



**-Instituto Politécnico de Lisboa-
-Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa-**

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

2º ano

**Quantificação celular no Líquido
Cefalorraquidiano: estudo comparativo entre
método manual e Alinity hq**

Mestrando: Frederico Miguel Serra Bragança

Orientadora: Prof^a Doutora Edna Ribeiro – Escola Superior de
Tecnologia da Saúde de Lisboa

Orientador: Dr. Rui Barreira – Instituto Português de Oncologia de
Lisboa Francisco Gentil

Julho de 2023

**-Instituto Politécnico de Lisboa-
-Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa-**

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

2º ano

**Quantificação celular no Líquido
Cefalorraquidiano: estudo comparativo entre
método manual e Alinity hq**

Mestrando: Frederico Miguel Serra Bragança

Orientadora: Prof^a Doutora Edna Ribeiro – Escola Superior de
Tecnologia da Saúde de Lisboa

Orientador: Dr. Rui Barreira – Instituto Português de Oncologia de
Lisboa Francisco Gentil

Júri: Prof^a Doutora Carina Ladeira – Escola Superior de Tecnologia
da Saúde de Lisboa

Júri: Prof. Doutor José Cortez – Instituto Português de Oncologia de
Lisboa Francisco Gentil

(esta versão inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Julho de 2023

“O aumento do conhecimento é como uma esfera dilatando-se no espaço: quanto maior a nossa compreensão, maior o nosso contacto com o desconhecido” – Blaise Pascal

Agradecimentos

Com esta tese pretendo concluir mais uma etapa no meu desenvolvimento pessoal, profissional e académico. Tal só foi possível devido à presença constante de pessoas que me apoiaram e orientaram nas diversas etapas do meu percurso. Gostava de prestar os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para este meu marco.

Começo por agradecer aos meus orientadores, a Professora Doutora Edna Ribeiro e ao Dr. Rui Barreira, sem esquecer o meu irmão o Professor Doutor Filipe Bragança, que também foi “orientador não oficial”. À Professora Edna, agradeço a disponibilidade, os ensinamentos e conselhos proporcionados durante a sua ótima orientação. Ao Dr. Rui agradeço o apoio, confiança, amizade e a dedicada orientação não só neste trabalho, mas em todos os trabalhos a que me proponho. Ao meu irmão Filipe, agradeço o precioso tempo despendido e a capacidade de me mostrar diferentes caminhos no campo da pesquisa.

A todos os colegas do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa, agradeço a amizade, a motivação e o espírito voluntarioso, sem o qual teria sido impossível recolher e processar as amostras para o estudo em tão curto espaço de tempo.

A toda a minha família pelo carinho, incentivo e apoio incondicional nesta e noutras etapas. Aos meus pais Francisco e Isabel pelo investimento depositado e pelos conselhos que me permitiram chegar até aqui. Um agradecimento especial à minha mulher Ana e aos meus filhos Miguel e Sofia, por terem prescindido de inúmeras horas passadas comigo para eu poder executar este projeto.

Obrigado

Resumo

A quantificação celular do Líquido Cefalorraquidiano (LCR) é uma metodologia com grande relevância nos serviços de Patologia Clínica, em especial na área de hematologia, nomeadamente em caso de doenças neuro-inflamatórias, hemorragias subaracnoideias e doenças hemato-oncológicas. Apesar dos inúmeros avanços tecnológicos dos contadores celulares automáticos, no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil (IPOLFG) a contagem de células no LCR é atualmente realizada com hemocítmetro (câmara de *Nageotte*) e posteriormente, caso o número de células ultrapasse o valor de referência, procede-se à contagem diferencial de células utilizando técnicas de cito-centrifugação e coloração por May-Grünwald-Giemsa. Trata-se de um procedimento moroso e dependente da presença constante de profissionais altamente qualificados.

Neste trabalho foi avaliada a possibilidade de automatizar a contagem de células no LCR, através de um estudo descritivo-comparativo, com o objetivo de validar e implementar o método. Assim comparou-se o método manual de contagem de células do LCR (método de referência) com o método automático do Alinity hq. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente de modo a determinar a concordância entre os métodos e ainda a capacidade de o Alinity hq discriminar as amostras patológicas (≥ 5 leucócitos/ μL) das normais (<5 leucócitos/ μL).

Utilizando o método de Bland-Altman, obteve-se para os leucócitos uma diferença média entre o método manual e o Alinity hq de $-2,0$ leucócitos/ μL e uma concordância (com intervalo de confiança de 95%) de $[-30,18$ a $26,18$ leucócitos/ μL]. Para os eritrócitos, a diferença média obtida foi de $-106,36$ eritrócitos/ μL e a concordância (com intervalo de confiança de 95%) de $[-934,64$ a $721,96$ eritrócitos/ μL].

Apesar dos resultados obtidos abrangerem o conjunto de valores com interesse clínico, seria desejável obter-se mais resultados patológicos e assim aprofundar o estudo do desempenho do Alinity hq.

A baixa concentração celular do LCR e os valores de aceitação clínica definidos para o método, não apoiam a implementação do Alinity hq na prática clínica.

Palavras-chave: líquido cefalorraquidiano; hemocítmetro; automatização; Alinity hq; contagem diferencial de células;

Abstract

Cell quantification in the Cerebrospinal fluid (CSF) is a method with great relevance in clinical pathology laboratories, especially in haematology, namely when neuro-inflammatory, subarachnoid bleeding and neoplastic pathologies are suspected. Despite the numerous technical improvements of the automatic haematology analysers, in the Clinical Pathology Department at the Portuguese Institute of Oncology in Lisbon, the CSF cell count is currently performed with a hemocytometer (Nageotte chamber). Subsequently, if the cell count is higher than the reference value, the differential count is accomplished through May-Grünwald-Giemsa staining. This is a time-consuming process that depends on the availability of skilled professionals.

To access the possibility to automate the CSF cell count, a comparative-descriptive study was conducted, with the aim to validate and implement the method. So therefore, a comparison between the manual CSF cell count method (reference method) and the Alinity hq automatic analyser was performed. The collected data was statistically processed to access the limits of agreement between both methods and the ability of Alinity hq to discriminate pathological samples (≥ 5 leucocytes/ μL) from normal samples (< 5 leucocytes/ μL).

Using Bland-Altman method, we obtained for leucocytes a mean difference between manual count and automatic count of $-2,0$ leucocytes/ μL and an agreement (with a confidence interval of 95%) of $[-30,18$ to $26,18$ leucocytes/ μL]. For the erythrocytes, we obtained a mean difference of $-106,36$ erythrocytes/ μL and an agreement (with a confidence interval of 95%) of $[-934,64$ to $721,96$ erythrocytes/ μL]. Although the obtained results cover the range of values with clinical interest, we hoped to get more pathologic results and therefore improve the study of Alinity hq's performance.

The CSF low cellular content and the clinical accepted reference values imposed for the method are a hinder to implement the Alinity hq in the clinical practice.

Keywords: cerebrospinal fluid; haemocytometer; automation; Alinity hq; cell differential count;

Índice geral

1. Introdução.....	1
2. Contextualização teórica.....	3
2.1 Líquido Cefalorraquidiano.....	3
2.2 Exame macroscópico do LCR.....	5
2.3 Avaliação laboratorial do conteúdo celular do LCR.....	6
2.3.1. Contagem manual de células no microscópio óptico.....	9
2.3.2. Contagem de células automática.....	10
2.3.2.1 Contador de células automático Alinity hq.....	10
2.3.3. Exame cito-morfológico do LCR.....	13
2.3.3.1. Cito-centrifugação.....	14
2.3.3.2. Coloração de May-Grünwald-Giemsa.....	15
3. Objetivos e hipóteses do estudo.....	17
3.1. Questão de investigação.....	17
3.2. Objetivo geral.....	17
3.3. Objetivos específicos.....	17
3.4. Hipóteses.....	18
4. Materiais e métodos.....	19
4.1. Tipo de estudo.....	19
4.2. Local do estudo.....	19
4.3. Amostras.....	19
4.4. Amostragem.....	20
4.5. Colheita de dados.....	20
4.6. Procedimento laboratorial.....	20
4.6.1. Contagem de células.....	20

4.6.1.1. Contagem manual de células em câmara de <i>Nageotte</i>	20
4.6.1.2. Contagem de células no contador de células automático Alinity hq.....	21
4.6.2. Exame cito-morfológico.....	22
4.7. Considerações éticas e legais.....	22
4.8. Financiamento.....	22
5. Resultados.....	23
5.1. Análise estatística dos resultados.....	26
5.1.1. Análise estatística dos resultados – leucócitos.....	27
5.1.2. Análise estatística dos resultados – eritrócitos.....	31
6. Discussão e conclusões.....	34
6.1. Discussão.....	34
6.2. Conclusões.....	38
7. Limitações e perspetivas futuras.....	39
8. Bibliografia.....	40
9. Anexos.....	43
Anexo I – Tabela de resultados.....	43
Anexo II – Resultados estatísticos dos leucócitos.....	48
Anexo III – Resultados estatísticos dos eritrócitos.....	49
Anexo IV – Código em R da estatística.....	50
Anexo V – Autorização do conselho de ética do IPOLFG.....	56
Anexo VI – Autorização do conselho de ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa.....	57
Anexo VII - Cronograma de atividades.....	58

Índice de tabelas

Tabela 2.1. – Valores de referência do LCR utilizados no IPOLFG.....	7
Tabela 2.2. – Detetores do Alinity hq e respetiva função.....	12
Tabela 2.3. – Células predominantemente encontradas no LCR e respetivas possíveis importâncias clínicas.....	14

Índice de figuras

Figura 2.1. – Posicionamento do doente e localização da punção lombar.....	5
Figura 2.2. – Aspeto macroscópico do LCR.....	6
Figura 2.3. – Câmara de <i>Nageotte</i> utilizada no SPC do IPOLFG.....	10
Figura 2.4. – Contador celular automático Alinity hq.....	10
Figura 2.5. – Tecnologia MAPSS™.....	11
Figura 2.6. – Citogramas obtidos no Alinity hq a partir de um sangue normal.....	13
Figura 2.7. – Sistema de cito-centrifugação do IPOLFG.....	15
Figura 2.8. – Morfologia de células de leucemia linfoblástica aguda de um LCR, obtidas após cito-centrifugação e coloração por May Grünwald – Giemsa.....	16
Figura 5.1. – Citogramas obtidos no Alinity hq a partir de amostra de LCR.....	26

Índice de gráficos

Gráfico 5.1. – Caracterização das amostras quanto ao seu aspeto macroscópico.....	23
Gráfico 5.2. – Contagens de leucócitos $<5/\mu\text{L}$ e $\geq 5/\mu\text{L}$	24
Gráfico 5.3. – Contagens de eritrócitos $<1000/\mu\text{L}$ e $\geq 1000/\mu\text{L}$	25
Gráfico 5.4. – Regressão linear dos resultados dos leucócitos.....	28
Gráfico 5.5. – Gráfico de dispersão da análise da concordância dos leucócitos, utilizando o método de Bland-Altman.....	29
Gráfico 5.6. - Distribuição de amostras de acordo com o valor crítico dos leucócitos (28,179 leucócitos/ μL).....	30
Gráfico 5.7. – Curva ROC dos leucócitos.....	31
Gráfico 5.8. – Regressão linear dos resultados dos eritrócitos.....	32
Gráfico 5.9. – Gráfico de dispersão da análise da concordância dos eritrócitos, utilizando o método de Bland-Altman.....	33

Abreviaturas

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

SPC – Serviço de Patologia Clínica

IPOLFG – Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda

MGG - May-Grünwald-Giemsa

ROC - *Receiving Operation Characteristic*

AUC – *Area Under the Curve*

\bar{d} – média das diferenças

AMR – *Analytical Measurement Range*

RCF - *Relative Centrifugal Force*

1. Introdução

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é atualmente um foco de interesse na investigação, particularmente nas áreas do diagnóstico com recurso a técnicas moleculares. Os avanços conseguidos trouxeram novas perspetivas em relação ao diagnóstico de patologias já conhecidas, tratamentos e ainda novos campos de investigação¹. No entanto, não tem havido grandes progressos no que toca à sua quantificação celular. Independentemente dos inúmeros avanços tecnológicos dos laboratórios de patologia clínica trazidos pela automatização, principalmente no que respeita à uniformização de procedimentos, rapidez de resultados, segurança dos profissionais e redução de erros², a contagem de células no LCR continua a ser um procedimento manual. No Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil (IPOLFG), a contagem total de células no LCR é feita utilizando câmara de *Nageotte* e posteriormente, caso o número de células ultrapasse o valor de referência, procede-se à avaliação por exame direto corado com técnica de cito-centrifugação e posterior coloração por May-Grünwald-Giemsa (MGG)¹.

A contagem de células no LCR é um procedimento fundamental num serviço de patologia clínica, particularmente na área de hematologia, quando existe suspeita de doenças neuro-inflamatórias, hemorragias subaracnoideias e doenças hemato-oncológicas³. Situações emergentes de encefalite ou meningites obrigam a que não só o exame, mas também profissionais altamente qualificados, estejam sempre disponíveis⁴. Até hoje a metodologia de referência para o procedimento é a contagem manual em câmara⁵, seguida de contagem diferencial por microscopia⁴. A implementação de contadores automáticos de células para este procedimento tem apresentado vários desafios, particularmente técnicos, uma vez que o desempenho analítico dos contadores automáticos está dependente não só dos seus fundamentos analíticos, como também do *software* utilizado⁴. Os equipamentos disponíveis não foram concebidos para a contagem de amostras com baixa concentração celular, assim como para a identificação de células anormais que podem estar presentes no LCR⁴. Mesmo existindo protocolos específicos para contagem total de células nucleadas em fluidos biológicos, a baixa sensibilidade analítica dos mesmos traduz-se numa limitação da tecnologia. Esta limitação tecnológica tem implicações na validade prática dos equipamentos, caso os contadores celulares não sejam capazes de diferenciar valores normais de patológicos, então a sua utilização é questionável^{4,6}.

Este projeto de investigação pretende avaliar e comprovar a validade do método automático para quantificar células no LCR, comparativamente com o método manual, utilizando o contador celular Alinity hq e assim permitir a implementação do método no SPC do IPOLFG. São espectáveis ganhos na rapidez de obtenção de resultados e resposta clínica, o aumento da disponibilidade de profissionais para outras tarefas, a diminuição da variação intra e inter-operador inerente à técnica manual e ainda a aquisição de dados do analisador que orientem o exame morfológico.

2. Contextualização teórica

2.1. Líquido Cefalorraquidiano

O LCR é um líquido límpido e incolor, que reveste o cérebro e a espinhal medula e desempenha funções essenciais à manutenção da homeostasia do cérebro⁷. Historicamente, o LCR era já conhecido pelos antigos egípcios e gregos, como o líquido que “preenche o cérebro”⁸. Na verdade, durante séculos, o LCR fascinou filósofos, anatomistas, fisiologistas, bioquímicos e neurologistas, que obtiveram grandes progressos no entendimento do LCR⁹. Grandes anatomistas dos séculos XV e XVI, entre os quais da Vinci e Vesalius, descreveram a estrutura do sistema ventricular do cérebro, sem, no entanto, concluírem sobre os seus mecanismos fisiológicos. Só mais tarde, em 1914 e em 1918, os neurocirurgiões Harvey Cushing e Walter Dandy, respetivamente, descreveram a produção de LCR no adulto⁸. Apesar de hoje se reconhecerem ao LCR mais funções do que somente de ambiente de suporte e resistência aos choques do cérebro, durante muitos anos essas eram a únicas funções que lhe eram atribuídas⁸.

Anatomicamente, o cérebro e a espinhal medula estão cobertos por 3 membranas meníngeas: dura-mater a mais superficial, a membrana aracnóideia no meio e a pia-mater no interior e que se liga estritamente à superfície do encéfalo e à espinhal medula. O LCR está presente no espaço subaracnoide, entre a membrana aracnóideia e a pia-mater, circulando pelos hemisférios cerebrais até à espinhal medula. O LCR é maioritariamente formado nos plexos coroideus, através de mecanismos de ultrafiltração e secreção ativa³. Existem granulações de tecido aracnoideu, denominadas granulações de Pacchioni, nas quais o LCR passa para os seios durais. Os seios durais estão cheios de sangue e no seu interior o LCR reintegra a corrente sanguínea. O epitélio do plexo coroideu e o endotélio dos capilares em contato com o LCR formam a estrutura anatómica denominada barreira hematoencefálica^{3,10}. Adultos saudáveis possuem um volume de LCR que varia aproximadamente entre 125 e 150mL, do qual cerca de 20% encontra-se nos ventrículos¹¹.

O LCR é essencialmente composto pelos iões Na^+ , Cl^- e HCO_3^- , com menores quantidades de K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} ; algumas vitaminas (e.g. folatos, aminoácidos, tiamina e fosfato piridoxal (forma ativa da vitamina B6)); péptidos e proteínas ativamente transferidas para o LCR (e.g. leptina) ou sintetizados nos plexos coroideus e depois transferidos para o LCR (e.g. transtiretina (pré-albumina), fator de crescimento semelhante à insulina e fator neurotrófico derivado do cérebro). Só uma pequena parte

das proteínas plasmáticas são transferidas para o LCR, tendo este muito baixa quantidade das mesmas e sendo a maioria albumina⁹.

