sujeito a um erro mínimo de 14% quando 1.000 eritrócitos são contados e 7% quando 4.000 hemácias são determinadas (Brecher & Cronkite, 1950). Além disso, a contagem de eritrócitos em câmara, que tem um erro em torno de 8%, também é requerida para a determinação da contagem de plaquetas (Brecher et al., 1952). Não obstante, sugere-se que

apenas extensões com distribuição uniforme de plaquetas devam ser avaliados (Dameshek, 1932) . A seleção de áreas do esfregaço onde haja distribuição uniforme das plaquetas, se por um lado é essencial à maior reprodutibilidade deste procedimento, por outro, sacrifica a distribuição aleatória das plaquetas (Brecher et al., 1952).

As primeiras contagens de plaquetas obtidas diretamente em hemocítmetro foram feitas a partir de metodologias que se utilizavam de microscopia óptica comum e líquidos diluidores não lisantes de hemácias. Assim eritrócitos e plaquetas poderiam ser vistos simultaneamente na câmara de contagem. Para isso, por necessitarem de uma boa distribuição das hemácias, eram usados graus de diluição bastante elevados (1:200, 1:400 , por ex). Mesmo em amostras com contagens normais, poucas plaquetas eram visualizadas, levando a pequena reprodutibilidade. A visualização simultânea de eritrócitos e plaquetas não permitia ao operador diminuir o grau de diluição, em função da impossibilidade de visualização segura das plaquetas frente a uma "cortina de eritrócitos". Esta limitação técnica tornava estas metodologias pouco precisas e exatas, principalmente para pacientes plaquetopênicos que necessitariam obrigatoriamente de uma grande redução da diluição prevista na técnica original para níveis normais. Métodos como os de Rees-Ecker (Rees & Ecker, 1923), Wright-Kinnicutt (Wright & Kinnicutt, 1911), Buckman-Hallisey (Buckman & Hallisey, 1921), são exemplos clássicos deste perfil técnico de contagem.

Desde os primeiros estudos de Tocantins em 1937, avaliando 116 métodos distintos, que a acurácia das contagens de plaquetas é colocada em dúvida. Segundo estimativa feita por Maupin, em 1969, somando os métodos mais antigos, suas variações e novas metodologias, o número de técnicas para avaliar plaquetas excederiam a 160. Este fato refletiria a inadequação das técnicas disponíveis e a necessidade de novos sistemas de contagens (Rowan et al., 1972). Os valores estipulados para indivíduos normais obtidos pelos diferentes métodos indiretos eram os mais divergentes possíveis. Dados que variavam em média de 234.000 como os estabelecidos por Fônio, de 469.000 por Pratt, de 619.000 por Olef (Damesheck, 1932), 750.000 como por Horwitz até valores em média de 800.000 plaq/mm³ como os obtidos por Kemp (Olef, 1930). Para os métodos diretos, apesar de também haver discordância, de um modo geral, os

dados da literatura revelavam como valores médios para indivíduos normais, resultados mais homogêneos. Valores de 210.000 obtidos por Aynauld, de 297.000 obtidos por Wright-Kinnicutt, de 300.000 por Buckman-Hallisey, de 380.000 por Preiss, de 536.000 por Casey-Helmer, até de 600.000 por Puchberger (Olef, 1930).

O uso de líquidos diluidores lisantes de eritrócitos que proporcionava a variação do grau de diluição em função do número de plaquetas por quadrante na câmara, associado ao advento da microscopia de contraste de fase, que facilitava a distinção entre as plaquetas e debris celulares, vieram proporcionar uma melhor determinação de plaquetas diretamente em hemocitômetro. Foi desta maneira que, em 1950, Brecher e Cronkite (Brecher & Cronkite, 1950) criaram o método direto de contagem de plaquetas, ainda hoje utilizado como de referência. (Wertz & Koepler, 1977; ICSH, 1984/1988).

Em 1955, Maspes e Jamra, propuseram metodologia alternativa que facilitava a visualização das plaquetas em câmara de contagem, utilizando plasma rico em plaquetas (PRP) (Maspes & Jamra, 1955). Deste modo, segundo os autores, não haveria a necessidade do uso de microscopia de contraste de fase para a diferenciação destas células no hemocitômetro. Além disso, também trazia a vantagem, como no método de Brecher-Cronkite, especificamente em relação aos métodos de Rees-Ecker, Wright-Kinnicutt, Buckman-Hallisey, por ex., de poder alterar o grau de diluição dependendo do número de plaquetas dispostos nos quadrantes da câmara de contagem, inclusive usar o plasma puro, para casos de pacientes severamente plaquetopênicos, sem alterar o grau de reprodutibilidade nos resultados.

Foi somente a partir de 1978 que as contagens manuais indiretas determinadas pela multiplicação por fator de conversão de plaquetas por campo microscópico para plaquetas por milímetro cúbico, obtidos empiricamente a partir de estudos comparativos (em relação às contagens diretas em câmara ou dos contadores automáticos), passaram a ser utilizadas como procedimentos alternativos de contagem. Também data desta época os primeiros relatos de comparações, para uma mesma casuística, de resultados obtidos direta e indiretamente (Abbey, 1978; Nosanchuk et al., 1978; Apibal et al., 1979; Bell &

Neely, 1980; Mogodan, 1980).

A automação em hematologia (análise fluxométrica) inicia-se em 1953, por obra de Wallace Coulter, que patentiou a impedância elétrica como princípio básico para contagem das células sanguíneas. Mais tarde, outras metodologias, como a utilização de princípios eletro-óptico por dispersão de luz passaram a ser desenvolvidas. Recentemente princípios mais modernos, como através de análise simultânea por volume e índice de refração tem sido utilizados.

Durante as últimas décadas, houve um grande crescimento na área da automação em hematologia. Isto trouxe numerosas mudanças nos laboratórios de hematologia clínica. Primeiramente, através dos rápidos avanços dos contadores para as contagens de hemácias e leucócitos na década de 60. Nos anos 70, surgem os primeiros contadores de plaquetas. A partir da década de 80, além das contagens globais para eritrócitos, leucócitos e plaquetas, surge a primeira geração de contadores diferenciais de leucócitos, com 10 parâmetros para as contagens globais e 3 parâmetros para diferencial de leucócitos (Gulati et al., 1992).

Os primeiros métodos automatizados de contagem de plaquetas utilizavam, como amostra, preparados de plasma rico em plaquetas (PRP) obtidos a partir de centrifugação diferencial prévia ou sedimentação gravitacional. Estes procedimentos, entretanto, consumiam mais tempo, além do risco de impor resultados inexatos (Wertz et al., 1980) em função de variáveis que poderiam interferir na eritrosedimentação (Bull et al., 1965; Oliveira et al., 1999).

O fato de estes primeiros contadores semi-automatizados de apenas um parâmetro (contavam apenas plaquetas) e que se utilizavam de PRP, por não conseguirem diferenciar as plaquetas dos eritrócitos, levou alguns pesquisadores como Eastham et al. (1963), Bull et al. (1965), Price et al. (1968), a maiores estudos para padronização de protocolos para obtenção de PRP.

Naturalmente, uma nova geração de contadores em sangue total passou a ser desenvolvida. Dotados de sistemas eletrônicos mais sofisticados de avaliação do tamanho de células para distinguir plaquetas dos demais elementos sanguíneos, não apresentavam mais a necessidade de fase prévia de separação

do sangue.

Com o passar dos anos e a evolução dos modelos e desenvolvimento da análise multiparamétrica, os aparelhos mais novos passaram a incluir a contagem de plaquetas como parte integrante do perfil hematológico no sangue periférico.

Entretanto, até final dos anos 70, boa parte dos laboratórios americanos ainda perfaziam suas contagens de plaquetas em câmara de contagem (retículo de Neubauer) e microscópio óptico convencional (Wertz et al., 1980).

Provavelmente pelo fato de proporcionar maior poder de trabalho nas grandes rotinas, além de aumentar a exatidão e precisão de resultados houve uma tendência natural à maior utilização dos contadores automatizados, e como consequência, uma maior valorização dos resultados das contagens de plaquetas.

Apesar de os primeiros procedimentos de automação em hematologia estarem bem estabelecidos com respeito a hemácias e leucócitos (Barnard et al., 1969; Nelson, 1969) sua satisfatoriedade não se estendia às contagens de plaquetas (Rowan et al., 1972). A acurácia e precisão dos contadores automáticos no que se refere às contagens de plaquetas são de mais difícil obtenção que para leucócitos e hemácias (Ross et al., 1979). Estudos de Wertz e Triplet (1976) demonstraram grande variação de resultados entre laboratórios, principalmente em função da falta de controle primário de calibração para os vários aparelhos. Para estes Autores, os contadores automáticos devem ser calibrados diretamente, bem como controlados indiretamente por sangue com determinação prévia obtida por método de referência. Assim estas discrepâncias entre laboratórios poderiam ser evitadas.

A citometria de fluxo (CMF) é um método moderno de estudo das células, que resulta da aplicação de conhecimentos físicos (óptica, tecnologia Laser, princípios de difração, refração, impedância, fluorescência etc.), de computação e biológicos (produção de anticorpos monoclonais) e bioquímicos.

A utilização da automação (citometria de fluxo) no laboratório clínico de rotina para as determinações e estudo dos elementos sangüíneos no hemograma,

se restringe, entretanto, às análises de tamanho e complexidade interna das células, não utilizando para isso os referidos anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos (mais utilizados em diagnóstico de neoplasias hematológicas-leucemias e linfomas). Apesar do seu alto custo, ela passou a oferecer vantagens na triagem de hemogramas normais e na melhor análise de algumas doenças hematológicas (Faulhaber et al., 199-; Gulati et al., 1992).

Sabe-se hoje que a automação é capaz de nos proporcionar contagens seguras e reprodutíveis, em amostras normais, tanto para contagens globais quanto para diferencial. (Ross et al., 1986; Combleet et al., 1993; Jones et al., 1995; Llompart et al., 1995; Vives-Corrans et al., 1996). Ela é essencial em laboratórios que façam um grande número de exames (Ross et al., 1980). A grande dúvida se limita àquelas amostras em que um determinado parâmetro interfere na exatidão de um outro ou quando o número de células por mm^3 está bastante diminuído (Dickerhoff et al., 1995; Hanseler et al., 1996).

Especificamente, no que se refere à contagem de plaquetas, uma possibilidade de limitação do uso dos contadores automatizados é a sua inabilidade em discriminar corretamente estes elementos sangüíneos de partículas interferentes como fragmentos de eritrócitos, "debrís" celulares, etc ou a possibilidade de diminuição na contagem real nos casos de aumento do número de macroplaquetas ou de aglutinação ("clumps").

Pseudo-plaquetopenias em contagem automatizada podem ocorrer em várias situações como presença de macroplaquetas (Stanworth et al., 1999); crioaglutinação plaquetária (Shreiner & Bell, 1973; Isobe et al., 1983); aglutinação EDTA dependente (Gowland et al., 1969; Solanki et al., 1983; Lombarts et al., 1988; Ohnuma et al., 1988) como em algumas malignidades, doenças hepáticas agudas e crônicas, condições auto-imunes ocasionais (Schreiner & Bell, 1973; Veenhoven et al., 1979); satelização (Bolton & Boyd, 1963; Crome & Barkan, 1963; Field & Macleod, 1963; Signy & Green, 1963; Kjeldsberg et al., 1974; Solanki et al., 1983). Por outro lado, contagens de outras partículas celulares e inclusões do tamanho equivalente ao limite estabelecidos pelos contadores, associadas a numerosos fatores incluindo Corpúsculos de Jolly ou de Pappenheimer (Morton et al., 1980), fragmentos de eritrócitos e leucócitos

(Rowan et al., 1972; Stass et al., 1977; Stass et al., 1979; Morton et al., 1980) microesferocitose (Akwari, 1982), leucemia de células cabeludas (Stass et al., 1977), linfoma em fase leucêmica (Stass et al., 1979) podem causar contagens erroneamente elevadas. Em todos estes casos, a comprovação das contagens espúrias obtidas pela automação foi determinada por contagens manuais.

A possibilidade da não identificação pelos contadores de possíveis anormalidades nas amostras (alarmes – “flags”) decorrentes de alterações morfológicas nas células sanguíneas ou da presença de artefatos, que possam gerar resultados falsamente-elevados também pode acarretar má conduta terapêutica. Segundo Cornbleet et al. (1985), cerca de 30% das amostras plaquetopênicas com “flags” (alarmes) nos aparelhos apresentam falsa contagem e devem ser determinadas por método de referência manual em hemocítômetro.

Mesmo nos dias atuais, a correta contagem de plaquetas ainda continua sendo uma matéria delicada. Isto se deve ao fato, acima descrito, de os instrumentos que são usados para contagem de plaquetas não discriminarem bem plaquetas de outras partículas celulares e precipitados que causem sinais similares (Dickerhoff et al., 1995). Segundo estes Autores, métodos visuais em hemocítômetro ainda são frequentemente usados na rotina laboratorial para verificar baixas contagens de plaquetas e, apesar de oferecerem algumas desvantagens técnicas, ainda devem ser utilizados.

Por outro lado, muitos laboratórios usam como método de avaliação de possíveis erros nos contadores, a contagem manual a partir da determinação indireta de plaquetas em estenção corada e liberam seus resultados tomando por base os valores obtidos por estas metodologias indiretas. Segundo Lawrence et al. (1995), grande parte dos laboratórios americanos utilizam este critério laboratorial para controle de resultados dúbios.

Pelo fato de os métodos manuais em hemocítômetro, apesar de serem mais trabalhosos e demorados, poderem ser úteis em contagens críticas de amostras plaquetopênicas em que a automação sugira incoerência na contagem, e que o método de referência estabelecido pelo International Committee for Standardization in Haematology (ICSH) é em câmara de contagem, far-se-a uma

análise comparativa prévia de algumas metodologias manuais, incluindo outro método em hemocitômetro e contadores eletrônicos em amostras normais; verificar-se-a a capacidade de precisão e exatidão dos contadores em baixas contagens de plaquetas a partir de amostras normais diluídas e a capacidade de precisão e exatidão destes aparelhos em amostras verdadeiramente plaquetopênicas, tendo como parâmetro de referência os resultados obtidos em câmara de contagem utilizando sangue total diluído em oxalato de amônio a 1%. Em virtude da não necessidade de utilização de métodos indiretos em amostras normais, estudo comparativo destes com os aparelhos automáticos e métodos manuais em câmara será feito apenas nas amostras plaquetopênicas ou com risco de erro de contagem pelos aparelhos.

A comprovação e/ou padronização de contagens fidedígnas em amostras plaquetopênicas poderá ser útil no auxílio do diagnóstico, prognóstico e conduta terapêutica desses pacientes.

Não identificar a possibilidade de risco e não proceder transfusão profilática em função de uma superestimação na contagem de plaquetas (para 10.000 e 20.000 plaq/mm³) ou para boa conduta clínica em pacientes pré-cirúrgicos, no prognóstico de pacientes leucêmicos, com mielodisplasias, ou proporcionar boa monitorização terapêutica em pacientes purpúricos, coagulopatas, ou em unidades de terapia intensiva dentre outros, justifica a escolha deste tema como objeto de trabalho.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Estudar a exatidão (acurácia) e a precisão (reprodutibilidade) dos contadores automáticos e métodos manuais diretos e indiretos na contagem de plaquetas, em amostras com contagens normais e de pacientes trombocitopênicos;

Estabelecer o grau de confiabilidade dos resultados da contagem de plaquetas obtidos por técnicas manuais e automatizadas, nas plaquetopenias, com base nos resultados do método de referência;

Avaliar a exatidão e precisão dos métodos automatizados em amostras plaquetopênicas, sem alterações morfológicas ou alarmes, obtidas artificialmente em laboratório após diluição seriada de amostras normais;

Verificar a confiabilidade dos “alarmes” dos aparelhos nas amostras plaquetopênicas;

Determinar, nas amostras plaquetopênicas em estudo, a validade do uso da estimativa de plaquetas em extensão corada como controle de qualidade de possíveis contagens erradas pelos aparelhos e o uso de seus resultados como um dado para conduta clínica em pacientes com risco de sangramento;

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

3- CASUÍSTICA E METODOLOGIA:

3.1. Casuística:

Foram investigadas 40 amostras de doadores voluntários normais, funcionários do Instituto Adolfo Lutz (IAL), e 70 amostras de pacientes plaquetopênicos provindas do Serviço de Hematologia Clínica do Hospital dos Servidores do Estado de São Paulo (HSPE).

Duas amostras com fragmentos de eritrócitos, por não serem plaquetopênicas, foram analisadas à parte.

3.2. Métodos utilizados:

O critério de seleção dos respectivos métodos: em extensão sanguínea corada (esfregaço); em câmara usando sangue total e plasma rico em plaquetas (PRP), por automação usando impedância e/ou sistema óptico de detecção (scatter de luz) ou até mesmo índice de refração celular, foi no sentido de possibilitar discutir todas as possibilidades analíticas pertinentes a grande parte dos princípios ainda hoje utilizados para contagem de plaquetas, ou seja, sangue total em extensão, sangue total em hemocitômetro (usando líquido diluidor lisante de eritrócitos, pela possibilidade de ajuste de diluição frente a plaquetopênicos), PRP em hemocitômetro, e por automação usando métodos distintos por impedância simples com leitura tripla num mesmo canal (Coulter modelo T-890), impedância simples com leitura tripla em 3 canais distintos (Coulter modelo STKS), sistema óptico simples para análise volumétrica, com leitura em 1 canal (H1 Technicon) e sistema óptico duplo com análise volumétrica e por índice de refração, com leitura em um canal de contagem (Bayer modelo ADVIA-120).

Contadores automáticos:

De um modo geral, os contadores automáticos têm como princípio de contagem um sistema de impedância (condutividade), um sistema óptico de leitura ou ambos. Mais recentemente, alguns aparelhos como o ADVIA-120 da Bayer (Kunicka et al., 1998; Stanworth et al., 1999) e o Cell-Dyn 4.000 da Abbott (Ault, 1996), tem se utilizado de contagens ópticas em duas dimensões (análise bidimensional em ângulos distintos).

O sistema de impedância elétrica (Coulter, 1953) de contagem é baseado na detecção e quantificação das mudanças na resistência elétrica produzidas por uma partícula suspensa em um líquido condutor. Além dos aparelhos Coulter, os Toa Sysmex e alguns dos Cell-Dyn se utilizam deste princípio.

Os métodos ópticos de contagem se utilizam de um sistema óptico de detecção após incidência de uma luz laser. A luz que é refratada, difratada ou dispersa pelas células que passam, uma a uma, por uma pequena área iluminada em um sistema óptico, é detectada por uma célula fotoelétrica. Esta célula detectora gera pulsos elétricos de magnitude proporcional ao tamanho da partícula. Assim como o sistema de impedância, os pulsos são contados e também usados para determinar o volume da partícula. Os instrumentos Technicon H1, H2 e H3, se utilizam deste princípio. Alguns contadores da Abbott (Cell-Dyn) se utilizam simultaneamente de princípios ópticos e de impedância.

3.2.1. ADVIA-120 Hematology System, Bayer: (ADVIA);

Tem como princípio para contagem de plaquetas uma análise bidimensional (sistema 2D-PLT Method) que se baseia na análise integrada das medições de glóbulos vermelhos e plaquetas. A diferenciação das plaquetas das demais partículas não-plaquetárias (fragmentos de eritrócitos, debrís tissulares ou mesmo glóbulos vermelhos bastante microcíticos), a partir da qual é traçado o citograma de plaquetas (PLT Scatter), é feita a partir de estudo comparativo de sinais de dispersão de luz adquiridos em baixos ângulos – 2° a 3° - (amplificado 30 vezes; alto ganho) e à altos ângulos – 5° a 15° - (amplificado 12 vezes; alto ganho) que são convertidos em valores de volume e índice de refração,

respectivamente (**anexo 2**). O citograma de plaquetas (PLT Scater) mostra células com volumes de 0 (zero) a 30 (trinta) fentolitros (fl). A identificação das células e contagem para células com volumes maiores do que 30 fl é feita utilizando-se o citograma para eritrócitos (RBC Scater). Amostras com plaquetas gigantes, apesar de apresentarem volumes que incidam no intervalo limite para contagem de eritrócitos, pelo índice de refração não são computados como glóbulos vermelhos, mas sim como plaquetas.

Os valores de índice de refração para plaquetas gigantes, maiores que 20 fl, variam de 1.35 a 1.40. Deste modo, estas células são computadas no citograma PLT Scater. As plaquetas grandes são também identificadas no citograma RBC Scater baseando-se em seus referidos valores de índice de refração, em volume inferior a 60 fl. Deste modo, o histograma Plaqueta-Volume contém plaquetas e plaquetas gigantes com volumes de até 60 fl.

A determinação da contagem de plaquetas e hemácias por amostra, é feita a partir de um só canal, após única contagem.

Alarmes:

Sempre que algum artefato não-plaquetário no qual o aparelho não conseguiu estabelecer um critério confiável de leitura interferir na caracterização da população plaquetária em análise, o aparelho deflagra um sinal de asterisco (*), indicando assim que a amostra em questão deverá ser reavaliada por método de referência.

A indicação de alterações morfológicas, em sistemas de cruces (+, ++ ou +++) (**anexo 1**) indica a intensidade da alteração que foi caracterizada com este sinal, entretanto sem necessidade de reavaliação, desde que não haja caracterização simultânea do parâmetro (plaquetas) com asterisco, havendo assim, por parte do aparelho segurança na contagem em relação ao aspecto morfológico sinalizado com (+). Deste modo, a ausência de asterisco para uma alteração morfológica indica que, dentro do scater de plaquetas não houve confusão por parte do aparelho, portanto, pelo índice de refração não houve possibilidade de dúvida ou interferência de qualquer outra partícula na contagem de plaquetas.

3.2.2. Coulter STKS : (STKS);

Tem como princípio de contagem, o sistema de impedância elétrica (Coulter, 1953). Este princípio é baseado na propriedade que as células têm de serem elementos não-condutores de corrente. Assim, quando uma suspensão de células é aspirada, a proporção que cada uma delas passa por uma abertura entre dois eletrodos de platina, sob corrente elétrica constante, leva a um impedimento da passagem desta corrente, momentânea diminuição da condutância, gerando um pico de voltagem (**anexo 4**). Uma vez que a magnitude de cada pulso é proporcional ao tamanho da célula, cada célula contada tem simultaneamente seu volume mensurado. Assim, eritrócitos e plaquetas, por serem de tamanhos diferentes, são quantificados separadamente em um mesmo canal. A contagem de leucócitos é feita em um canal distinto, onde uma prévia lise dos eritrócitos é procedida. Pulsos elétricos equivalentes a valores entre 2 e 20 fentolitros (fl) são classificados como plaquetas.

Assim como o VCM para as hemácias, as plaquetas medidas e contadas tem seu volume médio determinado como VPM.

Para determinação do número de eritrócitos e plaquetas, após aspiração e diluição específica em solução isotônica, a amostra se destina a três aberturas distintas (3 canais de contagem) por onde vão passar as partículas a serem analisadas. Para cada canal é determinado o número de plaquetas. O resultado final de contagem para aquela amostra será o valor médio obtido pelos três canais distintos.

Para evitar que uma mesma partícula seja contada repetidamente, os aparelhos Coulter utilizam um processo de arraste contínuo ("sweep flow"), onde um jato contínuo do diluente passa pela parte posterior do tubo onde se encontra o canal de abertura (canal de passagem das partículas). Deste modo, todas as células que tenham passado por este tubo são imediatamente arrastadas para uma câmara de depósito (**anexo 5**).

Alarmes:

Este aparelho é constituído de alertas definitivos, definidos pelo operador, em função dos valores pré-estabelecidos como normalidade. Por exemplo: Um

valor estabelecido como normalidade para o número de plaquetas por mm^3 de 150.000 a 400.000, terá deflagrado alarme de trombocitopenia, para qualquer contagem abaixo deste limite inferior, sem necessariamente haver pedido de revisão (review). Além da trombocitopenia, a trombocitose, a presença de macroplaquetas (VPM acima do valor pré-determinado) e de microplaquetas (VPM abaixo do valor pré-determinado) são alarmes definitivos.

Os alertas sem controle do operador (alarmes suspeitos) já vem predeterminados pelo fabricante no software do aparelho (dados não revelados pelo fabricante). Em relação ao canal de eritrócitos e plaquetas, são eles: "clumps" (agregados plaquetários), presença de plaquetas gigantes ("giant platelets"), população dimórfica de hemácias, fragmentos de eritrócitos, eritrócitos microcíticos, aglutinação de eritrócitos e presença de eritroblastos..

Qualquer contagem em que o aparelho não conseguiu estabelecer um critério confiável de caracterização das plaquetas, há pedido de revisão (R) (**anexo 3**). Da mesma forma, nas amostras em que houver diferenças significativas (critério não revelado pelo fabricante) nas contagens dos 3 canais, não terão seus resultados liberados (há apenas o aparecimento de linhas tracejadas, bem como do pedido de revisão). Quando uma das contagens tiver valor distinto das outras duas, o aparelho libera como resultado a média das duas contagens, com pedido de revisão (R).

3.2.3. H1 Technicon System: (H1);

Seu princípio de contagem é baseado na determinação do volume celular em função do grau de dispersão da luz laser incidente sobre as partículas que atravessam uma pequena abertura.

Após aspirada a amostra, a alíquota destinada à contagem de hemácias e plaquetas vai para um canal específico onde são diluídas, fixadas e sofrem uma transformação isovolumétrica (são transformadas em esferas). A medida que cada partícula passa através de uma célula fotoelétrica (foco hidrodinâmico), iluminada por luz laser de hélio/ neônio, há uma interrupção deste feixe de luz, e uma dispersão (espalhamento) dos raios incidentes. Para as hemácias, a luz dispersa, medida a baixos ângulos ($2,5^{\circ}$ a $3,5^{\circ}$) e altos ângulos (5° a 15°) determinará respectivamente, o volume e a concentração de hemoglobina de

cada célula contada (Groner & Tycko, 1980; Kim & Ornstein, 1983; Tycko et al., 1985) (**anexo 7**). As plaquetas tem apenas a determinação do seu volume através dos baixos ângulos (Groner & Tycko, 1980). Assim, por serem de volume e conteúdo distintos, plaquetas e hemácias são determinadas simultaneamente em um mesmo canal de contagem.

A determinação da contagem de plaquetas e hemácias por amostra, é feita a partir de um só canal, após única contagem.

Elementos sanguíneos com diâmetro de até 45 fl, são incluídos como plaquetas. Aqueles com volume entre 45 e 65 fl são caracterizados como plaquetas gigantes (software versão 1.3 da Technicon).

Alarmes:

Quando o percentual de sinais presentes na área destinada a plaquetas gigantes (45 a 65 fl) for maior que 10%, há sinal representado pela forma de asterisco (pedido de revisão) correspondente ao alarme LP* ("large platelets"). De modo similar, a presença maior que 10% de hemácias com menos de 60 fl determina a presença de asterisco (revisão) correspondente ao alarme SR* ("small RBC").

Para amostras em que a curva de distribuição do volume de plaquetas não siga padrão logarítmico normal, ou o ápice da curva não se encontre entre os valores de 4 a 12 fl, há deflagração de sinal representado por um asterisco correspondente ao código NF* ("no fit"), indicando interferências por restos celulares ou debris. O código NP (noise) significa que, apesar de similares aos valores de dispersão das plaquetas, mais de 20% dos sinais não seguiram um padrão confiável de contagem. Ruidos, restos celulares ou debris podem causar NP.

Segundo o fabricante, todas as amostras identificadas com alarmes merecem revisão de contagem.

3.2.4. Coulter T-890: (T-890);

É uma versão anterior ao STKS, sem capacidade para contagem diferencial de leucócitos. O T-890 não determina o volume médio de plaquetas (VPM) nem possui alarmes específicos para plaquetas gigantes ou "clumps".

Para a contagem global de eritrócitos e plaquetas, utiliza o tradicional princípio Coulter de contagem (ver anexo). Deste modo, quando partículas em suspensão numa solução eletrolítica (cloreto de sódio), passam através de um tubo com uma abertura de 50 micrômetros por 60 micrômetros de espessura, entre dois eletrodos e causam uma interrupção momentânea da passagem de corrente elétrica correspondente a limites entre 2 e 20 fentolitros, são consignadas como plaquetas.

De modo distinto ao STKS, a contagem em triplicata de eritrócitos e plaquetas pelo T-890 se dá consecutivamente através de apenas 1 canal (uma abertura) . Deste modo, a média obtida como resultado de plaquetas e hemácias, para cada amostra, é feita a partir de três contagens sucessivas pela mesma abertura.

Possui sistema “sweep flow” (anexo 5) similar ao do STKS.

Alarmes:

Quando os resultados obtidos da contagem em triplicata não se enquadram nas diferenças estatísticas definidas pela Coulter (valores não revelados pelo fabricante) há pedido de revisão pelo aparelho. Quando uma das contagens em triplicata tiver valor distinto das outras duas, o aparelho libera a média obtida pelas duas determinações mais próximas, e com asterisco (*). Quando as três determinações tiverem valores divergentes (para os valores definidos pela Coulter) não há liberação do resultado. Caso os valores parciais para obtenção da média não apresentem diferenças estatísticas e/ou pulsos de corrente que sigam padrão anormal para plaquetas, o resultado é liberado sem pedido de revisão ou asterisco.

A presença de agregados plaquetários (“clumps”), debris, microplaquetas ou qualquer outro interferente onde os pulsos de corrente não sigam um padrão que defina com segurança o que é artefato ou plaqueta, o aparelho libera alarme e pedido de revisão (R). O aparecimento da mensagem R2 indica resultados não tão divergentes. O alarme R3 significa maior possibilidade de erro. A possibilidade de erros múltiplos e mais grosseiros tem como alarme o código RM (anexo 8). Entretanto, de modo indistinto, em todos há pedido e necessidade de revisão (R = review).

Métodos manuais diretos:

3.2.5. Método Brecher-Cronkite : (BrCr);

Fundamento: determinação direta das plaquetas em hemocítmetro, após diluição em uma solução hipotônica lisante das hemácias, de modo a obter o número de plaquetas por mm^3 de sangue.

Amostra: sangue total colhido com anticoagulante (EDTA);

Líquido diluidor: solução de oxalato de amônio a 1%. Seu preparo foi feito essencialmente como descrito por Dacie & Lewis (1979;1995).

Foi pesada uma pequena quantidade de oxalato de amônio (1g); dissolvida em 100 ml de água destilada ou deionizada; filtrada através de papel filtro com $0,22 \mu\text{m}$ e acondicionado a 4°C .

Técnica:

Através de uma micropipeta de volume fixo, diluir 1: 20 o volume de sangue total (previamente homogeneizado), em solução diluidora; misturar por aspiração e expulsão; encher a câmara de Neubauer; colocá-la em cuba úmida por 20 min; proceder à contagem em aumento de 400x, em microscópio de contraste de fase;

OBS: Para cada amostra foram procedidas 3 diluições distintas;

Contagem: foi usado como critério, o valor mínimo de 200 plaquetas para cada uma das determinações em triplicata, para cada diluição. Quando o número de plaquetas dispostos em 1/5 do retículo central da câmara foi menor que 200, foi diminuído o grau de diluição para 1:10. Para os casos em que, ainda assim não se obtinha 200 plaquetas, houve a contagem de toda a área do retículo central da câmara (**anexo 9**), ou, até mesmo mais de um lado do retículo.

Cálculo: $\text{Plaq}/\text{mm}^3 = P \times f_d \times f_a$

P: número total de plaquetas contadas;

f_d : fator de correção para o grau de diluição da amostra;

f_a : fator de correção para o volume (área x altura) da amostra, presente na área do retículo utilizada para contagem;

Exemplo: P = 227 plaquetas;

Diluição 1: 20 . Portanto, o fator diluição = 20 ;

Contagem em 1/5 da área central do retículo. Como a área total do quadrante central da câmara equivale a 1/10 de mm² e a altura da câmara = 0,1 mm (1/10 do mm), o volume de amostra presente em toda área central = 1/10 do mm³. A quinta parte deste volume será 1/5 x 1/10 = 1/50 do mm³. Portanto fa = 50;

$$\text{Plaq/mm}^3 = 227 \times 20 \times 50 = 227.000 \text{ plaq/mm}^3$$

3.2.6. Método Maspes-Jamra : (Maspes);

Fundamento: Determinação direta do número de plaquetas em hemocítômetro, a partir de plasma rico em plaquetas obtido através de baixa força centrífuga ou sedimentação espontânea, diluído em solução isotônica, de modo a obter o número de plaquetas por mm³ de sangue após correção do número de plaquetas por mm³ de plasma pelo valor hematócrito.

