

Análise comparativa de contagens de plaquetas entre metodologias de impedância e óptica em amostras de sangue de indivíduos hospitalizados

Comparative analysis of platelet count between electrical impedance and optical platelet count methods in blood samples from hospitalized individuals

Thamires Aparecida Dzirba¹
Laura Mattana Dionísio²
Jéssica Rodrigues Fabro¹
Gisele Aparecida Langoski¹
Bruno Ribeiro Cruz³
Jeanine Izabel Margraf Bittencourt⁴
Everson Augusto Krum³
Danielle Cristyane Kalva Borato⁵
Mariane de Faria Moss³

Resumo

Objetivo: Comparar resultados de contagens plaquetárias em amostras de sangue de indivíduos hospitalizados realizadas por impedância (PLT-I) e metodologia óptica fluorescente (PLT-O). **Métodos:** Em estudo retrospectivo, foram avaliados dados sequenciais arquivados de contagens plaquetárias em amostras de sangue de trezentos indivíduos adultos hospitalizados, incluindo casos de anemias microcíticas e hemolíticas, neoplasias hematológicas, entre outras doenças. Todos os casos continham contagens de plaquetas PLT-I e PLT-O realizadas no equipamento Sysmex XE-5000. **Resultados:** Não houve diferença significativa entre os valores de contagens plaquetárias entre a PLT-I e PLT-O ($p=0,614$). Quando avaliamos os valores de plaquetas entre diferentes grupos em relação às metodologias, não houve diferença entre as contagens plaquetárias naqueles com VCM abaixo de 80 fL ($p=0,936$), VCM abaixo de 70 ($p=0,821$), plaquetas abaixo de $100 \times 10^9/L$ ($p=0,369$) e plaquetas abaixo de $50 \times 10^9/L$ ($p=0,314$). Além disso, a correlação entre PLT-I e PLT-O foi forte. **Conclusão:** Os valores de contagens plaquetárias, provenientes de amostras de sangue de pacientes não saudáveis, realizadas no analisador XE-5000 pelos métodos óptico e impedância, mostraram forte correlação e boa concordância.

Palavras-chave

Plaquetometria; Plaquetas; Paciente hospitalizado

INTRODUÇÃO

A contagem plaquetária precisa é fundamental para a avaliação do paciente com risco de sangramento e decisões clínicas, principalmente em situações de risco de hemorragias espontâneas e formação de trombos, devido à plaquetopenia acentuada⁽¹⁾ ou trombocitose,⁽²⁾ respectivamente.

As diretrizes da *American Association of Blood Banks* (AABB) de 2014 estabelecem valores de corte para direcionar a indicação transfusional. Segundo a AABB, há indicação transfusional se a contagem de plaquetas for igual ou inferior a $10 \times 10^9/L$ em adultos hospitalizados ou abaixo de

$20 \times 10^9/L$ para adultos com acesso venoso central.⁽¹⁾ No entanto, sabe-se que nas trombocitopenias acentuadas é observada maior discrepância na contagem de plaquetas em analisadores hematológicos que utilizam metodologias convencionais,^(3,4) como a impedância elétrica (PLT-I), e isso pode interferir diretamente na decisão clínica transfusional.

A PLT-I é um método preciso em casos com valores de contagens plaquetárias referenciais. Por outro lado, as contagens utilizando PLT-I tornam-se menos precisas quando os valores de plaquetas encontram-se abaixo de $20 \times 10^9/L$, isso ocorre devido à diminuição da confiança estatística, menos eventos analisados e a crescente influência de matéria plasmática não plaquetária.^(4,5)

¹Graduanda em Farmácia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) – Ponta Grossa-PR, Brasil.

²Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), Farmacêutica no Hospital Universitário Regional dos Campos Gerais (HURCG) - Ponta Grossa-PR, Brasil.

³Doutor(a) em Medicina (Hematologia) pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Professor da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) - Ponta Grossa-PR, Brasil.

⁴Mestre em Saúde Pública pela Fundação Oswaldo Cruz, Professora da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) - Ponta Grossa-PR, Brasil.