O LCR também contém células, essencialmente uma pequena seleção de células de linhagem hematopoiética, como linfócitos ou monócitos que passaram do sangue e atravessaram a barreira hematoencefálica do plexo coroideu. Esta permite uma entrada mínima de células do sistema imunitário e ainda de algumas macromoléculas, como anticorpos. Deste modo, as células do sistema imunitário que estão presentes no LCR são em número reduzido, predominantemente linfócitos CD4⁺ de memória, cuja função é fazer vigilância imunitária do Sistema Nervoso Central (SNC). Parte destas células regressam posteriormente a órgãos linfoides secundários⁷.

Há autores que consideram que as interações entre os plexos coroideus e o LCR constituem a 3ª circulação e que esta realiza muitas funções comparáveis aos rins, tais como nutrição e manutenção da estabilidade do meio interno⁹. Na verdade, é assumido que o LCR tem múltiplas outras funções implicadas na saúde cerebral, das quais se destacam: (1) equilíbrio e proteção contra traumatismos cranioencefálicos; (2) transferência de micronutrientes do sangue para o cérebro e posteriormente para o espaço extracelular do cérebro (e.g. vitaminas e minerais); (3) transporte e estabilização de moléculas de sinalização provenientes do sangue (e.g. hormonas) ou sintetizadas nos plexos coroideus (e.g. transtirretina); (4) remoção de moléculas desnecessárias para o cérebro (e.g. riboflavina, nucleosídeos); (5) transferência bidirecional de imunorreguladores (e.g. fator neurotrófico derivado do cérebro), estimulando o cérebro e ajudando-o a adaptar-se a situações de stress⁹; (6) contribui para a vigilância imunitária do SNC (e.g. as células de linhagem hematopoiética que patrulham o espaço subaracnoide à procura de agentes patogénicos)⁷.

O método mais comum para obter LCR, é um procedimento denominado punção lombar³. Antes da colheita, deve ser feita a história clínica do paciente e um exame físico ao mesmo. Para se obter a melhor informação possível do LCR, a amostra tem de ser corretamente colhida e processada. Os clínicos devem ter conhecimento da quantidade de amostra necessária para a realização dos testes requeridos e fornecer informação clínica apropriada ao laboratório³. Idealmente, durante a colheita, as amostras de LCR devem ser divididas em 3 amostras identificadas sequencialmente: a primeira para estudos bioquímicos e imunológicos, a segunda para exame microbiológico e a terceira para contagem total e eventual diferenciação celular³. A punção lombar é um procedimento invasivo, que consiste na introdução de uma agulha abaixo do final da espinhal medula, atravessando a dura-mater, de forma a aceder ao espaço subaracnoide. O procedimento é feito com o doente em posição de decúbito lateral ou

sentado, de forma a aceder ao espaço entre as vertebrae L3/L4 ou L4/L5, ambos adequados ao procedimento¹¹.

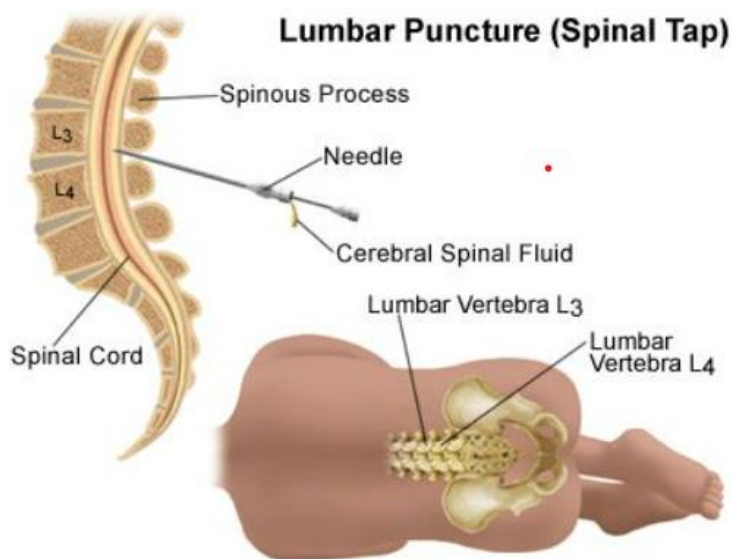


Figura 2.1. - Posicionamento do doente e localização da punção lombar. Adaptado de www.hopkinsmedicine.org.

A realização de punção lombar está indicada em 4 categorias de doença: (1) infeção meníngea (e.g. infeções bacterianas, virais e fúngicas); (2) hemorragia subaracnoide (e.g. resultante da rutura de um aneurisma); (3) doença maligna envolvendo o SNC (e.g. leucemias agudas e linfomas com envolvimento da espinhal medula, tumores do cérebro com envolvimento do LCR como meduloblastoma); (4) doenças desmielinizantes (e.g. esclerose múltipla, polineuropatia desmielinizante inflamatória)³. Como qualquer comportamento invasivo, se o risco do procedimento for superior ao benefício, o mesmo está contraindicado¹¹. Os principais riscos para proceder à punção lombar são: infeção no local da punção, diátese hemorrágica, anomalias congénitas e risco de herniação do SNC¹¹. Também podem surgir algumas complicações após o procedimento: desconforto local e dor radicular, hematoma no local da punção, meningite, cefaleias e fuga persistente de LCR (após a punção)¹¹.

2.2. Exame macroscópico do LCR

O aspeto normal do LCR é incolor e límpido³. Estando a decorrer algum processo patológico, o líquido pode assumir diferentes aspetos:

- Turvo - está geralmente relacionado com pleocitose (associada a uma contagem de leucócitos superior a 200/ μ L), presença de microrganismos ou de eritrócitos

(contagem de eritrócitos superior a 400/ μ L) ou ainda à presença de valores de proteínas aumentados³;

- Hemático – está geralmente relacionado com a presença de sangue e como tal pode resultar de hemorragia subaracnoide, hemorragia intracerebral, enfarte ou colheita traumática³;
- Xantocrômico – está geralmente relacionado com hemorragia subaracnoide, em que a lise dos eritrócitos ocorre 1 a 2 horas após o evento, originando uma coloração rosada, alaranjada ou amarelada³. Esta coloração é resultante da degradação da hemoglobina em oxihemoglobina, metahemoglobina e bilirrubina¹². Quando ocorre hemorragia subaracnoide, 12 horas após o evento a xantocromia está presente em mais de 90% dos pacientes e pode permanecer por duas a quatro semanas¹².

É ainda importante referir que o LCR normal não coagula³. No entanto em situações de grande aumento de proteínas no LCR, amostras hemáticas resultantes de colheitas traumáticas (devido à presença de fibrinogénio) ou situações de infeções meníngeas, a amostra pode coagular³.

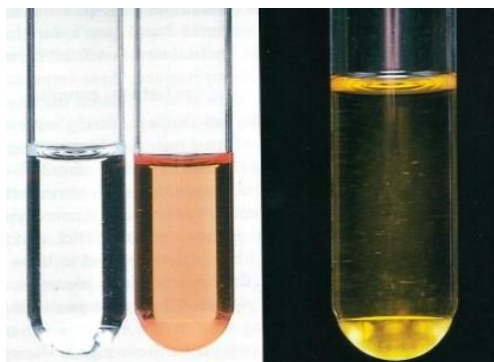


Figura 2.2. -. Aspeto macroscópico do LCR. Da esquerda para a direita, exemplos de LCR normal, LCR hemático após hemorragia subaracnoide recente e LCR após hemorragia subaracnoide há 36 horas. Imagem adaptada de Kjeldsber C, et al, 1993.

2.3. Avaliação laboratorial do conteúdo celular do LCR

A contagem e diferenciação de células são fundamentais para investigação de patologias relacionadas com o SNC. A contagem total de células geralmente obtém mais atenção dos clínicos, uma vez que está pronta mais rapidamente que a avaliação citológica. Por outro lado, quando as contagens estão elevadas, perceber quais as células que estão maioritariamente presentes também traz informação fundamental ao diagnóstico⁷.

Apesar de nos adultos os valores normais de leucócitos serem consensuais, o mesmo não acontece nas crianças³. Na tabela 2.1. (valores de referência do LCR utilizados no IPOLFG) estão indicados os valores normais utilizados no SPC.

Idade	Leucócitos /μL
> 18 anos	0 – 5
>1 ano	0 – 10
< 1 ano	0 – 30

Tabela 2.1. - Valores de referência do LCR utilizados no IPOLFG. Adaptado de Kjeldsber C, et al 1993.

As elevações do número de leucócitos acima dos valores normais no LCR são denominadas pleocitoses e são características de respostas inflamatórias a patologias diversas, tais como meningite, patologias autoimunes do SNC ou disseminação leptomeníngea⁷. As pleocitoses podem ser de natureza não-inflamatória, surgindo em situações como: acidente vascular cerebral, ataque epilético, traumatismo cranioencefálico, intervenção neurocirúrgica ou hemorragia subaracnoideia⁷. Nestas situações diz-se que a pleocitose é reativa e geralmente apresenta-se com contagens ligeira ou moderadamente aumentadas⁷. Pleocitoses com grandes aumentos celulares estão geralmente associados a meningites⁷. Uma vez identificada a pleocitose, o valor informativo do exame morfológico das células do LCR é fundamental⁷.

A presença de eritrócitos no LCR pode dever-se a duas situações: hemorragia subaracnoideia ou punção traumática. A distinção entre ambas é importante, uma vez que a hemorragia subaracnoideia está associada a mortalidade e morbidade significativas. Apesar de existirem métodos mais precisos, a inspeção visual do LCR continua a ser prática mais frequente para diagnosticar hemorragia subaracnoideia¹³. Apesar da verdadeira prevalência de punções traumáticas ser desconhecida, alguns autores sugerem valores que variam entre os 10 e os 20%¹⁴. Uma prática que poderia ajudar a esclarecer se a punção é traumática, seria avaliar o conteúdo celular de 3 tubos de LCR colhidos consecutivamente¹². Se o número de eritrócitos se mantiver relativamente constante, assume-se que os eritrócitos têm origem numa hemorragia subaracnoideia, se por contrário a contagem diminuir, então estaremos perante uma punção traumática¹². O método dos 3 tubos, como é denominado, nem sempre eficaz¹² e geralmente não é utilizado. Na prática clínica para distinguir a proveniência dos eritrócitos há duas observações que é importante fazer: (1) durante a colheita o clínico verifica visualmente que o primeiro tubo tem maior quantidade de sangue e que nos

seguintes há uma diminuição progressiva do mesmo, então suspeita-se de punção traumática³; (2) no laboratório, após centrifugação da amostra, se a amostra estiver límpida e com depósito de eritrócitos no fundo do tubo, então trata-se de punção traumática, mas se a alteração de coloração se mantiver trata-se de hemorragia subaracnoideia³. Pode-se definir punção traumática, quando se tem mais de 10 eritrócitos/ μL no LCR¹⁵. A contagem de eritrócitos em si mesma tem pouco valor diagnóstico, pois os mesmos são geralmente devidos a contaminação do sangue durante a colheita³. No IPOLFG, o serviço de pediatria tem especial interesse nas contagens de eritrócitos, pois as mesmas servem para estratificar os doentes em ensaios clínicos e avaliar o risco de leucemia do SNC (leucemia do SNC é definida como a presença de mais de 5 leucócitos/ μL no LCR e a presença de blastos¹⁵). É ainda importante referir que punções traumáticas com evidência de blastos no LCR, estão associadas a pior prognóstico¹⁵.

Se houver suspeita de colheita traumática, pode-se fazer um cálculo com o objetivo de corrigir a contagem de leucócitos. Este cálculo, no entanto, assume que todos os eritrócitos presentes são resultado da colheita e não de qualquer hemorragia intracerebral ou subaracnoide. A fórmula utilizada no SPC está de seguida descrita:

$$\text{Leuc} = \text{LeucF} - \frac{\text{LeucS} \times \text{EritF}}{\text{EritS}}$$

Leuc = Leucócitos no LCR antes de ser adicionado sangue

LeucF = Contagem total de Leucócitos no LCR

EritF = Contagem total de eritrócitos no LCR

EritS = Contagem total de eritrócitos no sangue

LeucS = Contagem total de leucócitos no sangue

O tempo desde a colheita da amostra de LCR, até à sua chegada e processamento no laboratório é crítico para a avaliação do conteúdo celular⁷. Após a colheita, o LCR rapidamente torna-se tóxico para as células lá presentes e limita muito o seu tempo de vida⁷. Se o conteúdo celular das amostras não for avaliado logo após a colheita, ocorrem fenómenos de lise dos leucócitos que darão resultados abaixo dos reais³. Em estudos em que se adicionou sangue homólogo a amostras de LCR sem células, verificou-se que após duas horas à temperatura ambiente 40% dos leucócitos foram lisados e que a 4º C só 15% sofreram lise³. Os mesmos estudos confirmaram que não se verificou lise significativa dos eritrócitos³. Nas amostras obtidas por punção traumática, a lise dos eritrócitos começa uma a duas horas após a colheita e como tal é importante iniciar a avaliação celular logo, para que não haja casos de falsos positivos de xantocromia³. A

juntar a este facto, as populações celulares presentes no LCR não diminuem ao mesmo tempo, os granulócitos são afetados primeiro, depois os monócitos e por fim os linfócitos⁷. O facto de o LCR ser um meio hipotónico, com baixa concentração de proteínas e lípidos contribui para a destruição celular³. Se as amostras não forem processadas idealmente num período de uma hora (no máximo duas horas após a colheita), poderemos estar a comprometer um correto diagnóstico¹. Quando se antecipa um atraso nas contagens celulares, deve-se refrigerar a amostra³.

No presente estudo, não foram encontrados critérios bem definidos para a rejeição de amostras de LCR utilizados para contagens celulares. No laboratório de hematologia do SPC do IPOLFG, só se rejeitam amostras muito hemáticas e/ou com coágulo.

2.3.1. Contagem manual de células no microscópio óptico

As contagens totais de células no LCR são comumente executadas manualmente em hemocitómetros^{6,16} ou câmaras de contagem. Quando se tornou claro o baixo conteúdo celular do LCR, o desenvolvimento de métodos fiáveis e práticos para a contagem de células revelou-se um grande desafio. Em 1904, Fuchs e Rosenthal desenvolveram o seu método de contagem em câmara⁷, a câmara de Fuchs-Rosenthal que ainda hoje é o método de referência para a contagem de células no LCR^{4,7,17}. Contudo, o método desenvolvido só permite fazer a contagem total de células, não as diferencia⁷. É também importante referir que existem disponíveis no mercado vários hemocitómetros, cujas diferenças consistem essencialmente nas medidas das grelhas de contagem e na profundidade da câmara. Uma vez conhecidas e percebidas as dimensões da câmara, a área em que se faz a contagem pode ser adaptada para facilitar a contagem em amostras com muitas ou poucas células¹⁸. No SPC o hemocitómetro utilizado para executar contagens de células no LCR é a câmara de *Nageotte*. A câmara de *Nageotte* permite executar contagens de leucócitos com concentrações baixas e que estariam perto dos limites de sensibilidade de outros hemocitómetros¹⁹.

Independentemente do hemocitómetro utilizado, as contagens manuais em câmara possuem a maioria das desvantagens associadas aos métodos manuais: resultados mais demorados, relativamente alta inexatidão, baixa precisão²⁰, alta variabilidade inter-observador⁶ e necessidade constante de pessoal especializado no laboratório^{4,21-23}. Também existem desvantagens e problemas exclusivos do método manual com hemocitómetro, dos quais se destacam: obrigatoriedade de manter a câmara limpa e seca, necessidade de preenchimento correto com a amostra para controlar o volume analisado, cuidado para não se deteriorar (partir e riscar) as câmaras que são de vidro

e como tal frágeis, risco de exposição a material potencialmente infeccioso devido à reutilização das câmaras²² e elevado custo do hemocítmetro.



Figura 2.3. –Câmara de *Nageotte* utilizada no SPC do IPOLFG. Imagem inédita.

2.3.2. Contagem de células automática

Atualmente existe um consenso de que a automatização dos laboratórios melhora a sua produtividade, contribui para uma maior integridade dos dados diminuindo o tempo de desenvolvimento dos métodos e de disponibilização de resultados². É também amplamente aceite que a automatização acarreta potenciais benefícios económicos²⁴. A automatização também aumenta a segurança de todos os envolvidos no processo analítico, uma vez que reduz a manipulação de amostras biológicas (e.g. transporte, aliquotagem, menos processos manuais)². Deste modo a automatização assegura a redução dos acidentes ocupacionais e das tarefas monótonas, possibilitando aos trabalhadores dedicarem-se a tarefas que permitam o desenvolvimento e expansão do próprio ou do laboratório².

