



Linearidade e *carryover* do contador hematológico Horiba® Abx Micros ESV 60¹

Nathan R.N. Cruz^{2*}, Matheus A. Yamazaki², Amanda E. Martinelli²,
Fernanda Martinato² e Aureo E. Santana²

ABSTRACT.- Cruz N.R.N., Yamazaki M.A., Martinelli A.E., Martinato F. & Santana A.E. 2018. [Linearity and carryover of automated hematology counter Horiba® Abx Micros ESV 60.] Linearidade e *carryover* do contador hematológico Horiba® Abx Micros ESV 60. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38(2):345-349. Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Hospital Veterinário Governador "Laudo Natel", Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Via de Acesso Rodovia Paulo Donato Castellane s/n Km 5, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil. E-mail: nathancruzbr@gmail.com

The automated hematology counter ABX Micros 60 ESX (Horiba Medical 2012) is veterinary hematology analyzer multi-species that carries 50 counts per hour releases 18 blood parameters, in addition to graphical representations (histograms) for leukocytes, erythrocytes and platelets. The objective of this study is to evaluate the performance of the apparatus with respect to linearity and carryover through commercial control and blood samples from the routine of Veterinary Clinical Pathology Laboratory. According to results we can say that this device has excellent linearity coefficient ($r^2=0.99$) in leukocyte parameters, erythrocytes and platelets during that time dilutions. Regarding the carryover was excellent device performance, however, was not in conformity values in the parameters of MCHC and VPM in one of the methodologies made that can be justified by the limited formula that does not consider the equipment characteristics.

INDEX TERMS: Automated hematology, counter Horiba® Abx Micros ESV 60, veterinary, cell blood counter, performance.

RESUMO.- O contador automático hematológico ABX Micros ESX 60 (Horiba Medical 2012) é analisador hematológico veterinário multi-espécie que realiza 50 contagens por hora, libera 18 parâmetros sanguíneos, além de fazer representações gráficas (histogramas) para leucócitos, hemácias e plaquetas. O objetivo deste trabalho é avaliar o desempenho do referido aparelho em relação à linearidade e *carryover*, através de controle comercial e de amostras de sangue provenientes da rotina do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária. De acordo com resultados é possível afirmar que o presente aparelho possui um excelente coeficiente de linearidade ($r^2=0,99$) nos parâmetros de leucócitos, eritrócitos e plaquetas em relação às diluições estudadas. Em relação aos *carryover*

houve excelente desempenho do aparelho, contudo, houve valores não conformes nos parâmetros de CHCM e VPM em uma das metodologias realizadas que pode ser justificada pela limitação da fórmula que não considera a características do equipamento.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Contador hematológico, Horiba® Abx Micros ESV 60, hematologia, desempenho.

INTRODUÇÃO

O contador automático hematológico ABX Micros ESX 60 é analisador hematológico veterinário multi-espécie (cão, gato, cavalo, coelho, rato, camundongo, porco, macaco, vaca e ovelha) que realiza 50 contagens por hora e libera 18 parâmetros sanguíneos: leucócitos, diferencial leucocitário de três populações, hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), índice de anisocitose eritrocitária (RDW) do tipo

¹ Recebido em 26 de setembro de 2016.

Aceito para publicação em 21 de maio de 2017.

² Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Hospital Veterinário Governador "Laudo Natel", Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de Acesso Rodovia Paulo Donato Castellane s/n Km 5, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil.

*Autor para correspondência: nathancruzbr@gmail.com

coeficiente de variação (CV), plaquetas e volume plaquetário médio (VPM), além de representações gráficas (histogramas) para leucócitos, hemácias e plaquetas (Horiba Medical 2012).

O sistema de reagentes é fechado com *pack* que analisa em média 100 a 120 amostras considerando os ciclos de *start-up* (inicialização), ciclos de branco e *stand-by* (desligamento), usando para análise 10µL de sangue com aquisição *open tube* através de probe (agulha) com sistema de lavagem (*flush*) integrado. O sistema de calibração própria do fabricante pelo *kit* Minocal (Horiba Medical 2012), sangue de controle de qualidade com *kit* Minotrol (Horiba Medical 2012) *tri-level* (*low*, *normal* e *high*), análise gráfica de qualidade de *Levey Jennings* e estatística de *XB* (*Bull moving average*) para os índices hematimétricos. Os resultados podem ser visualizados na tela de LCD colorido com tecnologia *touch screen*, impressos em impressora externa ou com interfaceamento para *software* de gerenciamento clínico em modo direcional com identificação do paciente em modo alfanumérico, nome, sexo e proprietário e por código de barras.

