

Validation of the mindray BC6000 hematology analyzer for erythroblast counting in peripheral blood

Validação do analisador hematológico Mindray BC6000 para a contagem de eritroblastos em sangue periférico

Lacy Brito Junior¹; Adna dos Santos Caldas¹; Vanessa Ingrid Cardoso Pereira¹; Roberta Isabella Senna Ferreira²; Ana Paula Silveira Paixão²

¹ Federal University of Para, Postgraduate Program in Clinical Analysis (PPGAC), Belem, Para, Brazil.

² Dr Paulo C Azevedo Clinical Pathology Laboratory, Hematology, Belem, Para, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: Differential counting of erythroblasts in blood samples by hematology analyzers still has limitations. Technological advances in blood count equipment have proposed the fully automated counting of these cells, however, not without its validation.

Objective: Validate the automated count of erythroblasts in peripheral blood in the Mindray BC6000 hematology analyzer and verify the existence of correlation of the maturation stages of erythroblasts with the equipment's graphics.

Material and Methods: Prospective study with peripheral blood samples from the Clinical Pathology Laboratory Dr Paulo C. Azevedo, regardless of age and gender, to validate the erythroblast count in the Mindray BC6000 hematology analyzer compared to the manual method (gold standard), in the period of June 2019 to December 2020.

Results: Seventeen peripheral blood samples were analyzed from newborns (09/17 - 52.3%) and from patients older than 2 years (08/17 - 47.7%) who had more than 18% of erythroblasts after morphological analysis of the sample. Statistical analysis of erythroblast counts by the two methodologies showed that the Mindray BC6000 hematological counter has good reproducibility, precision and linearity. There was no correlation between the maturation stages of erythroblasts and the equipment graphics.

Conclusion: The proposed validation showed that the Mindray BC6000 hematological counter has good analytical performance for counting erythroblasts in peripheral blood. However, there is no correlation between the maturation stages of erythroblasts with the graphics generated by the equipment.

Key words: hematology; erythroblasts; laboratory automation.

RESUMO

Introdução: A contagem diferencial de eritroblastos em amostras de sangue por analisadores de hematologia ainda apresenta limitações. Os avanços tecnológicos nos equipamentos de hemograma têm proposto a contagem totalmente automatizada dessas células, porém, não sem sua validação.

Objetivo: Validar a contagem automatizada de eritroblastos no sangue periférico no analisador hematológico Mindray BC6000 e verificar a existência de correlação dos estágios de maturação dos eritroblastos com os gráficos do equipamento.

Material e Métodos: Estudo prospectivo com amostras de sangue periférico do Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo, independente de idade e sexo, para validação da contagem de eritroblastos no analisador hematológico Mindray BC6000 em comparação ao método manual (padrão ouro), no período de junho de 2019 a dezembro de 2020.

Resultados: Foram analisadas 17 amostras de sangue periférico de recém-nascidos (17/09 - 52,3%) e de pacientes maiores

de 2 anos (17/08 - 47,7%) que apresentavam mais de 18% de eritroblastos após análise morfológica da amostra. A análise estatística das contagens de eritroblastos pelas duas metodologias mostrou que o contador hematológico Mindray BC6000 tem boa reprodutibilidade, precisão e linearidade. Não houve correlação entre os estágios de maturação dos eritroblastos e os gráficos do equipamento.

Conclusão: A validação proposta mostrou que o contador hematológico Mindray BC6000 apresenta bom desempenho analítico para contagem de eritroblastos em sangue periférico. Porém, não há correlação entre os estágios de maturação dos eritroblastos com os gráficos gerados pelo equipamento.

Palavras-chave: hematologia; eritroblastos; automação de laboratório.

INTRODUCTION

Technological advances in the automation process of the blood count in recent years have made this test faster in sample analysis, especially with the introduction of conveyors and smear processors and slide staining. But they also brought greater security to the results by improving the identification of normal peripheral blood cells and signaling, through the emission of alerts/alarms (flags), for the presence of immature bone marrow cells in these samples⁽¹⁻⁷⁾.

Accuracy in the identification of immature bone marrow cells in peripheral blood has only been possible thanks to the incorporation of impedance, flow cytometry and more recently fluorescence signals of the DNA/RNA content of the cell nucleus for counting and analysis of the leukocyte differential. Thus, allowing the analysis of leukocyte differential dispersion in complexity and cell size graphs, or cell complexity and fluorescence signals of DNA/RNA content⁽³⁻¹²⁾.

Specifically in relation to analyzers that use the principles of electrical impedance, optical dispersion and analysis of cells by DNA/RNA fluorescence signals from the cell nucleus, we can highlight the Mindray BC6000 and Sysmex[®] hematology analyzers, which have similar methodologies^(4,7-9,11,13). These equipments, in addition to providing the results of counting and differential of leukocytes in five parts, also propose the differential counting of erythroblasts (NRBC) and other body fluids such as pleural and synovial fluids^(4,8,12-14).

The incorporation of any new methodology into the routine of a clinical analysis laboratory, however, must first be validated to ensure its analytical quality by evaluating the accuracy of the results. Thus, the International Council for Standardization in Hematology (ICSH), for example, defines as precision the measure of agreement between the estimated value of a given analyte and the observed value obtained using independent techniques⁽¹⁵⁾.

Thus, this study presents the validation of the automated

counting of erythroblasts in peripheral blood samples in the Mindray BC6000 hematology device through a comparative method with the manual technique (Gold Standard), and verified the existence of a correlation between the maturation stages of erythroblasts and the graphics generated by the equipment.

METHODOLOGY

Casistry: Prospective study with routine peripheral blood samples from the Dr Paulo C. Azevedo Clinical Pathology Laboratory, located in the city of Belém, Pará, or bone marrow samples from the same laboratory from an oncology hospital, regardless of age and gender, for characterization of the immunophenotypic profile of the erythroblasts present in these samples and validation of the automated counting of erythroblasts in the Mindray BC6000 hematology counter from June 2019 to December 2020.