2.3.2.1. Contador de células automático Alinity hq



Figura 2.4. – Contador celular automático Alinity hq. Adaptado de www.corelaboratory.abbott.com

O equipamento Alinity hq é um analisador hematológico automático, concebido para executar contagens de células hematopoiéticas, em amostras de sangue total¹⁷. O Alinity hq é um citómetro de fluxo que utiliza princípios ópticos para todas as suas

medições: (1) a hemoglobina é lida por um método espectrofotométrico; (2) as células nucleadas são medidas recorrendo a um reagente patenteado, composto por um corante fluorescente utilizado para corar os núcleos das células e fazer a sua distinção por dispersão óptica e fluorescência. Deste modo, o Alinity hq, consegue fazer a contagem diferencial de leucócitos, reportando 6 populações, incluindo os granulócitos imaturos, e ainda distinguir os eritrócitos nucleados. É ainda importante referir que o Alinity hq, no processo de contagem dos leucócitos, faz a lise dos eritrócitos. Este procedimento tem como objetivo diminuir a interferência dos eritrócitos na contagem de leucócitos²⁵; (3) eritrócitos e plaquetas também são contados por dispersão óptica utilizando detetores em ângulos diferentes dos utilizados para os leucócitos. Durante as medições por dispersão óptica, um feixe de luz laser incide numa amostra de sangue diluído, que circula na célula de fluxo, utilizando uma tecnologia denominada focagem hidrodinâmica. À medida que as células vão passando na célula de fluxo, a luz que incide diretamente nas células é dispersa em várias direções e captada por vários detetores de luz, que posteriormente convertem esses mesmos sinais em impulsos elétricos. Os impulsos elétricos são depois transmitidos para um computador que os analisa e armazena. Os sinais fornecem detalhes acerca da estrutura da célula, como por exemplo o tamanho, complexidade, lobularidade/segmentação nuclear e presença de grânulos citoplasmáticos, que por sua vez permitem identificar a célula. Células com propriedades de dispersão de luz semelhantes formam populações que se aglomeram em locais específicos dos citogramas e podem distinguir-se de outras populações recorrendo a algoritmos avançados de *software*²⁶.

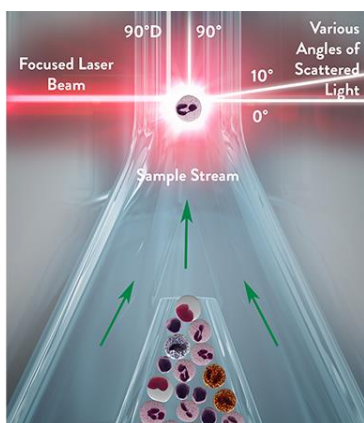


Figura 2.5. – Tecnologia MAPSS™. Adaptado de www.corelaboratory.abbott.com

Quanto maior o número de detetores utilizados no equipamento, maior é a informação disponível para distinção das células e por conseguinte, maior a precisão do método²⁶. A tecnologia utilizada pelo Alinity hq, denominada MAPSS™ (*Multi-Angle Polarized Scatter*)

Scatter Separation), resulta do aperfeiçoamento de uma tecnologia já existente em equipamentos Abbott, sofrendo, no entanto, algumas melhorias. Deste modo, 7 detetores de luz, em combinação com fluorescência, criam sinais únicos para cada célula, permitindo a diferenciação de subpopulações leucocitárias, assim como uma distinção fiável de plaquetas e eritrócitos¹⁷. A utilização de um sinal fluorescente aumenta ainda mais a capacidade de deteção e diferenciação da tecnologia de dispersão óptica²⁶. Os detetores, ângulos em que se encontram e a respetiva função, encontram-se descritos na tabela 2.2. (detetores do Alinity hq e respetiva função):

Detetor	Designação	Ângulo	Medição primária	Aplicação
ALL	<i>Axial Light Loss</i>	0° – 0,61°	Tamanho da célula	Todos os módulos
IAS	<i>Intermediate Angle Scatter</i>	3,0° - 7,45°	Conteúdo celular	Todos os módulos
IAS1	<i>Intermediate Angle Scatter 1</i>	2,24° - 4,5°	Hemoglobina	Eritrócitos, plaquetas e reticulócitos
IAS2	<i>Intermediate Angle Scatter 2</i>	4,5° - 5,5°	Volume celular	Eritrócitos, plaquetas e reticulócitos
IAS3	<i>Intermediate Angle Scatter 3</i>	5,5° - 7,45°	Granulação citoplasmática	Eritrócitos, plaquetas e reticulócitos
PSS	<i>Polarized Side Scatter</i>	90° (luz polarizada)	Segmentação nuclear	Todos os módulos
DSS	<i>Depolarized Side Scatter</i>	90° (luz despolarizada)	Grânulos eosinófilos	CBC (eosinófilos)
FL1	<i>Fluorescence Light 1</i>	90° (fluorescência)	Fluorescência	CBC (células nucleadas) e reticulócitos

Tabela 2.2. – Detetores do Alinity hq e respetiva função. Legenda: CBC (*Complete Blood Count*). Adaptado de Wright D. et al.- (*Advances in Automated Hematology Analysers: Optimizing Optical Technology*).

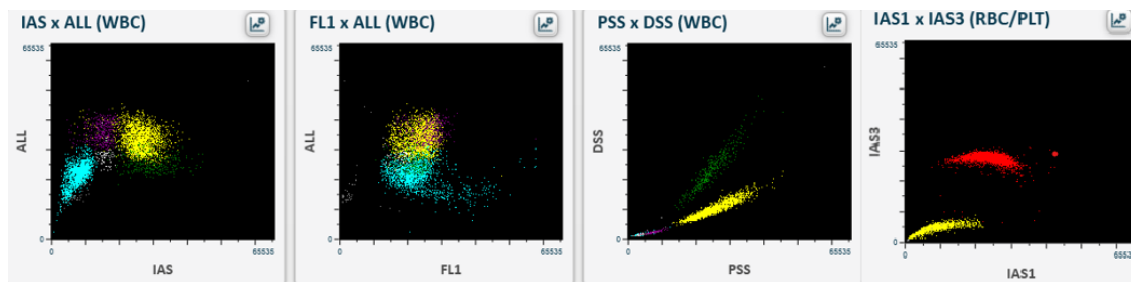


Figura 2.6. – Citogramas obtidos no Alinity hq a partir de um sangue normal. Os três primeiros citogramas mostram a separação das células com base no tamanho (ALL), complexidade (IAS), fluorescência (FL1), lobularidade (PSS) e despolarização da luz (DSS). As diferentes cores representam as células: azul (linfócitos), roxo (monócitos), amarelo (neutrófilos), verde (eosinófilos) e branco (basófilos). O citograma da direita, representa a separação de eritrócitos (vermelho) e plaquetas (amarelo). Imagem inédita.

2.3.3. Exame cito-morfológico do LCR

O método de referência para a contagem diferencial de células no LCR é a microscopia óptica⁴. Assim sendo, a contagem é feita após cito-centrifugação da amostra e posterior coloração³. No SPC, a coloração utilizada é o May-Grünwald – Giemsa (MGG). Apesar de já existirem registos de utilização de equipamentos automáticos para contagem de células no LCR e de estes fazerem concomitantemente a diferenciação das células presentes na amostra, os métodos automáticos não podem atualmente substituir a microscopia na diferenciação de células²². Para que tal aconteça, terão de se resolver algumas limitações tecnológicas relacionadas com volume de amostra necessário para processamento e também com o reconhecimento e diferenciação de células²². Atualmente os contadores celulares não têm capacidade de detetar certas células patológicas que podem ser encontradas no LCR, tais como células não hematopoiéticas (e.g. células neoplásicas)⁷. Deste modo, o exame citológico do LCR é de grande valor informativo. Porém, há que ter em consideração que dependendo do sistema imunitário de cada paciente, idade, comorbilidades, estágio da doença e terapêutica instituída, os achados citológicos podem ser mais ou menos característicos e até coincidir entre diferentes etiologias⁷. A tabela 2.3. (células predominantemente encontradas no LCR e respetivas possíveis importâncias clínicas) dá uma indicação, não exaustiva, das células predominantemente encontradas no LCR e dos seus possíveis significados.

Tipo de célula	Principal importância clínica
Linfócito	Célula normalmente presente no LCR. Meningite viral, tuberculosa e fúngica. Ocasionalmente, meningite bacteriana. Esclerose múltipla. Doenças inflamatórias.
Neutrófilos	Meningite bacteriana. Fase inicial de meningite viral, tuberculosa e fúngica. Hemorragia intracraniana. Injeções intratecais.
Monócitos	Célula normalmente presente no LCR. Meningite viral, tuberculose e fúngica. Esclerose múltipla.
Eosinófilos	Infeções parasitárias, Reações alérgicas.
Macrófagos	Meningites crônicas, meningites bacterianas tratadas. Injeções intratecais. Hemorragias intracranianas.
Blastos	Leucemias, linfomas.
Células linfoides malignas	Linfomas, leucemias.
Plasmócitos	Esclerose múltipla. Reações inflamatórias sub-agudas e crônicas.
Células malignas	Carcinomas metastáticos. Carcinomas primários do SNC.
Células endimais e do plexo coroideu	Trauma, cirurgia, <i>shunt</i> ventricular e injeções intratecais.

Tabela 2.3. – Células predominantemente encontradas no LCR e respetivas possíveis importâncias clínicas. Adaptado de Kjeldsber C, et al, 1993.

2.3.3.1. Cito-centrifugação

A cito-centrifugação é uma metodologia usada com o objetivo de aumentar a capacidade de identificar as células presentes no LCR¹⁸. Vai concentrar as células do LCR na lâmina para observação ao microscópio óptico, fornecendo mais células para análise³. O sistema de cito-centrifugação consiste num recipiente em forma de funil, papel de filtro que absorve o excesso de líquido e numa lâmina de vidro. Estes elementos são

encaixados juntos através de um suporte específico, sendo depois colocado um volume de amostra estabelecido e o conjunto completo é centrifugado. As células são concentradas e depositadas numa pequena área da lâmina, formando um “botão” de células, sendo o excesso de fluido absorvido pelo papel de filtro. A centrifuga é operada a baixa velocidade, de modo a minimizar as alterações morfológicas dos elementos celulares e apesar de haver alguma perda de células no papel de filtro, como esta não é seletiva, proporciona uma amostra representativa das células presentes no LCR¹⁸.



Figura 2.7. – Sistema de cito-centrifugação do IPOLFG. Da esquerda, para a direita: suporte de lâmina, lâmina, funil com respetiva tampa e sistema montado. Imagem inédita.

2.3.3.2. Coloração de May-Grünwald – Giemsa

O principal objetivo da coloração de amostras biológicas como o LCR é observar as células hematológicas e avaliar a sua morfologia¹⁸. A coloração utilizada no SPC para contagem diferencial de LCR é a de MGG, que por sua vez pertence a um grupo mais amplo, as colorações de tipo Romanowski. Os corantes de tipo Romanowski são bastante utilizados na rotina laboratorial e com eles obtêm-se resultados bastante satisfatórios²⁷. As suas notáveis capacidades de permitirem distinções subtis de coloração dos diferentes organelos celulares (efeito Romanowsky ou metacromasia), dependem essencialmente de dois componentes: Azure B (trimetilitionina) e a Eosina Y (tetrabromofluoresceína)²⁷. As reações de coloração são dependentes do pH¹⁸. Os mecanismos pelos quais os componentes estruturais das células coram com corantes específicos (ácidos e básicos) dependem das interações complexas que se estabelecem entre os corantes e as estruturas químicas das células, assim como das interações das moléculas dos próprios corantes. O Azure B liga-se a moléculas

aniónicas e a Eosina Y liga-se aos locais catiónicos das proteínas. Assim sendo, as estruturas ácidas dos ácidos nucleicos e das proteínas do núcleo e o citoplasma das células mais primitivas, ligam-se ao corante Azure B, por outro lado, a presença de grupos básicos na molécula de hemoglobina, resulta na sua afinidade pelos corantes ácidos e cora com a eosina. Os grânulos do citoplasma dos neutrófilos coram fracamente pelos complexos Azures, os grânulos dos eosinófilos contém espermina e são alcalinos, corando com a Eosina e os grânulos dos basófilos contém heparina, que é ácida e tem afinidade para o componente básico do corante²⁷.

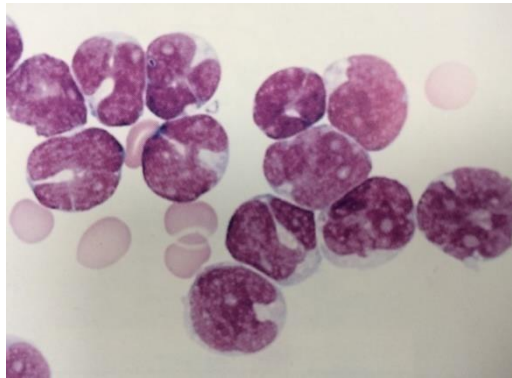


Figura 2.8 –Morfologia de células de leucemia linfoblástica aguda de um LCR, obtidas após cito-centrifugação e coloração por May-Grünwald – Giemsa. Imagem adaptada de Kjeldsber C, et al, 1993.

3. Objetivos e hipóteses do estudo

3.1. Questão de investigação

É possível automatizar a contagem total de células no LCR, utilizando o contador celular automático atualmente disponível no SPC, o Alinity hq?

3.2. Objetivo geral

Um dos desafios que os laboratórios atualmente enfrentam, é verificar se os seus contadores celulares automáticos estão aptos a realizar a contagem de células em líquidos biológicos¹⁶, particularmente no LCR. Muitos laboratórios já efetuam contagens de células no LCR nos seus contadores automáticos ou já começaram a fazer a verificação dos mesmos¹⁶. Apesar de já existirem alguns estudos a apoiar estas verificações, é importante referir que estes, por vezes, são feitos com equipamentos para os quais os fabricantes não têm especificações de desempenho¹⁶. Deste modo, torna-se responsabilidade do laboratório executar uma validação completa e não só uma verificação¹⁶. A validação é geralmente executada pelo fabricante e fornece as características de desempenho de um método. Quando a validação não é feita pelo fabricante, a mesma deve ser realizada pelo laboratório e deve seguir recomendações e orientações para desenvolvimento de testes *in-house*¹⁶. A verificação avalia a conformidade do desempenho reportado pelo fabricante, no local onde o equipamento opera¹⁶.

O objetivo geral deste estudo é comparar a contagem de células no LCR feitas pelo método manual implementado no SPC, com a contagem feita pelo método automático do contador celular Alinity hq, de forma a permitir a sua implementação na rotina laboratorial.

3.3. Objetivos específicos

Podem-se também descrever os seguintes objetivos específicos para este estudo:

- Validar a contagem de células no LCR no contador celular Alinity hq;
- Implementar o método desenvolvido para a contagem de células no SPC;
- Determinar que tipo de informação é possível obter a partir da análise dos citogramas, assim como dos alarmes dados pelo analisador;

3.4. Hipóteses

No presente estudo foram colocadas as seguintes hipóteses:

H0 – A contagem de células no LCR obtida pelo método manual é divergente dos resultados obtidos no contador celular Alinity hq.

H1 – Os resultados das contagens de células no LCR obtidos pelo método manual e pelo contador celular Alinity hq são reprodutíveis.

4. Materiais e Métodos

4.1. Tipo de estudo

Este estudo classifica-se como:

- Quantitativo e não experimental – Um estudo quantitativo caracteriza-se pela medida de variáveis e obtenção de resultados numéricos, que podem posteriormente ser generalizados a outras populações ou contextos²⁸. Um estudo não experimental não visa estabelecer uma relação causa efeito, como tal não existe intervenção por parte do investigador, não existe grupo controlo e, por conseguinte, distribuição aleatória de participantes em grupo controlo e grupo experimental²⁸.
- Descritivo-comparativo – O estudo descritivo tem como objetivo final definir as características de um fenómeno e é utilizado quando existe pouco ou nenhum conhecimento acerca de um determinado assunto²⁸. Neste estudo realizámos a comparação entre a contagem manual de células no LCR com câmara de *Nageotte* e a contagem de células no LCR automática utilizando o equipamento Alinity hq²⁸.

As variáveis que o compõe são:

- Variável dependente – as contagens de células no LCR;
- Variáveis independentes – a contagem manual de células e a contagem automática de células.

4.2. Local do estudo

A população alvo do estudo foram os doentes a quem foi colhido LCR, em qualquer serviço do IPOLFG e aos quais foi pedida uma contagem de células.

4.3. Amostras

As amostras foram colhidas em tubos de centrifugação não estéreis de fundo cónico, com tampa de rosca, sem anticoagulantes e aditivos.

4.4. Amostragem

O método de amostragem é não probabilístico, e fez-se por escolha racional²⁸. A seleção fez-se tendo em conta o volume da amostra de LCR (foram elegíveis as amostras com um volume mínimo de 0,5 mL, o suficiente para permitir a contagem de células manual em câmara de *Nageotte*, contagem de células automática no Alinity hq e caso fossem consideradas patológicas, a cito-centrifugação com eventual concentração celular). Obteve-se um número de amostras (N) de 222 amostras, bastante superior ao mínimo de 40 recomendados pelo *International Council for Standardization in Hematology* (ICSH) para se obterem dados estatísticos válidos²⁹.

4.5. Colheita de dados

A recolha de dados foi feita por meio de medidas objetivas: as contagens manuais de células feitas em câmara de *Nageotte* e as contagens de células automáticas feitas no contador celular Alinity hq²⁸.

4.6. Procedimento laboratorial

4.6.1. Contagem de células

As amostras, independentemente do método de contagem, devem ser processadas assim que recebidas no laboratório. Na altura da receção da amostra, faz-se uma observação macroscópica para a caracterizar como: límpida, turva, hemática ou xantocrômica.