Amostra: Plasma rico em plaquetas (PLP) obtido por centrifugação de 1.000 rpm por 3min.

Líquido diluidor: Sulfato de sódio (3 g); cloreto de sódio (0,7g); Tween-80 (2,0 ml); água destilada qsp 100 ml.

Técnica:

Através de uma micropipeta de volume fixo, diluir 20 µl de PRP em 1 ml do líquido diluidor (diluição 1:50); misturar por aspiração e expulsão; encher a câmara de Neubauer; colocá-la em cuba úmida por 20 min; proceder à contagem em aumento de 400x (10x ocular X 40x objetiva) em condensador baixo, na mesma região da câmara destinada à contagem de hemácias (1/5 da área central do retículo);

OBS: Para cada amostra foram procedidas 3 diluições distintas. Para cada diluição foram procedidas contagens em triplicata.;

Contagem:

Também foi usado como critério, o valor mínimo de 200 plaquetas para cada uma das determinações em triplicata, para cada diluição.

Quando o número de plaquetas dispostos em 1/5 do retículo central da câmara foi menor que 200, foi diminuído o grau de diluição para 1:20 ou 1:10. Para os casos que, ainda assim não se obtinha 200 plaquetas, houve diluição em 1:5 ou até mesmo 1:2. Se ainda assim, não fossem obtidas 200 plaquetas, a contagem era feita a partir de toda a área do retículo central da câmara (**anexo 9**).

Cálculo:

$\text{Plaq/mm}^3 \text{ sangue} = \text{Plaq/mm}^3 \text{ plasma} \times \text{fator hematócrito};$

Fator hematócrito = $(100 - \text{Ht}) / 100$; Ht (hematócrito);

$\text{Plaq/mm}^3 \text{ plasma} = P \times \text{fd} \times \text{fa}$

P: número total de plaquetas contadas;

fd: fator de correção para o grau de diluição da amostra;

fa: fator de correção para o volume (área x altura) da amostra, presente na área do retículo utilizada para contagem;

Exemplo: P = 321 plaquetas;

Diluição 1: 10; portanto, fd = 10

Contagem de 1/5 da área central ($1/5 \times 1/10 = 1/50$); fa = 50

Hematócrito do paciente = 27%; fator ht = $(100 - 27) / 100 = 0,73$

$\text{Plaq/mm}^3 \text{ plasma} = 320 \times 50 \times 10 = 160.000 \text{ plaq/mm}^3$

$\text{Plaq/mm}^3 \text{ sangue} = 160.500 \times 0,73 = 116.800 \text{ plaq/mm}^3$.

Métodos manuais indiretos:

3.2.7. Método de contagem de plaquetas em extensão de sangue corada 1: número médio de plaquetas por campo x fator de conversão para mm^3 . (Apibal et al., 1979; Bell & Neely, 1980; Nosanchung et al., 1978): (**“mét. ind. 1”**);

Fundamento: Consiste na conversão do número médio de plaquetas por campo microscópico (aumento de 1000x), dispostas na região destinada à análise da morfologia das hemácias, para número de plaquetas por mm^3 , através da multiplicação por uma constante (20.000).

Esta constante foi obtida a partir de estudos comparativos entre o número de plaquetas campo e o número de plaquetas por mm^3 , onde $\text{plaq } \text{mm}^3 / \text{plaq campo} = \text{constante}$. Os valores experimentais obtidos por (Apibal, 1979; Bell, 1980; Nosanchung, 1978) determinaram que para cada plaqueta disposta num aumento de 1000x, na região de análise das hemácias, corresponderia a 20.000 plaquetas por mm^3 .

Técnica: contar 10 campos microscópicos, em extensão de sangue corada por derivados do Romanovsky, em aumento de 1000x, exatamente na região destinada à avaliação da morfologia das hemácias (local onde elas apenas se tocam, sem haver qualquer sobreposição) (**anexo 11**); tirar a média de plaquetas por campo; multiplicar o valor médio obtido por 20.000. O resultado final será o número de plaquetas por mm^3 de sangue.

3.2.8. Método de contagem de plaquetas em extensão de sangue corada 2: n° médio de plaquetas por campo $\times (n^{\circ} \text{eritr}/\text{mm}^3) / n^{\circ}$ médio de eritrócitos por campo. (Esta metodologia foi por nós adaptada, a partir dos tradicionais princípios indiretos, porém sem limitação do número de eritrócitos por campo avaliados e tomando por base as contagens de eritrócitos dos contadores): (**“mét. ind. 2”**);

Fundamento: Tem como princípio o fato de que a relação entre plaquetas e hemácias dispostas na extensão (esfregaço corado) traduz a relação em valor absoluto (por mm^3) entre estas células no sangue periférico. Deste modo, uma vez determinada esta relação na extensão, e sabendo-se do número de eritrócitos por mm^3 de sangue, pode ser obtido o número de plaquetas por mm^3 .

Técnica: Contar simultaneamente o número de eritrócitos e plaquetas em 10 campos microscópicos. Multiplicar o número médio de plaquetas por campo pelo número de eritrócitos por mm^3 e dividir pelo valor médio obtido de hemácias por campo.

3.3. Metodologia:

A avaliação dos métodos para determinação de plaquetas foi dividida em conjuntos de procedimentos, executados em 3 fases, a saber: 1ª. Comparação dos contadores automáticos, ADVIA, STKS, H1 e T-890, com métodos manuais em hemocítmetro, de Maspes-Jamra e de Brecher-Cronkite, em indivíduos sadios; 2ª. Avaliação da precisão e exatidão dos contadores automáticos, em amostras normais e plaquetopênicas obtidas artificialmente por processo de diluição seriada a partir das próprias amostras normais; 3ª. Determinação do grau de acurácia e reprodutibilidade dos métodos automáticos, manuais, diretos em hemocítmetro e indiretos, através da estimativa de plaquetas em extensões de sangue coradas, "mét. ind. 1" e "mét. ind. 2", em pacientes plaquetopênicos. Estudo da validade dos seus resultados como valor diagnóstico, conduta terapêutica ou para controle transfusional de plaquetas em amostras críticas.

Na 1ª e 3ª fases do nosso trabalho, foi utilizado como valor padrão de referência, o método preconizado pelo International Committee for Standardization in Haematology 1984/1988 (ICSH), o método Brecher-Cronkite. Na 2ª fase, os valores de referência utilizados para cada aparelho, foram os próprios resultados obtidos por cada contador, nas amostras pré-diluição.

Todas as determinações manuais, diretas e indiretas, preparo de reagentes, manipulação de amostras para diluição seriada e padronização dos métodos, além das contagens automatizadas pelo Coulter T-890 foram realizadas na Seção de Hematologia do IAL. As demais análises por automação através do ADVIA (Bayer), Coulter STKS e H1 Technicon, foram realizadas no Laboratório de Hematologia Clínica do HSPE, São Paulo/SP.

3.3.1. 1ª fase: Estudo comparativo entre os contadores automáticos e os métodos diretos em hemocítmetro, em amostras de indivíduos normais:

Nesta fase foram analisadas 33 amostras de indivíduos sadios, obtidas de funcionários do Instituto Adolfo Lutz (IAL), com prévio consentimento, no período de maio/99 a dezembro/99.

As amostras foram colhidas pela manhã, na própria seção de coleta do IAL através de punção de veia periférica e coletadas em tubos Vacutainer com

capacidade para 5ml, utilizando K_3EDTA como anticoagulante. Elas foram analisadas num período de no máximo 8 horas. Inicialmente por cada um dos aparelhos e em duplicata, logo após foram feitas as determinações em câmara de contagem (contagem em triplicata) sendo primeiramente feita a diluição de sangue total em solução de oxalato de amônio a 1%, utilizando 1:20 como grau de diluição, para o método BrCr. Só então, procedeu-se a obtenção do PRP para o método de Maspes, através de centrifugação diferencial de 1.000 rpm por 3 minutos (descrito pelos autores) de aproximadamente 4 ml de sangue. Para este método foi utilizada a diluição de 1:50.

3.3.2. 2ª fase: Avaliação da precisão e da exatidão dos contadores automáticos em amostras plaquetopênicas produzidas artificialmente em laboratório por processo de diluição seriada, a partir de amostras de doadores voluntários com número normal de plaquetas, e que não tinham acionado qualquer alarme nos aparelhos: (Metodologia adaptada de Lawrence et al, 1995)

Nesta fase, foram utilizadas amostras, com prévio consentimento, de 4 indivíduos normais (25 ml de sangue), uma amostra a cada dia e usados como “valores alvo de contagem” a serem obtidos: 2.000; 5.000; 10.000; 20.000 e 30.000 plaquetas/mm³ de sangue.

As amostras foram colhidas em tubos com K_3EDTA (Vacutainer, Becton-Dickinson) na seção de coleta do IAL. Após serem homogeneizadas suavemente, foram contadas por cinco vezes em cada um dos contadores, previamente calibrados, onde a média dos resultados para contagem de plaquetas e contagem de eritrócitos serviram de base para, respectivamente, os cálculos de diluição para obtenção dos grupos alvo de plaquetopênicos, e para averiguação da possibilidade de erro na diluição.

Após a obtenção da média das cinco contagens de cada aparelho, foram calculados os respectivos fatores de diluição, para cada grupo alvo. As diluições seriadas foram obtidas utilizando solução isotônica (Isoton- Coulter). Elas foram preparadas, para cada uma das 4 amostras e para cada contador isoladamente. O fator de diluição utilizado para obter as amostras alvo para cada aparelho foi calculado isoladamente a partir da média da contagem prévia por cinco vezes, de

cada um dos contadores, para cada amostra. Por exemplo: um determinado aparelho obteve média de plaquetas/mm³ pós-quintuplicata, de 201.000 plaq/mm³. Para obter contagem alvo de 5.000 plaq/mm³ devemos usar o fator de diluição $201.000/5.000 = 40,2$. Deste modo, para a obtenção da amostra plaquetopênica alvo de 5.000 plaq/mm³ para o referido contador, a diluição seria de 1:40,2.

As pipetas utilizadas no processo de diluição seriada foram previamente calibradas. Além disso, a exatidão de cada diluição foi avaliada fazendo-se a comparação das contagens prévias dos eritrócitos obtidas em cada aparelho (média das cinco contagens pré-diluição) multiplicando-se a média da contagem de hemácias de cada doador pelo fator de diluição usado para preparação da amostra "plaquetopênica desejada". Este parâmetro, calculado matematicamente pela fórmula: fator de diluição / valor alvo de diluição, foi chamado de K (constante de acurácia da diluição). Valores acima de 1 indicam que a concentração de células vermelhas na diluição final foi maior que a ideal, indicando erro de pipetagem causador de concentração artefactual na diluição. Valores menores que 1 indicam que a pipetagem levou a um excesso de líquido diluidor. Os resultados obtidos para "K" foram utilizados para correção dos resultados com erros de diluição.

Para cada contagem alvo de plaquetas, foram feitas 3 diluições distintas. Para cada diluição, e para cada amostra alvo a ser obtida, em cada aparelho, foram feitas contagens em triplicata, perfazendo assim 9 contagens para cada amostra alvo, para cada contador, totalizando 45 contagens por aparelho, ou seja: 5 (grupo de contagens alvo) x 9 = 45. Como são 4 aparelhos, então $45 \times 4 = 180$. Além disso, como são 4 amostras, foram realizadas nesta etapa um total de $180 \times 4 = 720$ determinações.

Fase 2b: Estudo da precisão dos contadores automáticos, em diferentes níveis de plaquetas: de 50.000 a 800.000 plaq/mm³.

Além do estudo acima referido (fase 2a), para determinação da precisão dos contadores em diferentes níveis de plaquetas (de maior amplitude), utilizamos 3 outras amostras de doadores voluntários com contagens normais de plaquetas, a fim de obter-mos 6 níveis distintos com valores que variaram de

aproximadamente 50.000 plaq/mm³ a 800.000 plaq/mm³, obtidos a partir de manipulação daquelas amostras sem alterações morfológicas ou alarmes nos contadores, com plasma rico em plaquetas e plasma livre de plaquetas obtidos por centrifugação diferencial e eritrócitos da própria amostra de sangue. Nesta fase não se teve a intenção de ajustar as contagens para os mesmos valores para cada aparelho, mas apenas níveis distintos de plaquetas aos quais foram obtidas 10 contagens por cada aparelho, para cada nível de contagem.

3.3.3. 3ª fase: Estudo comparativo entre os métodos automáticos e os manuais (diretos e indiretos) para contagem de plaquetas em pacientes plaquetopênicos; análise de alarmes nos contadores automáticos.

Nesta fase, após aprovação em Comitê de Ética, foram analisadas 70 amostras de indivíduos plaquetopênicos obtidas do Serviço de Hematologia do Hospital dos Servidores do Estado de São Paulo (HSPE) no período de maio/99 a dezembro/99. Em sua maioria, eram pacientes submetidos à quimioterapia antineoplásica (**anexo 12**).

As amostras foram analisadas por todos os métodos num período de no máximo 8 horas. Inicialmente por cada um dos aparelhos e em triplicata, logo após procedeu-se ao preparo dos esfregaços de sangue e coloração pelo panóptico rápido. Ao final foram procedidas as determinações em câmara de contagem sendo primeiramente feita a diluição em sangue total para só então proceder-se à centrifugação para obtenção do plasma rico em plaquetas para o método Maspes. Como na 1ª fase, a fim de evitar possíveis tendências, as determinações manuais foram realizadas sem que o operador soubesse dos resultados dos contadores. As contagens em esfregaço só foram feitas no dia seguinte.

As 70 amostras utilizadas nesta fase foram analisadas separadamente em 2 grupos: no grupo 1 foram incluídas apenas as 43 amostras que tiveram contagem de plaquetas menores que 30.000/mm³ (plaquetopênicos críticos) por pelo menos um dos contadores utilizados. O outro grupo foi constituído de todas as 70 amostras que possuíam contagem abaixo de 100.000 plaq/mm³.

Para obtenção de PRP para o método de Maspes, as 23 primeiras amostras desta fase foram submetidas a centrifugação de 1.000 rpm por 3 min. Em virtude do pequeno volume de sangue que sobrava após todas as

determinações em sangue total, e observando a possibilidade de perda de plaquetas, como prevista originalmente (Maspes, 1955), passamos a utilizar 1.000 rpm por 1 min nas amostras subsequentes. Para confirmação da perda de plaquetas, as amostras 24 a 38 tiveram suas contagens de plaquetas feitas pelos dois processos de centrifugação.

Para os métodos que se utilizam de hemocítmetro (câmara de Neubauer), a fim de aumentar o grau de acurácia e precisão, foram feitas 3 diluições distintas e para cada diluição foram feitas contagens em triplicata (9 determinações por amostra). Para cada determinação foi estabelecido um critério de contagem de no mínimo 200 plaquetas, nos cinco quadrados do quadrante central da câmara destinados à contagem de eritrócitos e plaquetas. As amostras em que o número de plaquetas era inferior a 200 foram diluídas em menor proporção, ou então foram contadas em número maior de quadrados do quadrante central, até a obtenção mínima de 200 células.

Os dois métodos para contagem indireta de plaquetas em lâmina com extensão de sangue corado ("mét. ind.1" e "mét. ind.2") foram determinados simultaneamente. Em cada campo foi contado o número de plaquetas, tendo-se o cuidado adicional de averiguar o número de eritrócitos por campo (para "esfreg.2"). As contagens foram feitas em objetiva de imersão (100x) utilizando-se oculares de (10x), num aumento total de 1000x. O local da extensão corada utilizado para contagem foi o descrito por Abbey & Belliveau (1978), Nosanchung et al. (1978), Apibal et al. (1979) e Bell & Neely (1980). Cada contagem teve um total de 10 campos avaliados. Todas as contagens foram feitas em triplicata. Também foi estimado o percentual de plaquetas gigantes (plaquetas com diâmetro maior ou igual à metade do diâmetro dos eritrócitos) observados em relação ao total de plaquetas contadas em 30 campos, bem como a presença ou não de aglutinação de plaquetas ("clumps").

Obs: Duas amostras com fragmentos de eritrócitos, por não serem plaquetopênicas, apesar de não terem sido incluídas na nossa casuística da 3ª fase, foram analisadas à parte.

Análise de alarmes (*flags*):

Com a finalidade de determinar o grau de confiabilidade dos alarmes nos contadores, do total das 70 amostras analisadas na 3ª fase, para cada aparelho, foram determinados: a) o percentual de amostras com *flags*; b) o percentual de amostras sem *flags*; c) o percentual de amostras com *flags* sem repetição; d) o percentual de amostras com pedido de revisão; e) o percentual de ausência de pedidos de revisão em amostras com diferenças significativas; além de discutir o tipo de alarme deflagrado em cada um dos aparelhos. Para isso usamos a seguinte nomenclatura e critério de inclusão:

Alarme: qualquer indicador dado pelo aparelho de alteração morfológica na população de plaquetas (plaquetas gigantes ou agregados) ou qualquer outro interferente onde o aparelho não consiga estabelecer um critério confiável de caracterização das plaquetas.

0 = sem alteração morfológica ou alarme;

1 = plaquetas gigantes;

2 = agregados de plaquetas (clumps);

3 = interferentes como debris (restos de leucócitos -fragmentos nucleares ou citoplasmáticos- ou de tecidos mortos ou lesados); distribuição anormal dos picos elétricos de corrente (eletronic noise); microplaquetas; precipitados químicos; complexos imunes; eritrócitos de tamanho menor que seu limite de caracterização como célula vermelha; fragmentos de hemácias (esquisócitos); estroma de hemácias; eritrócitos fantasmas (sem hemoglobina – Ghosts), bolhas no sistema ou qualquer outro interferente não-plaquetário que possa gerar confusão na caracterização das plaquetas.

Repetição: deflagração do alarme nas 3 contagens;

0 = não houve repetição do alarme ou da alteração morfológica em pelo menos uma das 3 contagens;

1 = houve repetição do alarme ou da alteração morfológica nas 3 contagens;

Revisão:

0 = não houve, por parte do fabricante, o alerta de que a amostra necessitaria de revisão por método de referência;

1 = houve, por parte do fabricante, o alerta de que a amostra necessitaria de revisão por método de referência.

Critério de inclusão de alarme e pedido de revisão, por aparelho:

ADVIA: consideramos como alarme-positivos, as amostras com alterações morfológicas (*Morfologic flags*) ou que houveram pedido de revisão (caracterizadas pelo asterisco *). Para pedido de revisão, só foram consideradas as amostras que apresentaram sinal de asterisco (*).

STKS: foram consideradas como alarme-positivas, as amostras que tiveram pedido de revisão, juntamente àquelas em que só houve caracterização do alarme morfológico (*suspeito- suspected flag* ou *definitivo- definitive flag*). Para pedido de revisão, só foram incluídas as amostras com pedido de *review* (R).

H1: consideramos como alarme e pedido de revisão todas as amostras que apresentaram sinais representados pelo sinal de asterisco, sendo observado, porém, o código referente a cada asterisco na 2ª tela (monitor de trabalho) do aparelho.

T-890: Todas as amostras caracterizadas pelo pedido de revisão (*review*: R2, R3 ou RM) ou sinais representados por asterisco, foram consideradas como alarmes e pedido de revisão.

3.4. Análise estatística:

1ª fase: Os resultados foram comparados através da análise de variância e teste de Tukey entre os métodos que utilizam sangue total como amostra (contadores automáticos e método de referência) e também entre todos, indistintamente do tipo de amostra utilizada, sendo assim incluindo o método de Maspes, que se utiliza de plasma rico em plaquetas (PRP) como amostra. Estudo comparativo de cada método em análise com o método ICSH (BrCr), bem como dos contadores entre si, feito através de teste "t" pareado. Também foram avaliadas a correlação e a análise de regressão linear entre métodos.

2ª fase: Foram determinados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação para os resultados das contagens de plaquetas por grupo alvo, utilizando para isso programa EXCEL versão 97.

Os valores obtidos para os grupos alvo de plaquetas, serviram de base para o estudo de linearidade e da precisão dos contadores em amostras sem alterações morfológicas e com níveis muito baixos de plaquetas (amostras plaquetopênicas obtidas em laboratório), através da análise de regressão linear.

Os resultados observados das contagens em quintuplicata nas amostras "in natura", pré-diluição, juntamente com os valores pós diluição ("contagens-alvo") serviram de base para a comparação do poder de reprodutibilidade dos aparelhos em amostras sem alterações morfológicas, tanto em baixas quanto em contagens normais de plaquetas, através de comparação dos coeficientes de variação.

3ª Fase: Os resultados de cada método foram comparados através de teste "t" pareado, com os do método de referência (BrCr). Foi avaliada a correlação e a análise linear de regressão entre métodos, além da análise de variância entre eles tanto para o grupo com menos de 100.000 plaq/mm³ quanto para grupo de plaquetopênicos com contagens inferiores a 30000 plaq/mm³.

Nesta fase também foi feita a análise em separado das amostras com contagens abaixo de 20.000, entre 10.000 e 20.000 ou acima de 10.000 plaq/mm³ com base nos resultados obtidos pelo método BrCr. Para estas amostras foi determinado, para cada método, o percentual de casos que ultrapassaram cada valor limite. Incluindo apenas as amostras com valores superiores, também foi determinado, para cada método, o percentual de amostras com resultados discrepantes (superestimação significativa) discriminado como percentual de amostras com erro significativo. O critério por nós utilizados foi em função dos limites destacados na literatura (20.000 e 10.000 plaq/mm³) para transfusão profilática de plaquetas em pacientes sob quimioterapia antitumoral.

RESULTADOS

4- RESULTADOS:

Os resultados obtidos neste trabalho foram divididos pelas fases que ele foi realizado.

4.1. 1ª Fase: Análise comparativa entre os contadores automáticos e os métodos manuais em hemocitômetro, em amostras de indivíduos normais:

Nossos resultados obtidos a partir de amostras de doadores normais, sem alterações morfológicas ou alarmes nos aparelhos, listados nas Tabelas 1.1 a 1.3 não indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os contadores ADVIA, H1 e T-890 e o método de referência. Houve diferença estatística, com contagens discretamente maiores do método de referência (+12.500 plaq/mm³, teste "t" pareado com $p < 0,01$) em relação ao contador STKS (tabela 1.1). A análise de variância, $p > 0,5$ (tabela 1.3) e o teste de Tukey (tabela 1.2) também apresentaram valores bastante satisfatórios. Por outro lado, houve grande divergência de resultados entre os demais métodos e o método de Maspes, que utiliza PRP como amostra. Os valores médios deste método revelaram níveis de +145.400 plaq/mm³ acima dos valores do método de referência (teste "t" pareado com $p < 0,001$) (tabela 1.1) e análise de variância com $p < 0,001$ (tabela 1.3). Além disso, a diferença percentual observada (grau de inexatidão) em relação ao método de referência foi diretamente proporcional ao hematócrito (tabela 1.4).

Tabela 1.1 – Teste "t" pareado. Comparação dos métodos automatizados e método de Maspes em relação ao método de referência nas amostras de indivíduos normais (1ª fase)

Métodos (Média [#] ± D.P.)		Dif. entre médias	Diferença (A-B)** em		Teste t par.	
BrCr (A)*	B	(A-B)**	95% int. conf.		t	p
(264,1± 54,8)	ADVIA (267,7±50,6)	-3,6	-10,53 até	3,04	-1,12	0,270
(264,1± 54,8)	STKS (251,6±46,6)	+12,5	5,10 até	19,78	3,45	0,002
(264,1± 54,8)	H1 (266,6±50,9)	-2,5	-10,57 até	5,36	-0,66	0,513
(264,1± 54,8)	T890 (261,3±50,9)	+2,8	-5,88 até	11,24	0,64	0,528
(264,1± 54,8)	Maspes (409,5±79,2)	-145,4	-164,15 até	-126,79	-15,9	<0,001

Comparação das médias das contagens de plaquetas através de teste "t" pareado, em amostras com níveis acima de 150.000 plaq/mm³ e sem "flags" nos contadores (n=33).

* (A) = Método de referência (Brecher-Cronkite: média = 264,1 ± 54,8 x 1.000 plaq/mm³);

** Diferença entre os resultados dos métodos B e do método A, em plaquetas x 1000/mm³;

D.P = desvio padrão

(plaq x 1000/mm³)

Tabela 1.2 - Análise de variância (Teste Tukey) entre os contadores automáticos e o método de referência nas amostras de indivíduos normais (1ª fase)

Métodos	ADVIA (267,7)*	STKS (251,6)*	H1 (266,6)*	T-890 (261,3)*	Br.Cr** (264,1)*
ADVIA		0,725	0,999	0,988	0,995
STKS			0,777	0,944	0,471
H1				0,994	0,989
T-890					0,901

Análise de variância (teste Tukey) entre os métodos que se utilizam de sangue total como amostra (método de referência e contadores automáticos), tendo como variável a média de plaq x 1000 /mm³ em amostras com níveis acima de 150.000 plaq/mm³ e sem "flags" nos contadores (n=33).

** (BRECHER-CRONKITE)

* Média de plaq x 1000/mm³

Tabela 1.3 – Análise de variância entre métodos automatizados, método Maspes e método de referência nas amostras de indivíduos normais (1ª fase).

	F	p
(A)	0,774	> 0,5
(B)	36,15	< 0,001

(A) - método de referência (BrCr) e contadores automáticos.

(B) - métodos em hemocítômetro (Maspes e BrCr) e contadores automáticos.

F = valor da variância entre os métodos avaliados; p = nível de significância.

Estudo comparativo das médias de plaq/mm³ dos resultados através da análise de variância entre os métodos que se utilizam de sangue total como amostra (método referência e contadores automáticos- A) e todos os métodos diretos (automáticos e manuais, incluindo assim o método Maspes que se utiliza de plasma rico em plaquetas como amostra- B), tendo como variável a média de plaq/mm³ obtidas nas amostras com níveis acima de 150.000 plaq/mm³ e sem "flags" nos contadores (n=33).

Tabela 1.4 – Comparação dos resultados entre o método de Maspes e o método de referência (BrCr) de acordo com os níveis de hematócrito, nas amostras com níveis acima de 150.000 plaq/mm³ (n=33), 1ª fase.

Grupo por Hematócrito	Maspes (plaq/mm ³)	BrCr (plaq/mm ³)	N	*Dif. %
A (37,0%)	343.000	251.750	4	+36,3
B (39-43%)	422.600	286.000	22	+47,8
C (45-51%)	408.700	247.300	7	+65,3

* Diferença em percentagem entre o valor Maspes e o valor BrCr.

4.2. 2ª fase: Análise de exatidão e precisão dos contadores automáticos em amostras normais e “plaquetopênicas alvo” pós-diluição seriada:

Os resultados apresentados às tabelas 2.1 a 2.8 mostram os valores obtidos pelos contadores automáticos em amostras de indivíduos normais sem alterações morfológicas ou “flags” nos aparelhos e nas amostras plaquetopênicas obtidas em laboratório a partir daquelas amostras normais, após processo de diluição seriada (“plaquetopênicos alvo”). A tabela 2.9 mostra os valores médios de contagem e seus coeficientes de variação em níveis de plaquetas mais amplos (de 50.000 a 800.000/mm³) obtidas em laboratório, também a partir de amostras normais (sem alarmes) com e sem diluição.

Exatidão dos contadores:

Para os contadores ADVIA, STKS e H1, a diferença entre os valores médios obtidos e os valores alvo desejados, para as 36 determinações por grupo de contagem (contagens em triplicata para 3 diluições para cada amostra) foram de apenas 6% a 33%, para o grupo de 2.000; de 1,4% a 5,4%, para o grupo de 5.000; de -2,3% a 0,3%, para o grupo de 10.000, de -4,5% a 1,2% para o grupo de 20.000 ou de -1,6% a -0,1% para o grupo de 30.000 plaq/mm³. O coulter T-890 obteve valores médios para as 36 determinações de 11 a 16,5% menores que os valores alvo desejados, para os grupos de 10.000 a 30.000 plaq/mm³. Para os grupos alvo de 2.000 e 5.000, os resultados foram de respectivamente -2% e de -19,05% em relação ao valor alvo desejado (tabelas 2.1 a 2.5), (figura 1).

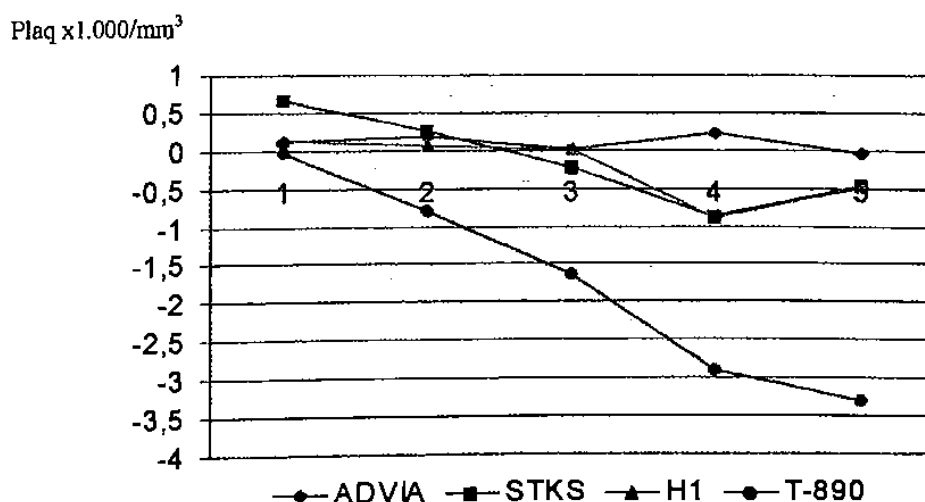


Figura 1. Diferenças em valor absoluto de plaq x 1.000/mm³ entre o valor alvo obtido e o valor alvo desejado por grupo de amostras plaquetopênicas de laboratório (2.000 (1); 5.000 (2); 10.000 (3); 20.000 (4) e 30.000 (5), para cada um dos contadores automáticos.

Tabela 2.1 - Contagem de plaquetas obtidas pelo ADVIA-120 Hematology System, em amostras plaquetopênicas produzidas em laboratório, a partir de amostras normais que sofreram processo de diluição seriada, (2ª fase).

Valor alvo	Média Plaq (x1000/mm ³)	CV%	K	Média plaq Corrig.# (x1000/mm ³)	Amplitude (x1000/mm ³)
Alvo 2.000					
Amostra 1	2,00	13,6	1,088	1,83	1-3
Amostra 2	2,11	6,73	1,017	2,07	2-3
Amostra 3	2,00	0	1,064	1,88	2
Amostra 4	2,89	21,21	1,064	2,72	2-4
Total	2,25	26,45*(10,38)**	1,058	2,12	
Alvo 5.000					
Amostra 1	5,00	0	1,033	4,84	5
Amostra 2	5,66	5,72	1,089	5,19	5-6
Amostra 3	5,55	11,27	1,00	5,55	5-7
Amostra 4	5,33	11,16	1,054	5,06	4-8
Total	5,39	10,96*(7,04)**	1,041	5,18	
Alvo 10.000					
Amostra 1	10,67	10,43	1,093	9,76	8-12
Amostra 2	10,67	8,46	1,03	10,36	9-12
Amostra 3	10,22	3,25	1,056	9,68	9-11
Amostra 4	10,77	3,86	1,054	10,22	10-12
Total	10,58	10,05*(6,5)**	1,058	10,01	
Alvo 20.000					
Amostra 1	19,78	4,97	1,025	19,29	18-23
Amostra 2	22,44	5,74	1,014	22,13	21-25
Amostra 3	20,55	6,69	1,07	19,20	18-24
Amostra 4	21,33	5,25	1,047	20,37	19-23
Total	21,03	8,27*(5,66)**	1,039	20,24	
Alvo 30.000					
Amostra 1	28,89	3,26	0,981	29,44	26-31
Amostra 2	31,55	3,0	1,005	31,39	29-34
Amostra 3	31,22	4,25	1,07	29,18	28-34
Amostra 4	31,55	2,75	1,056	29,88	30-35
Total	30,80	6,57*(3,32)**	1,028	29,97	

K (constante de controle da diluição): K >1 concentração artefactual; K < 1 diluição artefactual.
n = 9 para cada amostra (3 diluições, cada uma em triplicata); 1 –4 representam diluições seriadas de sangues obtidos de 4 doadores voluntários. Total de 180 contagens,36 por grupo alvo.