For this purpose, 20 bone marrow samples from patients with acute leukemia, disease-free, under therapeutic follow-up were analyzed, that is, in bone marrow recovery after specific treatment with 15 or 30 days post-chemotherapy, as a positive control for the definition of erythroblast populations at different stages of maturity. In addition, 17 samples of peripheral blood from patients undergoing routine blood counts in that laboratory, arising from spontaneous or hospital demand, to verify whether it would be possible to characterize the stage of maturation of peripheral blood erythroblasts in the graphic plotting of the Mindray BC6000 equipment.

Characterization of Samples: Peripheral blood or bone marrow samples from patients of both genders, of any age group, anticoagulated with EDTA (Ethylenediamine Tetraacetic Acid), with a volume of 2ml to 5ml, and with more than 18% of erythroblasts, for each, were included. 100 leukocytes were counted, after morphological analysis by common light microscopy with an immersion objective on a slide stained with May Grunwald by a specialized professional from that laboratory.

Exclusion Criteria: Samples of coagulated peripheral blood or bone marrow, with a volume of less than 2 ml, with less than 18% of erythroblasts after morphological analysis, or from patients with active acute leukemia, were excluded.

Characterization of the presence of erythroblasts by the Mindray BC6000 equipment:

The samples selected by the quantity of erythroblasts after morphological analysis were submitted to acquisition in the Mindray BC6000 equipment, which, according to the manufacturer, has the ability to identify and quantify the presence of erythroblasts in peripheral blood samples.

Immunophenotypic characterization of erythroblasts: For the immunophenotypic characterization of the various stages of erythroblast development in peripheral blood and bone marrow samples, the mononuclear cells were first separated in a conical centrifuge tube with the addition of 2ml of Histopaque-1077® and then the tube was tilted to 45°, gentle addition of 2ml of peripheral blood or bone marrow sample with Pasteur pipette. Afterwards, the samples were centrifuged at 1,500 rpm for 30 minutes and then, using another Pasteur pipette, the layer of mononuclear cells was carefully removed from the interface between the Histopaque gradient and the red blood cells, transferring these cells to another conical centrifuge tube containing 10ml of PBS (0.10%) Euroimun Sodium Perbarate. With another centrifugation at 1,500 rpm for 10 minutes, discarding the supernatant and resuspension of the cell pellet in 5ml of PBS.

Then, 100µL of this solution was transferred to each previously identified conical flow cytometry tube. Subsequently, 5µL of different combinations of commercial monoclonal antibodies, panhematopoietic, CD34 and CD45, or myeloid, CD33, CD117 and CD235a (Glycophorin A), labeled with the fluorochromes FITC, PE, Percyp and APC, were added. Followed by the addition of 200µL red cell lysis solution (Facslysing BD 1:10), incubation in the dark for 10 minutes, and subsequent addition of 1ml (1,000µL) of water to each tube. For further analysis after acquisition of 10,000 events in a BC Coulter DxFlex® flow cytometer, with CytExpert for DxFlex® software (BC, Indianapolis, Indiana, USA), for thirteen colors.

Statistical Analysis: The data obtained were analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software, version 26 (SPSS Inc., Chicago, USA) by applying descriptive statistics tests to determine the mean, standard deviation and median referring to the erythroblast counts by the automated and manual methods; of normality by Shapiro-Wilk, to verify if the data had normal distribution, and by Mann-Whitney to compare the medians of the amount of erythroblasts counted by the two methodologies. Being adopted as significance level $p \leq 0.05$.

Ethical Aspects: As this is a prospective study without the researchers' involvement with the research subjects or the use of any personal data of the same, those responsible for the research signed a Data Use Commitment Term (TCUD) with the institutions involved, with a request for a Term Waiver of Free and Informed Consent (TCLE), as provided for in the guidelines and regulatory standards described in Resolution No. 466 of December 12, 2012, complemented by article 17, item VII of Resolution 510/2010.

RESULTS

For the validation process of the automated counting of erythroblasts by the Mindray BC6000 equipment, 17 peripheral blood samples were analyzed, being 09/17 (52.9%) of newborn patients, 05/17 (29.4%) patients they were aged between 2 and 11 years and 03/17 (17.7%) were adults aged between 63 and 75 years. Of these 10/17 (58.8%) patients were female and 07/17 (41.2%) were male (Table 1).

Regarding the erythroblasts counts in the peripheral blood of the analyzed patients, it was observed that, for the newborn samples (9/17), the mean and standard deviation values were 163.0 ± 168.6 for the automated counts and 171.5 ± 185.6 for manual counts. While for samples from patients aged over 2 years (8/17) the mean values and standard deviations observed were 84.1 ± 174.5 for automated counts and 84.2 ± 174.4 for counts erythroblast manuals.

Then, the analysis of the existence of correlation between the erythroblast counts was carried out by manual and automated methods, by performing the normality distribution test, which showed that there was no normal distribution between the two methodologies. In view of this result, the non-parametric Mann-Whitney test was performed, which revealed a value of $p = 0.78$, thus demonstrating that the values of the automated counting of erythroblasts, when compared with the manual counting, are the same, thus being the methodology of Automated erythroblast count on Mindray BC6000 hematology equipment considered statistically validated for routine laboratory use.

Then, immunophenotypic characterizations of the different stages of differentiation of erythroblasts obtained from control samples from bone marrow (Figures 1A, 1B, 1C) and from peripheral blood (Figures 1E, 1F, 1G, 1I, 1J, 1K, 1M, 1N) were performed and 1O). For further analysis the graphical distribution of peripheral blood erythroblasts obtained from the automation equipment in hematology Mindray BC6000 (Figures 1D, 1H, 1L and 1P) in comparison with the respective immunophenotypic characterization of erythroblasts from the same peripheral blood sample.