4.6.1.1. Contagem manual de células em câmara de *Nageotte*

Após homogeneização da amostra, cobre-se uma câmara de *Nageotte* limpa e seca com lamela para controlar o volume da amostra. Procede-se ao preenchimento da câmara utilizando uma pipeta de Pasteur e deixa-se a amostra repousar, permitindo às células sedimentar. A câmara é colocada numa caixa de Petri, com papel de filtro no fundo humedecido com água, até à sua observação microscópica. Para proceder efetivamente à contagem, coloca-se a câmara de contagem na platina do microscópio e foca-se com a objetiva de 10X, de modo a observarem-se as malhas de contagem. De seguida, muda-se para a objetiva de 40X e faz-se a contagem manual dos leucócitos

e/ou eritrócitos presentes na amostra. Contam-se no mínimo 4 campos retangulares e calcula-se a média dos elementos celulares encontrados. Cada campo retangular possui um volume de $1,25 \text{ mm}^3$ (10 mm de comprimento, 0,25 mm de largura e 0,5 mm de altura), como tal multiplica-se o valor obtido por 0,8 para fazer a conversão em células por mm^3 ou μl .

Em situações de amostras hemáticas, pode-se proceder à lise dos eritrócitos. Adiciona-se ácido acético de modo a obter-se uma diluição de 1:2 e reporta-se o número de leucócitos encontrados, multiplicando-se antes pelo fator de diluição (2X). Este procedimento não se pode aplicar a doentes com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Nestes doentes procede-se á contagem dos eritrócitos e, se necessário para facilitar a contagem, pode-se diluir a amostra com soro fisiológico (0,9% de cloreto de sódio).

As amostras hemáticas que se considerem resultantes de uma punção traumática, devem ser reportadas ao clínico, informando-se que as células encontradas são eventualmente provenientes de contaminação da amostra. Se o clínico considerar necessário obter-se uma contagem diferencial das células encontradas, deve fazer-se uma correção da contagem de leucócitos, utilizando a fórmula já descrita. Este procedimento não é aplicado aos doentes com LLA.

4.6.1.2. Contagem de células no contador de células automático

Alinity hq

Tendo em conta o baixo conteúdo celular do LCR e os riscos de contaminação da amostra, as contagens de células no LCR no Alinity hq, têm de ser sempre realizadas após execução de uma leitura de fundo. Esta contagem irá garantir que o equipamento cumpre os critérios de desempenho necessários e evidencia que as células contadas pertencem à amostra e que não são resultantes de contaminação dos componentes do equipamento (tubos, sondas, agulhas). Tendo em conta o baixo conteúdo celular do LCR estabeleceu-se como limite da leitura de fundo 1 leucócito/ μL . Caso a leitura de fundo esteja superior aos limites definidos, deve-se proceder a uma manutenção diária do equipamento e no fim, repetir a leitura de fundo. Se esta cumprir os critérios pré-definidos, pode-se proceder à contagem de células, caso contrário não se poderá utilizar o equipamento Alinity hq.

A contagem no Alinity hq é feita em modo aberto, após homogeneização manual da amostra pelo operador.

4.6.2. Exame cito-morfológico

Se houver amostras, cujos resultados da contagem manual sejam superiores aos valores de referência, faz-se uma contagem diferencial celular das mesmas. Esta é feita após uma cito-centrifugação da amostra e posterior coloração por MGG. As amostras que possuam uma contagem de leucócitos inferior a 50 células/ μL , devem ser concentradas para aumentar a sensibilidade do método.

A concentração da amostra faz-se por centrifugação a 350 RCF (*Relative Centrifugal Force*) durante 10 minutos, após os quais se dispensa o sobrenadante e se homogeneiza o sedimento que será utilizado.

Monta-se o sistema de cito-centrifugação (suporte, lâmina já identificada e funil de cito-centrifugação) e pipetam-se 100 μL de amostra de LCR previamente homogeneizada para um funil de cito-centrifugação. Centrifuga-se 2 minutos a 20 RCF na cito-centrifuga *Shandon Cytospin II Cytocentrifuge* (marca e modelo respetivamente). Após secagem, as lâminas estão prontas para serem coradas.

Procede-se à coloração por MGG de acordo com o protocolo instituído no SPC: 7 minutos de May-Grünwald, 10 minutos de Giemsa, seguidos de 3 minutos de lavagem com água corrente e secagem das lâminas.

As amostras coradas são depois observadas no microscópio óptico.

4.7. Considerações éticas e legais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde do IPOLFG, com a referência UIC/1540, e pela Comissão de Ética da ESTeSL, com a referência CE-ESTeSL-Nº. 104-2022. O presente estudo tem base num conjunto de amostras cedidas pelo SPC do IPOLFG. Não houve necessidade de obter consentimentos informados, uma vez que não foram tratados quaisquer dados pessoais e não foi colhido volume de amostra superior para o desenvolvimento deste trabalho.

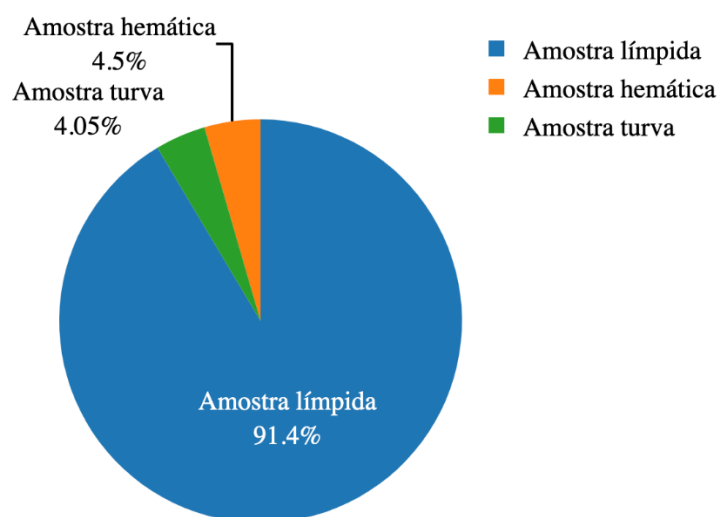
4.8. Financiamento

O estudo decorreu no laboratório de hematologia do SPC, localizado no IPOLFG, sem financiamento associado.

5. Resultados

No presente estudo, com o objetivo de comparar os métodos de contagem de células no LCR, obtiveram-se, no SPC do IPOLFG, 222 amostras de LCR, as quais foram processadas de acordo com a metodologia previamente descrita.

De acordo com o seu aspeto macroscópico, as amostras foram caracterizadas como límpidas, hemáticas e turvas. No gráfico 5.1. (caracterização das amostras quanto ao seu aspeto macroscópico) encontra-se representada a distribuição das amostras obtidas, de acordo com a classificação descrita.

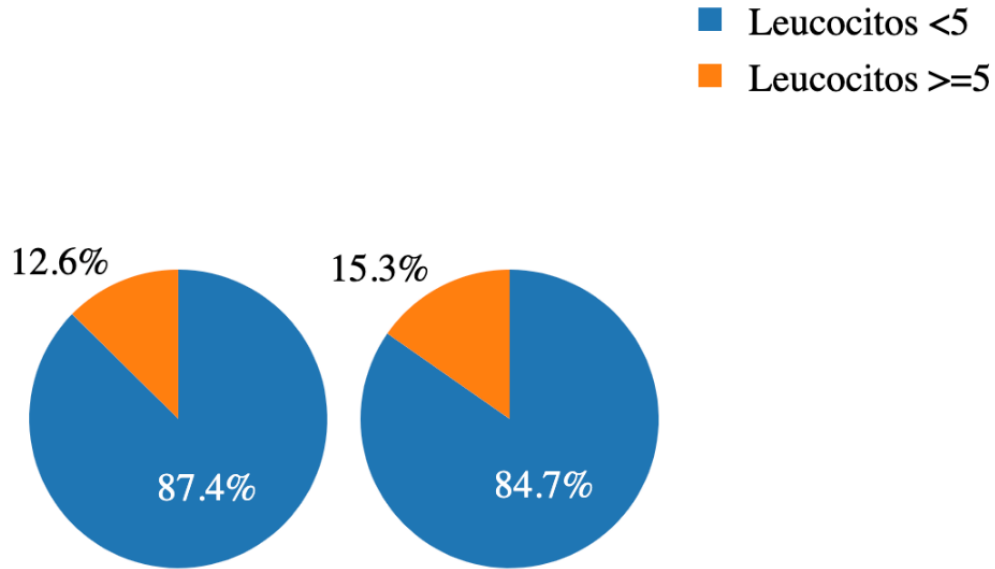


Caracterização de amostras

Gráfico 5.1. – Caracterização das amostras quanto ao seu aspeto macroscópico.

No anexo 1 (tabela de resultados) encontram-se os resultados obtidos para as amostras processadas no estudo. Para os leucócitos, o número mínimo de leucócitos obtidos em ambos os métodos foi de 0 leucócitos/ μL , já a contagem máxima obtida para o método manual foi de 810 leucócitos/ μL e para o Alinity hq foi de 497 leucócitos/ μL . Relativamente aos eritrócitos, também se obteve em ambos os métodos uma contagem mínima de 0 eritrócitos/ μL e relativamente à contagem máxima, obteve-se um máximo de 2640 eritrócitos/ μL na contagem manual e de 34000 eritrócitos/ μL com o Alinity hq. A distribuição das amostras de leucócitos obtida por método manual e por método automático, consoante concentração celular acima e abaixo do valor normal, encontra-se representada no gráfico 5.2. (Contagens de leucócitos $<5/\mu\text{L}$ e $\geq 5/\mu\text{L}$), onde se

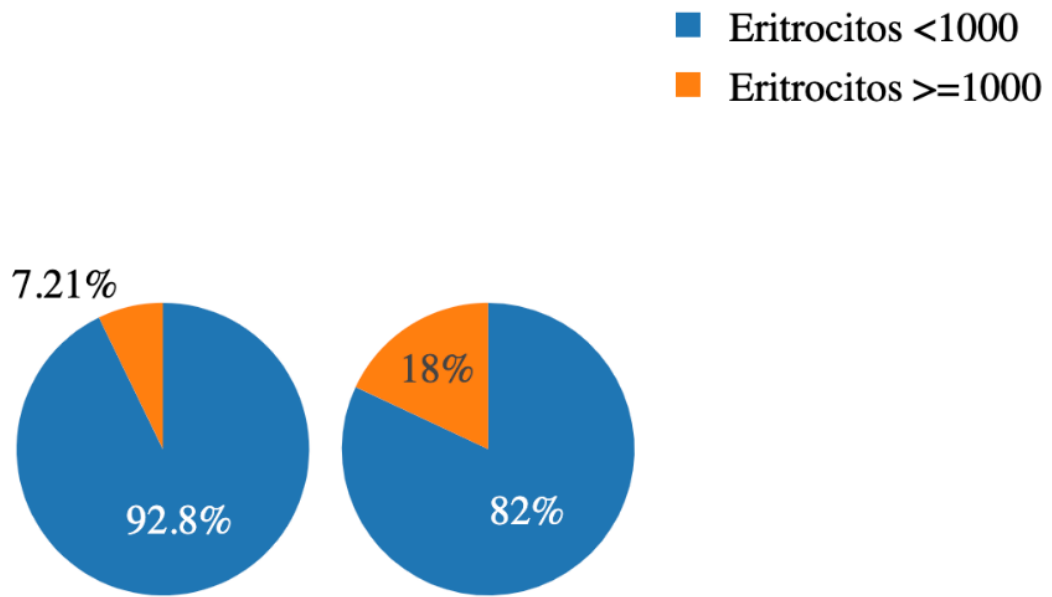
observa que, em ambos os métodos, a grande maioria das amostras não são consideradas patológicas (< 5 leucócitos/ μL).



Contagem de leucocitos

Gráfico 5.2. – Contagens de leucócitos $<5/\mu\text{L}$ e $\geq 5/\mu\text{L}$. À esquerda resultados obtidos por contagem manual e à direita, resultados obtidos no Alinity hq.

No gráfico 5.3. (Contagens de eritrócitos $<1000/\mu\text{L}$ e $\geq 1000/\mu\text{L}$) encontra-se representada a distribuição das amostras de eritrócitos obtidas por método manual e por método automático. O valor utilizado para representar a distribuição das amostras (<1000 eritrócitos/ μL e ≥ 1000 eritrócitos/ μL) representa o limite de detecção do equipamento Alinity hq para os eritrócitos. Como se pode observar no gráfico, a maioria das amostras tem uma contagem de eritrócitos $< 1000/\mu\text{L}$, no entanto a discrepância entre ambos os métodos é maior do que para os leucócitos.



Contagem de eritrocitos

Gráfico 5.3. – Contagens de eritrócitos <1000/ μ L e \geq 1000/ μ L. À esquerda resultados obtidos por contagem manual e à direita, resultados obtidos no Alinity hq.

A análise dos gráficos e citogramas disponibilizados pelo Alinity hq foi realizada, no entanto, tal como se pode verificar na figura 5.1. (Citogramas obtidos no Alinity hq a partir de amostra de LCR), os citogramas obtidos são paucicelulares. Este facto advém do baixo conteúdo celular do LCR, que se traduz em poucos sinais obtidos e incluídos nos citogramas, populações dispersas (no citograma) e incapacidade do analisador em gerar alarmes morfológicos.

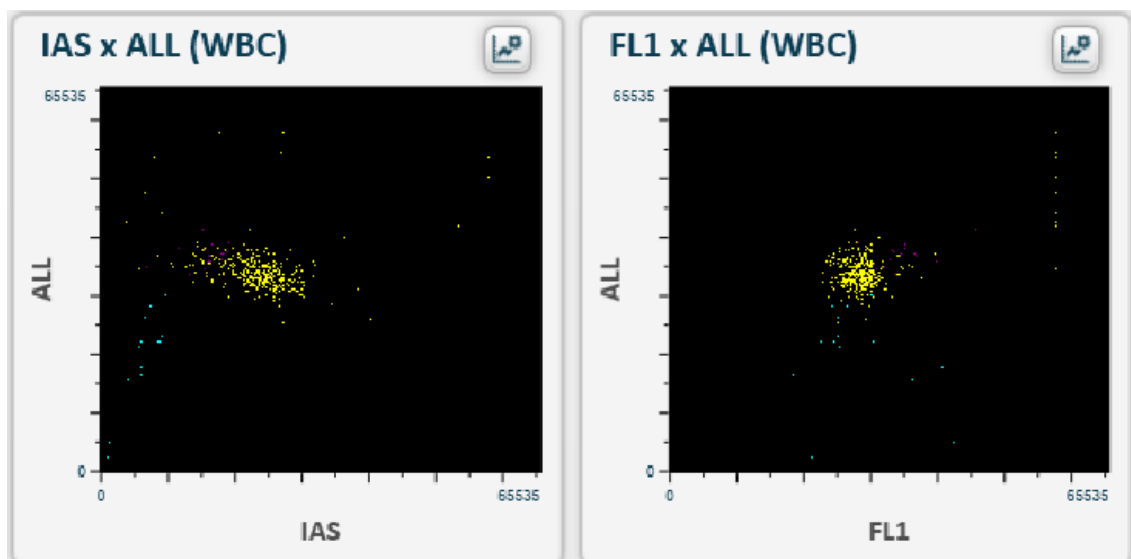


Figura 5.1. – Citogramas obtidos no Alinity hq a partir de amostra de LCR. O gráfico da esquerda distingue as células com base no tamanho (ALL) e complexidade (IAS) e o da direita com base no tamanho (ALL) e fluorescência (FL1). Foi nesta amostra que se obtiveram maior número de leucócitos (497/ μ L). Imagem inédita.

5.1. Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos no estudo relativamente às contagens celulares manuais e automáticas foram introduzidos e trabalhados com recurso ao software R versão 4.2.2. (2022.10.31 ucr) Copyright © 2022. Para tal recorreu-se à análise da concordância com o método de Bland-Altman.

O método de Bland-Altman é utilizado quando o objetivo é determinar com segurança se um método pode ser substituído por outro, ou seja, se existe concordância entre os resultados obtidos, não comprometendo a interpretação clínica dos resultados³⁰⁻³². O método de Bland-Altman pode ser utilizado para comparar duas medições, em que se compara um novo método com um método de referência ou com um método já implementado^{30,31,33}.

O método de Bland-Altman quantifica a diferença entre duas medições recorrendo a um método gráfico. Desenha-se um gráfico de dispersão no qual o eixo-X representa a média de duas medições $[(M1+M2)/2]$ e o eixo-Y representa a diferença entre duas medições $(M1-M2)$. Após o gráfico ser obtido, o valor médio da diferença – \bar{d} (valor médio de $M1-M2$) - e os intervalos de confiança (intervalos de concordância) devem ser quantificados. Primeiro, com um *software* de estatística, calcula-se a média e o desvio padrão recorrendo ao teste t. De seguida, os pontos do gráfico podem ser restritos

usando dois desvios-padrão para demonstrar um intervalo de confiança de 95% dos dados. O intervalo de confiança calcula-se da seguinte forma: média ± 1.96 desvio-padrão. Um valor \bar{d} de zero entre os dois métodos representa uma concordância ideal, assim como um \bar{d} e limites próximos de zero também representam um panorama ideal³⁰. O gráfico obtido pode ser avaliado de acordo com a dispersão dos pontos do gráfico. Quando existe uma boa concordância, a dispersão dos pontos é baixa e os pontos ficam relativamente próximos da linha que representa \bar{d} . Como medida quantificável, \bar{d} e os limites de concordância dão informação acerca da utilidade do método em investigação³⁰. O \bar{d} diz-nos, quando diferente de zero, que o método em investigação mede $\pm X$ do que o método implementado. Esse viés (ou diferença) pode ser constante ou um valor médio resultante de valores ou de concentrações específicas³³. O limite de concordância de 95% permite-nos estimar o tamanho do erro de amostragem³³. É também importante referir que o método de Bland-Altman apenas define os intervalos de concordância entre dois métodos, não indica se esses limites são ou não aceitáveis. Os limites de aceitação são definidos previamente e baseados em necessidades clínicas³³.