⁵Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Professora da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) - Ponta Grossa-PR, Brasil.

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) – Ponta Grossa-PR, Brasil.

Recebido em 15/11/2017

Artigo aprovado em 23/08/2018

DOI: 10.21877/2448-3877.201800647

Segundo a ISLH (*International Society for Laboratory Hematology*) e a ICSH (*International Council for Standardization in Haematology*), o método de referência internacional para a contagem de plaquetas é o imunológico por citometria de fluxo. Essa metodologia é indicada para avaliar a exatidão e a precisão de outros métodos automatizados utilizados na quantificação plaquetária, principalmente em amostras trombocitopênicas.^(6,7) A desvantagem do método imunológico por citometria de fluxo é o maior custo e, por esse motivo, não está disponível na rotina da maioria dos laboratórios clínicos.

Com a evolução tecnológica e a busca contínua por melhorias na área laboratorial clínica, outras metodologias foram desenvolvidas e atualmente temos disponível, em alguns analisadores, a contagem óptica fluorescente de plaquetas (PLT-O).

Esse sistema de contagem utiliza um corante de polimetileno para marcar o RNA/DNA de células reticuladas, membrana plaquetária e grânulos. Esta tecnologia permite a contagem simultânea de reticulócitos, eritrócitos e plaquetas fluorescentes. Estudos mostraram que a PLT-O é mais confiável em contagens plaquetárias abaixo de $100 \times 10^9/L$, permitindo decisões clínicas mais apropriadas quando relacionadas às transfusões plaquetárias.⁽⁵⁾ Além disso, a PLT-O mostra forte correlação com o método imunológico de quantificação de plaquetas, enquanto que a PLT-I demonstra correlação mais fraca. No entanto, o estudo de tendência demonstra alguma discordância entre a PLT-O e o método de referência, apesar da boa correlação.⁽⁸⁾

No Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Regional dos Campos Gerais, as contagens plaquetárias de rotina são realizadas no equipamento Sysmex XE-5000. A PLT-I é utilizada na grande maioria dos casos, enquanto que a PLT-O é utilizada somente em casos que necessitem de confirmação, como nas plaquetopenias, microcitoses, presença de fragmentos eritrocitários, distribuição anormal de plaquetas em histograma e resultados discrepantes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi comparar os valores de contagens plaquetárias de indivíduos hospitalizados, não saudáveis, realizadas pelo método de impedância e óptico fluorescente.

MATERIAL E MÉTODOS

Em estudo retrospectivo, foram avaliados dados sequenciais arquivados de contagens plaquetárias de trezentos indivíduos adultos hospitalizados, incluindo casos de anemias microcíticas e hemolíticas, neoplasias hematológicas, entre outras doenças. Todos os casos continham contagens de plaquetas realizadas pelo método de impedância e óptico fluorescente no equipamento Sysmex XE-5000 (Sysmex Corp, Kobe, Japão). Os dados eram provenientes

do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Regional dos Campos Gerais, Ponta Grossa, Paraná.

A distribuição das contagens de plaquetas foi avaliada quanto à normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov Z. Mediana e variação foram usadas para análise descritiva das variáveis contínuas. A mediana das contagens de plaquetas foi comparada entre os métodos utilizando-se o teste Mann-Whitney U. O método Bland-Altman foi utilizado para identificar a diferença média e limites de concordância de 95% entre os métodos de contagem de plaquetas. A regressão Passing-Bablok também foi utilizada para avaliar as diferenças entre as metodologias.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS (Versão 20.0, SPSS, Chicago, IL) e MedCalc (Versão 17.9.7, MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica). Consideraram-se valores significativos quando o $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os valores medianos e variações dos parâmetros gerais e das contagens plaquetárias dos hemogramas dos trezentos casos estudados apresentam-se na Tabela 1. A distribuição dos valores das contagens plaquetárias foi não paramétrica ($p < 0,001$).