* Coeficiente de variação do total de determinações em todas as amostras.

** Média dos CVs das quatro amostras.

Valor corrigido após multiplicação da média por "K".

CV = coeficiente de variação.

Tabela 2.2 - Contagem de plaquetas obtidas pelo Coulter STKS, em amostras plaquetopênicas produzidas em laboratório, a partir de amostras normais que sofreram processo de diluição seriada, (2ª fase).

Valor alvo	Média Plaq (x1000/mm ³)	CV%	K	Média plaq Corrig.# (x1000/mm ³)	Amplitude (x1000/mm ³)
Alvo 2.000					
Amostra 1	2,00	0	0,998	2,00	2
Amostra 2	3,22	9,43	0,964	3,34	3-4
Amostra 3	2,89	5,89	1,00	2,89	2-3
Amostra 4	2,78	20,86	1,122	2,47	2-4
Total	2,72	22,26* (9,04)**	1,021	2,66	
Alvo 5.000					
Amostra 1	4,67	6,99	0,954	4,89	4-5
Amostra 2	6,11	2,48	0,992	6,16	6-7
Amostra 3	5,44	8,67	1,00	5,44	5-6
Amostra 4	4,55	10,36	0,987	4,60	4-5
Total	5,19	14,92* (7,12)**	0,983	5,27	
Alvo 10.000					
Amostra 1	9,11	1,68	0,998	9,13	9-10
Amostra 2	10,55	5,42	0,992	10,64	10-12
Amostra 3	9,44	4,99	0,927	10,18	9-10
Amostra 4	8,78	6,65	0,962	9,13	8-10
Total	9,47	9,47* (4,68)**	0,969	9,77	
Alvo 20.000					
Amostra 1	17,99	2,57	0,984	18,29	17-19
Amostra 2	19,89	1,6	0,950	20,93	19-21
Amostra 3	18,22	2,59	0,991	18,38	17-19
Amostra 4	17,89	2,4	0,959	18,65	17-19
Total	18,58	5,44* (2,29)**	0,971	19,13	
Alvo 30.000					
Amostra 1	28,00	3,93	0,975	28,72	27-31
Amostra 2	27,66	3,94	0,953	29,03	25-31
Amostra 3	29,44	2,13	0,978	30,10	28-31
Amostra 4	28,89	4,38	1,009	28,63	25-31
Total	28,89	6,14* (3,59)**	0,978	29,54	

K (constante de controle da diluição): K > 1 concentração artefactual; K < 1 diluição artefactual.
n = 9 para cada amostra (3 diluições, cada uma em triplicata); 1 - 4 representam diluições seriadas de sangues obtidos de 4 doadores voluntários. Total de 180 contagens, 36 por grupo alvo.

* Coeficiente de variação do total de determinações em todas as amostras.

** Média dos CVs das quatro amostras.

Valor corrigido após multiplicação da média por "K".

CV = coeficiente de variação.

Tabela 2.3 - Contagem de plaquetas obtidas pelo H1 Technicon System, em amostras plaquetopênicas produzidas em laboratório, a partir de amostras normais que sofreram processo de diluição seriada, (2ª fase).

Valor alvo	Média Plaq (x1000/mm ³)	CV%	K	Média plaq Corrig.# (x1000/mm ³)	Amplitude (x1000/mm ³)
Alvo 2.000					
Amostra 1	2,22	13,6	1,004	2,21	1-4
Amostra 2	2,33	12,63	1,00	2,33	2-3
Amostra 3	2,22	13,47	0,989	2,24	2-3
Amostra 4	2,22	27,08	1,250	1,78	1-3
Total	2,25	26,44* (16,69)**	1,06	2,14	
Alvo 5.000					
Amostra 1	5,11	8,39	0,988	5,17	4-6
Amostra 2	4,78	10,10	0,850	5,62	4-6
Amostra 3	4,78	15,54	1,013	4,72	4-6
Amostra 4	4,89	3,37	1,025	4,77	4-5
Total	4,89	12,55* (9,35)**	0,969	5,07	
Alvo 10.000					
Amostra 1	10,55	5,51	0,983	10,73	10-12
Amostra 2	10,00	11,76	0,909	11,00	8-12
Amostra 3	9,11	5,20	0,996	9,15	8-10
Amostra 4	9,55	8,18	1,033	9,24	9-11
Total	9,80	10,97* (7,66)**	0,980	10,03	
Alvo 20.000					
Amostra 1	19,78	5,79	1,001	19,76	18-22
Amostra 2	19,22	3,06	0,954	20,15	18-20
Amostra 3	18,77	5,27	1,041	18,03	18-21
Amostra 4	19,11	4,59	1,035	18,46	18-21
Total	19,22	5,89* (4,68)**	1,007	19,1	
Alvo 30.000					
Amostra 1	31,77	4,52	1,027	30,93	28-36
Amostra 2	29,89	3,29	0,952	31,39	28-32
Amostra 3	29,33	5,05	1,043	28,12	28-32
Amostra 4	29,55	5,13	1,056	28,00	27-32
Total	30,08	6,48* (4,49)**	1,019	29,52	

K (constante de controle da diluição): K > 1 concentração artefactual; K < 1 diluição artefactual.
 n = 9 para cada amostra (3 diluições, cada uma em triplicata); 1-4 representam diluições seriadas de sangues obtidos de 4 doadores voluntários. Total de 180 contagens, 36 por grupo alvo.

* Coeficiente de variação do total de determinações em todas as amostras.

** Média dos CVs das quatro amostras.

Valor corrigido após multiplicação da média por "K".

CV = coeficiente de variação.

Tabela 2.4 - Contagem de plaquetas obtidas pelo Coulter T-890, em amostras plaquetopênicas produzidas em laboratório, a partir de amostras normais que sofreram processo de diluição seriada, (2ª fase).

Valor alvo	Média Plaq (x1000/mm ³)	CV%	K	Média plaq Corrig.# (x1000/mm ³)	Amplitude (x1000/mm ³)
Alvo 2.000					
Amostra 1	2,00	0	1,00	2,00	2
Amostra 2	2,00	0	1,046	1,91	2
Amostra 3	2,00	16,16	1,014	1,97	1-3
Amostra 4	2,00	0	1,103	1,97	2
Total	2,00	11,78* (4,04)**	1,04	1,96	
Alvo 5.000					
Amostra 1	4,22	11,97	0,965	4,37	3-5
Amostra 2	4,22	10,17	0,975	4,33	4-5
Amostra 3	4,44	3,67	1,001	4,43	4-5
Amostra 4	3,89	4,29	1,058	3,68	3-4
Total	4,14	14,13* (7,52)**	0,999	4,20	
Alvo 10.000					
Amostra 1	8,67	0	0,994	8,72	8-9
Amostra 2	8,22	3,77	1,01	8,14	8-9
Amostra 3	8,77	5,38	1,00	8,77	8-10
Amostra 4	8,11	1,89	1,04	7,8	8-9
Total	8,44	6,51* (2,76)**	1,011	8,36	
Alvo 20.000					
Amostra 1	17,33	3,4	0,997	17,38	16-18
Amostra 2	16,78	4,21	0,996	16,85	15-18
Amostra 3	17,67	3,31	0,989	17,87	17-19
Amostra 4	16,67	4,32	1,028	16,22	16-19
Total	17,11	5,29* (3,81)**	1,002	17,10	
Alvo 30.000					
Amostra 1	27,43	2,6	1,00	27,43	26-31
Amostra 2	25,67	1,05	0,985	26,16	24-27
Amostra 3	27,22	2,85	0,991	27,47	26-30
Amostra 4	26,99	1,75	1,050	25,70	26-28
Total	26,83	5,23* (2,06)**	1,006	26,69	

K (constante de controle da diluição): K > 1 concentração artefactual; K < 1 diluição artefactual.

n = 9 para cada amostra (3 diluições, cada uma em triplicata); 1 - 4 representam diluições seriadas de sangues obtidos de 4 doadores voluntários. Total de 180 contagens, 36 por grupo alvo.

* Coeficiente de variação do total de determinações em todas as amostras.

** Média dos CVs das quatro amostras.

Valor corrigido após multiplicação da média por "K".

CV = coeficiente de variação.

Tabela 2.5 – Diferença em percentagem e em valor absoluto (plaq/mm³) entre os valores desejados (grupos alvo) e os valores obtidos para as amostras plaquetopênicas produzidas em laboratório. Resultados obtidos por cada um dos contadores automáticos, (2ª fase).

Aparelhos	Grupo Alvo (plaq/mm ³)				
	2000	5000	10000	20000	30000
	Diferença %*	Diferença Absoluta em Plaq x 1000/mm ³ **)			
ADVIA	+6* (+0,12)**	+3,6 (+0,18)	+0,1 (+0,01)	+1,2 (+0,24)	-0,1 (-0,03)
STKS	+33 (+0,66)	+5,4 (+0,27)	-2,3 (-0,23)	-4,35 (-0,87)	-1,53 (-0,46)
H1	+7 (+0,14)	+14 (+0,07)	+0,3 (+0,03)	-4,5 (-0,9)	-1,6 (-0,48)
T890	-2 (-0,04)	-19,05 (-0,8)	-16,4 (-1,64)	-14,5 (-2,9)	-11,03 (-3,31)

Obs: Os valores usados foram os já corrigidos para o erro de diluição.

O estudo de linearidade dos contadores (tabela 2.6) mostra que os níveis de correlação (r), entre os valores "alvo" desejados e os valores obtidos pelos quatro contadores, foram maiores que 0,999. Os interceptos no eixo "y" não foram significativamente diferentes de zero. Entretanto, apesar de os demais aparelhos terem obtido valores de inclinação acima de 0,960, o valor de inclinação para o T-890 foi de apenas 0,880.

Tabela 2.6 – Análise de regressão linear e correlação dos contadores automáticos para contagens de plaquetas abaixo de 30.000 plaq/mm³ (2ª fase)

Aparelhos	r	Inclinação	Intercepto em y (plaq/mm ³)
ADVIA	1,000	1,000	150,1
STKS	0,999	0,960	438,8
H1	1,000	0,970	180,5
T890	0,999	0,880	-190,8

* Os valores usados foram os já corrigidos para o erro de diluição.

** r : coeficiente correlação de Pearson ($p < 0,001$).

Estudo da Linearidade dos contadores para contagem de plaquetas de 2.000 a 30.000/mm³, a partir de amostras normais após sofrerem processo de diluição seriada, (2ª fase)

Precisão dos contadores:

Para as 36 determinações por grupo de contagem (contagens em triplicata para 3 diluições para cada amostra), nenhum dos contadores apresentou resultados para coeficiente de variação acima de 26,5% para grupo alvo de 2.000 plaq/mm³, acima de 15% para o grupo de 5.000, acima de 11% para o grupo de 10.000, acima de 8,3% para grupo de 20.000 ou acima de 6,6% para o grupo de 30.000 plaq/mm³ (tabelas 2.1 a 2.4).

Os resultados apresentados nas tabelas 2.7 e 2.8 revelam o grande poder de precisão dos contadores em amostras de indivíduos normais. Uma ainda bastante satisfatória precisão dos contadores, também foi observada nas amostras "plaquetopênicas alvo" em relação às amostras com níveis normais de plaquetas. Os contadores Coulter tiveram um discreto maior poder de precisão em relação ao ADVIA e H1, nas amostras plaquetopênicas obtidas em laboratório. Os dados da tabela 2.9 mostra não haver interferência nos níveis de plaquetas acima de 50.000/mm³ no poder de precisão dos contadores em amostras sem alarmes.

Tabela 2.7 – Análise de precisão dos contadores automáticos em amostras com níveis normais de plaquetas (2ª fase).

	ADVIA		STKS		H1		T890	
	*Média Plq/mm ³	C.V. (%)	*Média Plq/mm ³	C.V. (%)	*Média Plq/mm ³	C.V. (%)	*Média Plq/mm ³	C.V. (%)
Amostra 1	244.000	3,25	217.667	0,70	221.667	5,13	231.333	0,25
Amostra 2	213.667	0,97	220.667	0,26	231.333	2,88	233.000	2,23
Amostra 3	233.000	1,13	225.000	0,77	230.333	2,61	231.667	2,45
Amostra 4	224.000	2,04	222.000	1,19	228.333	1,41	233.667	0,49
Média total	228.500	1,85	221.333	0,73	227.916	3,01	232.417	1,36

Análise de precisão dos contadores a partir de 04 amostras normais, sem alarmes nos aparelhos. que foram submetidas a contagens em quintuplicata.

* Média plaq/mm³ = média pós-quintuplicata por amostra;

**Média total = média das médias das 4 amostras.

CV = coeficiente de variação.

Tabela 2.8 – Estudo comparativo da precisão dos contadores entre as amostras com níveis normais de plaquetas e as amostras plaquetopênicas obtidas em laboratório a partir das próprias amostras normais, após processo de diluição, (2ª fase)

Grupos alvo pós-diluição Plq/mm ³	ADVIA	STKS	H1	T890
	CV (%)			
2.000	10,38	9,04	16,69	4,04
5.000	7,04	7,12	9,35	7,52
10.000	6,5	4,68	7,66	2,76
20.000	5,66	2,29	4,68	3,81
30.000	3,31	3,59	4,49	2,06
Média*	6,58	5,34	8,57	4,04
Sem Diluição**	1,85	0,73	3,01	1,36

* Média dos CVs dos grupos alvo pós-diluição (4 amostras por grupo pós-triplicata) 36 contagens por grupo.

** Média dos CVs nas mesmas amostras pré-diluição (4 amostras pós-triplicata)

CV = coeficiente de variação.

Tabela 2.9 – Análise da precisão dos contadores automáticos para níveis de plaquetas de 50.000 a 800.000/mm³, (2ª fase, 2b).

Plaq x 1000/mm ³				CV(%)			
ADVIA	STKS	H1	T-890	ADVIA	STKS	H1	T-890
52,8	47,8	51,4	44,0	1,86	2,81	3,08	2,27
99,6	87,9	97,2	83,7	2,97	2,4	1,96	2,04
225,6	220,6	228,3	215,3	2,53	1,3	1,99	2,32
422,4	399	400,3	407,6	3,01	1,96	1,67	1,67
575,8	539,1	597,2	544,8	3,22	2,5	1,37	1,29
748,4	695,4	709,7	724,4	1,33	1,44	1,85	0,94

CV = coeficiente de variação.

Precisão dos diferentes contadores. Foram feitas dez (10) contagens para cada uma das 6 amostras (sem alarmes), por cada aparelho. Influência dos níveis de plaquetas no coeficiente de variação.

4.3. 3ª fase: Estudo comparativo entre os métodos automáticos e os manuais (diretos e indiretos) para contagem de plaquetas em pacientes plaquetopênicos; análise de alarmes nos contadores automáticos.

Análise de exatidão:

A média das contagens de plaquetas realizadas em triplicata pelos aparelhos e métodos manuais para as 70 amostras plaquetopênicas com contagens abaixo de 100.000 plaq/mm³ apresentadas à **tabela 3.1** mostram que as contagens obtidas pelos contadores H1 e T-890 e o "mét. ind. 1" foram

significativamente maiores que aquelas obtidas pelo método de referência (média de contagem = 36.200 plaq/mm³), com valores em média de, respectivamente +5.450 plaq/mm³ (p = 0,001), +5.000 plaq/mm³ (p = 0,002) e +3.730 plaq/mm³ (p = 0,002), em teste "t" pareado. Para o grupo de plaquetopênicos críticos (43 amostras com menos de 30.000 plaq/mm³) os resultados mostraram valores ainda de maior significância (tabela 3.2). Foram obtidos valores de +5.160 plaq/mm³ para o H1 (p < 0,001), +6.120 plaq/mm³ para o T-890 (p < 0,001) e + 2.500 plaq/mm³ para o "esfreg.1" (p = 0,008), acima daqueles obtidos pelo método de referência (média de contagem = 18.040 plaq/mm³), em teste "t" pareado. Os demais métodos, tanto para o grupo de 70 quanto de 43 amostras, não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 3.1 – Análise da exatidão. Teste "t" pareado: comparação dos métodos automatizados e métodos manuais diretos e indiretos em relação ao método de referência (A), para amostras de pacientes plaquetopênicos com níveis de plaquetas abaixo de 100.000/mm³. Diferença entre a média das contagens de plaquetas por cada método (B) e o método de referência (A). (3ª fase, n = 70).

Métodos		Diferença das médias	Diferença em	t	P
A	B	(A - B) em plaq/mm ³	intervalo 95% Conf. em Pla _q /mm ³	(A x B)	
Br.Cr	ADVIA	970	-660 até 2.600	1,2	0,238
Br.Cr	STKS	870	-1.410 até 3.120	0,75	0,455
Br.Cr	H1	-5.450	-7.380 até -3.510	-5,6	0,001
Br.Cr	T890	-5.000	-8.150 até -1.850	-3,2	0,002
Br.Cr	Maspes	3.360	-1,030 até 7.750	1,5	0,131
Br.Cr	Mét. ind.1	-3.730	-6.100 até -1.370	-3,1	0,002
Br.Cr	Mét. ind.2	1.300	- 660 até 3.250	1,3	0,190

Valor médio obtido pelo método de referência (A) = 36.200 plaq/mm³

Tabela 3.2 – Análise da exatidão. Teste "t" pareado: comparação dos métodos automatizados e métodos manuais diretos e indiretos em relação ao método de referência (A), para amostras de pacientes plaquetopênicos com níveis de plaquetas abaixo de 30.000/mm³. Diferença entre a média das contagens de plaquetas por cada método (B) e o método de referência (A). (3ª fase, n = 43).

Métodos		Diferença das médias	Diferença em	t	P
A	B	(A - B) em plaq/mm ³	intervalo 95% Conf. em Pla _q /mm ³	(A x B)	
Br.Cr	ADVIA	730	-320 até 1.770	1,4	0,168
Br.Cr	STKS	-940	-2.700 até 810	-1,1	0,286
Br.Cr	H1	-5.160	-6.720 até -3.610	-6,7	<0,001
Br.Cr	T890	-6.120	-9.490 até -2.740	-3,7	<0,001
Br.Cr	Maspes	1.480	-1.150 até 4.110	1,1	0,263
Br.Cr	mét. ind.1	-2.500	-4.330 até -680	-2,8	0,008
Br.Cr	mét. ind.2	250	-1.210 até 1.720	0,4	0,729

Valor médio obtido pelo método de referência (A) = 18.040 plaq/mm³

Uma boa e significativa correlação ($p < 0,001$) entre os contadores ADVIA, STKS e H1 e o método de referência foi observada apenas a níveis de plaquetas que incluíram as contagens acima de 30.000 plaq/mm^3 ($n=70$), **tabela 3,3**. Entretanto, para as contagens incluindo apenas os valores abaixo de 30.000 plaq/mm^3 ($n=43$), somente o ADVIA manteve boa correlação com o método de referência ($r = 0,947$), **tabela 3,4**. O coulter T-890 apresentou baixa correlação de resultados com o método de referência para os dois grupos, com valores de 0,884 para ($n=70$) e 0,577 para ($n=43$), **tabelas 3,3 e 3,4**. Além disso, os dados da **tabela 3.12** também mostram não haver correlação significativa entre o ADVIA e os demais aparelhos (STKS, H1 e T-890). Destes, o valor obtido em relação ao Coulter-T890 foi o mais baixo, com ($r = 0,544$).

O método de Maspes apresentou baixa correlação de resultados com o método de referência, tanto para $n = 70$ ($r = 0,797$) quanto para $n = 43$ ($r = 0,534$) (**tabelas 3.3 e 3.4**).

Tabela 3.3 – Análise de regressão linear e correlação dos métodos automáticos e manuais (diretos e indiretos) em relação ao método de referência, para os pacientes plaquetopênicos com níveis abaixo de $100.000 \text{ plaq/mm}^3$, $n = 70$. (3ª fase)

(B)	Plaq/mm ³			(A)* Brecher-Cronkite		
	Média	±	D.P.	Coef. Correl. (r)	Inclinação	Intercepto**
ADVIA	35.230	±	27.070	0,968	0,974	-18,28
STKS	35.350	±	24.740	0,937	0,861	4177,8
H1	41.650	±	27.950	0,957	0,994	5654,3
T890	41.190	±	27.580	0,884	0,906	8390,1
Maspes	32.840	±	29.850	0,797	0,884	837,3
mét. ind.1	39.930	±	30.440	0,948	1,073	1100,5
mét. ind.2	34.900	±	26.910	0,954	0,953	373,3

* Brecher-Cronkite: média = 36.200 ± 26.920 ; D.P.(desvio padrão)

Obs: Todas as análises tiveram como variável independente o método de referência B.Cronkite.

** plaq/mm^3 ; ($p < 0,001$)

Tabela 3.4 – Análise de regressão linear e correlação dos métodos automáticos e manuais (diretos e indiretos) em relação ao método de referência, para os pacientes plaquetopênicos com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm³, n = 43. (3ª fase)

(B)	Plaquetas /mm ³			(A)* Brecher-Cronkite		
	Média	±	D.P.	Coef. Correl. (r)	Inclinação	Intercepto**
ADVIA	17.310	±	9.550	0,947	0,863	1.749,5
STKS	18.980	±	8.530	0,839	0,683	6.650,3
H1	23.200	±	9.960	0,879	0,835	8.136,8
T890	24.200	±	12.910	0,577	0,711	11.326,4
Maspes	16.560	±	8.980	0,623	0,534	6.929,3
mét. ind.1	20.530	±	12.990	0,893	1,107	556,7
mét. ind.2	17.780	±	10.930	0,902	0,940	814,7

* Brecher-Cronkite: média = 18.040 ± 10.480 (plaq/mm³); D.P.(desvio padrão)

Obs: Todas as análises tiveram como variável independente o método de referência B.Cronkite.

** plaq /mm³ ; (p < 0,001)

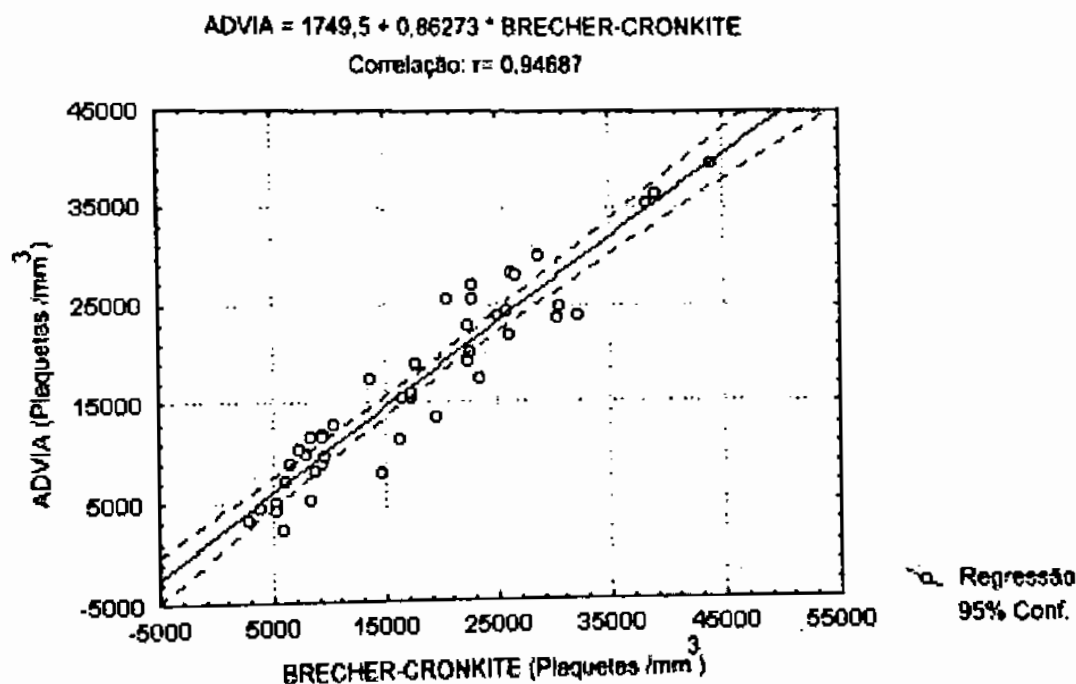


Figura 2. Análise de regressão linear e correlação entre o método de referência (Brecher-Cronkite) e o ADVIA, para as amostras de pacientes com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm³ (3ª fase).

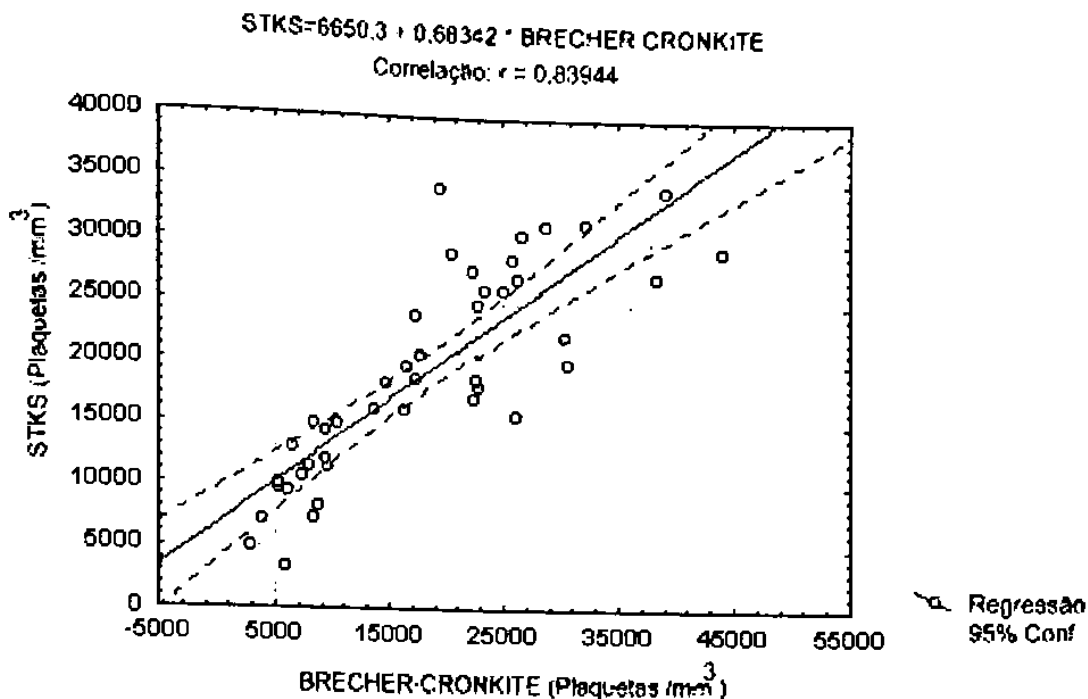


Figura 3. Análise de regressão linear e correlação entre o método de referência (Brecher-Cronkite) e o STKS, para as amostras de pacientes com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm³ (3ª fase).

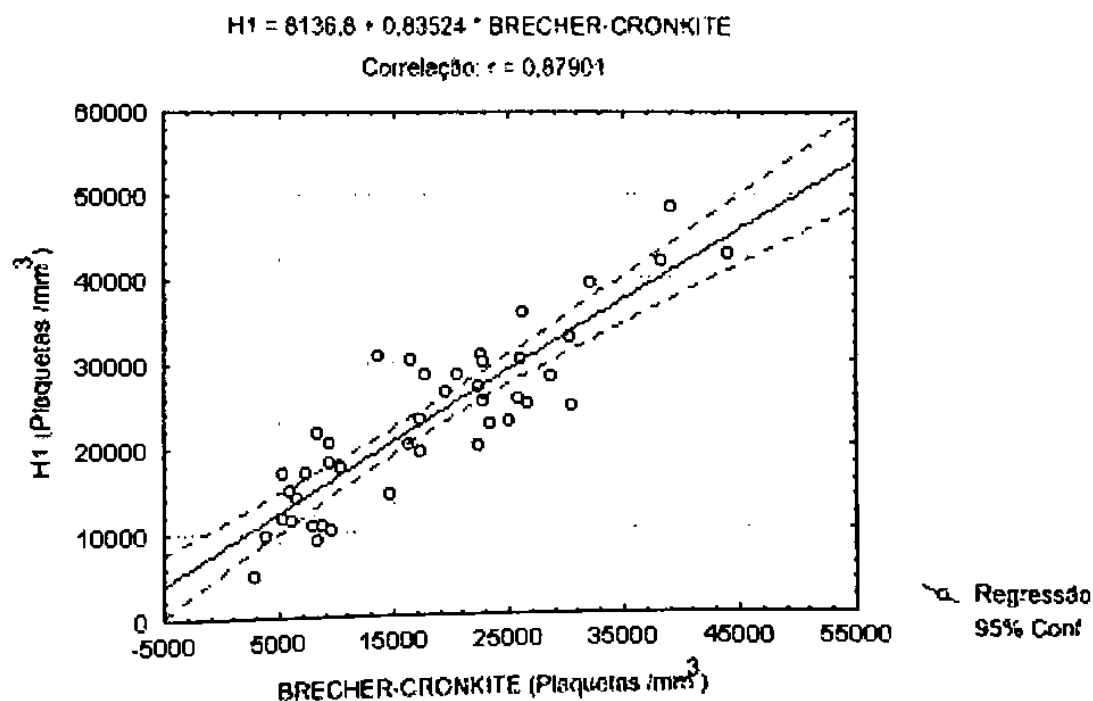


Figura 4. Análise de regressão linear e correlação entre o método de referência (Brecher-Cronkite) e o H1, para as amostras de pacientes com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm³ (3ª fase).

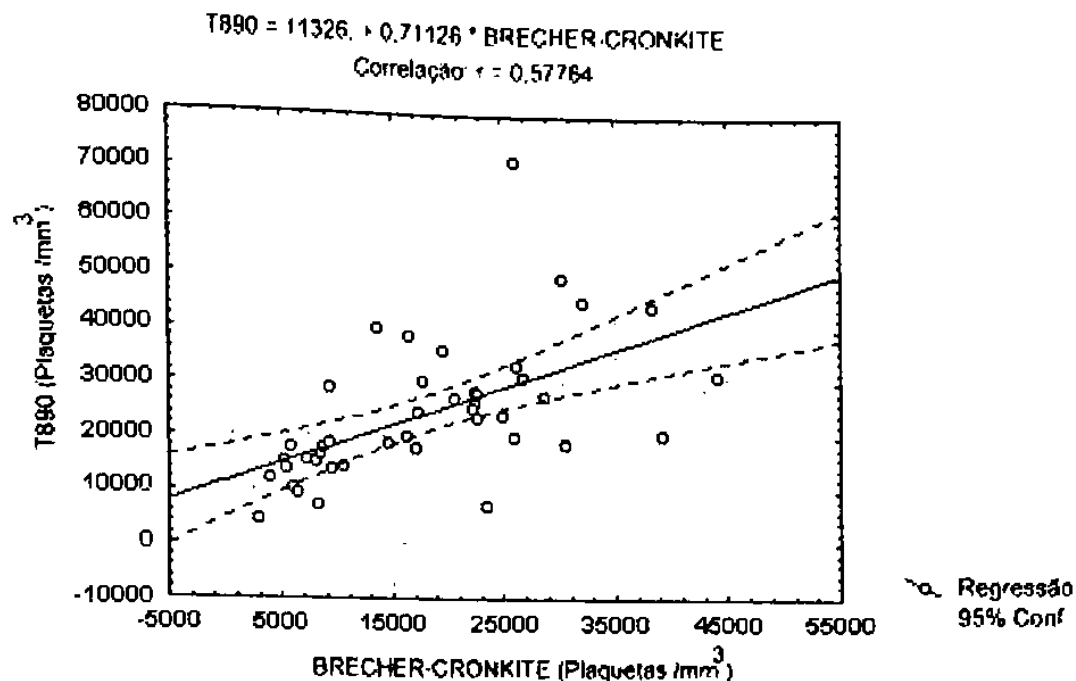


Figura 5. Análise de regressão linear e correlação entre o método de referência (Brecher-Cronkite) e o T-890, para as amostras de pacientes com níveis abaixo de $30.000 \text{ plaq}/\text{mm}^3$ (3ª fase).