5.1.1. Análise estatística dos resultados-leucócitos

Após a obtenção dos resultados e antes de se começar a avaliar a concordância dos resultados dos leucócitos, verificou-se se os resultados obtidos tinham uma distribuição normal. Para tal recorreu-se ao teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados encontram-se no anexo II (resultados estatísticos dos leucócitos) e uma vez que o valor de $P < 0.05$, rejeitamos a hipótese nula e como tal aceita-se que os resultados não possuem uma distribuição normal.

A avaliação visual aos resultados obtidos nas contagens dos leucócitos (anexo I – tabela de resultados) permitiu verificar que as diferenças obtidas entre os dois métodos variam na mesma ordem de grandeza independentemente da classificação do aspeto macroscópico da amostra (límpido, turvo ou hemático). Um resultado que se destacou foi o da amostra 117, no qual se obteve uma grande diferença entre a contagem manual e a contagem automática. A contagem automática (da amostra 117) subvaloriza a concentração de leucócitos num fator de 10x. Para melhor identificação deste resultado, fez-se uma regressão linear com e sem esse resultado de modo a perceber se o mesmo poderia ser considerado um *outlier*. Os resultados estão expressos no gráfico 5.4.(regressão linear dos resultados dos leucócitos). Da interpretação do gráfico pode-se constatar que sem a amostra 117 (que, entretanto, se considerou um *outlier*) obtém-se um declive da reta e uma interceção da mesma mais próximo do ideal, ou seja declive

próximo de 1 e interceção da reta no eixo Y próximo de 0. A interpretação do coeficiente de determinação (r^2), permite verificar a quantidade de variância dos métodos, ou seja o quão próximos estão os resultados da linha de regressão ajustada. Quanto maior o r^2 , melhor o modelo se ajusta aos dados, neste caso o gráfico sem o *outlier* obtém melhores resultados. Fez-se uma investigação mais aprofundada às condições de análise desta amostra e verificou-se que a contagem automática foi feita cerca de 2h30 depois da sua entrada no laboratório. De acordo com o procedimento adotado nesta investigação, as amostras deveriam ser analisadas o mais rápido possível desde a sua chegada ao laboratório e idealmente num período inferior a duas horas. Assim sendo, temos de ter em conta os seguintes fatores (1) duas horas após a colheita de LCR a contagem de leucócitos reduz-se em 40%³, (2) 2h30 é o tempo que temos a certeza da diferença de contagens e estamos ainda a excluir o tempo desde a colheita até à chegada ao laboratório (3) as contagens, manual e automática, não foram feitas nas mesmas condições. Deste modo, decidiu-se excluir esta amostra da análise dos leucócitos.

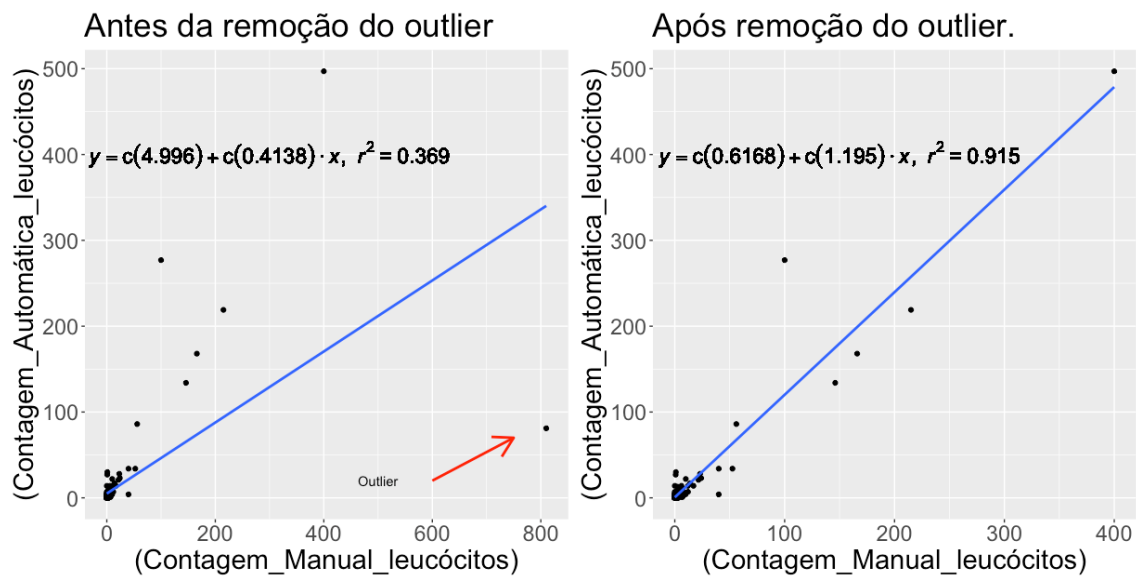


Gráfico 5.4. – Regressão linear dos resultados dos leucócitos. Com a amostra 117 (à esquerda) e sem a amostra 117 (à direita). Sem a amostra 117, obtém-se uma reta de regressão melhor (declive mais próximo de 1, interceção no eixo Y mais próximo de 0 e maior r^2).

Analisou-se os resultados das 221 amostras com o método de Bland-Altman estando os mesmos expostos no gráfico 5.5. (gráfico de dispersão da análise da concordância dos leucócitos, utilizando o método de Bland-Altman). No eixo X estão representados os valores médios das contagens obtidos pelos dois métodos e no eixo Y a diferença obtida entre a contagem por método manual e a contagem por método automático. A

diferença média (\bar{d}) entre as medições foi de -2,00, os limites de concordância superiores e inferiores calculados ($\bar{d} \pm 1,96$ desvio padrão) são respectivamente 26,18 e -30,18. O valor crítico do método (1.96 desvio padrão $- \bar{d}$) é 28,18. Da análise do gráfico de dispersão, verifica-se que para contagens de leucócitos baixas, as diferenças dos métodos em relação ao valor médio estão maioritariamente dentro dos limites de concordância, mas à medida que as contagens de leucócitos aumentam, encontramos algumas contagens fora dos limites de concordância. No entanto, não conseguimos estabelecer um padrão que sugira, por exemplo, que quanto mais altas estiverem as contagens, maior as diferenças encontradas entre os métodos.

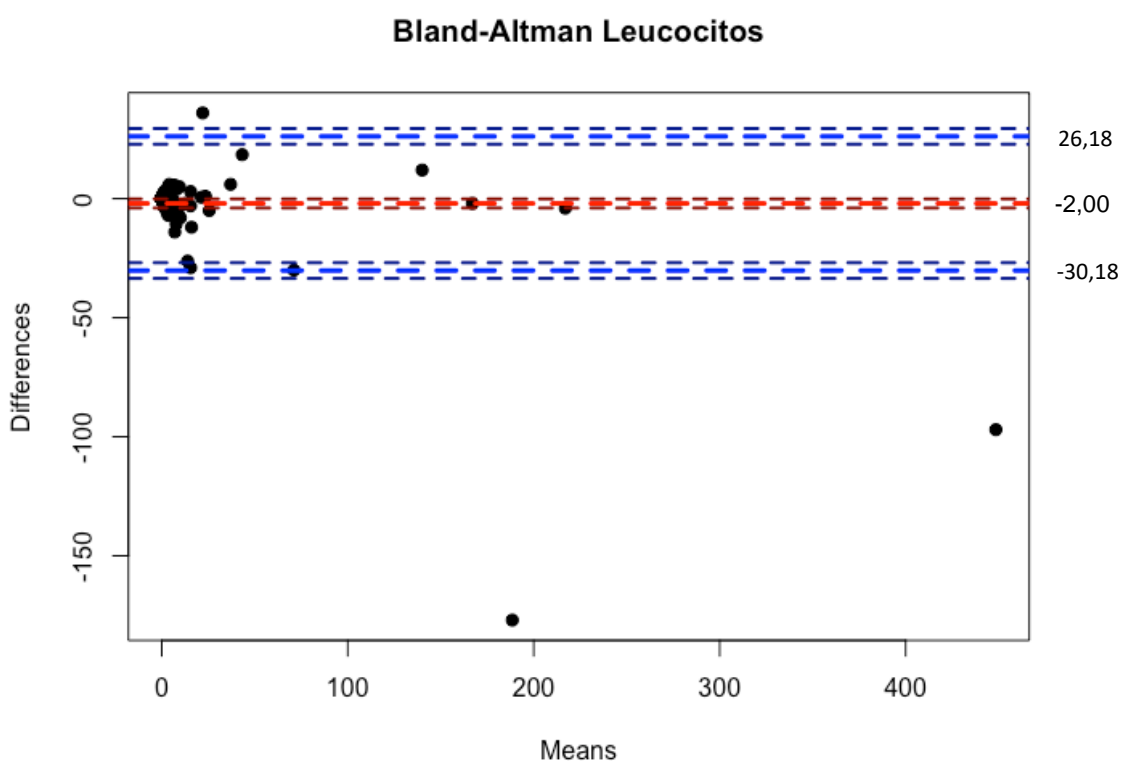
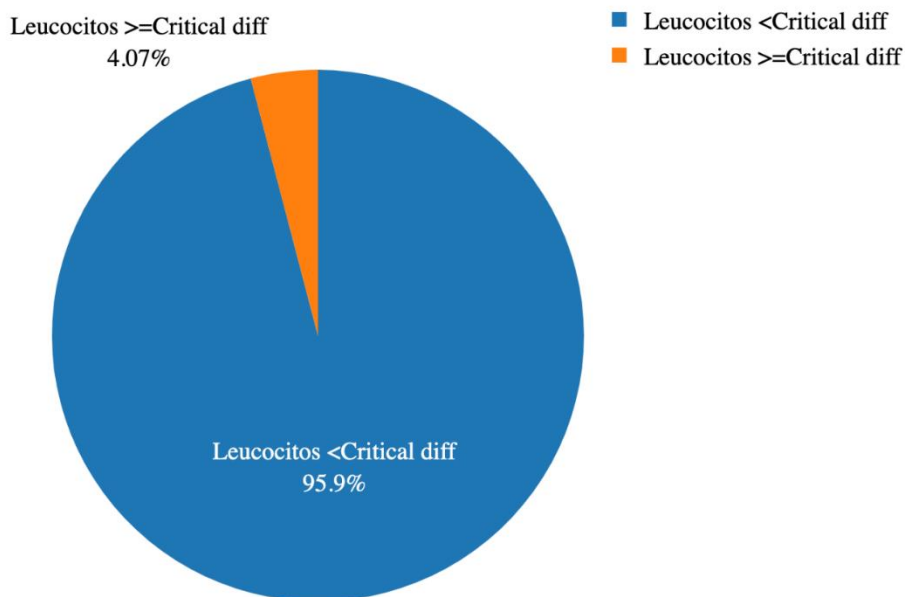


Gráfico 5.5. – Gráfico de dispersão da análise da concordância dos leucócitos, utilizando o método de Bland-Altman. No eixo X média das contagens obtidas por dois métodos e no eixo Y diferença entre contagem manual e contagem automática. A linha vermelha representa \bar{d} (média das diferenças de contagens) e as linhas a azul representam os limites de concordância.

Os dados apresentados no gráfico 5.6. (distribuição de amostras de acordo com o valor crítico dos leucócitos (28,179 leucócitos/ μ L), representam a distribuição das amostras de acordo com o valor crítico obtido pelo método de Bland-Altman. Como se pode verificar, a grande maioria das amostras obtidas (95,9%) encontra-se a abaixo do valor crítico obtido.



Distribuição das amostras em relação ao valor crítico

Gráfico 5.6. – Distribuição de amostras de acordo com o valor crítico dos leucócitos (28,179 leucócitos/ μ L).

Como já foi referido a contagem de células no LCR é de grande importância no diagnóstico de patologias relacionadas com o SNC, bem como a diferenciação das células presentes⁷. Assim sendo, e apesar do estudo da concordância dos métodos ser fundamental para a comparação dos mesmos, pensa-se que seria igualmente importante fazer uma curva característica de operação do recetor – curva ROC (*Receiving Operation Characteristic*) – de modo a determinar o desempenho do Alinity hq em discriminar se amostra é positiva (≥ 5 leucócitos/ μ L) ou negativa (< 5 leucócitos/ μ L). Quando se têm diversos meios à disposição e se sabe que os mesmos possuem diferenças entre si, por vezes o que é necessário saber é se uma determinada condição está presente ou não³⁴, neste caso se o número de leucócitos no LCR $\geq 5/\mu$ L. Para se construir uma curva ROC, a sensibilidade e a especificidade para diferentes valores de um ensaio contínuo são ordenados sistematicamente. Como resultado, obtém-se uma lista de vários valores recolhidos e a sensibilidade e especificidade correspondentes para um determinado valor. Para produzir graficamente a curva ROC, coloca-se a sensibilidade (taxa de verdadeiros positivos) no eixo Y e no eixo X coloca-se 1 - especificidade (taxa de falsos positivos)³⁴. Com a curva ROC podemos calcular a AUC (*area under the curve* – área debaixo da curva), que é uma medida que nos permite

determinar a precisão da técnica. Um teste com AUC de 0,5 representa um teste sem capacidade de discriminação e um com AUC de 1 representa um teste com uma capacidade de discriminação perfeita³⁴.

O gráfico 5.7. (curva ROC dos leucócitos) mostra a curva ROC do Alinity hq para os leucócitos considerando o teste negativo se leucócitos $<5/\mu\text{L}$ e positivos se $\geq 5/\mu\text{L}$. A sensibilidade obtida pelo índice de Youden foi de 0,665, a especificidade de 0,543 e a AUC de 0,5835.

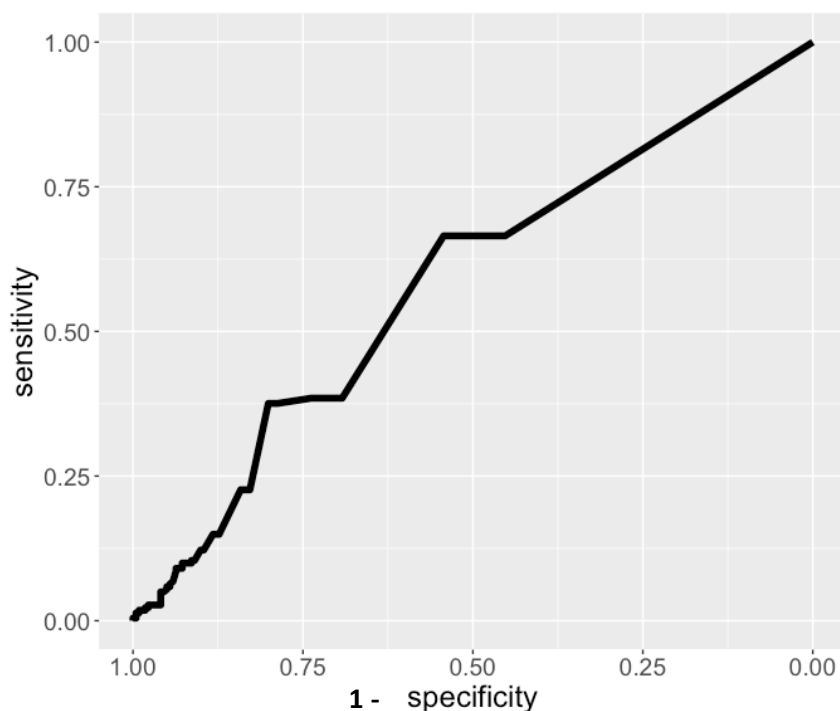


Gráfico 5.7. – Curva ROC dos leucócitos, apresentando no eixo X 1 – especificidade (taxa de falsos positivos) e no eixo Y a sensibilidade.

5.1.2. Análise estatística dos resultados-eritrócitos

Após a obtenção dos resultados e antes de se começar a avaliação da concordância dos resultados dos eritrócitos, verificou-se se os resultados obtidos tinham uma distribuição normal. Para tal recorreu-se ao teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados encontram-se no anexo III (resultados estatísticos dos eritrócitos) e uma vez que o valor de $P < 0.05$, rejeitamos a hipótese nula e como tal aceita-se que os resultados não têm uma distribuição normal.

Fez-se também uma regressão linear com os resultados dos eritrócitos, expressa no gráfico 5.8. (regressão linear dos resultados dos eritrócitos), para se ter uma ideia da

distribuição dos resultados e consegue-se perceber que os dois métodos têm uma correlação baixa.