TABLE 1- Analysis of counts, manual and automated, and immunophenotypic characterization of erythroblasts in peripheral blood samples from patients from the routine of the Dr Paulo C Azevedo Clinical Pathology Laboratory, from June 2019 to December 2020

Sample identification	Sex	Age (years)	Material	Erythroblast Count		Immunophenotypic Characterization of Erythroblasts by Flow Cytometry (%)		
				Automated (%)	Manual (%)	Basophil Erythroblasts CD34 + CD45fracCD117 + CD235a-	Polychromatic erythroblasts CD34-CD45fracCD117 + CD235a+	Erythroblasts Orthochromatic CD235a + CD45-
RN SLA	F	0	SP	22	26	0	2,36	18,93
RN VN	F	0	SP	15	18	0	3,63	63,91
RN GD	F	0	SP	93	93	0,7	1,62	68,7
RN VN	F	0	SP	119	120	2,71	3,05	8
RN FBF	M	0	SP	79	75	1,5	3,24	26,37
RN JV	M	0	SP	474	546	0	3,2	64,29
RN ACL	M	0	SP	363	363	1,46	3,45	68,52
RN TK	F	0	SP	283	284	0	3,11	59,7
RN CG	F	0	SP	19	19	3,71	2,39	50,11
MFL	F	75	SP	27	26	1,71	1,77	9,23
FBA	M	63	SP	18	20	9,73	4,71	53,36
SPK	M	3	SP	17	17	0	21,81	85,26
BNCS	M	11	SP	26	25	4,75	8,66	36,28
MCL	F	63	SP	25	27	0	36,47	11,71
LSGM	F	2	SP	21	20	0	0,92	88,94
PGCG	M	9	SP	23	23	0	3,31	35,85
KVSR	F	2	SP	516	516	1,14	1,39	77,89

Caption: SP: peripheral blood; NB: newborn; CD: cluster of differentiation; F: female; M: male; %: percentage (relative value).

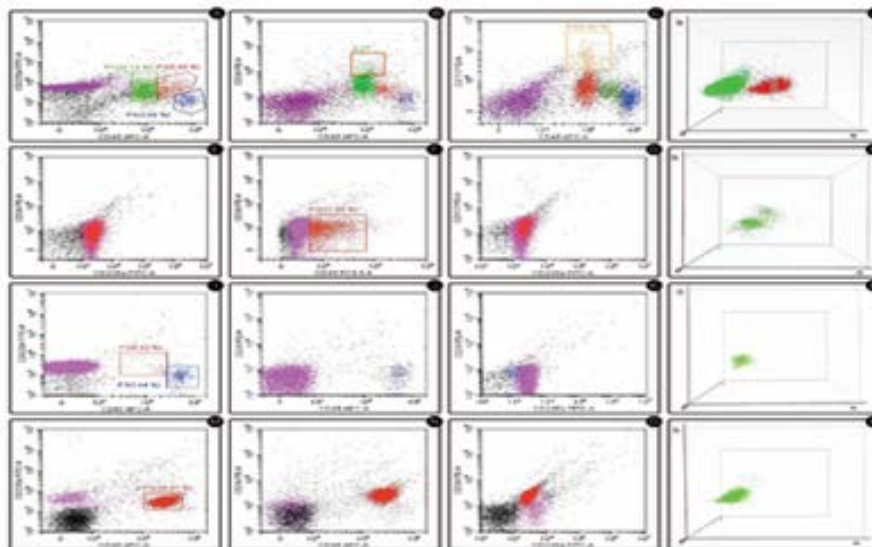


FIGURE 1 – Graphic representation of cell dispersion of the Dot plots type for the characterization of erythroblast populations in the bone marrow (A, B and C) by flow cytometry, where: in purple are orthochromatic erythroblasts and reticulocytes (Figure 1A to 1N); in green are polychromatic erythroblasts (Figure 1A and 1B); in red basophilic erythroblasts (Fig 1A and 1B); in orange the proerythroblasts (Figure 1C); and lymphocytes in blue (Figure 1A, 1B and 1C) in bone marrow samples. And in Figures 1E, 1F, 1G, 1I, 1J, 1K, 1M, 1N and 1O the populations of erythroblasts in peripheral blood are represented by flow cytometry, where: in purple, they are orthochromatic erythroblasts and reticulocytes; in red are polychromatic erythroblasts; and in black are likely cell debris. The complexity (FS) X nuclear fluorescence (FL) graphs are relative to the peripheral blood samples obtained in the Mindray BC6000 equipment (D, H, L and P), where: in Figure 1D the erythroblasts are represented in green and in red lymphocytes; and in Figures 1H, 1L and 1P, only erythroblasts are shown in green.

In this sense, it was observed that there is no relationship between the stage of differentiation of erythroblasts, observed in the peripheral blood of a sample, with the respective dispersion of these cells in the graphs obtained from the BC6000 automation equipment in hematology - Mindray®. As we can see, for example, in Figures E, F and G, where the presence of 78.11% of orthochromatic erythroblasts (pink) and 21.89% of polychromatic erythroblasts (red) is observed, these may even suggest the existence of correlation with the respective graphical dispersion by the Mindray BC6000 equipment. However, when the analysis is performed in relation to Figures M, N and O, where there is a predominance of polychromatic erythroblasts (36.47%), it is observed that, even so, the graphic dispersion of the Mindray BC6000 equipment does not change in regarding its special distribution.

DISCUSSION

As already presented, this research consisted of evaluating the performance of the Mindray BC6000 hematology analyzer for the automated counting of erythroblasts when compared to the manual counting on a slide (gold standard). In this sense, the results obtained with the analyzed automated methodology proved to be capable of accurately counting erythroblasts and were thus validated for use in the routine of the clinical analysis laboratory that supported the research. Thus ensuring precision in the results and more safety and speed in the release of blood count reports.

These data corroborate other studies in the literature that compare the count of erythroblasts in peripheral blood using non-automated and automated methodologies, and which also showed no statistical difference between these methodologies^(3,5,9,10-12,14,16).

It is known, however, that there is today on the market a large number of automated hematology analyzers available for routine use in clinical analysis laboratories, however, each using a variety of technologies for the analysis of peripheral blood samples. This fact, however, requires that each laboratory, before placing one of these devices in its diagnostic routine, has to perform their previous validation^(1,3-7,14,16-18).