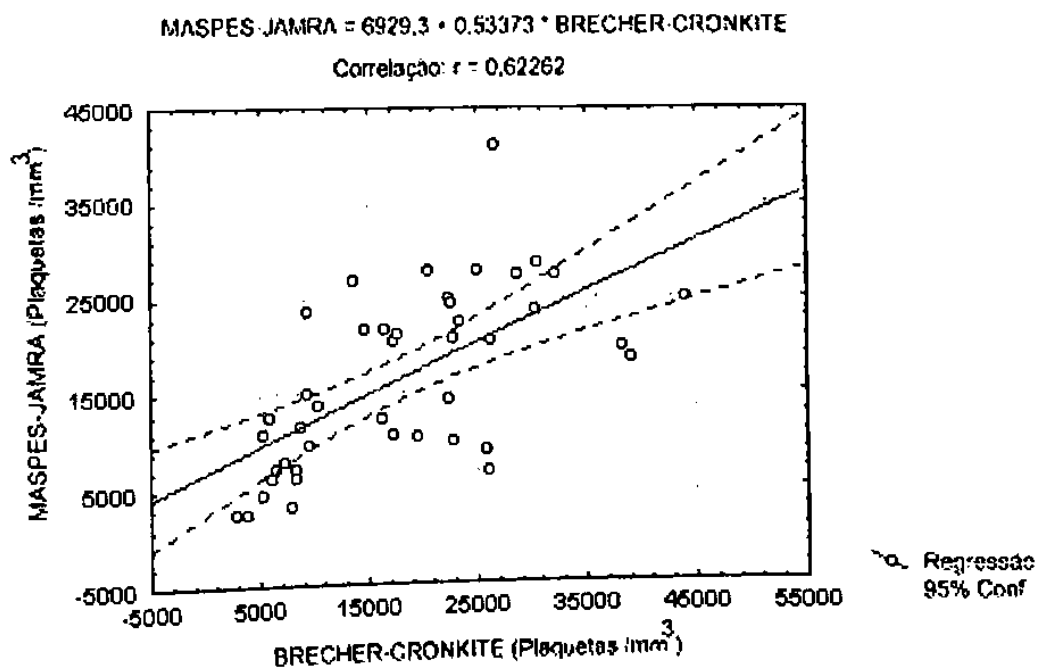


Figura 6. Análise de regressão linear e correlação entre o método de referência (Brecher-Cronkite) e o método de Maspes, para as amostras de pacientes com níveis abaixo de $30.000 \text{ plaq}/\text{mm}^3$ (3ª fase).

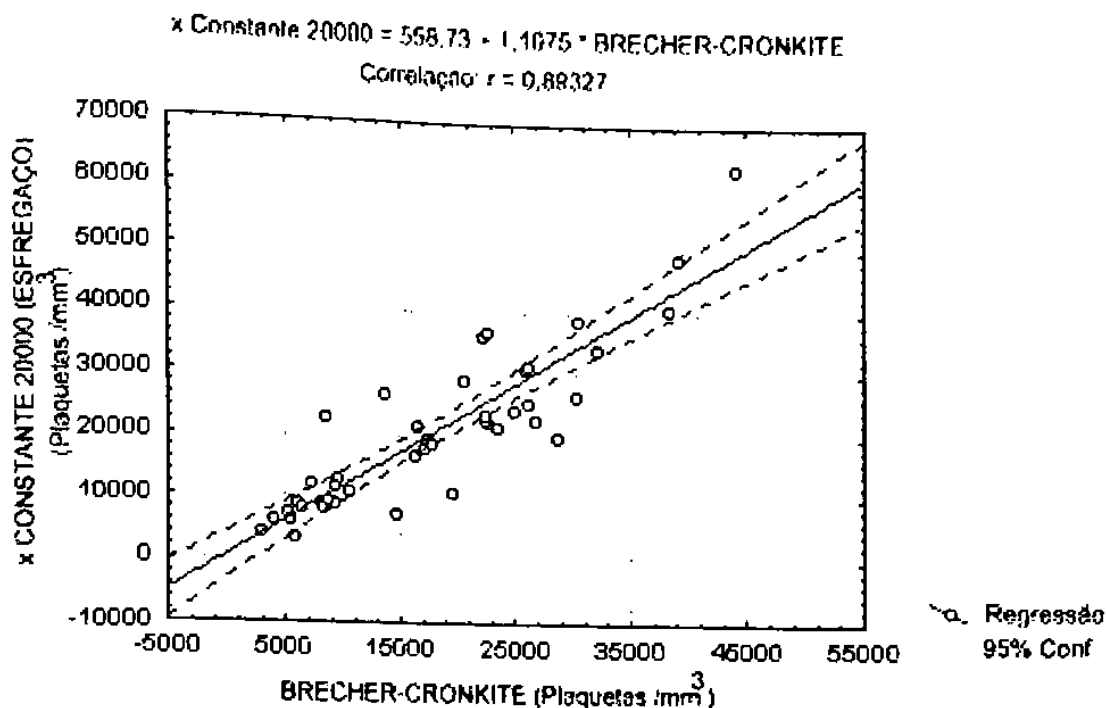


Figura 7. Análise de regressão linear e correlação entre o método de referência (Brecher-Cronkite) e o método indireto 1 (por fator conversão de 20.000), para as amostras de pacientes com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm³ (3ª fase).

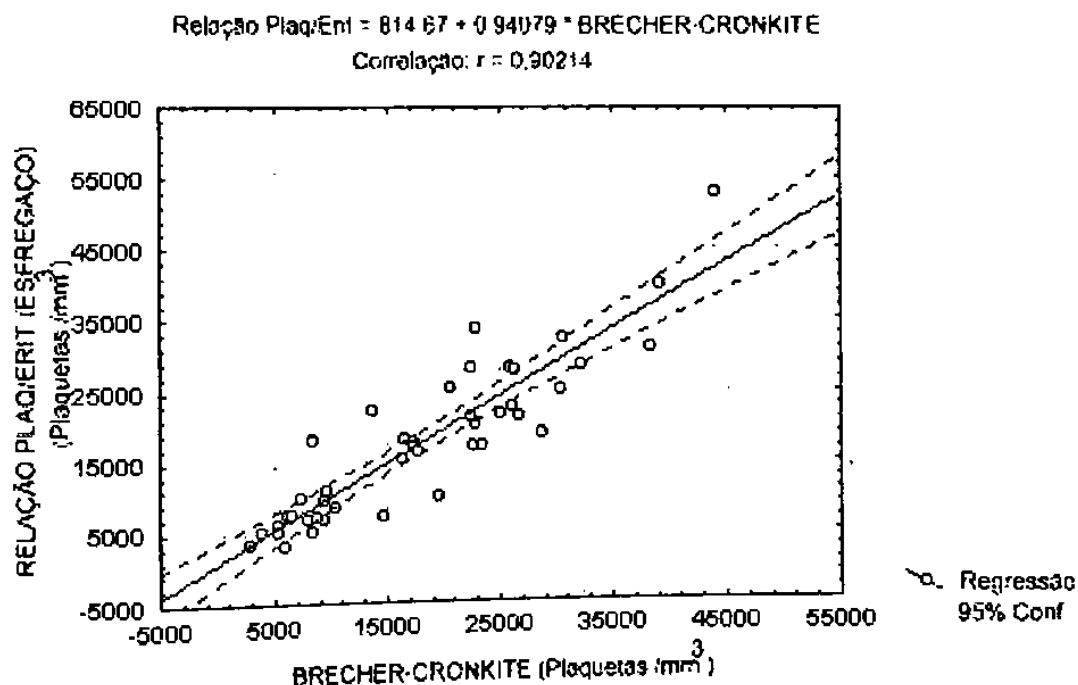


Figura 8. Análise de regressão linear e correlação entre o método de referência (Brecher-Cronkite) e o método indireto 2 (uso da relação eritrócitos/plaquetas), para as amostras de pacientes com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm³ (3ª fase).

Nossos resultados para correlação entre os aparelhos que se utilizam de sistema simples para contagem de plaquetas (STKS, volumetria por impedância; H1, volumetria por dispersão de luz laser em uma dimensão e T-890, volumetria por impedância) e o ADVIA que se utiliza de um sistema de contagem de plaquetas em duas dimensões (sistema 2D), não demonstrou resultados satisfatórios para as amostras plaquetopênicas com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm³. Além disso, os resultados para o teste "t" pareado demonstraram diferenças significativas entre os contadores STKS, H1 e T-890 em relação ao ADVIA (tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Teste "t" pareado e correlação entre a tecnologia 2D (volumetria e índice de refração) utilizada pelo ADVIA versus volumetria simples (1D) utilizada pelos contadores (STKS, H1 e T-890) nas amostras dos pacientes plaquetopênicos com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm³ (3ª fase)

Métodos	Teste "t"			Pearson
	p	dif. médias	interv. conf. de 95%	r
ADVIA x STKS	< 0,05	-1.672 plaq/mm ³	-3.279 até -055 plaq/mm ³	0,838
ADVIA x H1	< 0,001	-5.897 plaq/mm ³	-7.334 até -4.448 plaq/mm ³	0,885
ADVIA x T-890	< 0,001	-6.850 plaq/mm ³	-10.268 até -3.420 plaq/mm ³	0,544

dif. médias = diferença entre médias

O método indireto que se utiliza de fator de conversão ("mét. ind. 1") apesar de ter demonstrado boa correlação de resultados com o método de referência (r = 0,948; tabela 3.3), o ADVIA (r = 0,961; tabela 3.7) e o "mét. ind. 2" (r = 0,989) (tabela 3.6) para as amostras com níveis abaixo de 100.000 plaq/mm³, não demonstrou a mesma satisfatoriedade para o grupo de contagens abaixo de 30.000 plaq/mm³, em relação ao método de referência (tabela 3.4). Além disso, apresentou diferença significativa em teste "t" pareado tanto para as amostras com menos de 100.000 plaq/mm³, quanto para aquelas com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm³, em relação ao método de referência (tabelas 3.1 e 3.2), em relação ao ADVIA (tabela 3.7), e em relação ao "mét. ind. 2" (tabela 3.6).

Tabela 3.6 – Teste “t” pareado e correlação entre o “mét. ind. 1” e o “mét. ind. 2”, nas 70 amostras dos pacientes plaquetopênicos com valores abaixo de 100.000 plaq/mm³ e nas 43 amostras incluindo apenas os plaquetopênicos com contagens abaixo de 30.000 plaq/mm³ (3ª fase)

“mét.ind.2” x “mét. ind.1” (grupo amostras)	Teste “t”				Pearson
	T	p	dif. Médias	interv. conf. de 95%	r
A (n = 70)	-7,67	< 0,001	-5.030 plaq/mm ³	-6.339 até -3.724 plaq/mm ³	0,989
B (n = 43)	-7,03	< 0,001	-2.750 plaq/mm ³	-3.542 até -1.961 plaq/mm ³	0,991

Grupo A = amostras com menos de 100.000 plaq/mm³
Grupo B = amostras com menos de 30.000 plaq/mm³

Tabela 3.7 – Teste “t” pareado e correlação entre o “mét. ind.1” e o ADVIA, nas 70 amostras dos pacientes plaquetopênicos com valores abaixo de 100.000 plaq/mm³ e nas 43 amostras dos pacientes plaquetopênicos com contagens abaixo de 30.000 plaq/mm³ (3ª fase)

ADVIA x “mét.ind.1” (grupo amostras)	Teste “t”				Pearson
	T	p	dif. médias	interv. Conf. de 95%	r
A (n = 70)	-4,49	< 0,001	-4.700 plaq/mm ³	-6.793 até -2.616 plaq/mm ³	0,961
B (n = 43)	-3,61	< 0,001	-3.230 plaq/mm ³	-5.025 até -1.424 plaq/mm ³	0,909

Grupo A = amostras com menos de 100.000 plaq/mm³
Grupo B = amostras com menos de 30.000 plaq/mm³

Análise de precisão:

A reprodutibilidade de resultados dos métodos diretos (contagens automáticas com CV de 4,18% a 7,95% e manuais em hemocitômetro com CV de 10,26% e 10,43%) (tabela 3.9) foi significativamente maior que as obtidas pelos métodos indiretos em esfregaço corado com CVs de 26,02% (teste Tukey com $p < 0,001$), tanto para o grupo de plaquetopênicos críticos com < 30.000 plaq/mm³ (n=43) (tabela 3.9) quanto para seus subgrupos (tabela 3.10). Para o grupo geral de plaquetopênicos com < 100.000 plaq/mm³ (n=70) também foram observadas diferenças significativas (teste Tukey, $p < 0,001$) (tabela 3.8).

Entre os métodos automáticos e manuais em câmara de contagem os resultados mostraram diferenças significativas apenas em relação ao T-890 (teste Tukey, $p < 0,05$), tanto para o grupo de plaquetopênicos críticos (tabela 3.9),

quanto para o grupo geral de plaquetopênicos < 100.000 plaq/mm³ (n=70) (tabela 3.8).

Entre os contadores, apesar de os aparelhos da Coulter terem obtido valores de CV em média melhores que o ADVIA e H1, não foram observadas diferenças significativas (teste Tukey, $p > 0,05$) nem no grupo geral com menos de 100.000 plaq/mm³, nem no grupo de plaquetopênicos críticos abaixo de 30.000 plaq/mm³.

Tabela 3.8– Teste Tukey (análise de variância) entre os métodos automáticos e manuais (diretos e indiretos) nas amostras dos pacientes plaquetopênicos com níveis abaixo de 100.000 plaq/mm³ (n = 70), tendo como variável o coeficiente de variação, (3ª fase).

Método	ADVIA (5,97)*	STKS (5,89)*	H1 (6,67)*	T-890 (3,97)*	Maspes (9,04)*	Br.Cr (9,35)*	Met. ind.1 (21,02)*	met. ind.2 (21,02)*
ADVIA		1,000	0,999	0,815	0,310	0,194	0,000	0,000
STKS			0,999	0,847	0,275	0,169	0,000	0,000
H1				0,483	0,649	0,489	0,000	0,000
T-890					0,004	0,002	0,000	0,000
Maspes						0,999	0,000	0,000
Br.Cr							0,000	0,000
met. ind.1								1,000

* Coeficiente de variação (CV %)

Tabela 3.9– Teste Tukey (análise de variância) entre os métodos automáticos e manuais (diretos e indiretos) nas amostras dos pacientes plaquetopênicos com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm³, tendo como variável o coeficiente de variação (3ª fase)

Método	ADVIA (7,95)*	STKS (6,57)*	H1 (7,65)*	T-890 (4,18)*	Maspes (10,26)*	Br.Cr (10,43)*	mét. ind.1 (26,02)*	Mét. ind.2 (26,02)*
ADVIA		0,994	1,000	0,408	0,904	0,864	0,000	0,000
STKS			0,998	0,886	0,439	0,375	0,000	0,000
H1				0,523	0,829	0,776	0,000	0,000
T-890					0,016	0,011	0,000	0,000
Maspes						1,000	0,000	0,000
Br.Cr							0,000	0,000
met. ind.1								1,000

* Coeficiente de variação (CV %)

Tabela 3.10– Análise de precisão. Estudo comparativo dos coeficientes de variação em amostras de pacientes plaquetopênicos com níveis abaixo de 10.000 plaq/mm³, de 10.000 a 20.000 plaq/mm³ e de 20.000 a 30.000 plaq/mm³, entre os métodos automáticos e manuais diretos e indiretos (3ª fase)

Métodos	Subgrupos		
	≤ 10.000 plaq / mm ³	10.000 < plaq / mm ³ ≤ 20.000	> 20.000 plaq / mm ³
	*Média CV % (n)**		
ADVIA	10,8 (12)	7,12 (14)	6,56 (17)
STKS	8,6 (8)	7,20 (18)	5,00 (17)
H1	12,3 (3)	10,30 (14)	5,68 (26)
T-890	8,6 (4)	4,84 (15)	2,86 (24)
Maspes	12,9 (13)	9,19 (11)	9,08 (19)
Br.Cr	11,7 (15)	12,0 (9)	8,22 (19)
mét. ind.1	38,6 (12)	24,7 (10)	19,5 (21)
mét. ind.2	36,7 (14)	23,95 (12)	18,7 (17)

* valor médio obtido a partir do CV(%) de cada amostra.

** número de amostras segundo cada método, para cada subgrupo.

Contagens de plaquetas versus limites de transfusão profilática:

Das 43 amostras plaquetopênicas com contagem de plaquetas menor que 30.000/mm³, 19 pelo ADVIA, 29, 34, 35, 20, 31 e 22 pelo STKS, H1, T-890, Maspes, "mét. ind.1" e "mét. ind. 2", respectivamente, tiveram resultados maiores que os do método de referência (BrCr).

Para o limite profilático de 20.000 plaq/mm³, em boa parte das 24 amostras que tiveram contagens abaixo deste limite pelo método de referência BrCr (ICSH 1984/1988) e valores acima deste "treshold" pelos demais métodos avaliados, foram observadas diferenças significativas de contagem (**tabela 3.11**).

Para o limite de 10.000 plaq/mm³, das 15 amostras com valores abaixo de 10.000 plaq/mm³ pelo método de referência (BrCr), nenhuma pelo ADVIA (0%); 37% pelo STKS; 75% pelo H1; 91,7% pelo T-890; 80% pelo método Maspes; 50% pelo "mét. ind.1" e 33,3% pelo "mét. ind.2", das amostras que tiveram valores acima de 10.000 plaq/mm³ apresentaram uma diferença significativa de contagem (**tabela 3.11**).

Entretanto, para os contadores automáticos todas estas amostras com valores acima dos limites de 10.000 ou 20.000 plaq/mm³ e que o método de referência obteve resultados abaixo destes limites e com diferenças significativas,

tiveram deflagrados alarmes e indicação de revisão segundo os próprios fabricantes (tabela 3.13).

Os resultados apresentados à tabela 3.12 mostram ter havido um grande aumento no percentual de amostras obtidas pelos métodos indiretos, em que pelo menos um de seus resultados foi mais alto que os valores utilizados como limites profiláticos de 10.000 e 20.000 plaq/mm³, para os pacientes em que tiveram suas contagens inferiores à estes limites pelo método de referência, quando comparados aos resultados médios pós triplicata (tabela 3.11). Além disso, a quantidade de amostras obtidas pelos métodos indiretos que excederam os limites profiláticos e tiveram diferenças significativas de contagem em relação aos resultados de referência também aumentaram consideravelmente quando comparamos os resultados médios pós-triplicata (30 campos), tabela 3.11, com os resultados em que pelo menos uma de suas contagens (10 campos) excederam os referidos limites de 10.000 e 20.000 plaq/mm³ (tabela 3.12).

Tabela 3.11– Métodos automáticos e manuais versus limites indicados para transfusão de plaquetas: Percentual de amostras em que a média das contagens em triplicata obtidas pelos contadores automáticos, método Maspes e métodos indiretos excederam os limites profiláticos de 10.000 e 20.000 plaq/mm³, nas amostras em que tiveram valores inferiores à estes limites pelo método de referência. Percentual de amostras que excederam os limites profiláticos e tiveram diferenças significativas (erro significativo) de contagem em relação aos resultados de referência.

Métodos	Limite 20.000 plaq/mm ³ (n=24)		Limite 10.000 plaq/mm ³ (n=15)	
	% de amostras acima do limite	% de amostras acima do limite e com erro signific.*	% de amostras acima do limite	% de amostras acima do limite e com erro signific.*
ADVIA	0,0	0,0	33,3	0,0
STKS	12,5	33,3	53,3	37,0
H1	33,0	62,5	80,0	75,0
T890	29,2	71,4	80,0	91,7
Maspes	25,0	33,3	33,0	80,0
Mét. ind.1	12,5	66,7	26,7	50,0
Mét. ind.2	4,2	100,0	20,0	33,3

*Diferenças significativas: Para contagens < 5.000 por BrCr: valores com diferença maior ou igual a 5.000 plaq/mm³; Para contagens entre 5.000 e 10.000 por BrCr: valores com diferenças iguais ou acima do dobro; Para contagens entre 10.000 e 15.000 por BrCr: valores com diferenças acima de 10.000 plaq/mm³. Para contagens > 15.000 por BrCr: valores com diferenças acima de 15.000 plaq/mm³.

Tabela 3.12– Métodos indiretos versus limites indicados para transfusão de plaquetas: Percentual de amostras em que pelo menos uma das contagens em triplicata obtidas pelos métodos indiretos excederam os limites profiláticos de 10.000 e 20.000 plaq/mm³, nas amostras em que tiveram valores inferiores à estes limites pelo método de referência. Percentual de amostras que excederam os limites profiláticos e tiveram diferenças significativas (erro significativo) de contagem em relação aos resultados de referência:

Métodos	Limite 20.000 plaq/mm ³ (n=24)		Limite 10.000 plaq/mm ³ (n=15)	
	% amostra acima do limite	% de amostras acima do limite e com erro signific.*	% amostra acima do limite	% de amostras acima do limite e com erro signific.*
mét. ind.1	33,0	57,2	73,3	72,7
mét. ind.2	24,0	60,0	46,7	57,2

*Diferenças significativas: Para contagens < 5.000 por BrCr: valores com diferença maior ou igual a 5.000 plaq/mm³; Para contagens entre 5.000 e 10.000 por BrCr: valores com diferenças iguais ou acima do dobro; Para contagens entre 10.000 e 15.000 por BrCr: valores com diferenças acima de 10.000 plaq/mm³. Para contagens > 15.000 por BrCr: valores com diferenças acima de 15.000 plaq/mm³.

Análise de alarmes (flags):

Os resultados apresentados nas tabelas 3.13 e 3.14 mostram a excelente capacidade dos contadores em deflagrar alarmes em amostras com contagens comprovadamente inexatas. Nenhum dos aparelhos superestimou significativamente a contagem nas amostras sem “flags”.

O ADVIA foi o aparelho que menos deflagrou alarmes, bem como pedido de revisão. Nenhuma das amostras plaquetopênicas críticas incluídas no limite profilático de transfusão plaquetária teve valores com diferenças significativas em relação ao método de referência (tabelas 3.13 e 3.14).

Tabela 3.13– Análise de alarmes (flags) dos contadores automáticos, nas 70 amostras dos pacientes plaquetopênicos com valores abaixo de 100.000 plaq/mm³ (3ª fase)

Características	Contadores			
	ADVIA	STKS	H1	T890
% Sem flags #	85,7 (60)*	14,3 (10)	24,3 (17)	20 (14)
% com flags ##	14,3 (10)	85,7 (60)	75,7 (53)	80 (56)
% c/ flag s/ repetição	40 (4)	21,4 (7)	32,1 (17)	28,6 (16)
% Pedido revisão	4,3 (3)	78,6 (55)	75,7 (53)	80 (56)
% aus.ped.rev.c/dif **	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

*entre parênteses: valor absoluto de amostras;

** ausência pedido revisão (nas três contagens) e com diferença significativa em relação aos resultados de referência;

ausência de flag nas 3 contagens;

presença de flag em pelo menos uma das contagens em triplicata.

Tabela 3.14- Análise de alarmes nas 43 amostras dos pacientes plaquetopênicos com níveis de plaquetas abaixo de 30.000/mm³. Percentual de amostras com alarmes e que apresentaram diferenças significativas de contagem em relação ao método de referência, (3^a fase).

Aparelhos	Percentual
ADVIA	0%
STKS	9,3%
H1	27,9%
T890	34,9%

Para o ADVIA, apenas as amostras com suspeitas de "clumps" (que não tiveram repetição de flags) não tiveram esta característica comprovada na extensão sanguínea corada. Além disso, tão somente as amostras com suspeitas de "clumps" tiveram pedido de revisão de contagem. Em nenhuma amostra com plaquetas gigantes detectada pelo ADVIA ou detecção de alterações por código 3 (ver critério utilizado na metodologia) em algum dos outros contadores, houve pedido de revisão de contagem pelo ADVIA.

Para os demais aparelhos, houve um aumento significativo na deflagração de alarmes e/ou pedido de revisão de contagem, principalmente em função do código 3 por nós utilizado na metodologia e relacionado a interferentes como debris (restos de leucócitos -fragmentos nucleares ou citoplasmáticos- ou de tecidos mortos ou lesados); distribuição anormal dos picos elétricos de corrente (eletronic noise); microplaquetas; precipitados químicos; complexos imunes; estroma de hemácias; bolhas no sistema ou qualquer outro interferente não-plaquetário que possa gerar confusão na caracterização das plaquetas.

Das 70 amostras plaquetopênicas analisadas, as seis em que foram detectadas presença de plaquetas gigantes no extensão sanguínea (valores acima do limite de 10% do total de plaquetas avaliadas), tiveram esta alteração identificada nas 3 contagens pelo ADVIA.

Destas seis amostras, apenas 3 tiveram esta alteração morfológica detectada pelo STKS (repetidamente nas 3 contagens) e apenas uma pelo H1 (não repetidamente nas 3 contagens). O T-890 como não identifica especificamente este achado morfológico, não teve suas amostras avaliadas

sobre este aspecto específico. Em nenhuma delas houve diferença significativa entre o ADVIA e o método de referência e entre o H1 e o método de referência. Entretanto, em duas (33,3%), aquelas em que tiveram mais de 30% deste achado morfológico no esfregaço, houve diferença de resultados para com os contadores STKS e T-890. Os valores obtidos para a primeira amostra foram de 73.300 plaq/mm³ (ADVIA), 56.600 plaq/mm³ (STKS), 68.000 plaq/mm³ (H1) e 57.600 plaq/mm³ (T-890). A segunda amostra teve valores de 25.000 plaq/mm³ (ADVIA), 20.000 plaq/mm³ (STKS), 24.667 plaq/mm³ (H1) e 18.667 plaq/mm³ (T-890). Além disso, com exceção do ADVIA, todos os aparelhos pediram revisão de contagem.

Na nossa casuística para as amostras plaquetopênicas não houve qualquer caso com presença de eritrócitos microcíticos que pudessem interferir na contagem de plaquetas. Duas amostras não-plaquetopênicas que tiveram detectadas a presença de fragmentos de eritrócitos foram analisadas à parte.

4.4. Resultados para as amostras com fragmentos de eritrócitos:

Duas amostras com fragmentos de eritrócitos, por não serem plaquetopênicas não foram incluídas na nossa casuística da 3ª fase. Foram analisadas à parte por cada aparelho e pelo método de referência, após contagem em quintuplicata (ver abaixo).

Apenas o ADVIA apresentou valores aproximados aos de referência (BrCr). Os demais aparelhos obtiveram valores bem mais elevados em relação aos valores obtidos por BrCr. Nota-se também que o Coulter T-890 apesar de superestimar todas as contagens, não apresentou, para as duas amostras analisadas, diferenças significativas entre suas determinações. Tanto o STKS, quanto o H1 e o T-890 deflagraram alarmes e pediram revisão de contagem, inclusive o STKS em duas das análises para cada amostra (—) não liberou seus resultados (diferença significativa entre as contagens dos seus 3 canais). O ADVIA, apesar de ter detectado a referida alteração morfológica nas 5 determinações, não pediu revisão de contagem em nenhuma das contagens (não apresentou o sinal de asterisco- *).

Amostra 1:

ADVIA = 270.000/ 262.000/ 271.000/ 267.000/ 266.000; média = 267.200
plaq/mm³;

STKS = 411.000/ --- / 355.000/ --- / 332.000 ; média = 366.000
plaq/mm³;

H1 = 400.000/ 423.000/ 389.000/ 394.000/ 373.000 ; média = 395.800
plaq/mm³;

T-890 = 382.000/ 386.000/ 391.000/ 396.000/ 401.000 ; média = 391.200
plaq/mm³;

BrCr = 264.000/ 272.000/ 275.000/ 286.000/ 264.000 ; média = 272.200
plaq/mm³;

Amostra 2:

ADVIA = 143.000 / 141.000 / 138.000 / 130.000 / 136.000; média = 137.600
plaq/mm³;

STKS = --- / 255.000 / 250.000 / --- / 209.000; média = 238.000
plaq/mm³;

H1 = 263.000 / 223.000 / 289.000 / 264.000 / 273.000; média = 262.400
plaq/mm³;

T-890 = 311.000 / 307.000 / 314.000 / 311.000 / 317.000; média = 312.200
plaq/mm³;

BrCr = 162.000 / 168.000 / 163.000 / 160.000 / 163.000; média = 163.200
plaq/mm³;

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO:

A correta contagem do número de plaquetas foi e tem sido um tema de grande interesse dos clínicos, o que tem estimulado os pesquisadores a desenvolver métodos que apresentem a melhor exatidão e precisão possíveis.

Com o advento dos contadores automáticos, sabidamente acurados e precisos em amostras de indivíduos normais, o grande desafio tem sido discriminar as plaquetas de outras partículas celulares ou precipitados com propriedades físicas similares.

Para alguns autores (Mayer et al., 1980; Ross et al., 1980; Kjeldsberg et al., 1993; Dickerhoff et al., 1995; Hanseler et al., 1996) ainda é controverso que a contagem de plaquetas em amostras alteradas possa ser feita adequadamente, ou não, pelos métodos existentes. Isto se deve em grande parte à referida questionabilidade dos contadores automáticos em discriminar plaquetas das partículas não-plaquetárias de sinais elétricos e/ou ópticos semelhantes. Os dados de Dickerhoff et al. (1995) estudando dois contadores automáticos de rotina, método de citometria de fluxo (CMF) com anticorpos monoclonais antiplaquetas e método em hemocítômetro (BrCr), demonstraram para níveis plaquetários abaixo de $50.000/\text{mm}^3$ resultados satisfatórios apenas para os métodos em câmara e por CMF. Desta forma, para níveis críticos, a contagem de plaquetas pela automação não estariam indicadas para decisões terapêuticas. Outros autores também tem chegado a conclusões similares (Rowan et al., 1991; Hanseler et al., 1996).

Apesar de a maioria dos laboratórios de médio e grande porte atualmente efetuarem suas contagens através dos contadores eletrônicos, os métodos manuais ainda são importantes tanto em amostras com suspeitas de erros pela automação quanto em exames de rotina nos laboratórios menores. Além disso, outro problema consiste em se escolher o método manual que sirva de controle para os métodos automáticos. Desta forma, nosso estudo procurou abranger contadores de gerações distintas e com princípios de contagem diferentes, bem como os métodos manuais, muito utilizados na prática clínica para a referida

finalidade, a fim de englobar as mais diferentes variáveis que possam influenciar na exatidão e precisão dos resultados.

A proposta de alguns pesquisadores da utilização da citometria de fluxo e dos anticorpos monoclonais antiplaquetários como controle de qualidade de calibração dos contadores, apesar de trazer resultados bastante satisfatórios para indivíduos sadios com níveis normais de plaquetas, com boa correlação com os contadores automáticos (Tanaka et al., 1996), possuem a desvantagem do seu elevado custo (Dickerhoff et al., 1995). Nos parecem ainda inviáveis para a grande maioria das instituições.

5.1. Fatores que interferem na precisão e exatidão:

Dentre as variáveis analíticas que têm efeito na determinação exata e precisa da contagem de plaquetas e o seu grau de influência nos resultados, podemos destacar: **1) Amostra utilizada:** A maioria dos métodos utiliza sangue total como amostra (os atuais contadores automáticos; o método BrCr; os métodos indiretos em extensão corada de sangue, etc). Outros, entretanto, requerem uma fase inicial de preparação das amostras para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), por centrifugação diferencial ou por sedimentação gravitacional (método de Maspes; alguns contadores semi-automatizados de primeira geração etc); **2) Grau de diluição:** Alguns métodos (ex. Método de Rees-Ecker, 1923), mesmo tendo sangue total como amostra, por usarem líquidos não lisantes, são obrigados à utilização de elevados graus de diluição, sem possibilidade de mudança; outros, por utilizarem líquidos diluidores que lisem os eritrócitos (Método de BrCr), ou PRP (Maspes), podem modificar o grau de diluição, em função do número de plaquetas por campo; **3) A facilidade e segurança na distinção das plaquetas e demais interferentes,** seja visualmente em extensão sanguínea corada ou hemocítômetro a partir de sangue total, ou em hemocítômetro a partir de PRP, seja por impedância ou análise óptica diferencial, com ou sem sistema de análise do índice de refração nos contadores automatizados, e **4) O número de células contadas,** manualmente e por automação. Assim, nossa análise e discussão dos resultados obtidos pelas diferentes metodologias devem girar em função destas variantes analíticas para cada método empregado.