Para a análise da concordância dos métodos para a determinação dos eritrócitos, foram avaliadas 208 amostras. Utilizaram-se menos amostras para este estudo, porque a contagem de eritrócitos por método manual é demorada^{4,20,22,23} e a contagem de eritrócitos em si mesma tem pouco valor diagnóstico (os mesmos são geralmente sinónimo de contaminação com sangue durante a colheita – colheita traumática)³, acabando muitas vezes por se dar o resultado como >1000 eritrócitos/ μL . Este facto por sua vez impossibilita o tratamento estatístico e como tal a comparação dos métodos. Fez-se a análise dos resultados das 208 amostras com o método de Bland-Altman e os resultados estão expostos no gráfico 5.9. (gráfico de dispersão da análise da concordância dos eritrócitos, utilizando o método de Bland-Altman). No eixo X estão representados os valores médios das contagens obtidos pelos dois métodos e no eixo Y a diferença obtida entre a contagem por método manual e a contagem por método automático. Obteve-se uma diferença média (\bar{d}) entre as medições de -106,36, os limites superiores e inferiores de concordância calculados ($\bar{d} \pm 1,96$ desvio padrão) são respetivamente 721,92 e -934.64. O valor crítico do método (1.96 desvio padrão – \bar{d}) é 828,28. Da observação do gráfico 5.9. (gráfico de dispersão da análise da concordância dos eritrócitos, utilizando o método de Bland-Altman) verifica-se que não há uma dispersão dos resultados em torno da média em nenhuma gama de resultados. O padrão de dispersão obtido, resulta das grandes diferenças dos métodos e sobretudo do facto de o Alinity hq não dar resultados inferiores a 1000 eritrócitos/ μL e de manualmente, por norma, não se fazerem contagens >1000 eritrócitos/ μL .

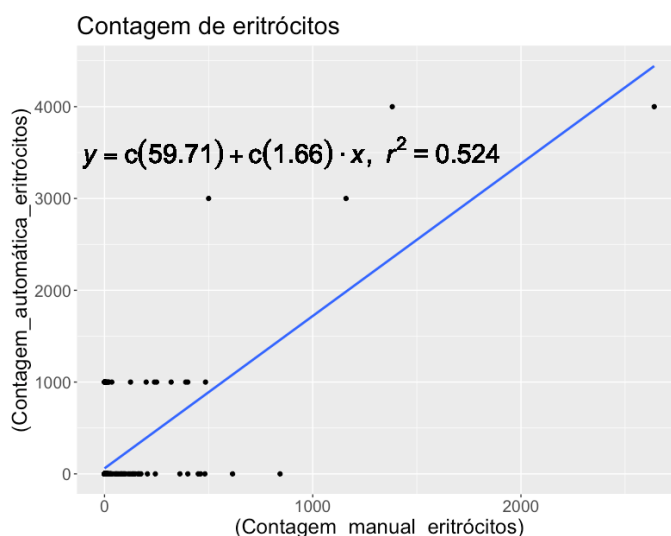


Gráfico 5.8. – Regressão linear dos resultados dos eritrócitos, apresentando no eixo X a contagem por método manual e no eixo dos Y a contagem por método automático.

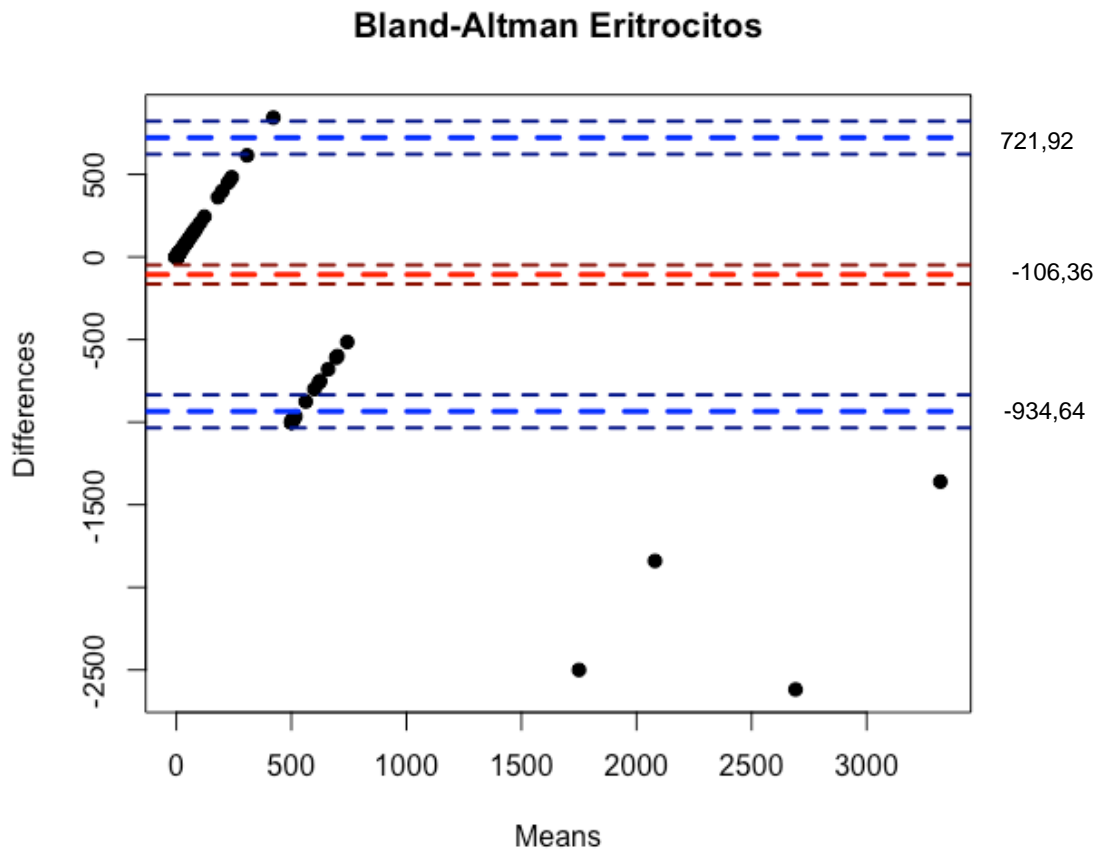


Gráfico 5.9. – Gráfico de dispersão da análise da concordância dos eritrócitos, utilizando o método de Bland-Altman. No eixo X média das contagens obtidas por dois métodos e no eixo Y diferença entre contagem manual e contagem automática. A linha vermelha representa \bar{d} (média das diferenças de contagens) e as linhas a azul representam os limites de concordância.

6. Discussão e Conclusões

6.1. Discussão

O presente estudo tinha como objetivo principal comparar a contagem de células no LCR feita pelo método manual já implementado no SPC, com a contagem feita pelo método automático do contador celular Alinity hq, em ordem a se avaliar se este último se poderia implementar na rotina laboratorial. Atualmente os laboratórios procuram implementar, sempre que possível, métodos automáticos, os quais estão habitualmente associados a ganhos no tempo de resposta e na redução da variabilidade interlaboratorial²⁴. Historicamente a contagem de células no LCR é feita manualmente, recorrendo a um hemocitómetro e como a grande maioria das técnicas manuais está sujeita a alguns problemas, tais como demora na obtenção de resultados, presença constante de pessoal qualificado e maior variabilidade nos resultados^{4,24}. Os contadores celulares são uma presença constante nos laboratórios modernos e como tal, nos últimos anos, têm sido desenvolvidos inúmeros estudos de forma a determinar se estes podem representar uma alternativa a utilizar na prática clínica⁴. Antes de iniciar a discussão, há algumas desvantagens para os contadores automáticos que é relevante analisar e que não podem ser ignoradas: (1) os contadores celulares são concebidos para contagem de células no sangue e como tal possuem intervalos de mediação analítica (AMR – *Analytical Measurement Range*) que não são adequados às baixas concentrações celulares do LCR; (2) a matriz do LCR difere consideravelmente da matriz do sangue; (3) podem estar presentes células no LCR que geralmente não estão presentes no sangue (e.g. células não hematopoiéticas) e como tal os equipamentos não são capazes de as diferenciar, podendo inclusivamente interferir com a contagem das outras células²⁴. Se os contadores celulares forem incapazes de diferenciar valores normais de patológicos, então os mesmos não têm aplicação prática^{4,6}.

Para se avaliar a concretização do objetivo principal, recorreu-se à avaliação da concordância, utilizando o método de Bland-Altman. Desta maneira, sabendo-se que iria sempre haver diferenças entre os dois métodos, o que se pretendia verificar era a dimensão, o significado dessas diferenças, não obstante que os critérios de aceitação do método são definidos com base em necessidades clínicas³³. Para os leucócitos o valor utilizado para definir a aceitação do método foram os 5 leucócitos/ μL e para os eritrócitos, 10 eritrócitos/ μL , o valor a partir do qual se considera que existe punção traumática¹⁵. Assim que se começaram a obter amostras e se verificou que o valor mais baixo reportado pelo Alinity hq era de 1000 eritrócitos/ μL , tornou-se perceptível que a

concordância dos métodos não seria possível para os eritrócitos e que o mesmo não serviria o nosso propósito.

É relevante referir que dos artigos consultados e referenciados neste trabalho, quer se focassem especificamente no LCR, quer estudassem a utilização dos contadores automáticos para outros líquidos biológicos, a amostragem é inferior à apresentada neste trabalho. No desenvolvimento do presente projeto, procurou-se obter amostras representativas da realidade do IPOLFG e em número suficiente, que permitissem analisar dados estatisticamente significativos. Ao contrário do referido na bibliografia, em que a maior parte das colheitas de LCR se fazem para investigação de infeções e de processos inflamatórios no SNC⁷, neste estudo a maior parte das amostras foram colhidas com intuito de verificar a presença de células neoplásicas hematopoiéticas e não-hematopoiéticas (leucemia do SNC e infiltrações leptomeníngicas).

Relativamente aos resultados dos leucócitos verifica-se que a grande maioria dos resultados têm baixas concentrações celulares. A diferença média (\bar{d}) obtida entre os dois métodos (método manual – Alinity hq) foi de -2,00 leucócitos/ μ L, o que significa que o Alinity hq, sobrevaloriza a contagem do método manual, em média em cerca de 2 leucócitos/ μ L. Ao calcular o desvio padrão das diferenças entre os métodos, podemos calcular os limites de concordância dos métodos. Os limites de concordância, obtidos pela fórmula: $d \pm 1,96$ desvio padrão, são [-30,18 a 26,18]. Estes limites significam que 95% das diferenças obtidas entre os métodos podem variar até $\pm 28,179$ leucócitos/ μ L. Este valor é o valor crítico do método, representando o valor a partir do qual podemos utilizar o equipamento e é bastante superior ao limite de aceitação estabelecido. As diferenças obtidas nas contagens que estejam dentro deste intervalo, atribuem-se a diferenças inerentes aos métodos e as diferenças superiores são resultantes de limitações técnicas do Alinity hq.

Por as amostras obtidas terem maioritariamente baixas concentrações de leucócitos, achou-se pertinente determinar a capacidade de o equipamento diferenciar as amostras entre positivas e negativas. Para tal obtivemos uma curva ROC, com uma AUC de 0,5835. Este valor indica-nos que o Alinity hq não possui uma boa capacidade de discriminação.

No que toca aos resultados dos eritrócitos, apesar de os mesmos não terem valores de referência definidos ou valores críticos, estabeleceu-se como limite de aceitação 10 eritrócitos/ μ L (valor que nos permite determinar se a punção é ou não traumática)¹⁵ e, por conseguinte, conhecer a proveniência das demais células nucleadas. O limite de deteção do Alinity hq é bastante superior e como tal, não é de grande utilidade. A diferença média (\bar{d}) obtida entre os dois métodos (método manual – Alinity hq) foi de -106,36 eritrócitos/ μ L, o que significa que o Alinity hq, sobrevaloriza a contagem do

método manual, em média em cerca de 106 eritrócitos/ μL . Ao calcular o desvio padrão das diferenças entre os métodos, podemos calcular os limites de concordância dos métodos. Os limites de concordância, obtidos pela fórmula: $d \pm 1,96$ desvio padrão, são [-924,81 a 721,92]. Estes limites significam que 95% das diferenças obtidas entre os métodos podem variar até $\pm 828,28$ eritrócitos/ μL . É ainda importante referir que basta que existam quaisquer interferências ou “ruído” eletrônico na contagem para que o equipamento conte 1000 eritrócitos/ μL e como tal se obtenham diferenças muito grandes em relação ao método manual. Já em situações em que o LCR está claramente hemático e manualmente se dá o resultado como >1000 eritrócitos/ μL , provavelmente com o Alinity hq poder-se-ia dar uma melhor estimativa da quantidade de eritrócitos presentes na amostra⁴.

Uma possível utilização que se poderia dar ao Alinity hq seria a de fazer um rastreio às amostras de LCR. Caso as mesmas tivessem valores acima dos valores críticos, poderíamos confiar e utilizar os resultados. Caso os valores fossem inferiores, teríamos que confirmar os resultados com o método implementado. Tendo em conta que a grande maioria das amostras estão abaixo do valor crítico, ver gráfico 5.6. (distribuição de amostras de acordo com o valor crítico dos leucócitos (28,179 leucócitos/ μL), esta prática não faz sentido aplicar, exceto, eventualmente, numa situação em que não exista disponibilidade de profissionais qualificados e se avance para um rastreio.

Os limites de concordância obtidos entre os métodos, podem ser explicadas por limitações tecnológicas do método: (1) o Alinity hq foi concebido para contagem de células no sangue periférico, cujas concentrações celulares são muito superiores. As contagens de leucócitos são feitas com uma diluição de 1:35 (28 μL amostra + 980 μL de reagente) e as de eritrócitos com uma diluição de 1:250 (8,5 μL amostra + 2125 μL de diluente)³⁵, o que seguramente diminui ainda mais a precisão do método, principalmente em amostras de baixo conteúdo celular. As amostras com celularidade baixa (5 – 30 leucócitos/ μL) são aquelas onde a imprecisão do equipamento é maior⁴ e cujas diferenças de valores encontrados, por mais pequenas que sejam, poderão ter implicações clínicas. Apesar de os eritrócitos não terem limites de precisão e de sensibilidade no LCR tão restritos como os leucócitos, deve-se pelo menos tentar quantificar pequenas contaminações de sangue (<1000 eritrócitos/ μL)⁴. Em relação a utilizar o Alinity hq para dar uma melhor estimativa de amostras muito hemáticas e que geralmente pelo método manual se dá o resultado como >1000 eritrócitos/ μL , há que ter em consideração que o *software* dos fabricantes bloqueia valores abaixo de 1000 eritrócitos/ μL , devido à baixa precisão dos resultados⁴ e que o AMR do Alinity hq é de $0.1 \times 10^6/\mu\text{L}$ a $8.08 \times 10^6/\mu\text{L}$, o que significa que para valores dentro deste intervalo teríamos garantias de precisão do fabricante, mas será que o poderíamos fazer para

valores entre os 1000 e os 10000 eritrócitos/ μL ? Apesar de termos poucas amostras quantificadas manualmente com resultados nesta ordem de grandeza, o valor crítico obtido pela análise do Bland-Altman (828,28 eritrócitos/ μL) sugere que esta possibilidade é exequível. O desenvolvimento de um módulo (*software*) de fluidos biológicos, já disponível por alguns fabricantes, com diluições mais baixas e utilizando um maior volume de amostra, poderia contrariar estas limitações. (2) O ambiente do LCR é tóxico para as células e limita muito o seu tempo de vida, pelo que quanto maior o tempo que decorre desde a colheita até à análise da amostra, mais sujeitas estarão as células a fenómenos de lise⁷. Deste modo, a utilização de reagentes que fazem a lise dos eritrócitos durante o pré-tratamento das amostras, poderão contribuir para resultados em que as contagens obtidas no método automático são mais baixas que as contagens manuais. (3) O procedimento do estudo requer que antes do processamento de amostras de LCR no Alinity hq se faça uma ou mais leituras de fundo, de forma a garantir o desempenho do equipamento, uma vez que o equipamento fornece uma contagem que tem origem num reagente isento de células ou em “ruído” eletrónico. Ao executar a leitura de fundo tenta-se evitar um fenómeno denominado *carry-over*. O *carry-over* representa a transferência de componentes sanguíneos de uma amostra geralmente com grande celularidade para outra de baixa celularidade, ou inadvertidamente que uma amostra que não seja de sangue processada antes do LCR dilua a amostra e cause um resultado falsamente inferior^{29,36}. Dos vários artigos consultados e que estudam o fenómeno, apesar da pré-diluição das amostras representar uma possibilidade, nos contadores hematológicos a principal preocupação com o fenómeno de *carry-over* é sobretudo com a sobrevalorização das contagens, daí a implementação da leitura de fundo antes da análise do LCR. Caso se verifique o fenómeno de pré-diluição, o equipamento não estará a cumprir com os seus critérios de desempenho e seguramente não representará um problema só para as amostras de LCR, mas também para as amostras de outros produtos biológicos, assim como para os resultados do controlo de qualidade interno. Assim sendo, todos os equipamentos que utilizem sistemas de auto-pipetagem devem fazer um estudo de *carry-over*³⁶. No caso dos Alinity hq recentemente instalados no SPC, durante o processo de instalação fez-se um estudo do *carry-over* e o mesmo cumpria os requisitos do fabricante. Tendo em conta a baixa celularidade do LCR o estudo do *carry-over* é fundamental e caso os resultados não estejam de acordo com os limites de aceitação, deve-se requisitar uma manutenção ou intervenção no equipamento²⁹. (4) As contagens mais altas obtidas no Alinity hq, em relação ao método manual, podem ser explicadas por partículas que não sejam leucócitos ou eritrócitos e que podem influenciar as contagens⁴. Entre os possíveis interferentes destacam-se agentes microbianos (bactérias e fungos),

lipossomas, detritos celulares e agregados celulares. Segundo alguns autores, é possível que as interferências possam ser detetadas nos citogramas do equipamento⁴, no entanto da análise realizada aos citogramas do Alinity hq o que se verificou é que tendo em conta o baixo conteúdo celular das amostras, os citogramas estão paucicelulares e é muito difícil recolher informação dos mesmos. A melhoria dos algoritmos das leituras de fundo poderia eventualmente contornar estas interferências. O baixo número de amostras positivas não possibilitou a recolha de dados estatisticamente significativos que permitissem determinar que tipo de informação se pode retirar da análise dos citogramas e dos alarmes do Alinity hq.