TAN, NAVA and GEORGE16 in their studies on the capacity of the Cell-Dyn Sapphire (Abbott®) and UniCel DxH 800 (Beckman Coulter) hematology equipment to count and differentiate erythroblasts from other cell types, for example, showed that the Cell-Dyn Sapphire (Abbott®) showed 93.5% sensitivity for counting erythroblasts, while the UniCel DxH 800 equipment

(Beckman Coulter) had 73.0% specificity for the same count, when compared to the gold standard methodology (manual). Thus suggesting that erythroblast counting using equipment that uses methodologies similar to the Cell-Dyn Sapphire (Abbott®), such as BC6000 (Mindray®), have greater sensitivity for counting these cells.

SHEN et al⁽¹²⁾ in their studies, in turn, compared automated and manual erythroblast counts in peripheral blood samples from several patients. In this validation, the equipment used for this counting of erythroblasts was the Mindray BC6000 and, similar to what was observed in our study, there was no significant difference in the results obtained when compared to the manual counting ($p>0.05$). These authors then suggest that this equipment has 80.0% sensitivity and 96.9% specificity for counting erythroblasts.

In our studies, however, we also sought to identify whether the graphical plot of the erythroblast count generated by the equipment would be able to differentiate the maturation stages of erythroblasts present in the peripheral blood sample. For this purpose, as already presented, immunophenotyping of erythroblasts from peripheral blood samples was performed by flow cytometry, and subsequent analysis of the plotting graphics of the Mindray BC6000 equipment, where it was observed that, although the equipment reproduces the erythroblast count with precision, the generated graphic projection does not allow to differentiate in which stage of maturation the erythroblasts are. This result, however, has no consequences for the patient, since the maturation stage of erythroblasts in peripheral blood, so far, does not seem to have any implications for its treatment or prognosis.

A similar study carried out by GRIMALD and SCOPACASA⁽¹⁹⁾ with samples from patients who had a hematological disease with the presence of immature cells of the myeloid lineage and erythroblasts acquired in the hematology analyzer CELL-DYN 4000 (Abbott®), which uses similar technology to the equipment Mindray BC6000 also showed similar results in terms of precision for counting erythroblasts and the same difficulty in graphically identifying the stages of maturation of these cells.


Thus, the validation proposed in our study showed that the Mindray BC6000 hematology counter has good analytical performance for counting erythroblasts in peripheral blood. However, the graphics generated by the equipment do not show correlation with the maturation stages of erythroblasts.

Conflicts of Interests: The authors declare they have no competing interests.

REFERENCES

1. Vis JY, Huisman A. Verification and Quality Control of Routine Hematology Analyzers. *Int J Lab Hematol.* 2016; 38(1): 100-9.
2. Failace R, Pranke PARA. Evaluation of criteria for direct dissemination of blood count results through electronic counters. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2004; 26(3): 159-66.
3. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol.* 2008; 130(1): 104-16.
4. Comar SR, Malvezzi M, Pasquini R. Evaluation of manual blood smear review criteria after automated complete blood counts in a large teaching hospital. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2017; 39(4): 306-17.
5. Froom P, Havis R, Barak M. The rate of manual reviews of peripheral blood smears in outpatients. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47(11): 1401-5.
6. Bandeira R, Magalhães AF, Aquino HBS. Interpretation of criteria for releasing blood count results through automated counters in an emergency laboratory. *Rev Saud Res.* 2014; 7(3): 403-8.
7. Chabot-Richards DS, George TI. Leukocyte count: reference methodology. *Clin Lab Med.* 2015; 35(1): 11-24.
8. Wang J, Zhao S, Su Z, et al. Analytical comparison between two hematology analysis systems: Mindray BC-5180 vs Sysmex XN-1000. *J Clin Lab Anal.* 2019; 33(8): e22955.
9. Maciel TES, Comar SR, Beltrame MP. Performance evaluation of the Sysmex® XE-2100D automated hematology analyzer. *J Bras Patol Med Lab.* 2014; 50(1): 26-35.
10. Lee HT, Park PW, Seo YH, et al. Performance evaluation of Mindray CAL 8000 hematology analyzer (BC-6800 and SC-120) and slide/dye manufacturer. *J Clin Lab Anal.* 2017; 31(4): e22065.
11. Xiang D, Yue J, Sha C, et al. Performance evaluation of the mindray bc 6800 hematology analyzer and comparison of flags with the xe-2100 and manual microscopy. *Clin Lab.* 2019; 65(4): 180923.
12. Shen Y, Cao J, Zhou Z, et al. Clinical performance evaluation of the new Mindray BC-6000 hematology analyzer. *Int J Lab Hematol.* 2019; 41(5): 622-34.
13. Briggs CJ, Linssen J, Longair I, et al. The improved cue rates on the Sysmex XE-5000 compared to the XE-2100 reduce the number of manual film reviews and increase lab productivity. *Am J Clin Pathol.* 2011; 136(2): 309-16.
14. Smith AS, Nowak RB, Fowler VM. High resolution fluorescence microscopic image of the erythroblast structure. *Methods Mol Biol.* 2018; 1698: 205-28.
15. Palmer L, Briggs C, McFadden S, et al. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and classification of morphological characteristics of peripheral blood cells. *Int J Lab Hematol.* 2015; 37(3): 287-303.
16. Tan BT, Nava AJ, George TI. Evaluation of Beckman Coulter UniCel DxH 800, Beckman Coulter LH 780 and Abbott Diagnostics Cell-Dyn Sapphire hematology analyzers in adult specimens in a tertiary hospital. *Am J Clin Pathol.* 2011; 135(6): 939-51.
17. Santos FJ, Figueira DO, Souza JEO. Prevalence of discordant microscopic changes with automated CBC analysis. *J Bras Patol Med Lab.* 2014; 50(6): 398-401.
18. OSTA, Viviana et al. Study of the deficiency and alarm sensitivity of hematology analyzers in a pediatric hospital. *Bioquim Clin Latinoam Minutes.* 2014; 48(1): 71-9.
19. Grimaldi E, Scopacasa F. Evaluation of the abbot CELL-DYN 4000 hematology analyzer. *Am J Clin Pathol.* 2000; 113(4): 497-505.

CORRESPONDING AUTHOR

Lacy Brito Junior  0000-0001-9102-5817
 lcdbrito2@gmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

between the maturation stages of erythroblasts and the equipment graphics.