5.2. Métodos manuais:

Apesar de boa parte dos serviços ligados a diagnósticos hematológicos utilizarem métodos indiretos (em extensão de sangue corada) como critério de avaliação de possíveis erros nos contadores, esta prática é bastante discutível por outra boa parcela de pesquisadores.

Os fabricantes dos contadores automáticos recomendam que as contagens com suspeitas de erros pelos seus aparelhos, tenham estes resultados confirmados por método de referência em hemocitômetro. Não é recomendada confirmação por métodos indiretos. Isto se deve, provavelmente, à inerente imprecisão destes métodos, e de sua grande dependência do operador, o que também os torna de difícil aplicabilidade generalizada. De modo distinto, os métodos em hemocitômetro poderiam ser determinados acuradamente por profissionais com um mínimo de experiência (Brecher et al., 1953; Maspes & Jamra, 1955). Além disso, a própria confiabilidade dos contadores é atestada pelos fabricantes, através de estudos comparativos em relação ao referido método em hemocitômetro, principalmente para amostras plaquetopênicas ou de pacientes com alterações hematológicas outras que possam interferir na contagem de plaquetas (Kunicka et al., 1998; Procedimentos...Coulter, 1988; Technicon H1, 1985)

Pelo fato de as plaquetas terem caracteristicamente amplo espectro de volume (menos de 2 até mais de 20 fentolitros), suas contagens automatizadas estão sujeitas a grande quantidade de interferentes. Ruidos elétricos podem causar interferência com a contagem de plaquetas pequenas. Outras estruturas particuladas podem interferir com a contagem de plaquetas maiores. O uso de microscopia de fase e hemocitômetro tornou-se método de referência devido não estar sujeito a estas interferências. Permite clara distinção entre as plaquetas e demais partículas (Arkin et al., 1993).

A utilização da contagem manual de plaquetas em câmara no laboratório de rotina, além de não ser uma técnica prazerosa, requer a necessidade de seguir um escrupuloso protocolo para obtenção de resultados com reprodutibilidade e sensibilidade. Deste modo, necessita de muito tempo

Entretanto, segundo Dickehoff et al (1995), a menos que a contagem de plaquetas seja feita utilizando estes princípios de referência em hemocítômetro, seria imprudente recomendar limites de transfusão profilática para amostras com menos de 20.000 plaq/mm³.

5.2.1. Exatidão dos métodos manuais:

Os resultados obtidos para o método de Maspes na 1ª fase, com valores de + 145.000 plaq/mm³ (**tabela 1.1**) em relação às contagens em sangue total (BrCr) são concordantes com os estudos de Elton & Hirscher (1954), Bull et al (1965), Eastham (1963), Lewis et al. (1981) e se devem, provavelmente, ao "fenômeno Bagnold" ,força Bagnold, (Bagnold, 1954) que explicaria a retenção de plasma livre de plaquetas (PLP) entre os glóbulos vermelhos em sedimentação, e sua relação diretamente proporcional à quantidade de glóbulos (hematócrito) (**tabela 1.4**).

Segundo Bull et al. (1965) e Lewis et al. (1981), para a obtenção de resultados acurados, além da correção pelo valor hematócrito, deveria ser adicionada um ajuste através de um fator que levasse em conta a retenção de PLP proporcional ao valor hematócrito.

Os resultados de baixa correlação com o método de referência, na 3ª fase pelo método de Maspes tanto para o grupo com menos de 100.000 plaq/mm³ (**tabela 3.3**) quanto para aquele com valores menores de 30.000 plaq/mm³ (**tabela 3.4**), foram provavelmente devidos à perda de plaquetas observada nas 23 primeiras contagens em função de termos utilizado uma excessiva força centrífuga para um pequeno volume de sangue (± 1 ml, que sobrava após as demais determinações) de amostras anêmicas (baixos hematócritos), que, como descrito pelo Autor (Maspes, 1955), quando a escala de sedimentação dos glóbulos se aproxima do valor hematócrito, há perda de plaquetas no plasma sobrenadante. Isto ficou bem caracterizado para as amostras de 24 a 38 quando comparamos dois protocolos distintos (1.000 rpm por 3 min e 1.000 rpm por 1 min) (**tabela 3.16**) . Em todas elas, houve um grande decréscimo das contagens pós 3 minutos de centrifugação em relação àquelas pós 1 minuto (tão maior

quanto menor foi o hematócrito do paciente, **tabela 3.15**), demonstrando assim a inviabilidade do uso de um volume tão pequeno de amostra para este tempo de centrifugação (3 min). Os resultados obtidos para 1 000 rpm por 1 minuto nestas amostras (24 a 38), bem como nas demais (39 a 70), variaram de exatos a bem inexatos, dependendo do valor hematócrito do paciente. As amostras pouco anêmicas e não-anêmicas, tiveram valores inexatos para mais, as amostras um pouco mais anêmicas tiveram resultados exatos e as amostras bastante anêmicas apresentaram resultados inexatos para menos. Todos estes resultados se explicam pela perda de plaquetas, para as amostras mais anêmicas (pelo pouco volume inicial, mesmo para 1.000 rpm por 1 min) e, nas amostras menos anêmicas, onde não houve aproximação do valor da escala de sedimentação com o valor hematócrito (sem risco de perda), os valores acima dos obtidos pelo método de referência se devem à retenção de PLP entre as hemácias (**tabela 3.15**).

Dados da literatura revelam que os métodos indiretos de contagem, em geral, obtêm valores muito acima daqueles determinados diretamente. Enquanto os resultados obtidos pelo método direto de Brecher-Cronkite estabeleceu como valores de referência para indivíduos sadios resultados de 140.000 a 440.000 plaq/mm³, vários métodos indiretos tiveram valores muito maiores. Por exemplo, valores de 437.000 a 536.000 plaq/mm³ (método de Olef, 1935); 500.000 a 900.000 plaq/mm³ (método de Dameshek, 1932). Segundo Brecher (1971), estes valores não estariam corretos e seriam atribuídos à tendência de as hemácias estarem justapostas (**ver anexo 7.3**) na região de análise da extensão de sangue, levando a uma falsa relação entre plaquetas e hemácias nestas regiões centrais da extensão sanguínea.

De acordo com o próprio Dameshek (1932), criador de um dos métodos indiretos de contagem, "a utilização de métodos indiretos apesar de mais simples, são menos acurados e devem ser restritos a procedimentos apenas ordinários de contagem, não devendo ser usados quando o valor exato de plaquetas tiver maior importância clínica".

Nossos resultados para o "mét. ind.2", que apesar de também se utilizar da relação plaquetas/eritrócitos para determinação indireta de plaq/mm³, como os

métodos originais de Fônio, Dameshek, Olef (Dameshek, 1932), não demonstraram diferenças significativas em relação ao método de referência, nem em relação ao ADVIA (aparelho que demonstrou maior segurança de resultados, nas amostras plaquetopênicas), com teste "t" pareado demonstrando $p > 0,1$ tanto para o grupo de amostras abaixo de $100.000 \text{ plaq/mm}^3$, quanto para o grupo de plaquetopênicos críticos com menos de 30.000 plaq/mm^3 (tabelas 3.1 e 3.2). Isto deve ter ocorrido, provavelmente, por termos utilizado regiões onde as hemácias estavam mais dispersas e de termos analisado o número de plaquetas sem fixar o número de eritrócitos por campo, como era estabelecido por muitos destes métodos originais. Fixamos apenas o número de campos contados (10 por contagem). Vale lembrar que, como agravante, os métodos originais de contagem indireta das plaquetas em extensão de sangue corada se utilizavam, em geral, de sangue capilar como amostra.

A favor dos nossos resultados estão os dados de Mogodan (1980), que, utilizando-se de amostras obtidas por punção venosa, e comparando resultados de contagens obtidas por método de BrCr e por estimativa de plaquetas em esfregaço a partir da correlação com hemácias, utilizando graticulo de Miiler (suporte que se adapta à ocular do microscópio que facilita a contagem de eritrócitos e plaquetas em extensão de sangue corada) e também em campos onde os eritrócitos estavam mais dispersos, obteve valores tão acurados quanto os diretos em câmara. Deste modo achamos que apenas alguns dos métodos utilizados no passado, provavelmente aqueles que obtiveram menores valores de referência para indivíduos normais, estariam corretos e que os erros dos demais poderia estar relacionado à própria metodologia (número fixo e limitado de eritrócitos a serem contados) ou até mesmo à contagem dos eritrócitos em local inapropriado como descrito por Brecher (1971).

Por outro lado, para o "mét. ind.1" que se utiliza de fator de conversão para plaq/mm^3 de 20.000, nossos resultados evidenciaram diferenças significativas para com o método de referência (BrCr), para o ADVIA, bem como para com o método "mét. ind.2", tanto para o grupo de plaquetopênicos abaixo de $100.000 \text{ plaq/mm}^3$ ($+3.730 \text{ plaq/mm}^3$ acima dos valores de BrCr, com $p = 0,002$; tabela 3.1), como para o subgrupo com menos de 30.000 plaq/mm^3 ($+ 2.500 \text{ plaq/mm}^3$ acima dos valores de BrCr, teste "t" pareado com $p = 0,008$ (tabela 3.2). Nossos

dados foram equivalentes àqueles obtidos por Lawrence et al (1995), que utilizando mesmo critério de contagem obteve resultados de $+ 2.083 \text{ plaq/mm}^3$ nas amostras plaquetopênicas (valores abaixo de 40.000 plaq/mm^3) sem alarmes obtidas pelo contador Sysmex NE-8 000 (teste "t" pareado com $p = 0,038$).

Os resultados de superestimação significativa, associado à boa correlação do método "mét. ind.1" em relação aos métodos BrCr, ADVIA e "mét. ind 2" (com valores para "r" de respectivamente 0,948; 0,989 e 0,961 para as contagens abaixo de $100.000 \text{ plaq/mm}^3$) (tabelas 3.3, 3.6, 3.7) nos faz pensar que a utilização de fator de conversão um pouco menor que 20.000, para plaquetopênicos, poderia nos levar a valores mais exatos.

Em função dos limites profiláticos para transfusão de plaquetas de 10.000 e $20.000/\text{mm}^3$, nossos resultados para os métodos indiretos revelaram um sensível aumento no risco de induzir a conduta não adequada em função de informação errada, quando apenas 10 campos microscópios foram contados (tabela 3.12) O percentual de amostras em que pelo menos uma de suas contagens em triplicata (ou seja, 10 campos) teve valores superestimados em relação aos de referência foram bem superiores àqueles quando se trabalhou com a média das contagens em triplicata (30 campos), tabela 3.11 Isto, muito provavelmente, se deve à disposição aleatória das plaquetas, e ao seu baixíssimo número por campo no esfregaço corado. Poderia ser minimizado pela utilização de um critério que estabelecesse um mínimo de células contadas para amostras plaquetopênicas.

Quando foi usada a média das contagens em triplicata por 10 campos, portanto, um total de 30 campos, os métodos indiretos demonstraram menor risco de levar a conduta terapêutica inadequada que os contadores H1 e T-890. Entretanto, para as contagens indiretas de plaquetas em que pelo menos um de seus resultados teve diferença significativa em relação ao método de referência, os resultados com risco de má conduta profilática foram semelhantes inclusive àqueles obtidos pelo H1 e T-890 (tabela 3.12).

O fato de termos utilizado regiões da extensão corada onde os eritrócitos estavam mais dispersos se justificam por dois motivos básicos: primeiro, pela maior facilidade e segurança em contar as hemácias em locais onde não

estivessem superpostas ou quando um bom número delas estivessem ainda se tocando e, segundo, em função de a contagem pelo "mét. ind. 1" (que foi feita simultaneamente) exigir como local exato para contagem das plaquetas, a região da extensão de sangue propícia para análise da morfologia das hemácias (os dois métodos foram analisados a partir dos mesmos campos microscópios). Segundo os Autores (Nosanchuk et al., 1978; Apibal et al., 1979; Bell & Neely, 1980), é exatamente neste local, que a proporção da média de plaquetas por campo para média de plaquetas por mm^3 é de 1 para 20.000.

Nos dias atuais, preterindo os métodos clássicos, boa parte das contagens de plaquetas em extensão corada são feitas pela utilização de fator de conversão. Este "número mágico" (fator), obtido a partir de vários estudos empíricos comparativos com contadores automáticos ou método de referência, transformaria o número de plaquetas por campo, para número de plaquetas por volume de sangue total. A utilização cada vez menos frequente dos métodos indiretos clássicos a partir da relação eritrócitos-plaquetas, em relação aos que utilizam fator, se devem provavelmente ao reconhecido fato, de que a estimativa de hemácias em extensões de sangue é bastante cansativa e requer maior tempo.

Entretanto, deve-se lembrar que a utilização de métodos indiretos por fator de conversão apesar de não depender diretamente do número de hemácias do paciente, exige do operador a certeza do local exato para a análise da morfologia dos eritrócitos tanto para amostras com número normal de eritrócitos, quanto para indivíduos anêmicos. Apesar dos dados da literatura (Apibal et al., 1979) não terem apresentado diferenças de contagens entre amostras anêmicas e não-anêmicas utilizando um mesmo fator de conversão, vale ressaltar que todos estes estudos foram feitos por operadores bastante experimentados.

Desta forma, sob o aspecto prático, mesmo não se utilizando do número de eritrócitos para efeito de contagem, os métodos que se utilizam de fator de conversão necessitam que o operador saiba exatamente qual o local ideal para análise da morfologia das hemácias. Para amostras não-anêmicas este local é de certo modo encontrado sem maiores dificuldades. Entretanto, para amostras bastante anêmicas o operador inexperiente pode, inadvertidamente, levar em conta um número aproximado de eritrócitos para amostras não-anêmicas e tender

a regiões bem mais espessas da extensão sanguínea, onde evidentemente teriam maior número de plaquetas por campo e, deste modo, obter resultados bastante inacurados. Assim, talvez a título de aprimoramento técnico, a fim de que o laboratorista ganhe confiança do local exato para análise de eritrócitos para indivíduos anêmicos e avaliação das plaquetas por fator de conversão, a utilização dos métodos indiretos que se utilizam da relação plaq/erit nos parecem como um treinamento inicial de comparação a ser levado em conta.

5.2.2. Precisão dos métodos manuais:

A precisão dos métodos em hemocitômetro é diretamente proporcional ao número de células contadas. Quanto maior o número, melhor a precisão. Nesse contexto, os métodos em câmara que se utilizam de líquidos lisantes de eritrócitos ou de plasma rico em plaquetas têm grande vantagem em relação àqueles que, por usarem soluções isotônicas não lisantes de eritrócitos, se vejam inviabilizados de procederem à redução do grau de diluição, principalmente em indivíduos plaquetopênicos. Dados de Lewis et al. (1979); Oliveira et al. (1999), comprovam valores mais imprecisos para os métodos que se utilizam de líquidos diluidores não lisantes (formol-citrato, método de Rees-Ecker), especialmente para amostras plaquetopênicas.

Segundo Berkson et al. (1940), o erro inerente ao uso do hemocitômetro é dependente, não-necessariamente do número de quadrantes contados no retículo, mas principalmente do total de células quantificadas. Este erro inato ao uso da câmara para contagem de plaquetas pode ser estimado em função do número de células contadas no retículo (n), do número de câmaras utilizado para cada contagem (nc), e do número de diluições usadas (nd), onde o erro percentual em relação à média de plaquetas por mm^3 seria igual à $\sqrt{(0,93)^2 (100)^2/n + 4,6^2 / nc + 4,7^2 / nd}$. Dados de Brecher et al. (1953), utilizando esta formulação preconizada por Berkson et al., demonstraram que os valores de CV (%) esperados pela fórmula e aqueles obtidos em relação a amostras de sangue venoso foram equivalentes, com resultados de 8% para 2 contagens repetidas, 6% para 4 contagens e de 4% para 8 contagens. De modo

distinto, as amostras obtidas por sangue capilar tiveram valores muito superiores àqueles esperados. Portanto, o segredo da correta utilização da câmara de contagem estaria no número de células contadas para cada contagem e, de preferência obtidas por punção venosa.

Assim, uma vez que procuramos ao máximo seguir o critério de um mínimo de 200 plaquetas por contagem (diminuindo o grau de diluição ou aumentando o número de quadrantes contados, quando necessário), além de termos usado contagens em triplicata e a partir de 3 diluições distintas, nossos resultados para CV (%) de 10,46 para método de BrCr e 10,26 para método Maspes nas amostras com menos de 30.000 plaq/mm³ e de 9,3% para BrCr e 9% para Maspes no total de amostras com menos de 100.000 plaq/mm³, mostram resultados bastante satisfatórios de precisão para indivíduos com baixos níveis de plaquetas, e são plenamente coerentes pois o erro inerente à câmara para estas condições seria, em média, de apenas 7,59%.

Apesar de alguns autores (Nosanchuk et al., 1978; Apibal et al., 1979) não admitirem grandes diferenças na precisão entre os métodos manuais diretos e indiretos, e de os dados da literatura serem divergentes em relação à precisão dos métodos em hemocítômetro para contagem de plaquetas em plaquetopênicos, com valores que variam de 7% a mais de 20%, talvez sejam explicados pelo próprio critério usado para contagem em câmara (uso correto do hemocítômetro). Dados de Dickerhoff et al. (1995), também utilizando critério de no mínimo 200 células por contagem, a partir de contagens em duplicata obteve valores de CV = 14,7% para níveis médios de plaquetas de 10.000/mm³, que foram bastante similares aos nossos, com valores em torno de 12,6%, para estes níveis de contagens (em triplicata), (tabela 3.10). Nossos dados também são bastante compatíveis com os resultados obtidos por Hanseler et al. (1996) que, em criterioso trabalho, demonstrou qual o menor limite de quantificação para plaquetas. Este Autor revelou que para um valor máximo permitido de 10% para CV, os métodos em câmara seriam satisfatórios para contagens em torno de até 17.000 plaq/mm³, e para valor máximo de 15% para CV, as determinações em hemocítômetro seriam seguras para valores de até 4.000 plaq/mm³. Estes resultados foram melhores até em relação ao contador automático por ele estudado (o H1 Technicon). Some-se a isso o fato de este Autor ter demonstrado

que o método de referência em câmara ter tido como menor limite de detecção valor de 1.600 plaq/mm³ contra valor de apenas 4.300 plaq/mm³ para o referido aparelho.

Segundo Wintrobe et al. (1974), em função do equipamento requerido (custo), tempo e acurácia, a técnica de Brecher-Cronkite representaria provavelmente a de melhor avaliação das plaquetas, mesmo que resultados da literatura reportem valores de CV bastantes divergentes- de 7 a 17% (Cartwright et al., 1968; Glass et al., 1971; Handin et al., 1971; Mayne et al., 1969) Os valores de CV obtidos por Lewis et al. (1979) e Brecher et al. (1953) foram de 8 a 10%.

Assim como descrito por Dacie e Lewis (1984), Bain (1997), o método de Maspes, por também utilizar plasma como amostra, apresentou a vantagem de poder utilizar diluições menores que aquelas pelo método BrCr, e, deste modo, conseguir-se obter maiores números de células por quadrante para aquelas amostras com números bem reduzidos de plaquetas (< 7.000/mm³). Para este método em plasma conseguimos utilizar diluições de até 1:2.

O grande problema do uso da câmara de contagem nos dias atuais se deve provavelmente ao fato de que, uma vez incorporada, a automação trouxe um grande distanciamento entre os mais novos hematologistas ou outros profissionais do laboratório de hematologia e as técnicas tradicionais que, ainda hoje, apesar de poderem ser bastante úteis estão sendo cada vez mais esquecidas. Talvez até mesmo pela falta de ensino das técnicas manuais em algumas universidades.

Em relação à precisão dos métodos indiretos em extensão corada por avaliação em triplicata de dez campos microscópicos (30 campos ao todo), nossos resultados revelaram valores significativamente mais elevados de coeficiente de variação que aqueles obtidos, tanto pela automação quanto em câmara de contagem, no grupo com menos de 100.000 plaq/mm³, bem como nas amostras com menos de 30.000 plaq/mm³ (análise de variância com $p < 0,001$) (tabelas 3.8 e 3.9). Além disso, nossos dados (CV = 26,02%) para grupo de plaquetopênicos críticos (média = 16.560 para "mét. ind.2" e 20.530 para "mét.

ind.1”) foram concordantes com os dados de Lawrence et al. (1995) que utilizando o mesmo critério de contagem e avaliando grupo de plaquetopênicos com valores médios de 16.000 plaq/mm^3 obteve resultados de $CV = 30\%$ para método “mét. ind.1”, confirmando assim valores insatisfatórios de precisão para pacientes com trombocitopenia severa.

Em estudo estratificado, tomando por base os valores estabelecidos pela literatura para transfusão profilática de plaquetas em pacientes sob tratamento quimioterápico, nossos resultados de CV para os métodos indiretos, a partir de triplicata por avaliação de 10 campos microscópicos também se mostraram bastante elevados. Foram em média, da ordem de 20% (amplitude de 7 a 40%) no subgrupo de amostras com valores acima de 20.000 plaq/mm^3 e menores que 30.000 plaq/mm^3 ; de 25% (amplitude de 8,8 a 39%) no subgrupo com valores de 10.000 a 20.000 plaq/mm^3 e de 38% (amplitude de 12,9 a 72%) no subgrupo com menos de 10.000 plaq/mm^3 (tabela 3.10). Todos estes resultados são explicados primeiro pela disposição aleatória das plaquetas no esfregaço e, principalmente, como decorrência do baixíssimo número de plaquetas por campo microscópio nas amostras plaquetopênicas.

Como exemplo, um dos nossos pacientes com contagens em torno de 8.000 plaq/mm^3 ($3.500.000 \text{ erit/mm}^3$), após avaliação de 10 campos microscópios em triplicata, apresentou uma média de apenas 0,2 a 0,7 plaquetas por campo microscópio (em objetiva de imersão, aumento de 1000 vezes). Imaginem portanto, para um paciente com estes níveis de contagem, que um operador avaliando em contagem simples (sem repetição em duplicata ou triplicata) apenas 4 campos microscópios (o que corresponderia aproximadamente aos supostos 1.000 eritrócitos preconizados por Fônio). Ele poderia obter a ausência completa de plaquetas (zero de plaq/mm^3) pois se em 10 campos podemos observar apenas 2 plaquetas, coincidentemente poderíamos em apenas 4 campos não observar uma sequer. Levando para o extremo oposto, se em 10 campos poderíamos observar até 7 plaquetas, quem é que garantiria que coincidentemente todas estas 7 plaquetas não estivessem logo nos 4 primeiros campos avaliados? Deste modo a contagem atingiria valores de 24.500 plaq/mm^3 . Vale lembrar que nossos resultados não foram tão discrepantes assim em função de termos avaliado 30 campos microscópios.

Assim, mesmo para operadores bastante experientes, devido ao baixíssimo número de células por campo microscópico, além do erro inerente à disposição aleatória das plaquetas na extensão sanguínea (como descrito por Brecher et al., 1953), a utilização de métodos indiretos pode ser perigosa para os casos de plaquetopenias mais intensas. A avaliação por profissionais menos experientes pode trazer consequências ainda mais graves. Até mesmo quando feita por pessoal mais qualificado, ela pode ser comprometida pela avaliação de poucos campos microscópicos e levar a resultados discrepantes. O uso de contagens em triplicata a partir de 10 campos (contagem de 30 campos) em 1000x (imersão) diminui bastante o risco de superestimação, muito embora em algumas amostras (pós triplicata) da nossa casuística tenha havido contagens indiretas com valores acima dos limites de transfusão profilática de 20.000 e 10.000 plaq/mm³ que tiveram valores abaixo destes limites pelo método de referência (**tabela 3.11**). Os resultados obtidos pelos métodos indiretos em que pelo menos uma das determinações (dos resultados em triplicata), teve valores acima dos limites profiláticos, com base nos resultados de referência, comprovam o grande aumento do risco de superestimação de contagem quando apenas 10 campos microscópicos são contados (**tabela 3.12**)

Resumir o termo precisão e exatidão para contagens de plaquetas a pontos chave, seria correlacioná-los a dois fatores básicos: Primeiro à sua base estatística de contagem. Para se obter contagens precisas é necessário que uma quantidade suficiente de células seja contada, diminuindo assim o erro estatístico; segundo, à necessidade de identificar com certeza as plaquetas em uma amostra de sangue. Sob este aspecto, qualquer pessoa que tenha observado objetivamente a extensão de sangue corado, ou mesmo em câmara de contagem, de inúmeras amostras de pacientes trombocitopênicos deve reconhecer certa dificuldade de identificar corretamente as plaquetas entre os vários artefatos. Mesmo assim, nosso critério morfológico nos parece bem melhor que aqueles de muitos dos mais sofisticados contadores automáticos de plaquetas. Muitos aparelhos identificam as plaquetas (célula a célula ou partícula a partícula) baseados em apenas um critério. Entretanto, o número de critérios que usamos quando examinamos uma extensão sanguínea corada (tamanho, formato, grânulos, cor, localização em relação às demais células sanguíneas, dentre

outros) é muito mais variado.

A análise da extensão de sangue pode nos dar segurança em discriminar coerentemente as plaquetas, entretanto peca pelo baixo número de células analisadas e pela sua disposição aleatória. A seleção de áreas da extensão sanguínea onde haja distribuição uniforme das plaquetas, se por um lado é essencial à maior reprodutibilidade deste procedimento, por outro, sacrifica a distribuição aleatória das plaquetas (Brecher et al., 1953). Deste modo, seria sensato a utilização de método substancialmente mais impreciso para decisões terapêuticas tão delicadas?

Enfim, mesmo com os baixos resultados de reprodutibilidade obtidos para os métodos indiretos, entendemos que, em algumas amostras analisadas por automação com resultados duvidosos, possam, numa primeira instância, ser avaliadas pelos métodos indiretos, como critério apenas de triagem para controle da automação. Desde que um elevado número de campos microscópicos, em objetiva de imersão sejam contados e para níveis de plaquetas não tão baixos e que não impliquem em qualquer risco para o paciente. Alguns exemplos característicos seriam a presença de aglutinação de plaquetas ("clumps"), satelização, restos de fibrina, fragmentos de eritrócitos, plaquetas gigantes, debris, dentre outros, já que são de ordem prática favoráveis e mais facilmente identificáveis em extensões coradas. Além disso, muitos destes casos necessitam naturalmente de contagem diferencial de leucócitos, bem como da avaliação de outras alterações qualitativas das plaquetas. Vale lembrar que a presença de "clumps" é facilmente identificável à extensão corada (muitas vezes em poucos campos) e se deve a problemas não relacionados à automação, mas sim a uma coleta inadequada, crioaglutinação ou mesmo aglutinação EDTA dependente. Nestes casos o procedimento correto é, uma vez eliminada a hipótese de aglutinação a frio (repetindo a contagem após aquecimento da amostra em banho maria), fazer nova coleta em heparina ou citrato. Em acordância com Wintrobe (1974), achamos que os métodos indiretos devem ser usados apenas como critério grosseiro de avaliação das plaquetas, uma vez que são bastante imprecisos, não sendo recomendados efetivamente como dado fidedigno para conduta terapêutica.

Para os casos de plaquetopênicos bastante críticos, cuja decisão terapêutica dependa do número exato de plaquetas, a contagem em câmara de Neubauer (de preferência em triplicata) a partir de sangue total como amostra, e utilizando como diluente solução de oxalato de amônio a 1%, apesar de muito trabalhosa, continua sendo o procedimento mais prudente. A utilização de método em plasma, desde que padronizado para o erro relativo à retenção de plasma livre de plaquetas entre as hemácias, poderia ser uma alternativa.

5.3. Métodos automáticos:

Está bem caracterizada pela literatura o grande aumento na capacidade de precisão e exatidão dos contadores em relação às técnicas manuais, em amostras normais (Ross et al., 1986; Hallawell et al., 1991; Cornbleet et al., 1992; Gulati et al., 1992; Bentley et al., 1993; Cornbleet et al., 1993; Jones et al., 1995; Llompart et al., 1995; Gutiérrez et al., 1996). Isto se deve principalmente ao muito maior número de células contadas pelos aparelhos (Williams et al., 1990). Entretanto, este fato pode levar a suposição de que esta "performance" superior possa ser extensiva para todos os limites de mensuração (Hanseler et al., 1996).

5.3.1. Exatidão dos contadores automáticos:

Os resultados obtidos na 1ª fase não demonstraram diferenças significativas entre os contadores ADVIA, H1 e T-890, em amostras de indivíduos normais, tomando por base os valores obtidos pelo método de referência de BrCr (ICSH 1984/1988). A pequena, mas estatisticamente significativa, diferença média de 12.500 plaq/mm³ (teste "t" pareado com $p < 0,05$) do Coulter STKS em relação ao valor de referência, deve ter ocorrido, provavelmente, como consequência da utilização de diferentes calibradores pelos aparelhos (Wertz et al., 1976), o que pode ser corrigido pelo uso de método controle pós-calibração utilizando algumas amostras normais, atestando assim a necessidade deste procedimento técnico que, como referido por Mayer et al. (1980) poderia ser a causa das grandes diferenças de resultados entre laboratórios. Por outro lado, mesmo sendo visto

como perfil de contagem deste aparelho, 12.500 plaq/mm³ são apenas cerca de 4,5% do valor médio de referência obtido para o grupo de indivíduos analisados nesta fase. E, para esses níveis de contagem, nos parecem, clinicamente, de pouco significado.

Os resultados obtidos na 2ª fase, entre os valores alvo desejados e os valores obtidos, demonstra, de um modo geral, o grande poder de exatidão dos contadores automáticos em amostras normais ou plaquetopênicas sem qualquer interferente (sem alarmes morfológicos ou pedido de revisão pelos aparelhos).

Entretanto, os valores médios obtidos pelo Coulter T-890 (após as 36 determinações repetidas por grupo de contagem) de 11 a 19,5% menores que os valores alvo desejados (pós-correção para erro de diluição) (**tabela 2.4, figura 1**), foram similares àqueles obtidos por Lawrence et al. (1995), utilizando metodologia semelhante, para o contador E-8.000 da Sysmex, e nos parecem revelar um discreto menor poder de sensibilidade destes aparelhos. Estas similaridades de resultados talvez se devam ao fato de estes dois contadores se utilizarem apenas do princípio de impedância elétrica, em apenas um canal, para contagem de plaquetas. Para os demais contadores (ADVIA, H1 e STKS) não foi observada qualquer diferença significativa entre os valores alvo obtidos e os desejados nas amostras "plaquetopênicas de laboratório" (**tabelas 2.1, 2.2 e 2.3**).

A grande maioria das tecnologias hoje utilizadas é baseada tradicionalmente em impedância elétrica, ou na dispersão dos raios de luz laser para obtenção do volume celular. Pelo fato de as inúmeras possibilidades clínicas que levam às trombocitopenias também poderem alterar o volume das plaquetas, das hemácias, ou proporcionarem o aparecimento de outros interferentes, há dúvidas de que aqueles critérios utilizados pelos contadores sejam suficientemente seguros para a determinação exata das plaquetas nestes pacientes.

Nossos resultados demonstraram para os pacientes com níveis de plaquetas abaixo de 30.000/mm³, que apenas o ADVIA (que se utiliza de sistema bidimensional de contagem: volumetria + índice de refração) teve correlação significativa com o método de referência ($r = 0,947$). Os demais contadores (que

se utilizam de sistemas simples por volumetria) demonstraram valores pouco significativos em relação ao método de referência (**tabela 3.4**).