Caso tivesse existido concordância dos métodos e se avançasse para uma validação do método, um problema que teria de ser resolvido, seria o controlo de qualidade das amostras de LCR. Uma vez que o fabricante não tem o método validado, não disponibiliza controlos de qualidade e ter-se-ia que averiguar a disponibilidade de produtos comerciais que permitissem testar o equipamento na zona inferior do AMR²⁹.

6.2. Conclusões

Apesar do desenvolvimento tecnológico do Alinity hq e do mesmo cumprir com todos os requisitos para os quais foi concebido, a contagem de células no LCR continua a ser um grande desafio para o mesmo, sendo o baixo valor de referência o grande responsável por essa limitação. Para os leucócitos, o valor a partir do qual se obtém concordância com o método implementado (28,179 leucócitos/ μ L) não está de acordo com o limite de aceitação definido clinicamente. No entanto, não está longe de valores encontrados para outros equipamentos (cerca de 20 leucócitos/ μ L)⁴. Relativamente aos eritrócitos, o valor da concordância obtido (828,28 eritrócitos/ μ L) está bastante longe dos limites de referência estabelecidos. As divergências em relação ao método implementado estão relacionadas com a imprecisão do método para as concentrações celulares típicas do LCR. Deste modo, não se pode utilizar o Alinity hq para contagem de células no LCR e substituir o método manual ou utilizar os dois métodos indistintamente. A grande percentagem de amostras obtidas abaixo do valor crítico, impedem a utilização do Alinity hq como teste de rastreio.

Eventualmente, numa situação limite, na ausência de profissionais qualificados e utilizando amostras para as quais a contagem de eritrócitos não tenha particular relevância (amostras que não pertençam a pacientes pediátricos com LLA), poder-se-ia efetuar a contagem de células no Alinity hq e caso a contagem de leucócitos fosse superior a 28,18/ μ L, poder-se-ia aceitar a contagem e avançar para cito-centrifugação.

7. Limitações do estudo e perspectivas futuras

Como limitações deste estudo reconhece-se que infelizmente não se obtiveram muitas amostras patológicas e com um espectro de valores maior, apesar do número de amostras obtidas e do intervalo de tempo em que se esteve a processar as amostras ser representativo da realidade do IPOLFG. A obtenção de mais amostras consideradas patológicas e com contagens de leucócitos mais elevadas, alargaria, eventualmente, as investigações que se poderiam realizar. Por exemplo poder-se-ia comparar os resultados das contagens diferenciais obtidas pelos dois métodos e ainda, se existissem alarmes do Alinity hq, poder-se-iam tentar associar a alguns tipos de células encontradas no exame cito-morfológico. Sendo o IPOLFG um local privilegiado para o estudo de patologia oncológica, seria expectável obter amostras com infiltrações leptomeníngicas e, por conseguinte, perceber o desempenho do equipamento com as mesmas. Infelizmente, para o estudo, apesar das várias amostras suspeitas, nenhuma revelou infiltração por células neoplásicas. Uma investigação mais prolongada no tempo poderia colmatar esta carência.

Não obstante do facto de não se ter um número de amostras hemáticas que permitissem obter dados estatisticamente significativos, poder-se-ia ter realizado contagem manual (ou seja não dar resultado como >1000 eritrócitos/ μL) a todas as amostras hemáticas e assim obter dados mais robustos para determinar a capacidade do Alinity hq dar uma melhor estimativa dos resultados com eritrócitos $>1000/\mu\text{L}$.

Está previsto, para breve, a instalação de um módulo de fluidos biológicos no Alinity hq. Quando o mesmo for introduzido, é imperativo realizar novo estudo e averiguar se conseguimos obter valores críticos para os leucócitos e para os eritrócitos, que sejam compatíveis com os limites de aceitação definidos.

8. Bibliografia

1. Otto F, Harrer C, Pilz G, Wipfler P, Harrer A. Role and Relevance of Cerebrospinal Fluid Cells in Diagnostics and Research: State-of-the-Art and Underutilized Opportunities. Vol. 12, Diagnostics. MDPI; 2022.
2. Archetti C, Montanelli A, Finazzi D, Caimi L, Garrafa E. Clinical laboratory automation: a case study. *Journal of Public Health Research*. 2017.
3. Kjeldsber C, Knight J. Body fluids Laboratory Examination of Cerebrospinal, Seminal, Serous & Synovial Fluids. 3rd ed. American Society of Clinical Pathologist, editor. Vol. 1. 1993. 399.
4. Wick M, Gross CC, Tumani H, Wildemann B, Stangel M. cells Automated Analysis of Cerebrospinal Fluid Cells Using Commercially Available Blood Cell Analysis Devices-A Critical Appraisal. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3390/cells>
5. Herroelen PH, Demeester S, Damiaens S, Evenepoel A, Jochmans K. Performance of Abbott Alinity hq hematology analyzer for automated cell counting of body fluids. *Int J Lab Hematol*. 2022 Feb 28;44(1):96–103.
6. Sandhaus LM, Dillman CA, Hinkle WP, MacKenzie JM, Hong G. A New Automated Technology for Cerebrospinal Fluid Cell Counts. *Am J Clin Pathol*. 2017 May 1;147(5):507–14.
7. Otto F, Harrer C, Pilz G, Wipfler P, Harrer A. Role and Relevance of Cerebrospinal Fluid Cells in Diagnostics and Research: State-of-the-Art and Underutilized Opportunities. Vol. 12, Diagnostics. MDPI; 2022.
8. Fame RM, Lehtinen MK. Emergence and Developmental Roles of the Cerebrospinal Fluid System. Vol. 52, Developmental Cell. Cell Press; 2020. p. 261–75.
9. Spector R, Robert Snodgrass S, Johanson CE. A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. Vol. 273, *Experimental Neurology*. Academic Press Inc.; 2015. p. 57–68.
10. Seeley R, Stephens T, Tate P. Anatomia e Fisiologia. 1st ed. Madeira MA, editor. Vol. 1. Lisboa: Lusodidacta; 2001. 6–1054 p.
11. Wright BLC, Lai JTF, Sinclair AJ. Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: A practical review. Vol. 259, *Journal of Neurology*. 2012. p. 1530–45.
12. Cerebrospinal Fluid Analysis - American Family Physician [Internet]. 2003. Available from: www.aafp.org/afpAMERICANFAMILYPHYSICIAN1103
13. Nagy K, Skagervik I, Tumani H, Petzold A, Wick M, Kühn HJ, et al. Cerebrospinal fluid analyses for the diagnosis of subarachnoid haemorrhage and experience from a Swedish study. What method is preferable when diagnosing a subarachnoid haemorrhage? Vol. 51, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2013. p. 2073–86.
14. Shah KH, Edlow JA. Clinical Laboratory in Emergency Medicine DISTINGUISHING TRAUMATIC LUMBAR PUNCTURE FROM TRUE SUBARACHNOID HEMORRHAGE. 2002.

15. Te Loo DMWM, Kamps WA, Van Der Does-Van Den Berg A, Van Wering ER, De Graaf SSN. Prognostic significance of blasts in the cerebrospinal fluid without pleiocytosis or a traumatic lumbar puncture in children with acute lymphoblastic leukemia: Experience of the Dutch Childhood Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2006 May 20;24(15):2332–6.
16. Bourner G, De la Salle B, George T, Tabe Y, Baum H, Culp N, et al. ICSH guidelines for the verification and performance of automated cell counters for body fluids. *Int J Lab Hematol*. 2014 Dec 1;36(6):598–612.
17. van der Beken Y, van Dalem A, van Moer G, Segers E, Damiaens S, Hoffmann J, et al. Performance evaluation of the prototype Abbott Alinity hq hematology analyzer. *Int J Lab Hematol*. 2019 Aug 1;41(4):448–55.
18. Rodak BF. *Hematology Clinical Principles and Applications*. 2nd ed. Rodak BF, editor. Philadelphia: Andrew Allen; 2002. 0–835 p.
19. Pandey P, Pande A, Setya D, Kumar P, Shanker A. Comparative Study for Measurement of Residual Leucocytes in Leucodepleted Red Blood Cells by Two Different Methods. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 2020 Oct 1;36(4):740–4.
20. Roccaforte V, Daves M, Proserpio V, Sciarini F, Sangiorgio R, Costanzo A, et al. Evaluation of body fluid mode of Sysmex XN-9000 for white blood cell counts in cerebrospinal fluid. *J Lab Precis Med*. 2018;3:22–22.
21. Roccaforte V, Daves M, Proserpio V, Sciarini F, Sangiorgio R, Costanzo A, et al. Evaluation of body fluid mode of Sysmex XN-9000 for white blood cell counts in cerebrospinal fluid. *J Lab Precis Med*. 2018;3:22–22.
22. Yamanishi H, Imai N, Suehisa E, Kanakura Y, Iwatani Y. Determination of leukocyte counts in cerebrospinal fluid with a disposable plastic hemocytometer. *J Clin Lab Anal*. 2007;21(5):282–5.
23. Herroelen PH, Demeester S, Damiaens S, Evenepoel A, Jochmans K. Performance of Abbott Alinity hq hematology analyzer for automated cell counting of body fluids. *Int J Lab Hematol*. 2022 Feb 1;44(1):96–103.
24. Aguadero V, Cano-Corres R, Berlanga E, Torra M. Evaluation of biological fluid analysis using the sysmex XN automatic hematology analyzer. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018 Sep 1;94(5):680–8.
25. ADD-00061876-Alinity hq Casebook Third Edition.
26. Wright D, Lakos G. *Advances in Automated Hematology Analyzers: Optimizing Optical Technology*.
27. Bain B, Bates I, Lewis SM. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11th ed. Vol. 1. 2011. 1–653 p.
28. Fortin MF. *Fundamentos e etapas do processo de investigação*. Lusodidata. 2006. 3–595 p.
29. Bourner G, De la Salle B, George T, Tabe Y, Baum H, Culp N, et al. ICSH guidelines for the verification and performance of automated cell counters for body fluids. *Int J Lab Hematol*. 2014 Dec 1;36(6):598–612.

30. Doğan NÖ. Bland-Altman analysis: A paradigm to understand correlation and agreement. Vol. 18, Turkish Journal of Emergency Medicine. Emergency Medicine Association of Turkey; 2018. p. 139–41.
31. Bland JM, Altman DG. STATISTICAL METHODS FOR ASSESSING AGREEMENT BETWEEN TWO METHODS OF CLINICAL MEASUREMENT.
32. Briggs C, Culp N, Davis B, d'Onofrio G, Zini G, Machin SJ. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. *Int J Lab Hematol*. 2014 Dec 1;36(6):613–27.
33. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015;25(2):141–51.
34. Hoo ZH, Candlish J, Teare D. What is an ROC curve? *Emergency Medicine Journal*. 2017 Jun 1;34(6):357–9.
35. Alinity h-series Operations Manual_Portuguese.
36. Pum J. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. In: *Advances in Clinical Chemistry*. Academic Press Inc.; 2019. p. 215–81.

9. Anexos

Anexo I – Tabela de resultados

Nº AMOSTRA	CONTAGEM MANUAL LEUCÓCITOS (NºCÉLULAS / μ L)	CONTAGEM AUTOMÁTICA LEUCÓCITOS (NºCÉLULAS / μ L)	CONTAGEM MANUAL ERITRÓCITOS (NºCÉLULAS / μ L)	CONTAGEM AUTOMÁTICA ERITRÓCITOS (NºCÉLULAS / μ L)	ASPETO MACROSCÓPICO
1	3,2	4	0,8	0	Amostra límpida
2	1	1	140	0	Amostra límpida
3	0	1	0	0	Amostra límpida
4	0	3	0	0	Amostra límpida
5	0,8	1	0,8	0	Amostra límpida
6	4	2	166	0	Amostra límpida
7	0	1	147	0	Amostra límpida
8	1	1	5	0	Amostra límpida
9	0	3	0,8	0	Amostra límpida
10	0	4	0,8	0	Amostra límpida
11	0	3	2640	4000	Amostra hemática
12	21,6	21	22,4	0	Amostra límpida
13	40	34	0,8	0	Amostra límpida
14	0	1	400	1000	Amostra límpida
15	0	3	10	0	Amostra límpida
16	0	0	400	0	Amostra límpida
17	0	0	0	0	Amostra límpida
18	0	0	0,8	0	Amostra límpida
19	1	1	0,8	0	Amostra límpida
20	0	1	1	0	Amostra límpida
21	3	1	2	0	Amostra límpida
22	1	0	31	0	Amostra límpida
23	1	0	1	0	Amostra límpida
24	23	28	>1000	21000	Amostra hemática
25	1	3	362	0	Amostra límpida
26	0	1	1	0	Amostra límpida
27	1,2	3	134	0	Amostra límpida
28	0	3	18	0	Amostra límpida
29	7	11	0,8	0	Amostra límpida
30	1	0	1	0	Amostra límpida
31	2	0	390	1000	Amostra límpida
32	1	3	0,8	0	Amostra límpida
33	0	0	615	0	Amostra límpida
34	14	17	51	0	Amostra límpida
35	215	219	6	1000	Amostra límpida
36	0	0	0	0	Amostra límpida

37	0	1	0,8	0	Amostra límpida
38	0	1	9	0	Amostra límpida
39	0	0	12	0	Amostra límpida
40	0	4	450	0	Amostra turva
41	0	1	60	0	Amostra límpida
42	2	8	>1000	12000	Amostra hemática
43	0	27	>1000	22000	Amostra hemática
44	0	3	16	0	Amostra límpida
45	0	0	2	0	Amostra límpida
46	0,8	0	0,8	0	Amostra límpida
47	0	0	0	0	Amostra límpida
48	0	3	0	0	Amostra límpida
49	0	1	0	0	Amostra límpida
50	0	1	9	1000	Amostra límpida
51	1	1	26	0	Amostra límpida
52	10	22	>1000	8000	Amostra hemática
53	2	4	4	0	Amostra límpida
54	2	0	6	0	Amostra límpida
55	0	0	4	0	Amostra límpida
56	0	4	91	0	Amostra límpida
57	56	86	1382	4000	Amostra hemática
58	9,7	4	0,8	0	Amostra límpida
59	100	277	200	1000	Amostra límpida
60	4	6	240	1000	Amostra límpida
61	1	0	482	0	Amostra límpida
62	0	1	22	0	Amostra límpida
63	0,8	0	30	0	Amostra límpida
64	0	1	77	0	Amostra límpida
65	2,8	3	0,8	0	Amostra límpida
66	0	0	0,8	0	Amostra límpida
67	0	0	0,8	0	Amostra límpida
68	2,6	4	0,8	0	Amostra límpida
69	0	1	0	0	Amostra límpida
70	0	0	0,8	1000	Amostra límpida
71	1	0	19	0	Amostra límpida
72	1	1	0	0	Amostra límpida
73	0	0	0,8	0	Amostra límpida
74	1,1	3	0,8	0	Amostra límpida
75	0	0	8	0	Amostra límpida
76	0	3	0	0	Amostra límpida
77	0	1	0	0	Amostra límpida
78	0	0	9,6	0	Amostra límpida
79	0	1	2	1000	Amostra límpida
80	0,8	1	0,8	0	Amostra límpida
81	0	7	0	1000	Amostra límpida
82	0,8	0	0,8	0	Amostra límpida
83	4	6	16	0	Amostra límpida
84	146	134	2,4	0	Amostra límpida