Conclusion: The proposed validation showed that the Mindray BC6000 hematological counter has good analytical performance for counting erythroblasts in peripheral blood. However, there is no correlation between the maturation stages of erythroblasts with the graphics generated by the equipment.

Key words: hematology; erythroblasts; laboratory automation.

INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos no processo de automação do hemograma nos últimos anos deram a esse exame mais rapidez nas análises de amostras, principalmente com a introdução de esteiras e processadores de esfregaços e coloração de lâminas. Mas trouxeram também maior segurança aos resultados pelo aprimoramento na identificação de células normais do sangue periférico e na sinalização, através da emissão de alertas/alarmes (flags), para a presença células imaturas da medula óssea nessas amostras⁽¹⁻⁷⁾.

A precisão na identificação de células imaturas da medula óssea no sangue periférico só têm sido possíveis graças a incorporação de metodologias de impedância, citometria de fluxo e mais recentemente de sinais de fluorescência do conteúdo de DNA/RNA do núcleo celular, para a contagem e análise da diferencial leucocitária. Permitindo assim a análise da dispersão da diferencial leucocitária em gráficos de complexidade e tamanho celular, ou de complexidade celular e sinais de fluorescência do conteúdo de DNA/RNA^(3-10,12).

Especificamente em relação aos analisadores que usam os princípios de impedância elétrica, dispersão ótica e análise das células por sinais de fluorescência de DNA/RNA do núcleo das células podemos destacar os analisadores hematológicos Mindray BC6000 e Sysmex®, que tem metodologias semelhantes^(4,7-9,11,13). Esses equipamentos além de fornecer os resultados de contagem e diferencial de leucócitos em cinco partes também se propõem a contagem diferencial de eritroblastos (NRBC) e de outros fluidos corporais como líquidos pleural e sinovial^(4,8,12-14).

A incorporação de qualquer metodologia nova a rotina de um laboratório de análises clínicas, contudo, precisa antes ser validada para garantir a qualidade analítica do mesmo através da avaliação da precisão dos resultados. Desse modo que, o Conselho Internacional para Padronização em Hematologia (ICSH), por exemplo, define como precisão a medida de concordância entre o valor estimado de um determinado analito e o valor observado obtido usando-se técnicas independentes⁽¹⁵⁾.

Assim, neste estudo é apresentada a validação da contagem automatizada de eritroblastos em amostras de sangue periférico no aparelho de hematologia Mindray BC6000 através de método comparativo com a técnica manual (Padrão Ouro), e verificada a existência de correlação entre os estágios maturativos de eritroblastos e os gráficos gerados pelo equipamento

METODOLOGIA

Casuística: Estudo prospectivo com amostras de sangue periférico da rotina do Laboratório de Patologia Clínicas Dr Paulo C. Azevedo, situado na cidade de Belém, Pará, ou de medula óssea do mesmo laboratório oriundas de um hospital oncológico, independente da faixa etária e gênero, para caracterização do perfil imunofenotípico dos eritroblastos presentes nessas amostras e validação da contagem automatizada de eritroblastos no contador hematológico Mindray BC6000 no período de junho de 2019 até dezembro de 2020.

Para tanto foram analisadas 20 amostras de medula óssea de pacientes portadores de leucemias agudas, livres de doença, em acompanhamento terapêutico, isto é, em recuperação medular pós-tratamento específico com 15 ou 30 dias pós-quimioterapia, como controle positivo para a definição das populações de eritroblastos em diferentes estágios de maturidade. E ainda 17 amostras de sangue periférico de pacientes que realizarem hemograma de rotina no referido laboratório, oriundas de demanda espontânea ou hospitalar, para a verificação se seria possível caracterizar na plotagem gráfica do equipamento Mindray BC6000 o estágio de maturação dos eritroblastos do sangue periférico.

Caracterização das amostras: Foram incluídas amostras de sangue periférico ou medula óssea de pacientes de ambos os gêneros, de qualquer faixa etária, anticoaguladas com EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético), com volume de 2ml a 5ml, e com mais de 18% de eritroblastos, para cada 100 leucócitos contados, após análise morfológica por microscopia de luz comum com objetiva de imersão em lâmina corada com May Grunwald por profissional especializado do referido laboratório.

Crítérios de exclusão: Foram excluídas amostras de sangue periférico ou medula óssea coaguladas, com volume inferior a 2ml, com menos de 18% de eritroblastos após análise morfológica, ou ainda de pacientes portadores de leucemia aguda em atividade.

Caracterização da presença de eritroblastos pelo equipamento Mindray BC6000: As amostras selecionadas pelo quantitativo de eritroblastos após análise morfológica foram submetidas a aquisição no equipamento Mindray BC6000, que segundo o fabricante tem a capacidade de identificar e quantificar a presença de eritroblastos em amostras de sangue periférico.

Caracterização imunofenotípica dos eritroblastos: Para a caracterização imunofenotípica das várias fases de desenvolvimento dos eritroblastos nas amostras de sangue periférico e de medula óssea primeiro foi realizada a separação das células mononucleares em tubo cônico de centrifugação com adição de 2ml de Histopaque-1077[®] e posteriormente inclinação do tubo a 45°, adição suave de 2ml de amostra de sangue periférico ou medula óssea com pipeta Pasteur. Em seguida foi feita a centrifugação das amostras em 1.500 rpm por 30 minutos e posteriormente com o uso de outra pipeta Pasteur foi feita a retirada cuidadosa da camada de células mononucleares da interface entre o gradiente de Histopaque e as hemácias, com transferência dessas células para outro tubo cônico de centrifugação contendo 10ml de PBS (Perbarato de Sódio Euroimun a 0, 10%). Com nova centrifugação em 1.500 rpm por 10 minutos, desprezo do sobrenadante e ressuspensão do sedimento celular em 5ml de PBS.