Além disso, nosso estudo comparativo entre os diferentes princípios de contagem, também demonstrou, para níveis abaixo de 30.000 plaq/mm³, não haver correlação significativa entre o sistema bidimensional utilizado pelo ADVIA com os sistemas simples utilizados pelos demais aparelhos (STKS, H1 e T-890) **tabela 3.5**. Nossos resultados são compatíveis com aqueles obtidos por Kunicka et al. (1998) que também encontrou significante maior correlação entre a contagem manual de referência e o sistema ADVIA que com os contadores H3, que se utiliza da mesma tecnologia H1 para contagem de plaquetas e o STKS, em amostras trombocitopênicas e nos casos de pacientes contendo partículas não-plaquetárias de tamanho equivalente ao das plaquetas. É oportuno lembrar que, para plaquetopênicos com menos de 50.000 plaq/mm³, Dickerhoff et al. (1995) também não encontraram correlação significativa entre o H1 e o método de referência; entre o H1 e a citometria de fluxo com anticorpos monoclonais antiplaquetários (CMF); entre o E-5000 (princípio simples de contagem por impedância) e o método de referência; entre o E-5.000 e a CMF. Seus dados comprovaram, para aqueles níveis de plaquetas, haver correlação significativa apenas entre a CMF e o método de referência.

A análise comparativa entre os nossos resultados da 2ª fase e da 3ª fase demonstram sensível perda da capacidade de exatidão dos aparelhos STKS, H1 e T-890, nos pacientes verdadeiramente plaquetopênicos, principalmente pelo T-890.

Associada à menor sensibilidade demonstrada e baixa inclinação no estudo de linearidade (**tabelas 2.4 e 2.6**) na 2ª fase (2a), os resultados mais elevados do Coulter T-890 em relação ao método de referência nas amostras do grupo de plaquetopênicos críticos (**tabela 3.11**), sugerem que sejam decorrentes da inabilidade em distinguir partículas não-plaquetárias ou restos celulares, na contagem final de plaquetas. Dados de Ault, (1996) também demonstraram haver uma clara tendência de as contagens por impedância elétrica isolada (volumetria por pulso de corrente) serem mais elevadas em pacientes plaquetopênicos que possuam elevado número de partículas não-plaquetárias.

Apesar de não ter demonstrado perda de exatidão nas amostras “plaquetopênicas” da 2ª fase, o H1 que se utiliza de análise volumétrica por dispersão de luz laser (contagem única por amostra) e o STKS que se utiliza de análise volumétrica por impedância, também demonstraram uma tendência em incluir partículas não-plaquetárias nas amostras severamente plaquetopênicas (**tabela 3.11**). Talvez pelo fato de o STKS utilizar contagem tripla por amostra através de 3 canais distintos de abertura para quantificação de plaquetas (o T-890 se utiliza de contagem tripla por amostra, através apenas de um canal de abertura), tenha tido resultados menos comprometedores que aqueles obtidos pelo H1 e T-890.

O aparelho possuidor de sistema bidimensional de contagem (ADVIA), não apresentou inacurácia significativa em nenhuma das amostras plaquetopênicas da 3ª fase (**tabela 3.11**). O STKS, mas principalmente o H1 e o T-890, em função de alguns de seus resultados discrepantes para o valor de referência (**tabela 3.11**) demonstraram que seus sistemas de distinção de partículas foram menos eficientes que aqueles utilizados pelo ADVIA.

Como os dados de Kunicka et al., 1998; Ault, 1996; Dickerhoff et al., 1995; nossos resultados sugerem que a contagem de plaquetas pela utilização da volumetria como único parâmetro de contagem, seja por impedância, seja por análise óptica da dispersão da luz laser, possui a significativa tendência em superestimar as contagens de plaquetas em amostras contendo partículas não-plaquetárias. Deste modo, não nos parecem seguras para pacientes críticos.

Porém, é oportuno mencionar que também ficou comprovada a grande capacidade dos contadores em deflagrar alarmes nas amostras plaquetopênicas com risco de contagens erradas. Nenhum dos contadores deixou de acusar “flags” em amostras com erros significativos (**tabela 3.13**). Além disso, cerca de 30%, em média, das amostras com “flags” (**tabela 3.14**) tiveram realmente resultados discrepantes, destacando assim ainda haver a necessidade do uso de métodos de referência para a liberação de resultados suspeitos de erro pela automação. Estes dados são concordantes àqueles obtidos por Cornbellet et al. (1985).

Uma vez que os próprios fabricantes, sabendo das limitações técnicas dos seus aparelhos, elaboram programas de software que pedem revisão de contagem em casos duvidosos, a liberação destes resultados fica sob total responsabilidade dos responsáveis técnicos das instituições que se utilizam da automação. Amostras com resultados questionados pelos próprios aparelhos, e ainda assim são dispensados, podem causar sérios riscos para os pacientes, principalmente em se tratando de amostras plaquetopênicas.

Nas amostras sem alarmes, mesmo no grupo de plaquetopênicos críticos, não houve diferença significativa em nenhum dos aparelhos, quando comparados ao método de referência.

Aliado ao comprovado poder de reprodutibilidade dos contadores, nestas amostras críticas, principalmente quando sem alterações morfológicas (ausência de *flags* após triplicata), sugerem não haver necessidade de reavaliação da contagem de plaquetas nestas amostras sem interferentes, mesmo que sejam severamente plaquetopênicas. O uso dos resultados, nestas amostras sem alarmes, apenas por serem plaquetopênicas, obtidos por avaliações indiretas (sabidamente pouco precisas) agravada pela observação de poucos campos microscópicos ou por operador inexperiente, como ponto de referência para a tomada de decisões terapêuticas nos parecem bastante insensatas. Além disso, nossos resultados para o "mét. ind.1", demonstrou, para as amostras do grupo com menos de 30.000 plaq/mm³, de modo concordante àqueles obtidos por Lawrence et al. (1995), valores de contagens que foram significativamente maiores que aqueles obtidos pelo método de referência ou pelo ADVIA (contador que obteve o melhor grau de correlação de resultados com o método de referência, e maior poder de distinguir elementos plaquetários de outros possíveis interferentes), com teste t pareado indicando $p < 0,001$ em ambas as comparações de resultados.

Deste modo, com exceção do ADVIA, nos parece que nenhum dos demais aparelhos demonstrou plena capacidade de distinção entre as plaquetas e os restos celulares ou artefatos. Nossos resultados atestam a tão questionada capacidade dos contadores em distinguir as plaquetas com segurança (Dickerhoff et al., 1995; Hanseler et al., 1996). Eles comprovam que a utilização de princípios

simultâneos para distinção e contagem das plaquetas podem trazer maior segurança para a tomada de decisões terapêuticas em pacientes severamente plaquetopênicos.

5.3.3. Contadores automáticos versus limites indicados para transfusão de plaquetas:

A grande tendência em diminuir os limites de transfusão profilática (Ault, 1996) para plaquetas, principalmente em função dos riscos de transmissão de doenças e do seu alto custo, impõe que a precisão e exatidão das contagens destes elementos sanguíneos sejam atualmente mais importantes hoje., que em dias anteriores. A capacidade em diminuir os níveis profiláticos de transfusão para 10.000 ou 5.000 plaq/mm³, sem perigo para o paciente, dependem dramaticamente da obtenção de valores exatos para esses níveis. Nossos resultados (tabelas 3.1, 3.2, 3.3, 3.5 e 3.11), aliados a boa parte dos relatos da literatura, demonstram que a maioria dos aparelhos hoje utilizados nos laboratórios de hematologia clínica não são capazes de dar segurança para condutas terapêuticas mais ousadas. Esta segurança estaria restrita apenas àqueles aparelhos ultra-modernos em que mais de um princípio de contagem são utilizados ou à utilização da citometria de fluxo com anticorpos monoclonais (Dickerhoff et al., 1995; Ault, 1996; Stanworth et al., 1999). Deste modo, de acordo com o International Committee of Standardization in Haematology (1984; 1988), seria conveniente que tais decisões clínicas fossem embasadas no método de referência que, embora requeira tempo, demonstra maior poder de exatidão por permitir clara distinção entre as plaquetas e as demais partículas. Além do que, nossos resultados não demonstraram diferenças significativas de precisão em relação aos contadores, nas amostras plaquetopênicas críticas (tabela 3.10).

Portanto, nossos dados não indicam que os tradicionais princípios utilizados pela automação, isoladamente, possam prover segurança à conduta terapêutica em pacientes severamente trombocitopênicos. Para a maioria dos contadores, ainda há necessidade de contagens por método de referência para utilização de menores limites de transfusão profilática de plaquetas.

5.3.3. Precisão dos contadores automáticos:

Todos os contadores demonstraram excelente capacidade de precisão, tanto em amostras normais e plaquetopênicas obtidas em laboratório após diluição (tabelas 2.1 a 2.8) quanto nas contagens de 50.000 até 800.000 plaq/mm³, sem presença de alterações morfológicas ou alarmes (tabela 2.9).

O discreto maior poder de precisão dos contadores Coulter em relação aos ADVIA e H1, obtido nas determinações laboratoriais da 2ª fase, provavelmente se devam ao fato de os aparelhos Coulter se utilizarem da média de 3 contagens para cada resultado liberado. Para as amostras em que hajam diferenças de contagens entre algum dos resultados, em pelo menos um dos canais, há deflagração de alarmes. Os resultados liberados pelo H1 e ADVIA são resultantes de apenas uma determinação.

O fato de as nossas contagens automatizadas abaixo de 30.000 plaq/mm³ terem demonstrado diminuição na reprodutibilidade em relação aos níveis maiores, se deve provavelmente ao baixo número de células contadas pelos aparelhos nas amostras com níveis críticos de plaquetas. Entretanto, estes valores ainda foram bastante satisfatórios. Os valores de coeficiente de variação por nós obtidos para as amostras com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm³ (tabela 3.10) foram semelhantes àqueles de Ault (1996) estudando o Cell-Dyn 4.000.

Assim, apesar de ter havido uma discreta perda de precisão para as contagens nas amostras plaquetopênicas verdadeiras (3ª fase) em relação àquelas obtidas para as amostras plaquetopênicas obtidas em laboratório (2ª fase), a capacidade de precisão dos aparelhos, mesmo em indivíduos severamente plaquetopênicos, nos parecem ainda aceitáveis. Estes resultados também podem estar relacionados ao fato de os pacientes plaquetopênicos, em geral, possuírem outras alterações, sejam ou não na série plaquetária, e que de certa forma podem influenciar em discreta perda de precisão.

Os resultados obtidos pelo T-890 para as amostras do grupo com menos de 30.000 plaq/mm³ (3ª fase) demonstraram significativa maior capacidade de precisão em relação a todos os demais (teste t pareado: $p < 0,001$ em relação ao ADVIA; $p < 0,007$ em relação ao STKS e $p < 0,001$ em relação ao H1). Não houve

variação significativa entre os demais aparelhos (teste t pareado: $p > 0,1$ entre ADVIA e STKS; $p = 0,8$ entre ADVIA e H1 e $p > 0,3$ entre STKS e H1).

Estes dados reforçam a proposição de vários autores na literatura (Kunicka et al., 1998) de que o grande problema dos aparelhos em plaquetopênicos não reside na imprecisão nem na inexatidão em função do simples fato de as contagens serem baixas, como foi demonstrado em nossa 2ª fase, mas que as amostras de indivíduos plaquetopênicos, de um modo geral, também possuem alterações morfológicas, sejam na série plaquetária ou em outras séries sanguíneas ou apresentarem quaisquer outros interferentes como restos celulares e artefatos. Estes sim como grandes causadoras da inexatidão nos plaquetopênicos.

Desta forma, a comprovação de resultados reprodutíveis não exclui a possibilidade de erro de contagem. Assim, a utilização isolada de um único princípio de contagem pelos contadores, apesar de não causar variações de contagens significantes (mesmo em amostras com alarmes), é incapaz de diferenciar com segurança as plaquetas dos demais interferentes. Isto pode levar ao sério problema de "reprodutibilidade do erro", o que pode ser perigoso para alguns casos clínicos, principalmente em limites críticos de plaquetas.

Os resultados obtidos para as amostras que não tiveram alarmes em quaisquer das determinações em triplicata para as amostras do grupo com menos de 30.000 plaq/mm^3 , tanto pelo T-890 como pelo H1 e STKS não demonstraram diferenças significativas em nenhuma das contagens. Assim, fica evidente a importância de seguir os critérios dos próprios fabricantes, de reavaliação de resultados de contagens com alarmes e pedido de revisão. Cabe a cada Instituição que utilize contadores automáticos a responsabilidade única e exclusiva em liberar o resultado de uma contagem suspeita. Deste modo, o operador que, mesmo repetindo uma contagem com alarme obtiver resultados aproximados, deve utilizar método de referência para descartar a possibilidade da referida "reprodutibilidade do erro".

5.3.4. Os alarmes nos contadores automáticos:

Nas amostras sem alarmes, mesmo no grupo de plaquetopênicos críticos não houve diferença significativa nas contagens por nenhum dos aparelhos, quando comparados ao método padrão (**tabela 3.13**). Assim, aliado ao grande poder de reprodutibilidade dos contadores em amostras de doadores normais diluídas, como comprovado pelos dados da nossa 2ª fase, nossos resultados sugerem não ser necessário a reavaliação por método alternativo menos preciso, das contagens nas amostras sem interferentes (alarmes), após confirmação em triplicata pelo próprio aparelho, mesmo sendo plaquetopênicas.

Muitos dos contadores ainda em fabricação ou que, apesar de terem saído de linha ainda continuam sendo usados na prática laboratorial, usam o limite de tamanho como referência única para discriminar plaquetas de outras partículas (celulares ou não). Isto pode causar alguns problemas principalmente em amostras com plaquetas gigantes, eritrócitos bastante microcíticos ou fragmentados e debris celulares. Entretanto, em nossa casuística, não foi detectada por nenhum dos aparelhos VCM (volume corpuscular médio dos eritrócitos) (**anexo 12**) ou curva histograma de hemácias que caracterizasse eritrócitos de pequeno tamanho, e que pudessem interferir nos limites de inclusão para plaquetas. Apenas duas de nossas amostras, incluídas em estudo à parte, por não serem plaquetopênicas, apresentaram fragmentos de eritrócitos.

De modo contrário à presença de hemácias microcíticas, grande parte dos nossos casos apresentou suspeita da presença de debris celulares pelos contadores. Com exceção do ADVIA, os demais contadores deflagraram alarmes em grande parte das suas determinações, na maioria das vezes em função de interferentes não-plaquetários (código 3 na nossa metodologia), para o nosso grupo de pacientes plaquetopênicos.

Vale lembrar que, segundo o próprio fabricante, o ADVIA usa o sinal de asterisco (*) apenas para amostras cujo critério de identificação do aparelho tenha gerado suspeita de erro no resultado (ver descrição técnica do aparelho). Uma vez que este aparelho teve um número de pedidos de revisão de contagem bem inferior aos demais e além disso, não ter tido resultados divergentes do método

de referência, fica clara que a associação de sistemas ou princípios de detecção de partículas, não só pelo tamanho, aumenta consideravelmente a segurança de resultados, e, por sua vez, diminui a necessidade de revisão de contagem em boa parte das amostras.

Os resultados obtidos especificamente em relação ao aspecto morfológico de plaquetas gigantes também demonstrou que a utilização do índice de refração facilita a inclusão de plaquetas, mesmo maiores que seu diâmetro normal (até 20 fentolitros) e possibilitam ser incorporadas à contagem. Deste modo, traduzem melhor o número de plaquetas em indivíduos que tenham, por exemplo, plaquetopenias por púrpura trombocitopênica idiopática (PTI), púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) ou coagulação intravascular disseminada (CIVD). Estes resultados são favoráveis àqueles obtidos por Stanworth et al. (1999) que demonstrou significantes diferenças nas contagens de plaquetas comparados com os valores obtidos por princípio de impedância, quando as causas de trombocitopenia levaram, ao aumento do número de plaquetas gigantes no sangue periférico (também comprovadas pela extensão sanguínea corada). Entretanto, como em nossa casuística foram observadas a presença de plaquetas gigantes em poucos casos, um estudo mais aprofundado, com um número maior de amostras poderia ratificar estes dados.

Provavelmente pelo fato de o contador H1, além do volume, também determinar o conteúdo de hemoglobina para cada célula avaliada no canal hemácias/plaquetas, os resultados para estas amostras com plaquetas de volume no limite de inclusão de hemácias, tenham sido similares aos de referência e aos do ADVIA.

De modo semelhante, os dados obtidos para as amostras com presença de fragmentos de eritrócitos também demonstraram a maior capacidade do aparelho com análise bidimensional das plaquetas (o ADVIA) para excluir estes restos de hemácias das plaquetas.

5.4. Métodos automáticos versus manuais:

Poucos autores tem enfatizado que a melhor performance dos contadores em relação aos métodos manuais seja válida somente para intervalos de mensuração limitados (Kjeldsberg et al., 1993), bem como relatado os limites da contagem das células nos seus vários níveis de contagem (Mayer et al., 1980; Ross et al., 1980).

Quando o número de plaquetas é baixo, é esperado que o coeficiente de variação aumente em função de um menor número de células contados e que o uso dos contadores celulares possa ser inapropriado (England et al., 1984). Para as amostras com um grande número de células (trombocitoses), a acurácia dos aparelhos também não tem sido avaliada criticamente (Kjeldsberg et al., 1993).

É comum a prática do uso de técnicas manuais se o número de plaquetas é baixo. Contudo, a decisão do uso de métodos manuais ao invés dos automáticos é baseado principalmente em impressões subjetivas que em sólidas bases estatísticas (Hanseler et al., 1996). Para Hackney et al. (1986) há falta de estudos matemáticos mais rigorosos na avaliação dos aparelhos e, decisões clínicas importantes com consequências significantes podem ocorrer, como por exemplo em pacientes com baixo número de plaquetas recebendo quimioterapia.

Segundo Hanseler et al. (1996) "O significativo aumento da precisão dos modernos contadores automáticos pode levar a uma má interpretação de que a performance destes instrumentos é superior a contagem manual, acima de qualquer limite de intervalo mensurado", e que o tema da determinação dos limites analíticos em hematologia são discutidos em poucos artigos e não estão incluídos nos mais novos livros textos. Para o Autor, a explicação para isso seria em função ou de a comunidade científica não considerar isto como um problema de importância ou então de que não exista solução óbvia para o problema.

Em geral, a decisão de uma contagem se manual ou por automação é usualmente baseada na experiência do responsável pelo setor de hematologia ou na capacidade do aparelho em deflagrar alarmes. Entretanto, muitas vezes esta decisão é tomada sem que o operador saiba exatamente a performance dos métodos manuais e automáticos utilizados ou até mesmo, por falta de

embasamento estatístico, tenha a equivocada impressão matemática de que a obtenção de resultados aproximados exclui a possibilidade de erro de contagem, e que a ausência de alarme em uma amostra pode não caracterizar que aquela amostra seja isenta de alterações morfológicas. Vale lembrar que a escolha de método alternativo de contagem para contraprova, de qualidade inferior àquele utilizado inicialmente, pode trazer resultados ainda mais equivocados.

Nossos resultados demonstraram que em algumas amostras não houve repetição do alarme nas três determinações (**tabela 3.13**). A ausência de resultados discrepantes nas amostras sem alarmes para os contadores T-890 e H1 em relação ao método de referência (**tabela 3.13**) somente pôde ser obtida em função de termos usado contagens em triplicata, ou seja, algumas amostras que não repetiram o "flag" nas três determinações tiveram resultados divergentes da determinação de referência. Desta forma é mais sensato que uma amostra com níveis bastante baixos de plaquetas mesmo que a primeira determinação pelo aparelho não tenha dado alarme, por se tratar de níveis críticos de contagem, seja passada em triplicata para evitar a possibilidade de que aquela amostra tenha erro sem ter acusado esta possibilidade, através do "flag", na primeira determinação do aparelho.

Os dados da literatura tentando traduzir a relação plaquetas campo para plaquetas por milímetro cúbico são controversos (Miale et al., 1972; Bell & Neely, 1980; Abbey, 1978). Apesar de termos usado fator de conversão plaquetas campo para plaq/mm³ de 20.000, nossos resultados para o "mét. ind. 1" foram semelhantes àqueles obtidos por Lawrence e colaboradores (1995), que também estudou pacientes severamente plaquetopênicos, e são mais compatíveis com fator de correção de 18.000 que de 20.000, uma vez que estudo comparativo com o "mét. ind. 2" (teste "t" + 2.750 com p = 0,001 para o grupo < 30.000 plaq/mm³; +5.030 com p < 0,001 para grupo < 100.000 plaq/mm³ e r > 0,980), e com o método de referência (teste "t" +2.500 com p = 0,008, para grupo < 30.000 e +3.730 com p = 0,002 para grupo < 100.000 plaq/mm³) apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Além disso, vale lembrar que aqueles estudos para determinação de fator de conversão, não foram feitos em grupo específico de pacientes plaquetopênicos.

Nossos dados já discutidos no tópico dos métodos manuais deixa bem clara a inferior capacidade de precisão das contagens indiretas, em relação às determinações em hemocitômetro bem como em relação àquelas por automação.

Se tomarmos por base como menor limite de quantificação (limite para o qual é definida uma imprecisão máxima aceitável, que não pode ser ultrapassada) o valor de 15% para o coeficiente de variação (como limite máximo aceitável para contagem de plaquetas: Stockl et al., 1995; Fraser et al., 1990), a contagem de plaquetas por métodos indiretos se torna inapropriada à liberação de resultados para níveis de plaquetas tanto inferiores a $30.000/\text{mm}^3$, quanto para aqueles menores que $100.000/\text{mm}^3$. Nossos resultados são concordantes com as considerações de Wintrobe et al. (1974). Dameshek (1932), sobre a limitação técnica dos métodos indiretos para liberação de resultados, servindo apenas como alternativa viável para verificação de alterações morfológicas plaquetárias como "clumps", presença de plaquetas gigantes, fragmentos de hemácias, restos de fibrina, etc, ou para uma estimativa apenas grosseira e de primeira instância da possibilidade de grandes discrepâncias para com a automação.

Em relação aos métodos em hemocitômetro, para os níveis críticos de plaquetas (abaixo de $30.000/\text{mm}^3$) exceção feita ao Coulter T-890, não houve diferenças significativas de CV para com os aparelhos. Os resultados obtidos pelo T-890 apesar de reprodutíveis não demonstraram segurança de contagem nas amostras que apresentaram alarmes, quando determinadas em triplicata, demonstrando deste modo a perigosa característica de reprodutibilidade do erro.

A virtual igualdade da precisão entre os contadores e os métodos em câmara para as amostras abaixo de 100.000 e de 30.000 plaq/ mm^3 , aliada à grande quantidade de alarmes demonstrada pelos aparelhos (exceção feita ao ADVIA) juntamente com a comprovação de que em cerca de 30% destas amostras houve real discrepância de resultados (dados concordantes com os de Cornbelet et al., 1985), fica evidente que mesmo nos dias atuais, a utilização do hemocitômetro ainda se faz necessária. Talvez, uma vez ultrapassadas as desvantagens de custo, a utilização da citometria de fluxo com os anticorpos monoclonais possa ser incorporada de vez como critério de controle de qualidade dos contadores, ou até mesmo como método de referência para contagem de

plaquetas.

A pequena quantidade de alarmes e pedidos de revisão obtidas pelo ADVIA, principalmente em função de seu maior poder de discriminação entre as plaquetas e outras partículas celulares como debrís (apenas para amostras sob suspeitas de "clumps" houve pedido de revisão; em nenhuma amostra com presença de plaquetas gigantes, confirmadas em esfregaço, ou debrís, detectados pelos demais aparelhos, houve pedido de revisão pelo ADVIA) demonstra seu maior poder de distinção das plaquetas.

Deste modo, havendo uma tendência por parte dos demais fabricantes à utilização de princípios associados para contagens de plaquetas, deverá haver uma diminuição na necessidade de utilização da câmara de contagem. Além disso, a possível utilização da citometria de fluxo com anticorpos monoclonais antiplaquetários marcados com fluorocromos como método de referência, ou pelo menos como norma de avaliação dos novos modelos de contadores, restringiria o uso do hemocitômetro àquelas instituições que ainda se utilizassem de métodos automatizados com limitações na contagem de plaquetas. A falta de concordância de resultados entre os contadores, de um modo geral, pode dificultar o estabelecimento e uniformização dos limites profiláticos de transfusão de plaquetas.

CONCLUSÃO

6- CONCLUSÃO

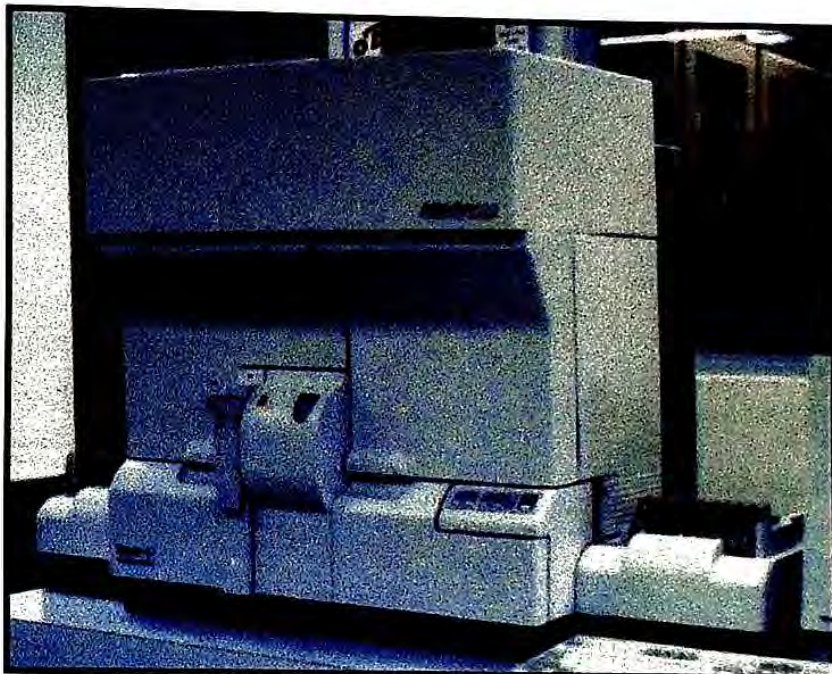
- A acurada contagem de plaquetas em níveis baixos ainda continua sendo um grande problema.
- A falta de concordância de resultados entre os contadores de um modo geral, pode dificultar o estabelecimento e uniformização dos limites profiláticos de transfusão de plaquetas.
- A utilização das mais novas gerações de aparelhos tende a facilitar a tomada de decisões para transfusões terapêuticas em pacientes sob uso de quimioterapia.
- Os contadores automáticos são capazes de produzir resultados acurados e reproduzíveis para baixas contagens de plaquetas, se os equipamentos forem devidamente calibrados e com uso de controle diário, para as amostras sem alarmes.
- A associação de sistema de luz laser ao índice de refração, utilizados pelo ADVIA, demonstrou maior capacidade de distinção entre plaquetas e partículas não plaquetárias. A utilização isolada de princípios de volumetria não nos parece segura para decisões profiláticas em amostras severamente plaquetopênicas e com alarmes.
- A tendência natural da utilização simultânea de mais de um princípio para caracterização das plaquetas pelos contadores mais modernos deve reduzir a necessidade de utilização do hemocítmetro, bem como limitar a avaliação em extensão sanguínea corada apenas para análise morfológica ou certificar a possibilidade de aglutinação de plaquetas.
- Os contadores automáticos, de um modo geral, não demonstraram maior poder de precisão em relação aos métodos diretos em hemocítmetro, nas amostras plaquetopênicas. Ambos demonstraram resultados satisfatórios.
- A correção da presença de PLP entre as hemácias, a partir de condições definidas para obtenção do PRP, pode prover ao método Maspes a obtenção de resultados mais acurados, e sua utilização como alternativa de contagem.

- A maior laboriosidade e menor praticidade do hemocitômetro, em relação aos métodos de estimativa indireta em extensão sanguínea, claramente mais imprecisos, não justificam a não utilização daqueles como controle mais reprodutível e seguro em amostras plaquetopênicas críticas, com suspeitas de erro pela automação.
- A estimativa de plaquetas em extensão sanguínea corada podem até auxiliar na triagem para detecção de erros nos contadores, entretanto, o seu uso para decisões clínicas de transfusão profilática de plaquetas é pouco prudente.
- O limite de 30.000 plaq/mm³ nos parece um valor de corte bastante razoável para descartar o uso de contagens indiretas. Amostras com valores abaixo destes limites devem ser avaliadas em triplicata pelos contadores. Para aquelas em que não houver alarmes em nenhuma das determinações, não há necessidade de contagens confirmatórias em hemocitômetro. Entretanto, para as amostras em que pelo menos um dos resultados pós-triplicata tiver alertado a possibilidade de erro (alarme) pelos contadores, o procedimento correto ainda é a contagem por método de referência em câmara. Não fazê-las por contagens indiretas.

ANEXOS

ANEXOS:

Anexo 1. Fotografia e exemplo de modelo para emissão de resultados pelo ADVIA.



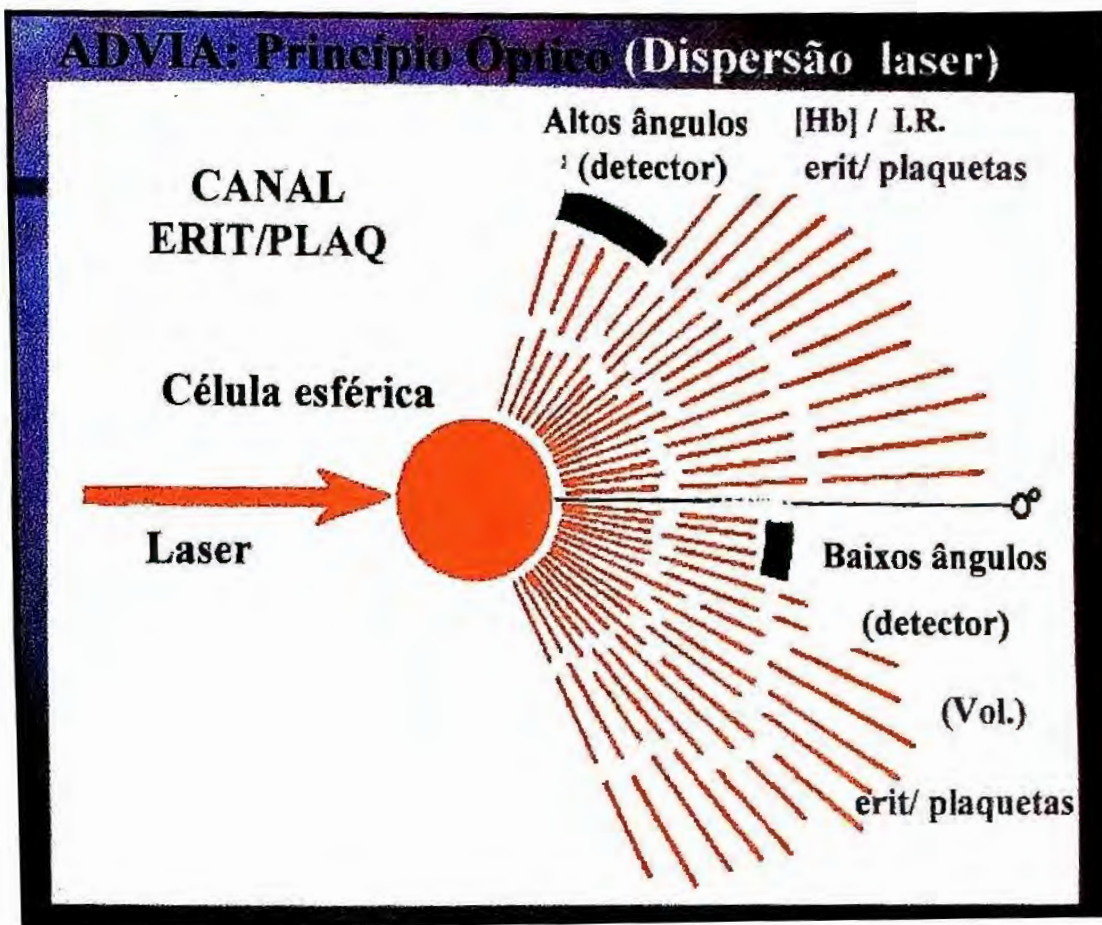
ADVIA 120 Hematology

CBC			
WBC:	L	3,53	$\times 10^3$ cells/ μ L
RBC:	L	2,30	$\times 10^6$ cells/ μ L
HGB:	L	6,7	g/dL
HCT:	L	18,9	%
MCV:		82,0	fL
MCH:		29,0	pg
MCHC:		35,4	g/dL
CHCM:		36,2	g/dL
CH:		29,6	pg
CHDW:		4,05	pg
RDW:	H	15,1	%
RDW:		2,55	g/dL
PLT:	L	25	$\times 10^3$ cells/ μ L
MPV:	H	11,8	fL
PDW:	H	80,3	%
PCT:	L	0,03	%

Morphology Flags	
MICRO:	
MACRO:	
HYPO:	
HYPER:	
ANISO:	
HC VAR:	
LEFT SHIFT:	
BLASTS:	++
ATYPS:	+++
NRBC:	
IC:	
LARGE PLT:	++
PLT CLUMPS:	
MPO DEF:	
RBC FRAG:	
RBC GHOSTS:	

Modelo de resultado emitido pelo ADVIA. Colocamos apenas a parte destinada às contagens globais, sem as curvas histogramas. Em destaque (setas) o valor de plaq $\times 1.000/\mu$ L sem sinal de asterisco (sem pedido de revisão), mesmo com a caracterização de plaquetas gigantes.