Tabela 1 - Características gerais numéricas dos hemogramas dos 300 casos estudados

Parâmetros	Mediana (variação)
Leucócitos $\times 10^9/L$	7,8 (0,2 - 130,8)
Eritrócitos $\times 10^{11}/L$	3,88 (1,37 - 6,48)
Hemoglobina g/dL	10,9 (4,0 - 17,5)
VCM fL	88,4 (48,6 - 118,8)
PLT-I $\times 10^9/L$	197 (1 - 1181)
PLT-O $\times 10^9/L$	210 (1 - 1171)

Não houve diferença significativa entre os valores de contagens plaquetárias PLT-O e PLT-I ($p = 0,614$). Quando avaliamos os valores de plaquetas entre diferentes grupos em relação às metodologias não houve diferença entre as contagens plaquetárias naqueles com VCM abaixo de 80 fL ($p = 0,936$), VCM abaixo de 70 ($p = 0,821$), plaquetas abaixo de $100 \times 10^9/L$ ($p = 0,369$) e plaquetas abaixo de $50 \times 10^9/L$ ($p = 0,314$) (Tabela 2).

Na Figura 1 encontra-se o gráfico de Bland-Altman referente aos valores plaquetários. A média da diferença entre os valores de contagens PLT-O e PLT-I foi de $9,3 \times 10^9/L$. Além disso, o coeficiente de correlação da análise de regressão entre métodos foi de 0,987 (95% IC: 0,983 - 0,989) ($p < 0,0001$).

Nos grupos com plaquetas abaixo de $100 \times 10^9/L$ e plaquetas abaixo de $50 \times 10^9/L$, o coeficiente de correlação foi de 0,962 (95% IC: 0,938 - 0,977) ($p < 0,0001$) e 0,930 (95% IC: 0,842 - 0,969) ($p < 0,0001$), respectivamente.

Tabela 2 - Comparação dos valores medianos das contagens plaquetárias em diferentes grupos

Grupos	Contagens Plaquetárias		p**
	Óptica Mediana x10 ⁹ /L (variação)	Impedância Mediana x10 ⁹ /L (variação)	
Geral (n=300)	210 (1 - 1171)	197 (1 - 1181)	0,614
<100x10 ⁹ /L* (n=74)	60 (1 - 99)	56 (1 - 119)	0,369
<50x10 ⁹ /L* (n=24)	16 (1 - 43)	14 (1 - 42)	0,314
VCM <80fL (n=42)	277 (51 - 1171)	300 (27 - 1181)	0,936
VCM <70fL (n=16)	266 (79 - 513)	294 (111 - 531)	0,821

*Corte estipulado nas contagens realizadas pelo método óptico fluorescente.