Os equipamentos laboratoriais podem avaliados em relação a sua capacidade de determinar resultados precisos proporcionais à concentração do analito em uma determinada amostra, esse item é denominado linearidade, que é o limite analítico que por meio de uma curva linear que passa por um ponto de origem e de calibração o aparelho terá a capacidade de extrapolar os resultados em amostras de valores desconhecidos e diferentes concentrações em relação a uma média conhecida (Mendes & Romano 2010).

Outra propriedade avaliada em relação aos contadores celulares é o *carryover* (arrastamento) que é um índice expresso em porcentagem ou desvio-padrão de quanto uma amostra com contagem alta pode influenciar os resultados de uma amostra com citopenia quando o aparelho não possui uma eficiência em seu processo de lavagem de probe, cubeta ou canal que deixam resíduos de um teste, e assim contaminando o próximo teste que será realizado (Broughton et al. 1974, Mendes & Romano 2010, Briggs et al. 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho do referido aparelho em relação à linearidade e *carryover* por meio de controle comercial e de amostra de sangue provenientes da rotina de um Laboratório de Patologia Clínica Veterinária.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária (LPCV) no Hospital Veterinário Governador “Laudo Natel” (FCAV/ UNESP, Campus Jaboticabal) e todas as análises foram realizadas em contador hematológico do LPCV, o ABX Micros ESV 60 (Horiba Medical 2012).

O ensaio de linearidade seguiu a metodologia proposta por Briggs et al. (2012) e foi realizado com amostras de sangue total coletadas em tubo a vácuo contendo anticoagulante EDTAK2 com contagens baixa ($4,43 \times 10^6/\mu\text{L}$) e normal ($6,32 \times 10^6/\mu\text{L}$) para eritrócitos (RBC) e alta ($33,70 \times 10^3/\mu\text{L}$) para leucócitos (WBC) e plaquetas (PLT: $762 \times 10^3/\mu\text{L}$) proveniente de exames realizados na rotina do laboratório após a conclusão dos resultados. As amostras foram diluídas em solução salina 0,85% em 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128, analisadas

em duplicatas e a média desses resultados foram traçadas contra o valor esperado calculado para cada diluição.

Para o ensaio de *carryover* utilizou-se de sangue controle nível *low* e *high* do Minotrol Tri-Level (Horiba Medical 2012). Foram realizados dois ensaios de arrastamento um proposto por Broughton et al. (1974), onde uma amostra com alta contagem era analisada três vezes seguidas no contador automático (H1, H2 e H3), subseqüentemente, era realizada uma análise triplicada de uma amostra com contagem baixa (L1, L2 e L3), conforme a fórmula, foi determinado o *carryover* para cada parâmetro:

$$\text{Carryover}(\%) = \frac{(L1 - L3)}{(H3 - L3)} \times 100 \quad (1)$$

Na fórmula os itens L1 e L3 foram os resultados da primeira e terceira mensuração da amostra de baixa concentração, e a H3 será a terceira mensuração da amostra alta.

Já no ensaio de *carryover* proposto por Mendes & Romano (2010) foram realizadas análises seqüenciais de 11 amostras com concentração conhecida como baixa (Nível *Low* do Minotrol) e 10 amostras com valor conhecido como alto (Nível *High* do Minotrol), na seguinte ordem: 1 = Três vezes amostra *low*; 2 = duas vezes amostra alta; 3 = uma amostra baixa; 4 = duas amostras altas; 5 = quatro amostras baixas; 6 = duas amostras altas; 7 = uma amostra baixa; 8 = duas amostras altas; 9 = uma amostra baixa; 10 = duas amostras altas; 11 = uma amostra baixa. Depois das leituras calcularam-se as médias e desvio padrão das concentrações de todas as amostras baixas analisadas após uma amostra baixa (B-B) e as concentrações de amostras baixas após amostra alta (A-B), sendo que a diferença entre as médias de B-B e A-B foi o índice de *carryover* para o parâmetro analisado.

Tanto para o ensaio de linearidade como *carryover*, os dados foram analisados através do *software* R (R Core Team 2016) em relação à estatística descritiva, normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk* e regressão linear e gráfica para ensaio de linearidade.

RESULTADOS

Todos os parâmetros analisados tanto no ensaio de linearidade como de *carryover* tiveram uma distribuição normal no teste de *Shapiro-Wilk*, sendo todos expressos em média e desvio padrão.