Anexo 2. Princípio de contagem de plaquetas pelo ADVIA.



No detector de baixos ângulos (2 a 3°) o sinal é amplificado 30 vezes e convertido em volume para hemácias e plaquetas, e a altos ângulos (5 a 15°) o sinal é amplificado 30 vezes e convertido em saturação de hemoglobina para as hemácias (CHCM) e índice de refração para plaquetas. Estes dois sinais são usados para a análise de plaquetas.

Anexo 3. Fotografia e exemplo de modelo para emissão de resultados pelo STKS.

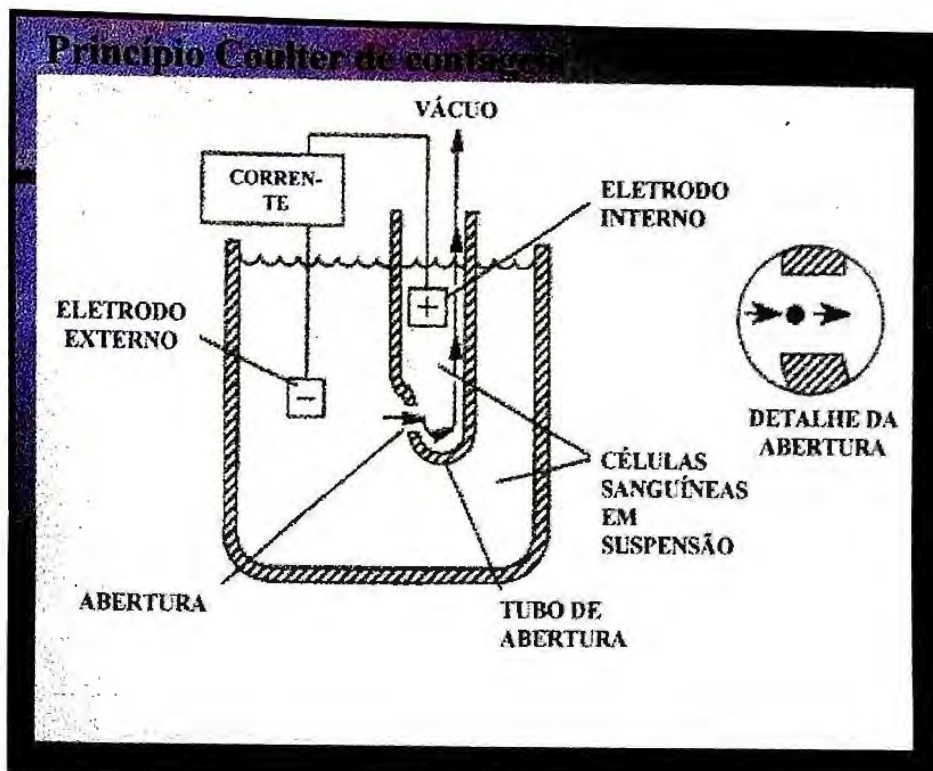


Coulter STKS

Abnormal RBC Pop			Abnormal PLT Pop		
RBC	3.19	L $10^6/\mu\text{L}$	PLT	10 RL	$10^3/\mu\text{L}$
HGB	9.0	L g/dL	PCT	0.006 R	%
HCT	26.2	L %	MPV	6.3 R	fL
MCV	82.1	fL	PDW	17.8 R	(ratio)
MCH	28.2	pg			
MCHC	34.3	g/dL			
RDW	19.0	H %			
RET%		%			
RET#		$10^6/\mu\text{L}$			
SUSPECT FLAGS:					
DEFINITIVE FLAGS:					
Anemia			Thrombocytopenia		
2+ Anisocytosis					

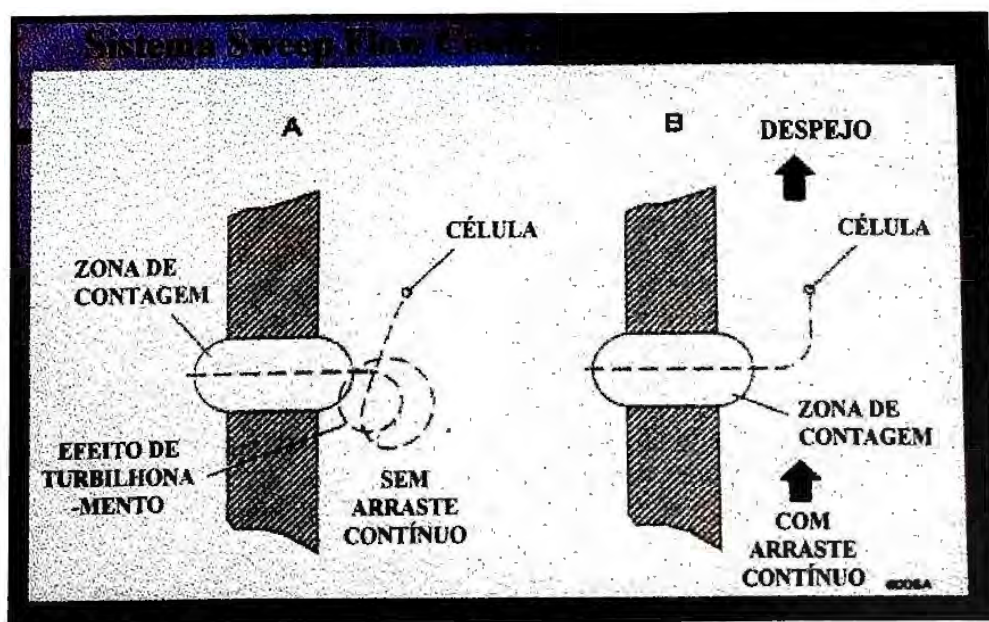
Modelo de resultado emitido pelo Coulter STKS. Colocamos apenas a parte destinada às determinações da série vermelha e plaquetária, sem as curvas histogramas. Em destaque (seta) o valor de plaq x 1.000/ μL com pedido de revisão (RL).

Anexo 4. Princípio Coulter de Contagem.

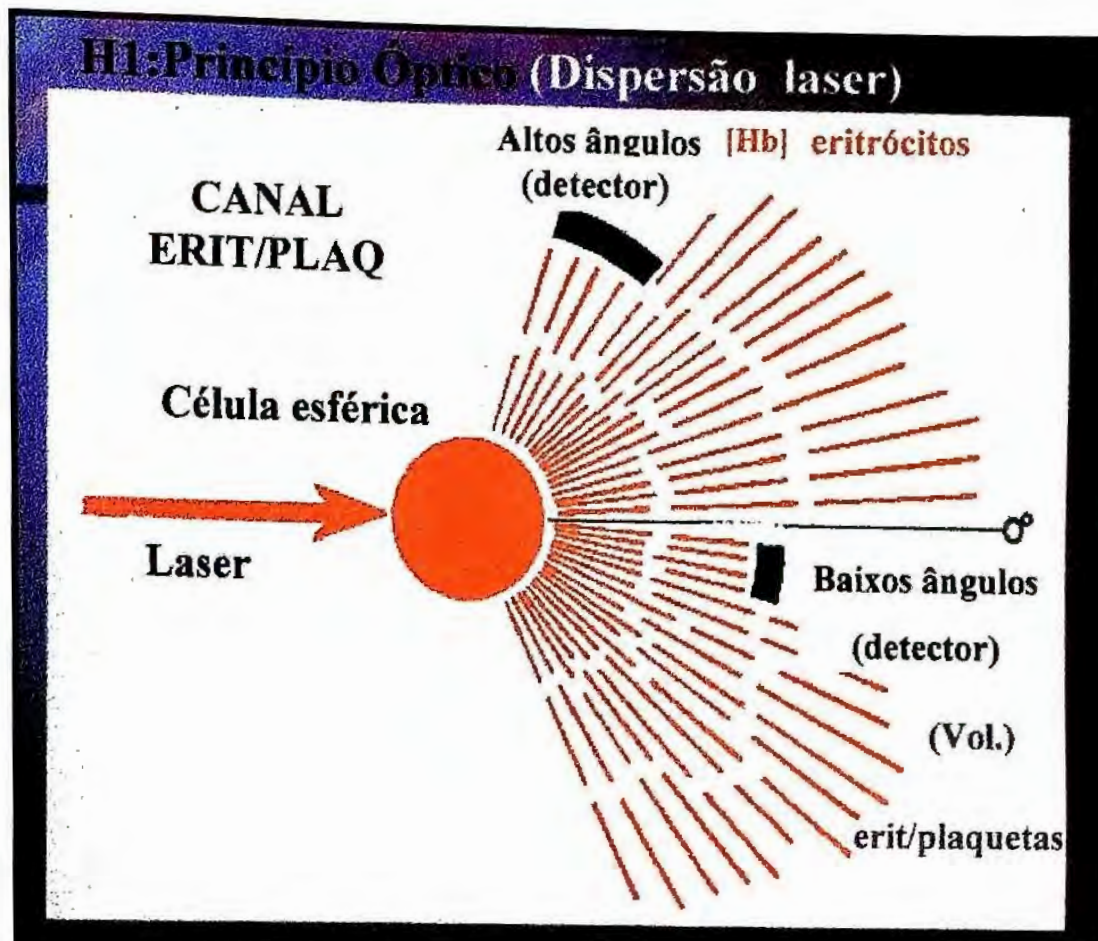


Princípio de impedância elétrica. Os elementos sanguíneos em suspensão passam por uma pequena abertura, entre dois eletrodos, geram um impedimento momentâneo na passagem de corrente (impedância), de magnitude proporcional ao tamanho da partícula. Elementos sanguíneos de 2 a 20 femtolitros (fl) são consignados como plaquetas.

Anexo 5. Sistema Sweep flow utilizado pelos contadores Coulter.



Anexo 7. Princípio de contagem de plaquetas pelo H1.



No detector de baixos ângulos (2 a 3°) há determinação do volume de hemácias e plaquetas. No detector a altos ângulos (5 a 15°) há determinação apenas da saturação de hemoglobina para as hemácias (CHCM). As plaquetas são apenas analisadas volumetricamente.

Anexo 8. Fotografia e exemplo de modelo para emissão de resultados pelo T-890.

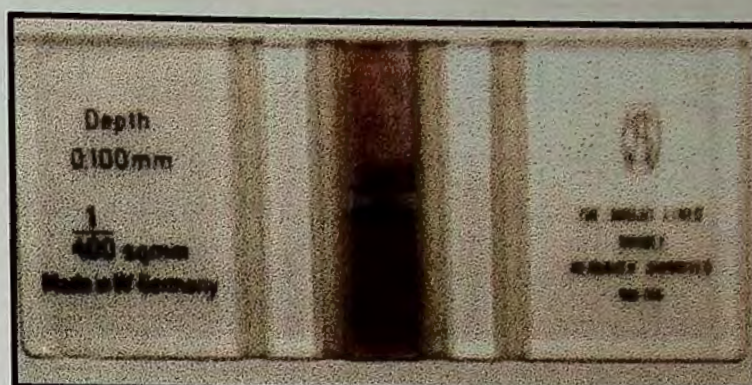


Coulter T-890

EA	*	Ex- me	Valores Normais
	5, 9	LEU x10 ⁹	M 7-8-3 F
	2, 02 L	HGB x10 ⁴	M 5-6-2 F 4-8-3
	5, 7 L	HGB g/dl	M 16-2-2 F 14-2-2
	16, 4 L	HT %	M 42-5 F 42-5
	81, 2	WBC /L	M 87-7 F 50-29
	28, 2	WBC /mm ³	M 7 F
	34, 7	PLT /mm ³	M 35-7 F
		ADH %	M 12-1-5 F
	20, RM	PLQ x10 ⁹	M 130-400 F
		WBC /L	M 8-8-16 F
	26, 5	LYM %	M 20-40 F
		MONO %	M 1-7-9-3 F
		SEG %	M 42-7-57 F
	1, 6	PLT x10 ⁹	M 7-2-3-4 F
		PLQ x10 ⁹	M 211-2-60 F
		SEG x10 ⁹	M 1-4-6-5 F
		EOB x10 ⁹	M 0-0-0-3 F
		BASO x10 ⁹	M 0-0-0-2 F

Modelo de resultado emitido pelo Coulter T-890. Em destaque (seta) a caracterização de contagem duvidosa e pedido de revisão para contagem de plaquetas (RM).

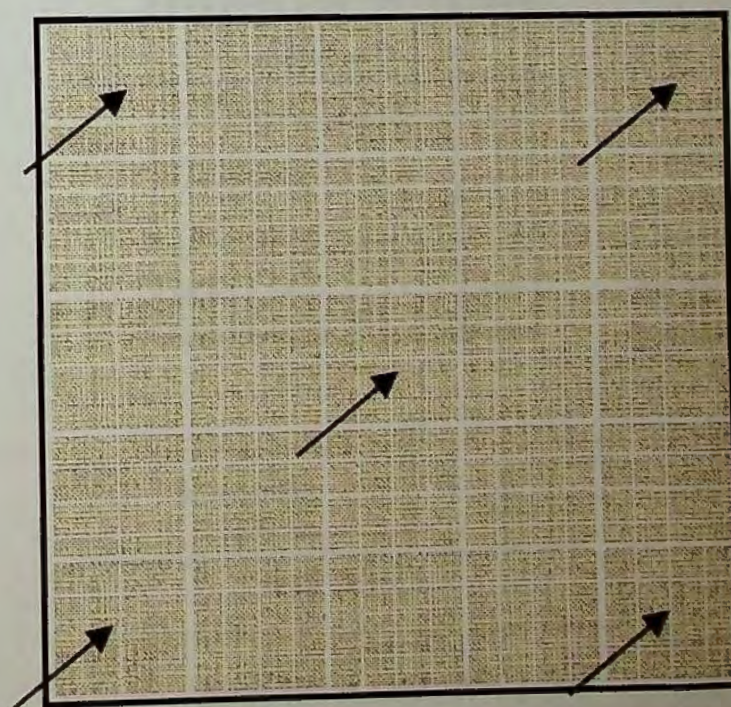
Anexo 9. Fotografias da câmara de Neubauer (Hemocitômetro).



Visão frontal da câmara, com lamínula.

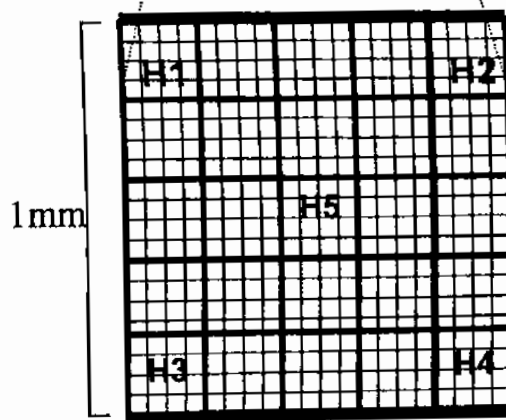
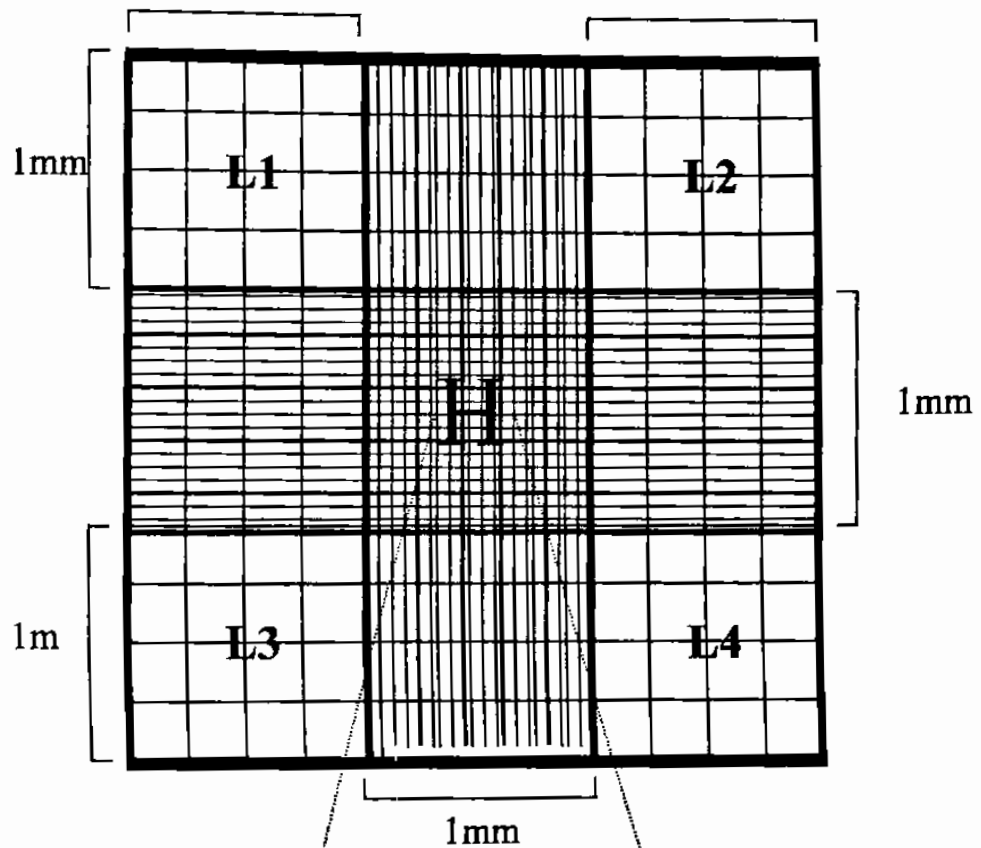


Visão de perfil da câmara.

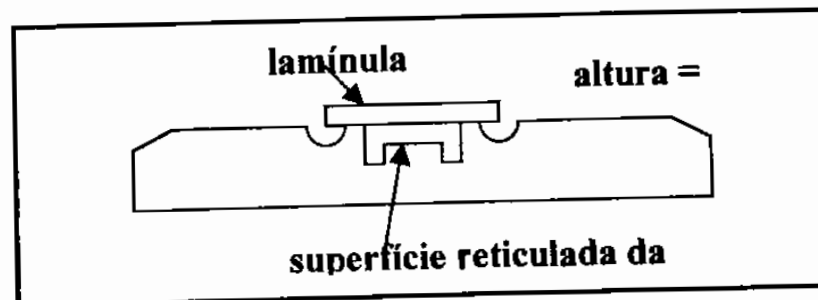


Área central do retículo de Neubauer. Destaque (setas) para os quadrados onde geralmente são feitas as contagens de plaquetas.

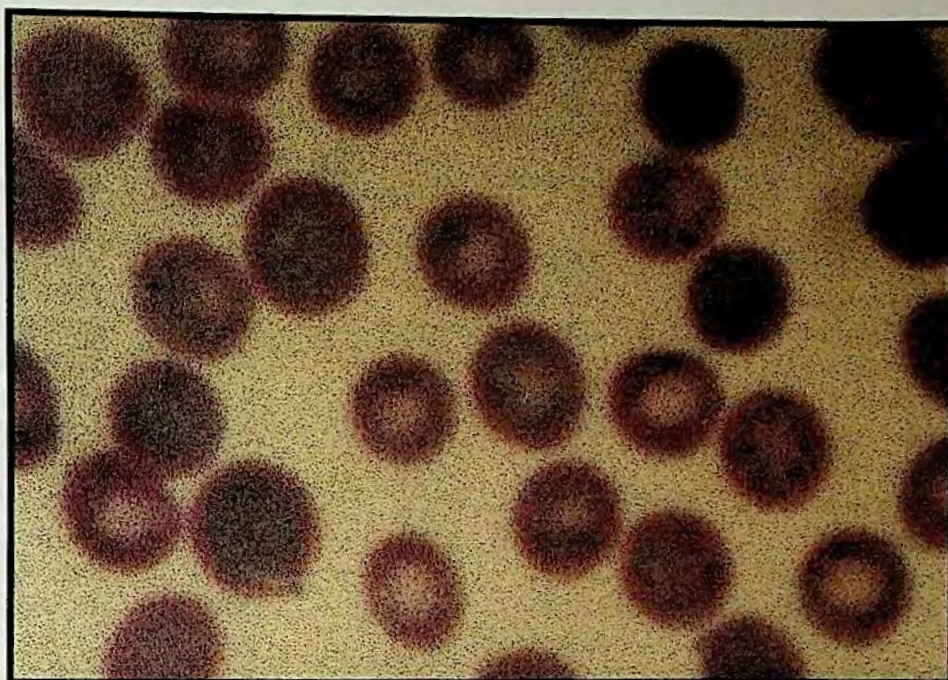
Anexo 10. Ilustração esquemática da câmara de Neubauer (hemocitômetro).



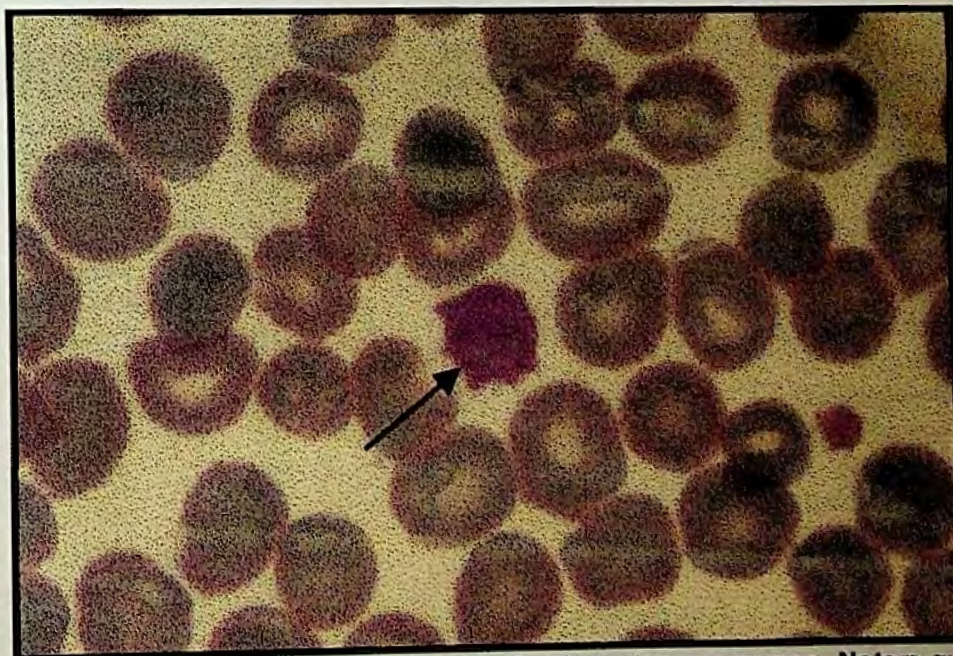
Visão de toda a área do retículo de Neubauer (acima). Destaque para o quadrante central (H) destinado à



Anexo 11. Visualização das hemácias e plaquetas para contagem indireta em extensão de sangue corada.



Local apropriado para estimativa de plaquetas por campo microscópico. Os eritrócitos estão bem dispersos, alguns apenas se tocando, porém sem sobreposição. Notem a ausência de plaquetas neste campo microscópico. Aumento de 1.000 vezes (em imersão). Amostra severamente plaquetopênica da nossa casuística.



Local não indicado para estimativa de plaquetas por campo. Notem que ainda há sobreposição de eritrócitos. Destaque para a presença de plaqueta gigante (seta). Aumento de 1.000 vezes (em imersão). Amostra cujos resultados estão apresentados no modelo impresso pelo ADVIA (ver anexo 7.1), onde foi caracterizada a presença de plaquetas gigantes.

Anexo 12. Dados da série vermelha, contagem de leucócitos e referências clínicas, das 70 amostras plaquetopênicas utilizadas na nossa casuística (3ª fase).

Amostras	Série vermelha		VCM fentolitros	Global leucócitos		Referências Clínicas
	E (milhões/mm ³)	Hb g / dl		/ mm ³		
1	3.150.000	9,3	86,5	0080		Sob tratamento Qt
2	3.250.000	8,3	81,0	53.350		Leucemia aguda
3	2.950.000	8,8	90,8	183.000		Leucemia mielóide crônica
4	2.740.000	10,2	92,9	2.700		Sob tratamento Qt
5	4.700.000	13,6	87,1	13.800		Dados não referidos
6	3.940.000	12,2	91,5	13.700		Leucemia aguda
7	3.570.000	10,5	87,6	9.700		Dados não referidos
8	3.700.000	9,2	78,0	0080		So tratamento Qt
9	3.860.000	10,8	85,6	25.900		Infecção
10	4.880.000	15,2	94,5	7.700		Dados não referidos
11	3.000.000	9,0	92,4	2.000		Sob tratamento Qt
12	3.650.000	11,8	93,3	3.000		Pancitopenia
13	3.100.000	8,7	82,1	7.700		Dados não referidos
14	2.500.000	8,4	90,2	2.000		Leucemia aguda sob Qt
15	4.520.000	12,8	89,8	43.000		UTI (infecção)
16	3.830.000	12,0	99,2	4.200		Síndrome Mielodisplásica
17	4.690.000	13,1	85,2	7.000		Dados não referidos
18	2.810.000	9,1	98,2	0100		Sob tratamento Qt
19	2.670.000	8,2	92,8	0560		Sob tratamento Qt
20	2.600.000	8,0	94,3	2.200		Sob tratamento Qt
21	2.950.000	9,1	88,6	0980		Sob tratamento Qt
22	2.690.000	8,6	97,5	0070		Sob tratamento Qt
23	3.200.000	9,4	89,0	1.800		Osteosarcoma
24	4.280.000	12,2	86,3	5.800		Infecção
25	3.670.000	12,6	102,0	4.000		Infecção
26	3.200.000	9,1	88,5	5.200		Osteosarcoma
27	2.350.000	6,8	88,0	3.500		Dados não referidos
28	3.400.000	10,1	86,7	0500		Meduloblastoma
29	2.880.000	8,0	84,3	0500		Sob tratamento Qt
30	2.340.000	6,5	87,9	0180		Sob tratamento Qt
31	2.470.000	7,3	97,0	0900		Leucemia aguda sob Qt
32	2.580.000	7,9	88,4	0200		Neuroblastoma
33	2.240.000	6,2	93,5	12.900		Sob tratamento Qt
34	2.750.000	8,0	88,0	0300		Sob tratamento Qt
35	2.470.000	7,0	89,6	0430		Sob tratamento Qt
36	3.300.000	9,0	88,1	4.000		Pancitopenia
37	5.300.000	15,5	89,0	21.500		Neuroblastoma
38	3.540.000	9,9	90,3	4.200		Tumor SNC
39	2.800.000	8,4	85,0	0130		Sob tratamento Qt
40	3.500.000	9,6	82,0	16.200		L.eucemia aguda
41	3.870.000	11,1	84,3	2.000		Sob tratamento Qt
42	3.170.000	9,8	92,4	7.800		Leucemia aguda

43	2.700.000	8,8	93,5	3.400	
44	2.220.000	8,3	106,4	0600	Dados não referidos
45	4.400.000	10,0	72,1	5.400	Sob tratamento Qt
46	1.940.000	5,9	95,9	9.000	Dados não referidos
47	2.100.000	9,9	82,0	6.500	Leucemia aguda
48	3.300.000	8,7	82,0	5.400	Dados não referidos
49	3.500.000	10,0	84,0	1.600	Leucemia aguda
50	2.700.000	13,8	100,8	54.510	Sob tratamento Qt
51	3.000.000	10,8	109,6	0500	Leucemia mielóide crônica
52	2.700.000	7,3	79,0	1.300	Sob tratamento Qt
53	2.550.000	7,1	83,0	6.200	Leucemia aguda sob Qt
54	3.470.000	10,9	97,1	6.200	Dados não referidos
55	2.280.000	7,3	92,6	8.700	Dados não referidos
56	4.000.000	11,8	85,2	9.600	Dados não referidos
57	3.000.000	8,7	84,0	2.600	Leucemia aguda
58	2.280.000	7,3	92,6	8.700	Sob tratamento Qt
59	3.300.000	9,3	87,7	9.900	Dados não referidos
60	1.930.000	5,4	84,0	4.800	Dados não referidos
61	2.920.000	8,1	80,3	1.400	Dados não referidos
62	3.120.000	9,1	85,3	13.200	Leucemia aguda sob Qt
63	3.220.000	9,9	88,5	0220	Leucemia aguda
64	2.690.000	7,8	83,0	0180	Sob tratamento Qt
65	3.460.000	9,6	81,1	5.000	Sob tratamento Qt
66	2.700.000	9,5	110,6	3.200	Leucemia aguda
67	3.000.000	7,9	78,6	8.300	Sob tratamento Qt
68	4.000.000	12,4	87,0	4.200	Bicitopenia
69	3.520.000	10,0	84,9	3.380	Leucemia aguda
70	2.340.000	7,7	96,4	0130	Sob tratamento Qt

E (contagem de eritrócitos); Hb (hemoglobina); VCM (volume corpuscular médio); Qt (quimioterapia).

Anexo 13.

Tabela 3.15 – Estudo comparativo entre os resultados obtidos pelo método de Maspes e pelo método de referência (Brecher-Cronkite), nas amostras dos pacientes com níveis abaixo de 30.000 plaq/mm³ (n=43).

Amostras	Hematócrito (%)	Vol. Pré-Centrif.(ml)	MASPES-JAMRA Plaq/mm ³	BRECHER-CRONKITE Plaq/mm ³
*1	27,5	1,0	8900	25833
*2	26,0	1,0	6866	26083
*6	37,0	1,0	20600	26166
*14	26,0	1,0	19733	38333
*15	39,0	1,0	10000	22666
*17	41,0	1,3	14410	22333
*19	27,0	1,0	25000	44083
*20	25,0	1,0	3300	7916
*21	27,0	1,0	18633	39083
*22	28,0	1,0	2600	3800
*23	28,0	1,0	7333	8333
**26	26,0	1,0	6333	6000
**27	20,0	1,0	28533	30500
**28	29,5	1,0	10633	17166
**29	22,0	1,0	27866	20616
**30	20,0	1,0	20533	17250
**31	31,0	0,8	13833	10383
**32	22,0	0,8	24866	22250
**33	19,0	1,2	2700	2750
**35	21,5	0,8	27466	28583
**36	28,0	0,8	27800	25000
**37	47,0	1,0	41000	26683
**38	31,5	0,8	9600	9500
**39	23,5	0,8	6366	8250
**40	28,0	1,0	26866	13500
**46	19,0	1,0	21266	17583
**47	17,0	1,0	12466	16166
**48	27,0	1,0	21700	16416
**50	27,0	1,7	24300	22500
**51	32,0	1,3	11033	5166
**52	21,0	1,0	27466	32166
**53	21,0	1,0	21833	14666
**55	25,0	1,0	10500	19500
**56	33,0	1,0	22400	23416
**58	31,5	1,0	4566	5250
**60	19,0	1,0	7266	6416
**61	24,0	1,0	23800	30250
**62	29,0	1,7	23600	9333
**64	22,5	1,0	11633	8666
**67	24,5	1,0	12533	5750
**68	22,0	1,0	8033	7250
**69	29,0	1,3	15100	9333
**70	23,0	1,0	20633	22666
Média	29,0	1,03	16556	18036

* Centrifugação de 1.000 rpm por 3 min.