**Teste Mann-Whitney U.

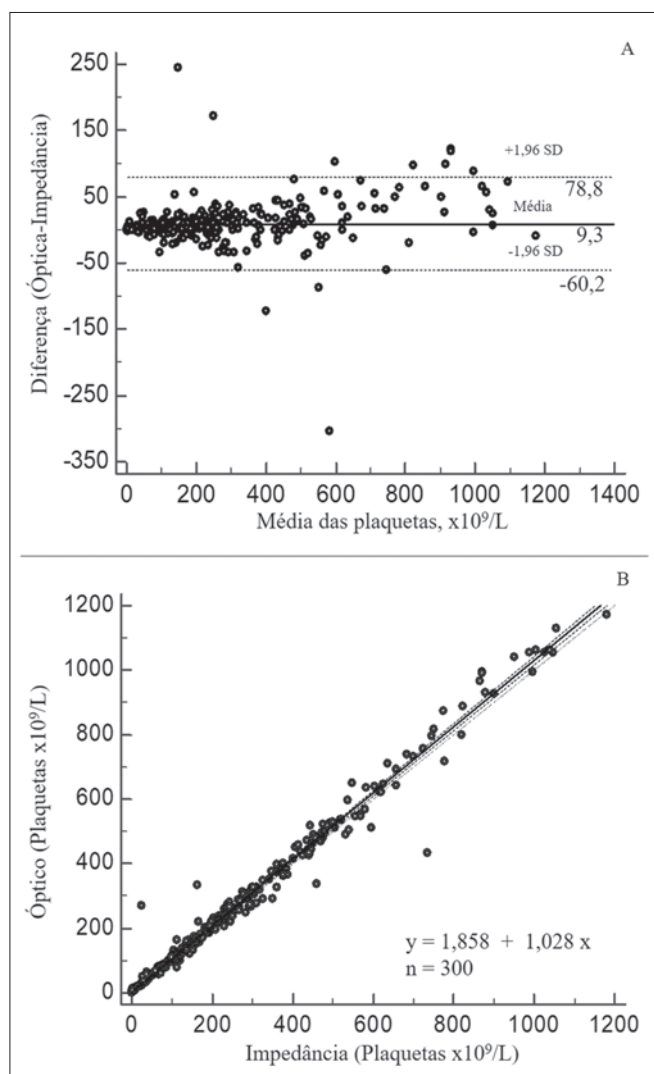


Figura 1. Gráfico de Bland-Altman referente aos valores plaquetários.

DISCUSSÃO

Os analisadores hematológicos disponibilizam diferentes metodologias para realizar a contagem plaquetária, como a PLT-I, PLT-O, método CD61, e, mais recentemente,

plaquetas fluorescentes. Apesar de o número de analisadores hematológicos disponíveis, a metodologia mais utilizada é a PLT-I. Esta metodologia não necessita de reagentes específicos, é rápida e de baixo custo. Além disso, é disponibilizada tanto em analisadores mais simples, com contagem diferencial em três partes, quanto em analisadores de última geração, que disponibilizam mais de 30 parâmetros para avaliação do hemograma. Em nosso estudo, avaliamos a concordância entre os valores de contagens plaquetárias PLT-O e PLT-I em indivíduos hospitalizados.

Nossos resultados demonstraram uma forte correlação entre os valores obtidos por PLT-O e PLT-I. No entanto, os valores plaquetários utilizando PLT-I mostraram um viés positivo em relação aos valores de contagem utilizando PLT-O, estes achados estão de acordo com os dados encontrados em outros estudos.⁽⁵⁾ Quando avaliamos somente as contagens plaquetárias abaixo de 100x10⁹/L e abaixo de 50x10⁹/L, a correlação também foi forte. Porém, estudos demonstraram discrepâncias significativas em valores plaquetopênicos obtidos por PLT-I, principalmente quando os valores de contagens encontravam-se abaixo de 50x10⁹/L.^(4,9) Provavelmente, essa divergência entre nossos resultados e os da literatura pode ser atribuída à nossa pequena casuística de casos com plaquetopenia.

A metodologia PLT-O não é superior à PLT-I para todas as populações;^(9,10) quando comparada com o método de referência, parece superestimar os valores em situações de trombocitopenias acentuadas^(4,5) e pode contar erroneamente fragmentos de leucócitos apoptóticos, principalmente na terapia citotóxica.⁽⁹⁾ Isto provavelmente ocorre devido à coloração inadequada de fragmentos leucocitários após a apoptose.⁽¹¹⁾ Além disso, Wada et al.⁽¹²⁾ recentemente demonstraram que amostras com hemácias fragmentadas superestimaram expressivamente as contagens plaquetárias realizadas tanto pelo método PLT-O quanto pelo método PLT-I. Os motivos das imprecisões na contagem automatizada de plaquetas foram bem documentados. As contagens superestimadas podem resultar da falha dos analisadores em discriminar os fragmentos de

glóbulos vermelhos e outras partículas não plaquetárias, como imunocomplexos, bactérias, entre outros.^(13,14) Por outro lado, os valores subestimados de contagens plaquetárias podem ocorrer quando as plaquetas gigantes não são discriminadas dos glóbulos vermelhos e são excluídas da contagem de plaquetas.^(15,16)