Os resultados de linearidade analisados em relação aos parâmetros de leucócitos, plaquetas e hemácias podem ser visualizados na Figura 1. Em todos os parâmetros analisados houve uma regressão linear positiva com coeficiente de correlação (r^2) entre 0,992 a 0,999.

Os resultados dos ensaios de *carryover* conforme metodologia de Broughton et al. (1974) podem ser visualizados no Quadro 1. Os resultados relacionados com a metodologia de Mendes & Romano (2010) para determinação do *carryover* para leucócitos e plaquetas estão expostos no Quadro 2 e para parâmetros eritrocitários analisados pelo contador hematológico podem ser visualizados no Quadro 3.

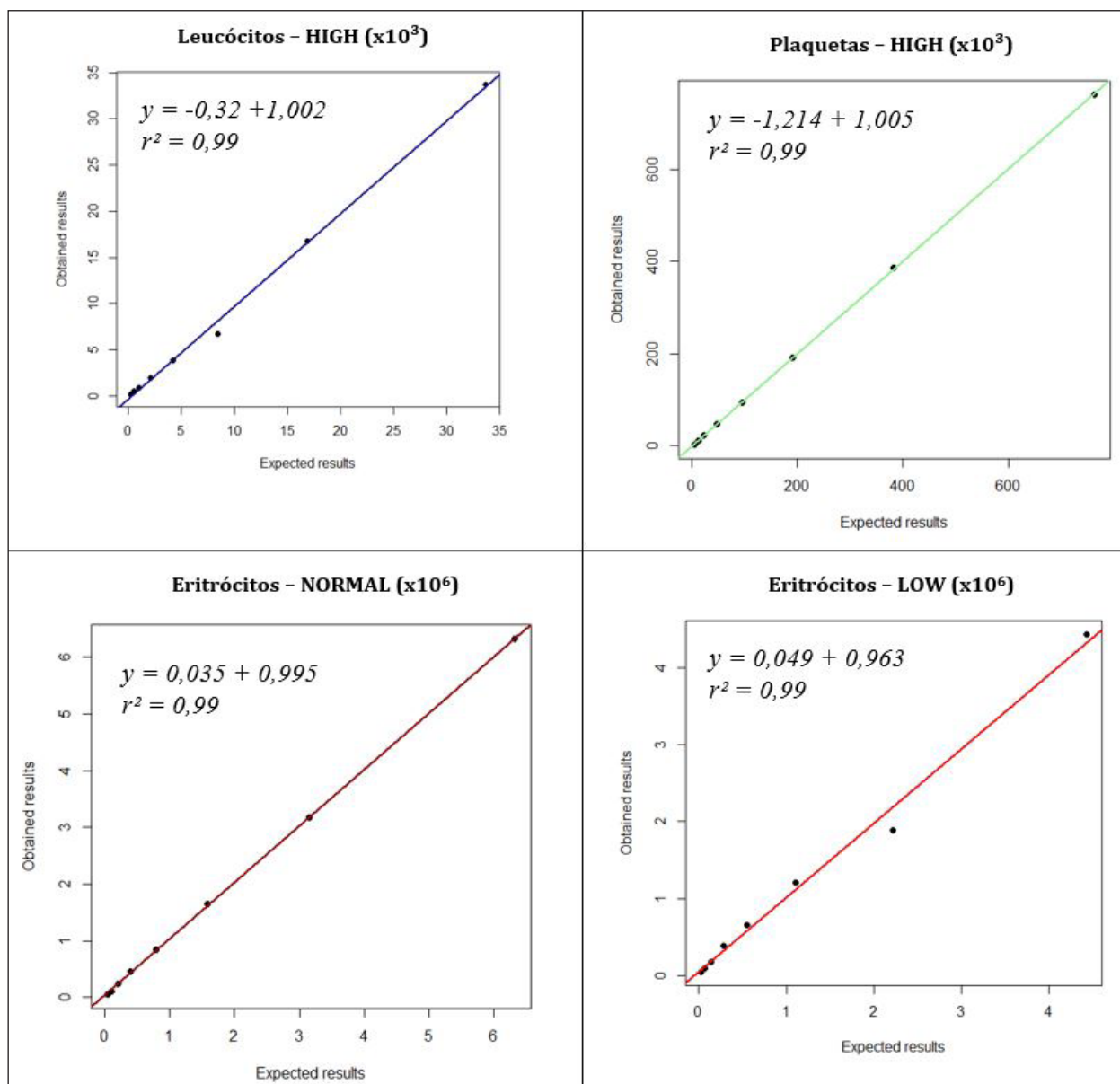


Fig.1. Linearidade para leucócitos, plaquetas e eritrócitos para ABX Micros ESX 60 (Horiba Medical®).