** Centrifugação de 1.000 rpm por 1 min.

Tabela 3.16 – Estudo comparativo dos resultados obtidos por centrifugação a 1000rpm por 3 min versus centrifugação 1000rpm por 1 min, nas amostras 24 a 38 da 3ª fase.

Amostra	Hematócrito (%)	Volume Inicial (ml)	1000 rpm por 1 min (plaq/mm³)	1000 rpm por 3 min (plaq/mm³)
24	37,0	1,0	113.900	96.667
25	37,0	1,0	132.933	102.100
26	26,0	1,0	6.333	3.400
27	20,0	1,0	28.533	10.533
28	29,5	1,0	10.633	4.267
29	22,0	1,0	27.866	13.933
30	20,0	1,0	20.533	9.900
31	21,0	0,8	13.833	8.700
32	22,0	0,8	24.866	12.400
33	19,0	1,2	2.700	1.900
34	24,0	0,8	29.600	10.800
35	21,5	0,8	27.466	11.700
36	28,0	0,8	27.800	12.233
37	47,0	1,0	41.000	20.833
38	31,5	0,8	9.600	3.933

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABBEY, A.P., BELLIVEAU, R.R. Enumeration of platelets. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v.69, p.55, 1978.

ADERICA, D., PRAFF, G., SANTO, M., et al. Bleeding due to thrombocytopenia in acute leukemias and re-evaluation of the prophylactic platelet transfusion policy. **American Journal of Medical Science**, Thorofare, v.291, p.147, 1986.

AKWARI, A.M., ROSS, D.W., STASS, S.A. Spuriously elevated platelet counts due to microspherocytosis. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v.77, p.220-221, 1982.

ALVIN, M.B., SPIVAK, L.J., DELOUGHERY, G.T. Consultative hematology: hemostasis and transfusion issues in surgery and critical care medicine. In: EDUCATION PROGRAM OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, Orlando, 1996. Proceedings. Philadelphia: ASH, 1996.

APIBAL, S., RAVIVONGSE, R., BUNYARATVEJ, A., ROJANASTHCN, S. The effects of hemotocrit on visual platelet estimation. **American Journal of Medical Technology**, v.45, p.785, 1979.

ARKIN, C.F. Quality control and standardization in the hematology laboratory. In: BICK, R.L., ed. **Hematology: clinical and laboratory practice**. St Louis: Mosby, 1993. p.29.

AUL, C., GATTERMANN, N., HEYLL, A., et al. Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system. **Leukemia**, v.6, p.52-59.

AUL, C., SCHNEIDER, W. Myelodysplastic syndromes: a prognostic factor in 221 untreated patients. **Blut**, v.57, p.234, 1988.

AULT, K.A. Platelet counting: Is there room for improvement? **Laboratory Hematology**, v.2, p.139-143, 1996.

- BAER, M.R., BLOOMFIELD, C.D. Controversies in transfusion medicine: prophylactic platelet transfusion therapy. **Transfusion**, v.32, p.381, 1992.
- BAIN, B.J. **Células Sanguíneas: um guia prático**. 2.ed. Porto Alegre: Aretes Médicas, 1997. p.110.
- BAGNOLD, R.A. Experiments on a gravity-free dispersion of large solid spheres in a Newtonian fluid under shear. **Proceedings of Royal Society of London, Serie A**, v.225, p.49-63, 1954.
- BARNARD, D.F., CARTER, A.B., CROSLAND-TAYLOR, P.J. et al. Na evaluation of the Coulter model. **South Journal of Clinical Pathology**, v.22, Suppl 3, p.26-33, 1969.
- BAUGHMAN, R.P., Lower, E.E., Flessa, H.C., Tollerud, D.J. Thrombocytopenia in the intensive care unit. **Chest**, v.104, p.1243, 1993.
- BELL, A, Neely, C.L. Smear platelet counts. **South Medical Journal**, v.73, p.899, 1980.
- BENTLEY, S., Johnson, A., Bishop, C.A. A parallel evaluation of four automated hematology analyzers. **American Journal of Clinical Pathology**, v.100, p.626-632, 1993.
- BERKSON, J., Magath, T.B., Hurn, M. The error of estimate of blood cell counts as made with the hemocytometer. **American Journal of Physiology**, v.128, p.309-323, 1940.
- BEUTLER E. Platelet transfusions: the 20,000/NL trigger. **Blood**, v.337, p.1914-1915, 1997.
- BITHELL, T.C. Plaquetas e megacariócitos. In: LEE, G.R., BITHELL, T.C., FOESTER, J., ATHENS, J.W., LUKENS, J.N. **Wintrobe's hematologia clinica**. São Paulo: Manole, 1998. v.1, p.555.
- BIZZOZERO, J. Über einen neuen formbestandtheil des blutes und die rolle bei der thrombose un der bltgerinnung. **Virchows Arch. A: Pathol. Anat. Histol.**, Berlin, v.90, p.261, 1882.

- BLAJCHMAN, M.A., Ali, A.M. Bacteria in blood supply In: Nance, S.J., ed. **Blood safety: current challenges**. Bethesda: American Association of Blood Banks, 1992. p.213.
- BODE, A.P. The use of flow cytometry in the study of blood platelets. In: RILEY, R.S., MAHIN, E.J., ROSS, W. **Clinical applications of flow cytometry** New York: Igaku-Shoin, 1993. 613-633.
- BOLTON, F.G., BOYD, J. Platelet adherence to polymorphs. **British Medical Journal**, v.2, p.747, 1963.
- BONFIGLIO, M.F., Traeger, S.M., Kier, K.L., Martin, B.R., Hulisz, D.T., Verbeck, S.R. Thrombocytopenia in intensive care patients: a comprehensive analysis of risk factors in 314 patients. **Annals of Pharmacotherapy**, v.29, p.835, 1995.
- BRECHER, G. Enumeration of blood platelets: methods and their validity, in the platelet. In: Brinkhous, K.M., ed. *Título da Obra?*. Chapel Hill: University of North Carolina Press, 1971. p.358 (International Academy of Pathology Monograph)
- BRECHER, G., Cronkite, E.P. Morphology and enumeration of human blood platelets. **Journal of Applied Physiology**, v.3, p.365-377, 1950.
- BRECHER, G., SCHNEIDERMAN, M.A., CRONKITE, E.P. The reproducibility and consistency of the platelet count. **American Journal of Clinical Pathology**, v.23, p.15-26, 1953.
- BUCKMAN, T., HALLISEY, J.E. Studies in properties of blood platelets. **Journal of American Medical Association**. v.76, p.427, 1921.
- BULL B.S., SCHNEIDERMAN, M.A., BRECHER, G. Platelet counts with the coulter counter. **American Journal of Clinical Pathology**, v.44, p.678-688, 1965
- BULL, B.S. A circular slide rule for calculating platelet counts. **American Journal of Clinical Pathology**, v.57, p.545-546, 1969.

- CARTWRIGHT, G.E. **Diagnostic Laboratory Hematology**, 4. ed. New York: Grune & Stratton, 1968.
- CHAKRAVERTY, R., DAVIDSON, S., PEGGS, K., STROSS, P., GARRARD, C., LITTLEWOOD, T.J. The incidence and cause of coagulopathies in an intensive care population. **British Journal of Haematology**, v.93, p.460, 1996.
- CHAMBERNAND, J.L., LACAGET, T., ZUPAN, V., et al Platelets transfusion in neonatology. **Transfusion Clinical Biology**, v.2, n.1, p.17-25, 1995.
- CHONG, B.H., BURGESS, J., ISMAIL, F. The clinical usefulness of the platelet aggregation test. **Thrombosis and Haemostasia**, v.69, p.344, 1993.
- CONSENSUS Conference. Platelet transfusion therapy. **Journal of American Medical Association**., Chicago, v.257, p.1777-1780, 1987.
- CORNBLEET, P.J., HAIFLICH, C.L., HUDON, K.E. On reliability of low platelet counts performed on electronic platelet counters. **American Journal of Clinical Pathology**, v.75, p.441, 1981.
- CORNBLEET, P.J. et al. Evaluation of the CELL-DYN 3.000 differential. **American Journal of Clinical Pathology**, v.98, p.603-614, 1992.
- CORNBLEET, P.J. et al. Evaluation of the Coulter STKS Five-part Differential. **American Journal of Clinical Pathology**, v.99, p.72-81, 1993.
- CORNBLEET, P.J., KESSINGER, M.T. Accuracy of low platelet counts on the Coulter S-Plus IV. **American Journal of Clinical Pathology**, v.83, p.78-80, 1985.
- COUNTS, R.B., HAISCH, C., SIMON, T.L., MAXWELL, N.G., HEIMBACH, D.M., CARRICO, C.J. Hemostasis in massive y transfused trauma patients. **Annals of surgery**., v.190, p.91, 1979.
- COULTER, T. Series with differential capabilities: product reference manual n. 4235880C. Miami: Coulter, 1993.

- COULTER, S.T.K.S. Analyser with reticulocyte analysis: product reference manual n. 4237182B. Miami: Coulter, 1995.
- CROME, P.E., Barkhan, A. Platelet adherence to polymorphs. **British Medical Journal**, v.2, p.871, 1963.
- DACIE, J.V., LEWIS, S.M. Basic haematological techniques. In: **PRACTICAL haematology**. 6.ed. New York: Churchill Livingstone, 1984. p.453.
- DACIE, J.V., LEWIS, S.M. Basic haematological techniques. In: **PRACTICAL haematology**. 8.ed. New York: Churchill Livingstone, 1995. p.609.
- DALTON, W.T., BOLLINGER, P, DREWINKO, B. A side-by-side evaluation of four platelet-counting instruments. **American Journal of Clinical Pathology**, v.74, p.119-134, 1980.
- DAMESHEK, W. A method for simultaneous enumeration of blood platelets and reticulocytes. **Archives Internal Medicine**, v.50, p.579-589, 1932.
- DAY, H.J., YOUNG, E., HEKFRICH, M. In evaluation of a whole-blood platelet counter. **American Society of Clinical Pathologists**, v.73, n.4, p.588-593, 1980.
- DELOUGHERY, T.G., LIEBLER, J.M., SIMONDS, V., GOODNIGHT, S.H. Invasive line placement in critically ill patients: do the static defects matter? **Transfusion**, v.36, p.827, 1996.
- DICKERHOFF, R., RUECKER, A.Von. Enumeration of platelets by multiparameter flow cytometry using platelet-specific antibodies and fluorescent reference particles. **Clinical Laboratory Haematology**, v.17, p.163-172, 1995.
- DODD, R.Y. Will blood products be free of infectious agents? In: Nance, S.J., ed. **Transfusion medicine in the 1990's**. Arlington VA. 223: American Association of Blood Banks, 1990.
- DOERFTLER M.E., KAUFMAN, B., GOLDENBERG, A.S. Central venous catheter placement in patients with disorders of hemostasis. **Chest**, v.110, p.185, 1996.

- DORSEY, Dennis B., M.D. Quality control in hematology. **American Journal of Clinical Pathology**, v.40, n.5, p.457-464, 1963.
- EASTHAM, R.D. Rapid whole-blood platelet counting using an electronic particle counter. **Journal of Clinical Pathology**, 16, p.168-169, 1963.
- ELTON, G.A.H., HIRSCHLER, F.G. In the physics of particle size analysis (Conference, Nottingham, 1954). **British Journal Applied Physiology**, suppl.3, p.S60, 1954.
- ENGLAND, J.M., ROWAN, R.M., VAN ASSENDELFT, O.W., et al. Protocol for evaluation of automated blood cell counters. **Clinical Laboratory Haematology**, v.6, p.69-84, 1984.
- EVANS, V.J., GLASSER, L. Accuracy of low electronic platelet counts using platelet distribution curves. **American Internal of Medical Technology**, v.47, n.1, p.15-18, 1984.
- FAULHABER, M.H.W., CRUZ, M.C.P., SANCHES, S.L. Fluxocitometria na rotina laboratorial: análise hematológica automatizada. Tema de Atualização, 199-.
- FIELD, E.J., MACLEOD, I. Platelet adherence to polymorphs. **British Medical Journal**, v.2, p.388-389, 1963.
- FINAZZI, G. Prophylactic platelet transfusion in acute leukemia: which threshold should be used? **Haematologica**, v.83, p.961-962, 1998.
- FISCHER, G., CATANIA, L., KUHICKA, J. Identification of abnormal WBC populations flagged by the Advia Tm hematology system. In: BAYER, Prenome do Autor? **Advia Tm 120 hematology system**. Local de Publicação: [199_?].
- FONIO, A. Ueber ein neues Verfahren der Blutplättchenzahlung, **Deutsche Zeitschrift Fur Chirurgie**. v.117, p.176, 1912.
- FOSTER P.F., MOORE, L.R., SANKARY, H.N., HART, M.E., ASHMANN, M.K WILLIAMS, J.W. Central venous catheterization in patients with coagulopathy **Archives of Surgery**, v.127, p.273, 1992

- FRATANTONI, J.C., POINDEXTER, B.J., BONNER, R.F. Quantitative assessment of platelet morphology by light scattering: a potential method for the evaluation of platelets for transfusion. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.103, n.4, p.620-631, 1984.
- FRASER, C.G. Special report. desirable standards for hematology tests: a proposal. **American Journal of Clinical Pathology**, v.88, p.667-669, 1987.
- FROJMOVIC, M.M., MILTON, J.G. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. **Physiology Review**, v.62, p.185, 1982.
- GAYDOS, L.A., FREIREICH, E.J., MANTEL, N. The quantitative relation between platelet count and hemorrhage in patients with acute leukemia. **New England Journal of Medicine**, v.266, p.905-909, 1962.
- GEORGE, J.N., WOOLF, S.H., RASKOB, G.E., WASSER, J.S., ALEDORT, L.M., BALLEM, P.J., BLANCHETTE, V.S., BUSSEL, J.B., CINES, D.B., KELTON, J.G., LICHTIN, A.E., McMILLAN, R., OKERBLOOM, J.A., REGAN, D.H., WARRIER, I. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. **Blood**, v.88, p.3-40, 1996.
- GIL-FERNANDEZ, J.J., Alegre, A., Fernandez-Villalta, M.J., et al. Clinical results of a stringent policy on prophylactic platelet transfusion: non-randomized comparative analysis in 190 bone marrow transplant patients from a single institution. **Bone Marrow Transplant**, v.18, p.931-935, 1996.
- GLASS, U.H. Automated platelet counting. **British Journal of Haematology**, v.21, p.529, 1971.
- GMÜR, J., BURGER, J., SCHANZ, U., FEHR, J., Schafner, A. Safety of stringent Prophylactic platelet transfusion policy for patients with acute leukemia. **Lancet**, v.338, p.1223-1226, 1991.
- GOASGUEN, J.E., GARAND, R., BIZET, M., et al. Prognostic factors of myelodysplastic syndromes- a simplified 3-D scoring system. **Leukemia Research**, v.14, p.255-262, 1990.

- GOLDMAN, M., BLAJCHMAN, M.A. Blood product-associated bacterial sepsis. **Transfusion Medical Review.**, v: 73, 1991.
- GOWLAND, H.E.M.E., KAY, J.C., SPILLMAN, C. et al. Agglutination of platelets by a serum factor in the presence of EDTA. **Journal of Clinical Pathology**, v.22, p.460-464, 1969.
- GRANT, I.H., GOLD, J.M.W. et al. Transfusion-associated acute Chagas' disease acquired in the United States. **Annals of Internal Medicine.**, v.111, p.849, 1989.
- GRONER, Tycko, D. Characterizing blood cells by biophysical measurements in flow. **Blood Cells**, v.6, p.141-157, 1980.
- GULATI, G.L., HYUN, B.H., ASHTON, J.K. Advances of the past decade in automated hematology. **Pathology Patterns**, v.98, n.4, p.11-16, 1992.
- GUTIERREZ, G., JOU, M.J., REVERTER, J.C. et al. Programa de evaluacion externa de la calidad en hematología; general Valoración de los resultados correspondientes a 1994. **Sangre**, v.41, n.2, p.115-124, 1996.
- HACKNEY, J.R., CEMBROWSKI, G.S. Need for improved instrument and kit evaluations. **American Journal of Clinical Pathology**, v.86, p.391-393, 1986.
- HALLAWELL, R., O'MALLEY, C., HUSSEIN, S. et al. Na evaluation of the sysmex NE-8000 hematology analyzer. **American Journal of Clinical Pathology**. v.96, p.594-601, 1991.
- HANDLER, R.I. Automated platelet counting. **American Journal of Clinical Pathology**, v.56, p.661, 1971.
- HANSELER, E., FEHR, J., KELLER, H. Estimation of the lower limits of manual and automated platelet counting. **American Journal of Clinical Pathology**, v.105, n.6, p.782-787, 1996.

- HECKMAN, K.D., WEINER, G.J., DAVIS, C.S, STRAUSS, R.G., JONES, M.P., BURNS, P. Randomized study of prophylactic platelet transfusion threshold during induction therapy for adult acute leukemia: 10,000 versus 20,000. **Journal of Clinical Oncology**, v.15, p.1143-1149, 1997.
- HITTMAIR, A. Die Blutplattchen. **Folia Haematology** v.35, p.156, 1928.
- ICSH – International Committee for Standardization in Haematology. Selected method for visual platelet counting. **Labmedica**, 5:31-34, 1988.
- INTERNATIONAL COMMITTEE FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY. Protocol for evaluation of automated blood cell counters. **Clinical Laboratory Haematology**, v.6, p.69-84, 1984.
- ISOBE, T., FUJITA, T., KINOSHITA, S. et al. Pseudothrombocytopenia with cold-type platelet agglutinins. **Japan Journal of Medicine**, v.22, p.9-13, 1983.
- JONES, B.R. et al. Quality team approach in evaluating three automated hematology analyzers with five-part differential capability. **American Journal of Clinical Pathology**, v.103, p.159-166, 1995.
- KIM, Y.R., ORNSTEIN, L. Isovolumetric shepering of erithrocytes for more accurate and precise cell volume measurement by flow cytometry. **Cytometry**, v.3(b), p.419-427, 1983.
- KJELDSBERG C.R. Principles of hematologic examinalion. In: Lee, G.R., Bithell, T.C., Foerster, J., et al, eds. **Wintrobe's clinical hematology**. 9.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. v.1, p.11-12.
- KJELDSBERG, C.R. et al Spurious thrombocytopenia. **Journal of American Medical Association**., Chicago, v.227, n.6, p.628-630, 1974. .
- KRUSKALL, M.S. The perils of platelet transfusions. **New England Journal of Medicine**, v.337, p.1914-1915, 1997.
- KUNICKA, J., Fisher, G., Zelmanovic, D. et al. Accurate quantitation of platelets on the ADVIA™ 120 hematology system. In: BAYER. **ADVIA™ 120 Hematology System**. .

- LAWRENCE, J.B., YOMOTOVIAN, C.D. Reability of automated platelet counts: comparison with manual method and utility for prediction of clinical bleeding. **American Journal of Hematology**, v.48, p.244-250, 1995.
- LEWIS, S.M., WARDLE, J., COUSINS, S., et al. Platelet counting: development of a reference method and a reference preparation. **Clinical and Laboratory Haematology**, v.1, p.227, 1979.
- LEWIS, S.M., SKELLY, J.V., COUSINS, S. Automated platelet counts: a re-avaluation of the sedimentation method. **Clinical and Laboratory Haematology**, v.3, p.215, 1981.
- LLOMPART, I. et al. Evaluation del autoanalizador hematológico Coulter Maxm. **Sangre**, v.40, n.2, p.121-128, 1995.
- LOMBARTS, A.J.P.F., De KIEVIET, W. Recognition and prevention of pseudothrombocytopenia and concomitant pseudoleukocytosis. **American Journal of Clinical Pathology**, v.89, p.634-639, 1984.
- LOTT, J.A., HARTZELL, R.K., LONGBERRY, J. Synthetic materials for platelet quality control, **Medical Tecnology**, v.49, n.1, p.43-48, 1983.
- MASPES, V., JAMRA, M. Direct method for platelet counting, with a study of its accuracy. **Journal Laboratory of Clinical Medicine**, v.45, n.4, p.641-647, 1955.
- MAUPIN, B.I. **Blood platelets in man and animals**. Oxford: Pergamon Press, 1969. v.1, p.37
- MAYER, K., Chin, B., Baisley, A. Evaluation of the S-Plus IV. **American Journal of Clinical Pathology**, v.83, p.40-46, 1985.
- MAYER, K., CHIN, B., MAGNES, J., et al. Automated platelet counters: a comparative evaluation of latest instrumentation. **American Journal of Clinical Pathology**, v.74, p.135-150, 1980.
- MAYNE, E.E., CARVILLE, J.M. Enumeration of platelets using a model B counter. **Journal of Clinical Pathology**. v.22, p. 107, 1969.

- MIALE, J.B. Differential leukocyte count. **Laboratory Medical Hematology**. 4.ed. St. Louis: Mosby, 1972. p.1210.
- MOGADAN, L. Application of the Miller's disc for the estimation and quality control of the platelet count. **Laboratory Medicine**, v.11, p.131-132, 1980.
- MOREL, P., HEBBAR, M., LAI, J.L. et al. Cytogenetics analysis has strong independent prognostic value in *de novo* myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 case. **Leukemia**, v.7, p.1315-1323, 1993.
- MORTON, B.D. et al Pappenheimer bodies, Na additional cause for a spurious platelet count. **American Journal of Clinical Pathology**, v.74, p.310-311, 1980.
- MUFTI, G.J., STEVENS, J.R., OSCHER, D.G., et al. Myelodysplastic syndromes: a scoring system with prognostic significance. **British Journal of Haematology**, v.59, p.425-433, 1985.
- MURPHY, S., LITWIN, S., HERRING, L.M. The indications for platelet transfusion in children with acute leukemia. **American Journal of Hematology**, v.12, p.347, 1982.
- MURPHY, W.G., SEYMOUR, J., GMUR, J., SCHAFFNER, A., BENBASSAT, I., RAMOT, B. Prophylactic platelet transfusion in acute leukaemia. **Lancet**. v.339, p.120, 1992. [Letter]
- NAND, S., WONG, W., YUEN, B., YETTER, A., SCHMULBACH, L., FISHER, S.G. Heparin-induced thrombocytopenia with thrombosis: Incidence, analysis of risk factors, and clinical outcomes in 108 consecutive patients treated at a single institution. **American Journal of Hematology**, v.56, p.12, 1997.
- NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Consensus development conference on platelet transfusion policy. **Journal of American Medical Association**., Chicago, v.257, p.1777-1780, 1987.

- NAVARRO, J.T., HERNANDEZ, J.A., RIBERA, J.M., et al. Prophylactic platelet transfusion threshold during therapy for adult acute myeloid leukemia: 10,000/NL versus 20,000/NL. **Haematologica**, v.83, p.998-1000, 1998.
- NELSON, M.G. Multichannel continuous flow analysis on the SMA-4. **Journal of Clinical Pathology**, v.22, Suppl.3, p.20-25, 1969.
- NICHOLLS, P.D. Erroneous platelet counts on the Coulter model S Plus counter after correction for hyperlipaemia. **Medical Laboratory Science**, n.40, p. 69-71, 1982.
- NOSANCHUK, J.S., CHANG, J., BENNETT, J.M. The analytic basis for the use of platelet estimates from peripheral blood smears. **American Journal of Clinical Pathology**, v.69, p.383, 1978.
- OHNUMA, O., SHIRATA, Y., MIYAZAWA, K. Use of theophylline in the investigation of pseudothrombocytopenia induced by edetic acid (EDTA- 2K). **Journal of Clinical Pathology**, p.41, p.915-917, 1988.
- OLEF, I. The enumeration of blood platelets. **Journal Laboratory of Clinical Medicine**, v.20, p.416-436, 1935.
- OLIVEIRA, R.A.G., Gonçalves, R.S., Oshiro, M., et al. Estudo comparativo entre dois métodos diretos manuais para contagem de plaquetas, tendo como parâmetro a automação. **Série Monografias da Escola Brasileira de Hematologia**, Ribeirão Preto, v.6, supl.1, 1999. [CONGRESSO NACIONAL DO COLÉGIO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA, 17, Foz Iguaçu, 1999]
- PASSMORE, S.J., HANN, I.M., STILLER, C.A., et al. Pediatric myelodysplasia: a study of 68 children and new prognostic scoring system. **Blood**, v.85, p.1742-1750, 1995.
- PATTEN, E. Controversies in transfusion medicine. Prophylactic platelet transfusion revisited after 25 years: **Transfusion**, v.32, p.381, 1992.

- PISCIOTTO, P.T., BENSON, K., HUME, H. et al. Prophylactic versus therapeutic platelet transfusion practices in hematology and/or oncology patients. **Transfusion**, v.35, p.498-502, 1995.
- PRICE, L.W., MAJ, M.C., GRAY, J.M. Experience with platelet counting by a electronic method. **American Journal of Clinical Pathology**. v.49, n.4, p.606-610, 1968.
- PROCEDIMENTOS sugeridos para la manipulacion de resultados anormales em los instrumentos- Coulter counter. 1988. 18p.
- REBULLA, P., Finazzi, G., Marangoni, F., et al. The threshold for prophylactic platelet transfusions in adults with acute myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v.337, p.1870-1875, 1997.
- REES, H.M., Ecker, E.E. An improved method for counting blood platelets. **Journal of American Medical Association**., v.80, n.9, p. 621-622, 1923.
- RICKER, R. Enumeration of platelets. **American Journal of Clinical Pathology**, v.71, p.359-360, 1979. (Letter)
- ROSS, D.W., Lanier, A., Gulley, M. Automated platelet counts: accuracy, precision, and range. **American Journal of Clinical Pathology**, v.74, p.151-156, 1980.
- ROSS, D.W., BENTLEY, S.A. Evaluation of a aAutomated Hematology System (Technicon H-1), **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.110, p.803-808, 1986.
- ROWAN, R.M. Platelet counting and the assessment of platelet function. In: Keopke, J.A., ed. **Practical Laboratory Hematology**. New York: Churchill Livingstone, 1991. p.157-170.
- ROWAN, R.M., ALLAN, W., PRESCOTT, R.J. Evaluation of a automatic platelet counting system utilizing whole blood. **Journal of Clinical Pathology**, v.25, p.218-226, 1972.

- SANFORD, A.S., et al. Spurious platelet counts in Hair cell leukemia. **American Journal of Clinical Pathology**, v.68, n.4, p.530-531, 1977.
- SANZ, G.F., SANZ, M.A., VALLESPI, T., et al. Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. **Blood**, v.74, p.395-408, 1989.
- SARODE, R., GOTTSCHALL, J.L., ASTER, R.H., et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura: early and late responders. **American Journal of Clinical Pathology**, v.54, p.102-107, 1997.
- SAVAGE, R.A. Pseudoleukocytosis due to EDTA-induced platelet clumping. **American Journal of Clinical Pathology**, v.81, p.317-322, 1984.
- SCHIFFER C.A. Prophylactic platelet transfusion. **Transfusion**, v.32, p.295, 1992.
- SCHMUNIS, G.A. Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**, v.31, p.547, 1991.
- SHERRILL, J.S., Corash, L., Shiffer, C., et al. Newer approaches to platelet transfusion therapy. In: Transfusion Medicine Education program of The American Society of Hematology, Orlando, 1996. **Proceedings**. Philadelphia: ASH, 1996. p.119-131.
- SHREINER, D.P., BELL, W.R. Pseudothrombocytopenia: manifestation of a new type of platelet agglutinin. **Blood**. v.42, n.4, p.541-549, 1973.
- SIGNY, A.G., Green, A.E. Platelet adherence to polymorphs. **British Medical Journal**, v.2, p.624, 1963.
- SMALL, M., LOWE, G.D.O., CAMERON, E., FORBES, C.D. Contribution of the haematocrit to the bleeding time. **Haemostasis**, v.13, n.6, p.379-384, 1983.
- SOLANKI, D.L. et al. Spurious leukocytosis and thrombocytopenia: a dual phenomenon caused by clumping of platelet in vitro. **Journal of American Medical Association**, Chicago, v.250, n.18, p.2514-2515, 1983.

- SOLOMON, J., FENKAMP, T., FAHEY, J.L., CHILLAR, R.K. BEUTER, E. Platelet prophylaxis in acute non-lymphoblastic leukemia. **Lancet**, v.1, p.267, 1978.
- STASS, S.A., HOLLOWAY, M.L., PETERSON, V., et al: Cytoplasmic fragments causing spurious platelet count's in the leukemic phase of poorly differentiated lymphoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v.71, p.125-128, 1979.
- STASS, S.A., HOLLOWAY, M.L., SLEASE, R.B., SCHUMACHER, H.R. Spurious counts in hairy cell leukemia. **American Journal of Clinical Pathology**, v.68, p.530-531, 1977.
- STASS, A.S. et al. Cytoplasmic fragments causing spurious platelet counts in the leukemic phase of poorly differentiated lymphocitic lymphoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v.71, p.125-128, 1979.
- STANWORTH, S.J., Denton, K., Monteath, J., et al. Automated counting of platelets on the Bayer ADVIA™ 120 analyser. **Clinical Laboratory Haematology**, v.21, p.113-117, 1999.
- STOCKL, D., Baadenhuisen, H., Fraser, C.G., et al. Desirable routine analytical goals for quantities assayed in serum. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.33, p.157-169, 1995.
- TECHNICON H1 System – Software digest. New York, 1985.
- TECHNICON H1 Information Bulletin, mar., 1986. 34p.
- TOCANTINS, L.M. Technical methods for the study of blood platelets. **Archives Pathology**, v.23, p.850-879, 1937.
- TYCKO, D.H., et al. Flow-cytometric light scattering measurement of red cell volume and hemoglobin concentration. **Applied Optics**, v.24, n.9,1985.
- VARELA, B.J., CHUANG, C., WOLL, J.E., et al. Modifications in the classification of primary myelodisplastic syndromes: the addition of a scoring system. **Hematology Oncology**, v.3, p.55-63, 1985.

- VEENHOVEN, W.A., VAN DER SHANS, G.S., HUIGES, W., et al. Pseudothrombocytopenia due to agglutinins. **American Journal of Clinical Pathology**, v.72, p.10005-10008, 1979.
- VELLOSO, E.D.R.P. Contribuição ao estudo clínico e hematológico das síndromes mielodisplásicas: estudo de 33 casos. São Paulo, 1992. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina - USP).
- VIVES-CORRONS, et al. Evaluation of the Abbot Cell-Dyn 3500 hematology analyzer in a university hospital. **American Journal of Clinical Pathology**, v.105, n.5, p.553-559, 1996.
- WARKENTIN, T.E. Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis, frequency, avoidance and management. **Drug Safety**, v.17, p.325, 1997.
- WERTZ, R.K., et al. A critical analysis of platelet counting methods. **American Journal of Clinical Pathology**, v.68, p.195-201, 1977.
- WERTZ, R.K. Triplet D: a review of platelet counting performance in the United States. **American Journal of Clinical Pathology**, v.74, suppl., p.575-580, 1980.
- WERTZ, R.K., KOEPKE, J.A. A critical analysis of platelet counting methods. **American Journal of Clinical Pathology**, v.68, suppl., p.195-201, 1977.
- WESTGAD, J.O., HUNT, M.R. Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies. **Clinical Chemistry**, v.19, n.1, 1973.
- WILLIAMS, W.J., SCHNEIDER, A.S. Examination of the peripheral blood. In: WILLIAMS, W.J., BEUTLER, E., ERSLEV, A.J., RUNDLES, R.W., eds. **Hematology**. New York: McGraw-Hill, 1972. p.18.
- WILLIAMS, W.J., NELSON, D.A., MORRIS, M.W. Examination of blood. In: WILLIAMS, W.J., BEUTLER, E., ERSLEY, A.J., LICHTMAN, M.A., eds. **Hematology**. 4.ed. New York: McGraw-Hill, 1990.

WINTROBE, M.M., LEE, G.R., BOGGS, D.R., BITHELL, T.C., ATHENS, J.W.,
FOERSTER, J. **Clinical hematology**. 7.ed. Philadelphia: Lea & Febeger, 1974.
p.1043-1070. [The diagnostic approach to the bleending disorders].

WRIGHT, J.H., KINNICUTT, R. A new method for counting blood platelets for
clinical purposes. **Journal of American Medical Association**., Chicago, v.56,
p.1457, 1911.