Quando avaliamos as contagens plaquetárias em relação ao VCM, não encontramos diferenças significativas no grupo geral com microcitose (VCM abaixo de 80 fL) e o mesmo ocorreu em relação ao grupo de casos com microcitose moderada e acentuada (VCM abaixo de 70 fL). No entanto, recentemente, um estudo demonstrou que o método de impedância superestimou a contagem de plaquetas em amostras com valores de VCM abaixo de 70 fL. Além disso, os mesmos autores demonstraram fraca correlação entre os métodos PLT-I e PLT-O. Esses achados sugerem que o método PLT-O é mais preciso para estimar a contagem de plaquetas em amostras com hemácias microcíticas, especialmente nos casos com microcitose moderada e acentuada.⁽¹⁷⁾

De uma maneira geral, estudos demonstraram que os analisadores hematológicos apresentam contagens de plaquetas superestimadas, tanto em metodologias ópticas (XE-2100, Advia 120, Cell-dyn 4000) como por impedância (XE-2100, LH 750 e Pentra). Isso impacta justamente no "threshold" das decisões clínicas transfusionais, influenciando prognósticos e subestimando necessidades de transfusões plaquetárias, aumentando o risco de sangramento em pacientes plaquetopênicos.^(9,18) Por outro lado, nas situações em que pode ocorrer a contagem subestimada de plaquetas, pacientes que não necessitam de transfusão de plaquetas acabam recebendo e enfrentam um risco aumentado de aloimunização, imunossupressão, doenças infecciosas e doença de enxerto *versus* hospedeiro.⁽¹⁹⁾

Atualmente existem metodologias disponíveis que emitem resultados de quantificação plaquetária com maior precisão, confiabilidade e menor interferência de contagem, como, por exemplo, a plaqueta fluorescente disponibilizada na linha Sysmex-XN,⁽²⁰⁾ a qual utiliza um reagente específico para coloração das plaquetas. No entanto, o alto custo dificulta o acesso dos laboratórios de pequeno e médio porte às diferentes tecnologias.

CONCLUSÃO

Os valores de contagens plaquetárias, provenientes de pacientes não saudáveis, realizadas no analisador XE-5000 pelos métodos óptico e impedância mostraram forte correlação e boa concordância. Além disso, a maioria das contagens realizadas por essas metodologias é confiável e precisa, e as situações em que podem ocorrer discrepâncias são consideradas raras na rotina laboratorial ambulatorial e de hospitais não especializados.

Abstract

Objective: The objective of this study was to compare the results of platelet counts in blood samples from hospitalized individuals performed by impedance and fluorescent optical methods. **Methods:** In a retrospective study, it was evaluated the archived sequential data from platelet counts in blood samples from three hundred hospitalized adult individuals, including cases of microcytic and hemolytic anaemia, hematological malignancies, among other diseases. All cases contained platelet counts performed by the impedance (PLT-I) and optical fluorescent method (PLT-O) on the Sysmex XE-5000. **Results:** There was no significant difference between platelet counts between PLT-O and PLT-I ($p=0.614$). When the platelet values among different groups regarding methodologies was evaluated, there was no difference between platelet counts in those with MCV below 80 fL ($p=0.936$), MCV below 70 fL ($p=0.821$), platelets below $100 \times 10^9/L$ ($p=0.369$) and platelets below $50 \times 10^9/L$ ($p=0.314$). In addition, the correlation between PLT-I and PLT-O was strong. **Conclusion:** The values of platelet counts from unhealthy patients performed in the XE-5000 analyzer by impedance and optical methods showed strong correlation and good agreement.