Quadro 1. Índices de *carryover* para parâmetros analisados pelo ABX Micros ESX 60 (Horiba Medical®) conforme metodologia proposta por Broughton et al. (1974)

Itens	<i>Carryover</i> (%)
WBC	0,55
RBC	-2,55
HGB	-0,78
HCT	-2,07
VCM	-5,55
CHCM	16,67
HCM	-48
RDW	20
PLT	-0,19
VPM	71,43

Quadro 2. Índices de *carryover* para parâmetros de leucócitos (WBC), plaquetas (PLT) e volume plaquetário médio (VPM) do analisador ABX Micros ESX 60 (Horiba Medical®) conforme metodologia de Mendes & Romano (2010), sendo: B (Média (Ma) e desvio padrão (DP) das amostras baixas realizadas após uma amostra baixa) e A (média (Ma) e desvio padrão (DP) das amostras baixas realizadas após uma amostra alta)

	WBC		PLT		VPM	
	B	A	B	A	B	A
Ma	1,92	99	99	87,2	7,5	7,18
DP	0,44	39,74	39,77	14,58	0,17	0,28
<i>Carryover</i> (Ma A) - (Ma B)	0,04		-11,8		-0,32	
Erro permitido 3x (DP B)	1,32		119,32		0,51	

Quadro 3. Índices de *carryover* para parâmetros de eritrocitários do analisador ABX Micros ESX 60 (Horiba Medical®) conforme metodologia de Mendes & Romano (2010), sendo: B (Média (Ma) e desvio padrão (DP) das amostras baixas realizadas após uma amostra baixa) e A (média (Ma) e desvio padrão (DP) das amostras baixas realizadas após uma amostra alta), *Carry* (diferença entre Ma A - Ma B) e EP (erro permitido 3x DP B)

	RBC		HGB		HCT		VCM		HCM		CHCM		RDW	
	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A
Ma	2,67	2,62	6,2	6,16	19,14	18,74	71,6	71,6	23,36	23,66	32,62	33,04	13,5	13,44
DP	0,38	0,24	0,18	0,17	2,81	1,76	0,54	0,54	2,48	1,43	3,54	2,06	0,23	0,15
<i>Carry</i>	-0,05		-0,04		-0,4		0		0,3		0,42		-0,06	
EP	1,14		0,54		8,43		1,62		7,44		10,62		0,69	

DISCUSSÃO

Os coeficiente de correlação para linearidade do ABX Micros ESX para os parâmetros de leucócitos, plaquetas e eritrócitos tiveram coeficientes próximos a 1, conforme preconizado pelo fabricante do equipamento (Horiba Medical 2012) bem como encontrado em outros aparelho estudados como Cell-Dyn 3500 (Costa et al. 1996), Xe-2100® (Tsuda et al. 1999, Walters & Garrity 2000; Nakul-Aquarone et al. 2003), Sysmex® XE-2100D (Maciel et al. 2014).

A linearidade são os limites de análise de um determinado equipamento laboratorial proporcionais à concentração do analito (Mendes & Romano 2010), e segundo Broughton et al. (1974), quando um aparelho possui um regressão de linearidade baixa pode introduzir imprecisões na determinação analítica, uma vez que, a capacidade de extrapolar resultados em relação ao ponto de calibração está com tendência negativa, condicionada a produzir erros constantes e amplificados, ou seja, a passagem linear através dos pontos de calibração estão fora dos limites da faixa aceitável e distante de uma constante excelente que seria próxima ou igual ($r^2=1,000$).

O *carryover* é o índice que analisa o efeito do erro processo de lavagem dos canais do aparelho que deixa resíduos de um teste (Briggs et al. 2012) para outro sendo um erro aceitável de até 5% de acordo com fórmula postulada por (Broughton et al. 1974). No presente estudo, todos os parâmetros analisados tiveram resultados excelentes, com exceção da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média - CHCM (16,67%) e Volume Plaquetário Médio - VPM (71,43%) estiveram acima do nível aceitável pela referência.

Na metodologia proposta por Mendes & Romano (2010) não houve ocorrência de *carryover* em nenhum dos parâmetros analisado do equipamento testado, ao contrário da metodologia proposta por Broughton et al. (1974) que determina um coeficiente de aceitação padronizado (até 5%), Mendes & Romano (2010) propõe um coeficiente que considere as características do equipamento, afirmam que haverá influência do *carryover* quando a diferença das médias de amostras alta e baixas for maior a três desvios-padrões das média baixas, porém o laboratório pode determinar o nível de aceitação acatando o desvio proposto ou diminuindo-o.