Em seguida foi transferido 100µL dessa solução para cada tubo cônico de citometria de fluxo previamente identificado. Posteriormente foram acrescidos de 5µL de diferentes combinações de anticorpos monoclonais comerciais, pan-hematopoiético, CD34 e CD45, ou mielóides, CD33, CD117 e CD235a (Glicoforina A), marcados com os fluorocromos FITC, PE, Percyp e APC. Seguido de adição de 200µL solução de lise de hemácias (Facslysing BD 1:10), incubação no escuro por 10 minutos, e posterior adição de 1ml (1.000µL) de água em cada tubo. Para posterior análise após aquisição de 10.000 eventos em citômetro de fluxo da BC Coulter DxFlex[®], com CytExpert for DxFlex[®] software (BC, Indianápolis, Indiana, EUA), para treze cores.

Análise estatística: Os dados obtidos foram analisados através do software Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versão 26 (SPSS Inc., Chicago, USA) pela aplicação dos testes de estatística descritiva para determinação de média, desvio padrão e mediana referentes as contagens de eritroblastos pelos métodos automatizado e manual; de normalidade de Shapiro-Wilk, para verificar se os dados tinha distribuição normal, e de Mann-Whitney para comparar as medianas da quantidade de

eritroblastos contados pelas duas metodologias. Sendo adotados como nível de significância $p \leq 0,05$.

Aspectos Éticos: Por se tratar de estudo prospectivo sem envolvimento dos pesquisadores com os sujeitos da pesquisa ou a utilização de quaisquer dados pessoais dos mesmo os responsáveis pela pesquisa assinaram Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD) junto as instituições envolvidas, com solicitação de Dispensa de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme prevêem as diretrizes e normas regulamentadoras descritas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012, complementada pelo artigo 17, inciso VII da Resolução 510/2010.

RESULTADOS

Para o processo de validação da contagem automatizada de eritroblastos pelo equipamento Mindray BC6000 foi realizada a análise de 17 amostras de sangue periférico sendo 09/17 (52,9%) dos pacientes recém-nascidos, 05/17 (29,4%) pacientes tinham idades entre 2 e 11 anos e 03/17 (17,7%) que eram adultos com idades entre 63 e 75 anos. Desses 10/17 (58,8%) pacientes eram do sexo feminino e 07/17 (41,2%) do sexo masculino (Tabela 1).

Em relação as contagens de eritroblastos no sangue periférico dos pacientes analisados foi observado que, para as amostras de recém-nascidos (9/17), os valores de média e desvio padrão foram de $163,0 \pm 168,6$ para as contagens automatizadas e de $171,5 \pm 185,6$ para as contagens manuais. Enquanto que para as amostras de pacientes com idades superior a 2 anos (8/17) os valores médias e desvios padrões observados forma de $84,1 \pm 174,5$ para as contagens automatizadas e de $84,2 \pm 174,4$ para as contagens manuais de eritroblastos.

Foi realizada então a análise de existência de correlação entre as contagens de eritroblastos pelos métodos manual e automatizado através da realização do teste de distribuição de normalidade, o qual mostrou que não existia distribuição normal entre as duas metodologias. Diante desse resultado foi realizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney o qual revelou um valor de $p = 0,78$ demonstrando assim que os valores da contagem automatizada de eritroblastos, quando comparados com a contagem manual são iguais, sendo então a metodologia de contagem automatizada de eritroblastos no equipamento em hematologia Mindray BC6000 considerada validada estatisticamente para uso na rotina laboratorial.

Em seguida foram realizadas as caracterizações imunofenotípicas dos diferentes estágios de diferenciação dos eritroblastos obtidos de amostras controle de medula óssea (Figuras 1A, 1B, 1C) e do sangue periférico (Figuras 1E, 1F, 1G,

TABELA 1- Análise das contagens, manual e automatizada, e da caracterização imunofenotípica de eritroblastos em amostras de sangue periférico de pacientes oriundos da rotina do Laboratório de Patologia Clínica Dr Paulo C Azevedo, no período de junho de 2019 até dezembro de 2020

Identificação das amostras	Sexo	Idade (anos)	Material	Contagem de Eritroblastos		Caracterização Imunofenotípica dos Eritroblastos por Citometria de Fluxo (%)		
				Automatizada (%)	Manual (%)	Eritroblastos Basófilos CD34 + CD45fracCD117 + CD235a-	Eritroblastos Policromáticos CD34-CD45fracCD117 + CD235a+	Eritroblastos Ortocromático CD235a + CD45-
RN SLA	F	0	SP	22	26	0	2,36	18,93
RN VN	F	0	SP	15	18	0	3,63	63,91
RN GD	F	0	SP	93	93	0,7	1,62	68,7
RN VN	F	0	SP	119	120	2,71	3,05	8
RN FBF	M	0	SP	79	75	1,5	3,24	26,37
RN JV	M	0	SP	474	546	0	3,2	64,29
RN ACL	M	0	SP	363	363	1,46	3,45	68,52
RN TK	F	0	SP	283	284	0	3,11	59,7
RN CG	F	0	SP	19	19	3,71	2,39	50,11
MFL	F	75	SP	27	26	1,71	1,77	9,23
FBA	M	63	SP	18	20	9,73	4,71	53,36
SPK	M	3	SP	17	17	0	21,81	85,26
BNCS	M	11	SP	26	25	4,75	8,66	36,28
MCL	F	63	SP	25	27	0	36,47	11,71
LSGM	F	2	SP	21	20	0	0,92	88,94
PGCG	M	9	SP	23	23	0	3,31	35,85
KVSR	F	2	SP	516	516	1,14	1,39	77,89

Legenda: SP: sangue periférico; RN: recém-nascido; CD: cluster de diferenciação; F: feminino; M: masculino; %: percentual (valor relativo).