Keywords

Platelet count; Platelets; Hospitalized patient

REFERÊNCIAS

1. Kaufman RM, Djulbegovic B, Gernsheimer T, Kleinman S, Tinmouth AT, Capocelli KE, et al. Platelet Transfusion: A clinical Guideline From the AABB. *Ann Intern Med*. 2015;162(3):205-13.
2. Chuzi S, Stein BL. Essential thrombocythemia: a review of the clinical features, diagnostic challenges, and treatment modalities in the era of molecular discovery. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(12): 2786-98.
3. Hong KH, Kim MJ, Lee KW, Park KU, Kim HS, Song J. Platelet count evaluation using three automated haematology analysers compared with the immunoplatelet reference method, and estimation of possible inadequate platelet transfusion. *Int Jnl Lab Hem*. 2009;31:298-306.
4. Briggs C, Harrison P, Grant D, Staves J, MacHin SJ. New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter the XE 2100. *Clin Lab Haematol*. 2000;22(6):345-50.
5. Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count. *Int J Lab Hematol*. 2007;29:77-91.
6. International Council for Standardization in Haematology Expert Panel on Cytometry and International Society of Laboratory Hematology Task Force on Platelet Counting. Platelet counting by the RBC/platelet ratio method: a reference method. *Am J Clin Pathol*. 2001;115:460-4.
7. Harrison P, Ault KA, Chapman S, Charie L, Davis B, Fujimoto K, et al. An interlaboratory study of a candidate reference method for platelet counting. *Am J Clin Pathol*. 2001;115:448-59.
8. Cid J, Nascimento JD, Vicent A, Aguinaco R, Escoda L, Ugarriza A, et al. Evaluation of low platelet counts by optical, impedance, and CD61-immunoplatelet methods: estimation of possible inappropriate platelet transfusion. *Transfusion*. 2010;50(4):795-800.
9. Segal H, Briggs C, Kunka S, Casbard A, Harrison P, Machin SJ, et al. Accuracy of platelet counting haematology analysers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusion. *Br J Haematol*. 2005;128:520-25.
10. Sandhaus LM, Osei ES, Agrawal NN, Dillman CA, Myerson HJ. Platelet counting by the Coulter LH 750, Sysmex XE 2100, and Advia 120: a comparative analysis using the RBC/platelet ratio reference method. *Am J Clin Pathol*. 2002;118:235-41.
11. van der Meer W, MacKenzie MA, Dinnissen JW, de Keijzer MH. Pseudoplatelets: a retrospective study of their incidence and interference with platelet counting. *J Clin Pathol*. 2003;56(10):772-774.

12. Wada A, Takagi Y, Kono M, Morikawa T. Accuracy of a new platelet count system (PLT-F) depends on the staining property of its reagents. *Plos one*. 2015;10(10): e0141311.
13. Ault KA. Platelet counting: is there room for improvement? *Lab Haematol*. 1996;2:139-43.
14. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review, part I: platelets. *Int J Lab Hematol*. 2007;29:4-20.
15. Kunicka JE, Fischer G, Murphy J, Zelmanovic D. Improved platelet counting using two dimensional laser light scatter. *Am J Clin Pathol*. 2000;114:283-9.
16. Lima KG, Werlang MC, Munhoz TP. Avaliação do desempenho do equipamento de hematologia Sysmex XE2100D em um laboratório municipal. *RBAC*. 2015;47(4):133-40.
17. Boulassel MR, Al-Farsi R, Al-Hashmi S, Al-Riyami H, Khan H, Al-Kindi S. Accuracy of Platelet Counting by Optical and Impedance Methods in Patients with Thrombocytopenia and Microcytosis. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2015;15(4):e463-8.
18. De La Salle BJ, McTaggart PN, Briggs C, Harrison P, Doré CJ, Longair I, et al. The accuracy of platelet counting in thrombocytopenic blood samples distributed by the UK National External Quality Assessment Scheme for General Haematology. *Am J Clin Pathol*. 2012;137: 65-74.
19. Katus MC, Szczepiorkowski ZM, Dumont LJ, Dunbar NM. Safety of platelet transfusion: past, present and future. *Vox Sang*. 2014;107(2):103-13
20. Tanaka Y, Tanaka Y, Gondo K, Maruki Y, Kondo T, Asai S, et al. Performance evaluation of platelet counting by novel fluorescent dye staining in the XN-series automated hematology analyzers. *J Clin Lab Anal*. 2014;28:341-8.

Correspondência

Thamires Aparecida Dzirba

*Avenida General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bloco M - Sala 92
Ponta Grossa-PR, Brasil*