Os valores altos de *carryover* para CHCM e VPM na metodologia de Broughton et al. (1974) está relacionado ao fato de maior variação das leitura alta em relação aos valores baixos, que produzem resultados discrepantes quando está no divisor da fórmula, situação que não acontece na metodologia de Mendes & Romano (2010) que utiliza uma diferença entre médias e desvio-padrão como fator de decisão para aceitação dos resultados.

Os valores encontrados em ambas as metodologias desenvolvidas contrastam com os valores encontrados por Maciel et al. (2014) para equipamento Sysmex XE-2100D para os parâmetros de leucócitos (0,08%), eritrócitos (0,36%), hemoglobina (0,46%), hematócrito (0,4%) e plaquetas (0,04%), de Costa et al. (1996) encontrou valores de hemácias (0,5%), hemoglobina (0,2%), leucócitos (0,6%) e plaquetas (0,8%) para o aparelho Cell-Dyn 3500, além de Tsuda et al. (1999), Walters & Garrity (2000) e Nakul-Aquarone et al. (2003) para equipamento Sysmex XE-2100 e como Briggs et al. (2012) em estudo referente ao aparelho Sysmex XN Modular. Não foram encontrados estudos que determinaram o índice de *carryover* para os parâmetros de VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM, RDW (índice de anisocitose) e VPM, para comparação com o presente estudo.

CONCLUSÕES

Com o presente trabalho pode-se determinar em relação à linearidade nos parâmetros de leucócitos, eritrócitos e plaquetas em relação aos resultados esperados das diluições propostas que o aparelho obteve um bom coeficiente de linearidade 0,992 a 0,999.

Em relação aos *carryover* da ABX MICROs ESX 60, houve excelentes resultados; no entanto, houve valores não conformes nos parâmetros de CHCM e VPM em uma das metodologias realizadas, o que pode ser justificado pela limitação da fórmula que não considera as características do equipamento.

Comissão de ética animal.- O presente trabalho não envolve experimentação animal.

REFERÊNCIAS

- Briggs C., Longair I., Kumar P., Singh D. & Machin S.J. 2012. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. J. Clin. Pathol. 65(11):1024-1030. PMID:22851510. <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2012-200930>.
- Broughton P.M.G., Gowenlock A.H., McCormack J.J. & Neill D.W. 1974. A revised scheme for the evaluation of automatic instruments for use in clinical chemistry. Ann. Clin. Biochem. 11(6):207-218. PMID:4460843. <http://dx.doi.org/10.1177/000456327401100164>.
- Costa M.J.A., Reis A.B., Silva C., Fernandes I., Lopes S. & Júnior E. 1996. Avaliação do Cell-Dyn 3500. Acta Med. Port. 9(10-12):309-318. PMID:9254527.
- Horiba Medical 2012. ABX MICROs ESX 60: manual guide. Horiba Medical, Montpellier, France.

- Maciel T.E.S., Comar S.R. & Beltrame M.P. 2014. Performance evaluation of the Sysmex® XE-2100D automated hematology analyzer. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 50(1):26-35. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442014000100004>.
- Mendes M.E. & Romano P. 2010. Validação de sistema analítico, p.39-61. In: Oliveira CA, Mendes ME (Eds), *Gestão da Fase Analítica Laboratório: como assegurar a qualidade na prática*. ControlLab, Rio de Janeiro.
- Nakul-Aquaronne D., Sudaka-Sammarcelli I., Ferrero-Vacher C., Starck B. & Bayle J. 2003. Evaluation of the Sysmex XE-2100® Hematology Analyzer in hospital use. *J. Clin. Lab. Anal.* 17(4):113-123. PMID:12784259. <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.10083>.
- R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em <<https://www.R-project.org/>> Acesso em 16 fev. 2018.
- Tsuda I., Hino M., Takubo T., Katagami T., Kubota H., Kawai S. & Tatsumi N. 1999. First basic performance evaluation of the XE-2100 haematology analyser. *J. Autom. Methods Manag. Chem.* 21(4):127-133. PMID:18924849. <http://dx.doi.org/10.1155/S1463924699000152>.
- Walters J. & Garrity P. 2000. Performance evaluation of the Sysmex XE-2100 Hematology Analyzer. *Lab. Hematol.* 6:83-92.