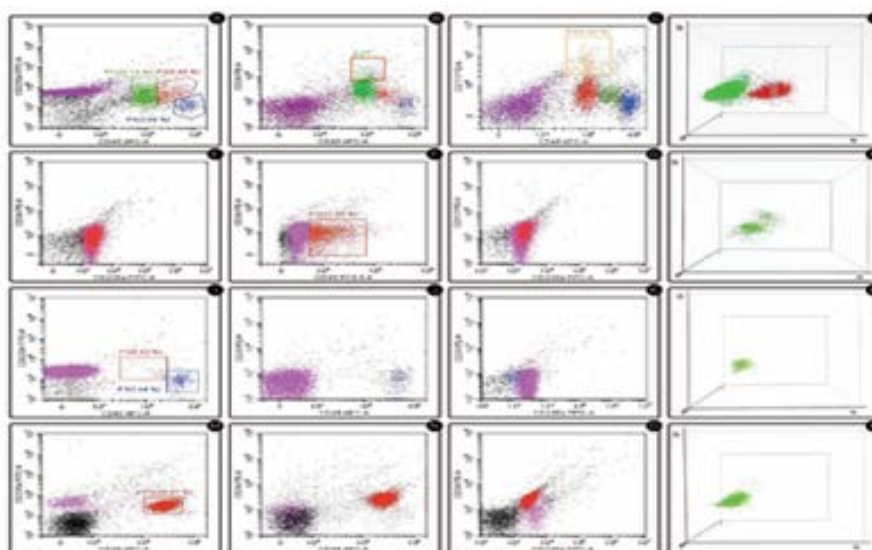


FIGURA 1 – Representação gráfica de dispersão celular do tipo Dot plots para a caracterização das populações de eritroblastos na medula óssea (A, B e C) por citometria de fluxo, onde: em roxo são eritroblastos ortocromáticos e reticulócitos (Figura de 1A até 1N); em verde são eritroblastos policromáticos (Figura 1A e 1B); em vermelho os eritroblastos basófilos (Figura 1A e 1B); em laranja os proeritroblastos (Figura 1C); e em azul os linfócitos (Fig 1A, 1B e 1C) em amostras de medula óssea. E nas Figuras 1E, 1F, 1G, 1I, 1J, 1K, 1M, 1N e 1O estão representadas as populações de eritroblastos em sangue periférico por citometria de fluxo, onde: em roxo são eritroblastos ortocromáticos e reticulócitos; em vermelho são eritroblastos policromáticos; e em preto são prováveis restos celulares. Já os gráficos de complexidade (FS) X fluorescência nuclear (FL) são relativos as amostras de sangue periférico obtidos no equipamento Mindray BC6000 (D, H, L e P), onde: na Figura 1D são representados em verde os eritroblastos e em vermelho os linfócitos; e nas Figuras 1H, 1L e 1P estão representados em verde apenas os eritroblastos.

II, IJ, 1K, 1M, 1N e 1O). Para posterior análise a distribuição gráfica de eritroblastos de sangue periférico obtida a partir do equipamento de automação em hematologia Mindray BC6000 (Figuras 1D, 1H, 1L e 1P) em comparação com a respectiva caracterização imunofenotípica dos eritroblastos da mesma amostra de sangue periférico.

Neste sentido foi observado que não há relação entre o estágio de diferenciação dos eritroblastos, observados no sangue periférico de uma amostra, com a respectiva dispersão dessas células nos gráficos obtidos a partir do equipamento de automação em hematologia BC6000 - Mindray®. Como podemos observar, por exemplo, nas Figuras E, F e G, onde observa-se a presença de 78,11% de eritroblastos ortocromáticos (rosa) e 21,89% de eritroblastos policromáticos (vermelho), essas até podem sugerir a existência de correlação com a respectiva dispersão feita em relação as Figuras M, N e O onde tem-se o predomínio de eritroblastos policromáticos (36,47%) observa-se que, mesmo assim, a dispersão gráfica do equipamento Mindray BC6000 não se altera em relação a sua distribuição especial gráfica pelo equipamento Mindray BC6000. Contudo, quando a análise é

DISCUSSÃO

Como já apresentado esta pesquisa se consistiu na avaliação do desempenho do analisador hematológico Mindray BC6000 para a contagem automatizada de eritroblastos quando comparada com a contagem manual em lâmina (padrão ouro). Nesse sentido os resultados obtidos com a metodologia automatizada analisada mostrou-se capaz de realizar a contagem de eritroblastos com precisão e foi assim validada para uso na rotina do laboratório de análises clínicas que apoiou a pesquisa. Garantindo assim precisão nos resultados e mais segurança e rapidez na liberação dos laudos de hemograma.

Esses dados corroboram com outros estudos da literatura que comparam a contagem de eritroblastos no sangue periférico através de metodologias não automatizadas e automatizadas e que também não demonstraram diferença estatística entre essas metodologias^(3,5,9,10-12,14,16).

Sabe-se porém que existe hoje no mercado um grande número de analisadores hematológicos automáticos disponíveis para uso na rotina dos laboratórios de análises clínicas, contudo, cada um utilizando uma variedade de tecnologias para as análises de amostra de sangue periférico. Esse fato porém obriga que cada laboratório, antes de colocar um desses aparelhos na sua rotina diagnóstica, tenha que realizar a validação previa dos mesmos^(1,3-7,14,16-18).

TAN, NAVA e GEORGE⁽¹⁶⁾ em seus estudos sobre a capacidade dos equipamentos de hematológicos Cell-Dyn Sapphire (Abbott®) e UniCel DxH 800 (Beckman Coulter) em contar e diferenciar eritroblastos de outros tipos celulares, por exemplo, mostraram que o equipamento Cell-Dyn Sapphire (Abbott®) apresentou 93,5% de sensibilidade para a contagem de eritroblastos, enquanto que o equipamento UniCel DxH 800 (Beckman Coulter) teve 73,0% de especificidade para a mesma contagem, quando comparados a metodologia padrão ouro (manual). Sugerindo assim que a contagem de eritroblastos através de equipamentos que utilizam metodologias semelhantes a do Cell-Dyn Sapphire (Abbott®), como o BC6000 (Mindray®), têm maior sensibilidade para a contagem dessas células.

SHEN et al⁽¹²⁾ em seus estudos, por sua vez, compararam as contagens automatizada e manual de eritroblastos em amostras de sangue periférico de diversos pacientes. Nessa validação o equipamento utilizado para essa contagem de eritroblastos foi o Mindray BC6000 e, semelhante ao que foi observado em nosso estudo, não houve diferença significativa nos resultados obtidos quando comparados com a contagem manual ($p > 0,05$). Esses autores sugerem então que esse equipamento apresenta 80.0% de sensibilidade e 96.9% de especificidade para a contagem de eritroblastos.

Ainda em nossos estudos porém buscamos também identificar se a plotagem gráfica da contagem de eritroblastos gerada pelo equipamento seria capaz de permitir a diferenciação dos estágios maturativos dos eritroblastos presentes na amostra de sangue periférico. Para tanto, como já apresentado, realizou-se a imunofenotipagem dos eritroblastos das amostras de sangue periférico, por citometria de fluxo, e posterior análise dos gráficos de plotagem do equipamento Mindray BC6000 onde observou-se que, embora o equipamento reproduza a contagem de eritroblastos com precisão, a projeção gráfica gerada não permite diferenciar em qual estágio de maturação encontram-se os eritroblastos. Esse resultado porém não trás consequências ao paciente visto que o estágio maturativo dos eritroblastos em sangue periférico, até o momento, não parece ter implicação no tratamento ou prognóstico do mesmo.

Um estudo semelhante realizado por GRIMALD e SCOPACASA⁽¹⁹⁾ com amostras de pacientes que possuíam alguma doença hematológica com a presença de células imaturas da linhagem mielóide e eritroblastos adquiridas no analisador de hematológico CELL-DYN 4000 (Abbott®), que utiliza a tecnologia semelhante a do equipamento Mindray BC6000, mostrou resultados também semelhantes quanto a precisão para a contagem de eritroblastos e a mesma dificuldade na identificação gráfica dos estágios de maturação dessas células.

Assim, a validação proposta no nosso estudo mostrou que o contador hematológico Mindray BC6000 apresenta bom desempenho analítico para a contagem de eritroblastos em sangue periférico. Porém, que os gráficos gerados pelo equipamento não

guarda correlação com os estágios maturativos de eritroblastos.

Conflitos de interesses: Os autores declaram não ter interesses conflitantes.

REFERÊNCIAS

1. Vis JY, Huisman A. Verificação e controle de qualidade de analisadores de hematologia de rotina. *Int J Lab Hematol.* 2016; 38(1): 100-9.
2. Failace R, Pranke PARA. Avaliação dos critérios de divulgação direta dos resultados do hemograma por meio de contadores eletrônicos. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2004; 26(3): 159-66.
3. Buttarello M, Plebani M. Contagens automatizadas de células do sangue: estado da arte. *Am J Clin Pathol.* 2008; 130(1): 104-16.
4. Comar SR, Malvezzi M, Pasquini R. Avaliação dos critérios de revisão de esfregaço de sangue manual após contagens de sangue completas automatizadas em um grande hospital universitário. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2017; 39 (4): 306-17.
5. Froom P, Havis R, Barak M. A taxa de revisões manuais de esfregaços de sangue periférico em pacientes ambulatoriais. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47(11): 1401-5.
6. Bandeira R, Magalhães AF, Aquino HBS. Interpretação dos critérios para liberação de resultados de hemograma por meio de contadores automatizados em um laboratório de emergência. *Rev Saud Res.* 2014; 7(3): 403-8.
7. Chabot-Richards DS, George TI. Contagem de leucócitos: metodologia de referência. *Clin Lab Med.* 2015; 35(1): 11-24.
8. Wang J, Zhao S, Su Z, et al. Comparação analítica entre dois sistemas de análise hematológica: Mindray BC-5180 vs Sysmex XN-1000. *J Clin Lab Anal.* 2019; 33(8): e22955.
9. Maciel TES, Comar SR, Beltrame MP. Avaliação de desempenho do analisador hematológico automatizado Sysmex® XE-2100D. *J Bras Patol Med Lab.* 2014; 50(1): 26-35.
10. Lee HT, Park PW, Seo YH, et al. Avaliação de desempenho do analisador hematológico Mindray CAL 8000 (BC-6800 e SC-120) e fabricante de lâminas / corante. *J Clin Lab Anal.* 2017; 31(4): e22065.
11. Xiang D, Yue J, Sha C, et al. Avaliação de desempenho do analisador de hematologia mindray bc 6800 e comparação de sinalizadores com o xe-2100 e microscopia manual. *Clin Lab.* 2019; 65(4): 180923.
12. Shen Y, Cao J, Zhou Z, et al. Avaliação do desempenho clínico do novo analisador de hematologia Mindray BC-6000. *Int J Lab Hematol.* 2019; 41(5): 622-34.
13. Briggs CJ, Linssen J, Longair I, et al. As taxas de sinalização aprimoradas no Sysmex XE-5000 em comparação com o XE-2100 reduzem o número de revisões manuais do filme e aumentam a produtividade do laboratório. *Am J Clin Pathol.* 2011; 136(2): 309-16.
14. Smith AS, Nowak RB, Fowler VM. Imagem microscópica de fluorescência de alta resolução da estrutura do eritroblasto. *Methods Mol Biol.* 2018; 1698: 205-28.
15. Palmer L, Briggs C, McFadden S, et al. Recomendações do ICSH para a padronização da nomenclatura e classificação das características morfológicas das células do sangue periférico. *Int J Lab Hematol.* 2015; 37(3): 287-303.
16. Tan BT, Nava AJ, George TI. Avaliação dos analisadores hematológicos Beckman Coulter UniCel DxH 800, Beckman Coulter LH 780 e Abbott Diagnostics Cell-Dyn Sapphire em espécimes adultos em um hospital terciário. *Am J Clin Pathol.* 2011; 135(6): 939-51.
17. Santos FJ, Figueira DO, Souza JEO. Prevalência de alterações microscópicas discordantes com análise CBC automatizada. *J Bras Patol Med Lab.* 2014; 50(6): 398-401.
18. OSTA, Viviana et al. Estudo da deficiência e sensibilidade de alarme de analisadores hematológicos em um hospital pediátrico. *Bioquim Clin Latinoam Minutes.* 2014; 48(1): 71-9.
19. Grimaldi E, Scopacasa F. Avaliação do analisador de hematologia abbott CELL-DYN 4000. *Am J Clin Pathol.* 2000; 113(4): 497-505.

AUTOR CORRESPONDENTE

Lacy Brito Junior  0000-0001-9102-5817
lcdbrito2@gmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.