85	0	3	6	0	Amostra límpida
86	0	0	1	0	Amostra límpida
87	1	0	0	0	Amostra límpida
88	0	1	2	0	Amostra límpida
89	0	0	2	0	Amostra límpida
90	4	2	>1000	4000	Amostra hemática
91	0,8	0	1,6	0	Amostra límpida
92	0,8	3	0,8	0	Amostra límpida
93	4,5	11	175	0	Amostra límpida
94	0	0	0	1000	Amostra límpida
95	0	3	0	0	Amostra límpida
96	0	4	0	0	Amostra límpida
97	0	1	0	0	Amostra límpida
98	0	0	1	0	Amostra límpida
99	0	1	7	0	Amostra límpida
100	0	6	35	1000	Amostra límpida
101	1	0	3	0	Amostra límpida
102	1,2	1	18	1000	Amostra límpida
103	0	0	14	0	Amostra límpida
104	1,2	3	0,8	0	Amostra límpida
105	1,8	3	0	0	Amostra límpida
106	0	1	1	0	Amostra límpida
107	0	14	0	1000	Amostra límpida
108	3,6	3	125	1000	Amostra límpida
109	0	0	0	0	Amostra límpida
110	0	0	0	0	Amostra límpida
111	1	1	0	0	Amostra límpida
112	6	14	>500	1000	Amostra turva
113	0,8	3	0,8	1000	Amostra límpida
114	0	1	0	1000	Amostra límpida
115	0	3	0	0	Amostra límpida
116	1	0	10	1000	Amostra límpida
117	810	81	4	0	Amostra límpida
118	1	1	>1000	33000	Amostra hemática
119	0	1	>1000	2000	Amostra hemática
120	1,6	1	0	0	Amostra límpida
121	0,8	1	7,2	0	Amostra límpida
122	0,8	1	4	0	Amostra límpida
123	1,2	4	6,4	0	Amostra límpida
124	0	1	100	0	Amostra límpida
125	1	0	0	0	Amostra límpida
126	0	0	14	0	Amostra límpida
127	0	1	5	0	Amostra límpida
128	1	0	0	0	Amostra límpida
129	0	1	0	0	Amostra límpida
130	1	1	500	3000	Amostra turva
131	1	0	0	0	Amostra límpida
132	4	6	0	0	Amostra límpida

133	0	1	0	0	Amostra límpida
134	0	1	461	0	Amostra límpida
135	52,5	34	0	0	Amostra límpida
136	166	168	0	0	Amostra límpida
137	12	7	56	0	Amostra límpida
138	6	1	>1000	34000	Amostra hemática
139	0	0	0	0	Amostra límpida
140	0	0	0	0	Amostra límpida
141	0	0	28	0	Amostra límpida
142	0	0	0	0	Amostra límpida
143	0	1	0	0	Amostra límpida
144	4	4	0	0	Amostra límpida
145	2	0	320	1000	Amostra límpida
146	0,4	0	12	0	Amostra límpida
147	0	1	0	0	Amostra límpida
148	7,2	4	5,2	0	Amostra límpida
149	2	1	>1000	1000	Amostra turva
150	0	1	21	1000	Amostra límpida
151	2	0	30	0	Amostra límpida
152	1	0	0	0	Amostra límpida
153	1	3	1	0	Amostra límpida
154	1	0	0	0	Amostra límpida
155	0	0	0	0	Amostra límpida
156	0	0	8	0	Amostra límpida
157	4	6	2	0	Amostra límpida
158	0	4	0	0	Amostra límpida
159	0	0	0	0	Amostra límpida
160	1	1	0	0	Amostra límpida
161	1	0	0	0	Amostra límpida
162	1,2	3	1	0	Amostra límpida
163	0	4	2	0	Amostra límpida
164	0	0	2	0	Amostra límpida
165	40	4	0	0	Amostra límpida
166	3	1	843	0	Amostra límpida
167	0	1	4	0	Amostra límpida
168	0	0	17,6	0	Amostra límpida
169	3	1	0	0	Amostra límpida
170	2	3	0	0	Amostra límpida
171	0	1	>1000	1000	Amostra turva
172	0	0	0	0	Amostra límpida
173	0	1	485	1000	Amostra turva
174	1	1	3	0	Amostra límpida
175	1	3	0,8	0	Amostra límpida
176	0,4	0	3	0	Amostra límpida
177	17	14	6	0	Amostra límpida
178	1	3	162	0	Amostra límpida
179	0	0	4	0	Amostra límpida
180	1	1	0	0	Amostra límpida

181	0	0	2	0	Amostra límpida
182	2	1	1	0	Amostra límpida
183	0	3	84	0	Amostra límpida
184	3,6	3	250	1000	Amostra límpida
185	2,4	13	14	0	Amostra límpida
186	0	3	0	0	Amostra límpida
187	1	30	95	0	Amostra límpida
188	7	1	0	0	Amostra límpida
189	0	0	0	0	Amostra límpida
190	24	23	67	0	Amostra límpida
191	10	6	>1000	3000	Amostra límpida
192	3	1	>1000	2000	Amostra turva
193	0	0	0	0	Amostra límpida
194	0,8	0	0	0	Amostra límpida
195	0	0	8	0	Amostra límpida
196	0	0	38	0	Amostra límpida
197	2	0	206	0	Amostra límpida
198	1	0	0	0	Amostra límpida
199	0,8	1	0	0	Amostra límpida
200	12	14	80	0	Amostra límpida
201	0,2	0	114	0	Amostra límpida
202	0,6	1	0,8	0	Amostra límpida
203	0	4	3	0	Amostra límpida
204	1	3	11	0	Amostra límpida
205	2	0	0	0	Amostra límpida
206	6	7	0	0	Amostra límpida
207	0,3	0	2	1000	Amostra límpida
208	1,6	3	0	0	Amostra límpida
209	5,6	7	1160	3000	Amostra turva
210	0	0	1	0	Amostra límpida
211	0	0	0	0	Amostra límpida
212	3	0	1	0	Amostra límpida
213	0	0	244	0	Amostra límpida
214	0	1	0	1000	Amostra límpida
215	0	4	124	0	Amostra límpida
216	0	1	1	0	Amostra límpida
217	0,8	3	0,4	0	Amostra límpida
218	0,2	3	0,8	0	Amostra límpida
219	6,1	4	0,8	0	Amostra límpida
220	1,6	1	0	0	Amostra límpida
221	3	0	0,5	0	Amostra límpida
222	400	497	0	0	Amostra turva

Anexo II – Resultados estatísticos dos leucócitos

Teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) – contagem automática

```
> ks.test(Resultados_LCR_bck$Contagem_Automática_Leucocitos, "pnorm")  
  
Asymptotic one-sample Kolmogorov-Smirnov test  
  
data: Resultados_LCR_bck$Contagem_Automática_Leucocitos  
D = 0.5, p-value < 2.2e-16  
alternative hypothesis: two-sided
```

Teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) – contagem manual

```
> ks.test(Resultados_LCR_bck$Contagem_Manual_Leucocitos, "pnorm")  
  
Asymptotic one-sample Kolmogorov-Smirnov test  
  
data: Resultados_LCR_bck$Contagem_Manual_Leucocitos  
D = 0.5, p-value < 2.2e-16  
alternative hypothesis: two-sided
```

Output do método Bland-Altman

```
$based.on  
[1] 221  
  
$lower.limit  
[1] -30.1822  
  
$mean.diffs  
[1] -2.002715  
  
$upper.limit  
[1] 26.17677  
  
$lines  
lower.limit mean.diffs upper.limit  
-30.182202 -2.002715 26.176772  
  
$CI.lines  
lower.limit.ci.lower lower.limit.ci.upper mean.diff.ci.lower mean.diff.ci.upper  
-33.48350418 -26.88089968 -3.90872267 -0.09670719  
upper.limit.ci.lower upper.limit.ci.upper  
22.87546982 29.47807431  
  
$two  
[1] 1.96  
  
$critical.diff  
[1] 28.17949
```

Anexo III – Resultados estatísticos dos eritrócitos

Teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) – contagem automática

```
> ks.test(Resultados_LCR_bck$Contagem_automática_eritrócitos, "pnorm")
```

Asymptotic one-sample Kolmogorov-Smirnov test

data: Resultados_LCR_bck\$Contagem_automática_eritrócitos

D = 0.5, p-value < 2.2e-16

alternative hypothesis: two-sided

Teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) – contagem manual

```
> ## test normal distribution
```

```
> ks.test(Resultados_LCR_bck$Contagem_manual_eritrócitos, "pnorm")
```

Asymptotic one-sample Kolmogorov-Smirnov test

data: Resultados_LCR_bck\$Contagem_manual_eritrócitos

D = 0.5, p-value < 2.2e-16

alternative hypothesis: two-sided

Output do método Bland-Altman

```
$based.on
```

```
[1] 209
```

```
$lower.limit
```

```
[1] -934.6369
```

```
$mean.diffs
```

```
[1] -106.3603
```

```
$upper.limit
```

```
[1] 721.9163
```

```
$lines
```

```
lower.limit mean.diffs upper.limit
-934.6369 -106.3603 721.9163
```

```
$CI.lines
```

```
lower.limit.ci.lower lower.limit.ci.upper mean.diff.ci.lower mean.diff.ci.upper upper.limit.ci.lower
-1034.45037 -834.82341 -163.98763 -48.73295 622.10284
upper.limit.ci.upper
821.72980
```

```
$two
```

```
[1] 1.96
```

```
$critical.diff
```

```
[1] 828.2766
```

Anexo IV – Código em R da estatística

```
## Bland-Altman for Fred
# 2-2-2023

## correr com e sem valores hemorragicos

# Set library path (only for Filipe)
#.libPaths(c("C:/Rlib/4.1"))

## Install needed libraries (only need to do this once)
install.packages("BlandAltmanLeh")
install.packages("ggplot2")
#install.packages("SimplyAgree")
#install.packages("mcr")

## Load needed libraries
library(BlandAltmanLeh)
library(ggplot2)
library(readxl)
library(plotly)
library(dplyr)
library(gridExtra)
library(pROC)
library(tidyr)
#library(SimplyAgree)
#library(mcr)

## load the data
Resultados_LCR <- read_excel("/Users/filipebraganca/Downloads/OneDrive-2023-04-30/Resultados LCR_R_11_4_23.xlsx", col_types = c("numeric", "numeric", "numeric", "numeric", "numeric", "numeric", "text"))

data_plot = data.frame(table(Resultados_LCR$Comentários))
## Gráfico com caracterização da amostra
fig <- plot_ly(data_plot, labels = ~Var1, values = ~Freq, type = 'pie', textinfo='label+percent')
fig <- fig %>% layout(title = 'Caracterização de amostras',
                    xaxis = list(showgrid = FALSE, zeroline = FALSE, showticklabels = FALSE),
                    yaxis = list(showgrid = FALSE, zeroline = FALSE, showticklabels = FALSE))

fig

## Grafico com N leucócitos com N leucócitos < 5 e > ou = a 5
Resultados_LCR$N_leucocitos_categoria[Resultados_LCR$Contagem_Manual_leucocitos < 5] <- 'Leucocitos <5'
```

```
Resultados_LCR$N_leucocitos_categoria[Resultados_LCR$Contagem_Manual_leucó
itos>=5] <- 'Leucocitos >=5'
data_plot1 = data.frame(table(Resultados_LCR$N_leucocitos_categoria))
```

```
Resultados_LCR$N_leucocitos_categoria[Resultados_LCR$Contagem_Automática_leu
cócitos< 5] <- 'Leucocitos <5'
```

```
Resultados_LCR$N_leucocitos_categoria[Resultados_LCR$Contagem_Automática_leu
cócitos>=5] <- 'Leucocitos >='
data_plot2 = data.frame(table(Resultados_LCR$N_leucocitos_categoria))
```

```
data_plot_final = data_plot1
data_plot_final$Freq2 = data_plot2$Freq
```

```
fig <- plot_ly()
fig <- fig %>% add_pie(data = data_plot_final, labels = ~Var1, values = ~Freq,
name = "Contagem_Manual_leucócitos", domain = list(row = 0, column
= 0))
fig <- fig %>% add_pie(data = data_plot_final, labels = ~Var1, values = ~Freq2,
name = "Contagem_Automática_leucócitos", domain = list(row = 0,
column = 1))
fig <- fig %>% layout(title = "Contagem de leucocitos", showlegend = T,
grid=list(rows=1, columns=2),
xaxis = list(showgrid = FALSE, zeroline = FALSE, showticklabels =
FALSE),
yaxis = list(showgrid = FALSE, zeroline = FALSE, showticklabels =
TRUE))
```

```
fig ## FIXME add missing title on subplots ##
```

```
## Grafico com N eritrocitos com N Eritrocitos < 5 e > ou = a 5
```

```
Resultados_LCR$N_eritrocitos_categoria[Resultados_LCR$Contagem_manual_eritró
itos< 1000] <- 'Eritrocitos <1000'
```

```
Resultados_LCR$N_eritrocitos_categoria[Resultados_LCR$Contagem_manual_eritró
itos>=1000] <- 'Eritrocitos >=1000'
```

```
Resultados_LCR$N_eritrocitos_categoria[is.na(Resultados_LCR$Contagem_manual_
eritrócitos)] <- 'Eritrocitos >=1000'
```

```
data_plot1 = data.frame(table(Resultados_LCR$N_eritrocitos_categoria))
```

```
Resultados_LCR$N_eritrocitos_categoria[Resultados_LCR$Contagem_automática_eri
trócitos< 1000] <- 'Eritrocitos <1000'
```

```
Resultados_LCR$N_eritrocitos_categoria[Resultados_LCR$Contagem_automática_eri
trócitos>=1000] <- 'Eritrocitos >=1000'
```

```
data_plot2 = data.frame(table(Resultados_LCR$N_eritrocitos_categoria))
```

```

data_plot_final = data_plot1
data_plot_final$Freq2 = data_plot2$Freq

fig <- plot_ly()
fig <- fig %>% add_pie(data = data_plot_final, labels = ~Var1, values = ~Freq,
                      name = "Contagem_Manual_eritrocitos", domain = list(row = 0, column
= 0))
fig <- fig %>% add_pie(data = data_plot_final, labels = ~Var1, values = ~Freq2,
                      name = "Contagem_Automática_eritrocitos", domain = list(row = 0,
column = 1))
fig <- fig %>% layout(title = "Contagem de eritrocitos", showlegend = T,
                     grid=list(rows=1, columns=2),
                     xaxis = list(showgrid = FALSE, zeroline = FALSE, showticklabels =
FALSE),
                     yaxis = list(showgrid = FALSE, zeroline = FALSE, showticklabels =
TRUE))

fig ## FIXME add missing title on subplots ##

# make a copy of teh data for the plot
Resultados_LCR_bck <- Resultados_LCR

### Remove outlier
Resultados_LCR <- Resultados_LCR[!Resultados_LCR$`Nº Amostra`== 117,] #
remove outlier
eq <- function(x,y) {
  m <- lm(y ~ x)
  as.character(
    as.expression(
      substitute(italic(y) == a + b %.% italic(x)*", "~italic(r)^2~"=~r2,
                list(a = format(coef(m)[1], digits = 4),
                      b = format(coef(m)[2], digits = 4),
                      r2 = format(summary(m)$r.squared, digits = 3)))
    )
  )
}

p1<-      ggplot(aes(x          =(Contagem_Manual_leucócitos),          y
=(Contagem_Automática_leucócitos) ),
  data =Resultados_LCR_bck) + geom_point()+ geom_smooth(method = 'lm', formula=
y~x, se=FALSE )+
  ggtitle('Antes da remoção do outlier')+
  annotate("text", x = 500, y = 20, label = "Outlier") +
  annotate("segment", x = 600, xend = 750, y = 20, yend = 70,
          colour = "red", linewidth = 1, arrow = arrow())+
  geom_text(x          =          300,          y          =          400,          label          =
eq(Resultados_LCR_bck$Contagem_Manual_leucócitos,
          Resultados_LCR_bck$Contagem_Automática_leucócitos),
  parse = TRUE)

p2<-      ggplot(aes(x          =(Contagem_Manual_leucócitos),          y
=(Contagem_Automática_leucócitos) ),

```

```

data =Resultados_LCR) + geom_point()+ geom_smooth(method ='lm',formula=
y~x, se=FALSE ) +
  ggtitle('Após remoção do outlier.')+
  geom_text(x = 150, y = 400, label =
eq(Resultados_LCR$Contagem_Manual_leucócitos,
Resultados_LCR$Contagem_Automática_leucócitos), parse
= TRUE)

grid.arrange(p1,p2,nrow=1)

# Plot Leucocitos Bland altman
bland.altman.plot(Resultados_LCR$Contagem_Manual_leucócitos,
Resultados_LCR$Contagem_Automática_leucócitos ,
main="Bland-Altman Leucocitos", xlab="Means",
ylab="Differences",conf.int=.95, pch=19)

bland.altman.stats(log(Resultados_LCR$Contagem_Manual_leucócitos+1),
log(Resultados_LCR$Contagem_Automática_leucócitos+1))

## display critical value
Resultados_LCR$N_leucicitos_categoria[Resultados_LCR$Contagem_Manual_leucóc
itos< 28.17] <- 'Leucocitos <Critical diff'
Resultados_LCR$N_leucicitos_categoria[Resultados_LCR$Contagem_Manual_leucóc
itos>=28.17] <- 'Leucocitos >=Critical diff'

data_plot = data.frame(table(Resultados_LCR$N_leucicitos_categoria))
## Gráfico com caracterização da amostra
fig <- plot_ly(data_plot, labels = ~Var1, values = ~Freq, type =
'pie',textinfo='label+percent')
fig <- fig %>% layout(title = 'Distribuicao das amostras em relacao ao valor critico',
xaxis = list(showgrid = FALSE, zeroline = FALSE, showticklabels =
FALSE),
yaxis = list(showgrid = FALSE, zeroline = FALSE, showticklabels =
FALSE))

fig

# Plot Eritrocitos Bland altman

# Plot Leucocitos Bland altman

# remove NA
Resultados_LCR_bck
Resultados_LCR_bck[!is.na(Resultados_LCR_bck$Contagem_manual_eritrocitos),] <-

# regression
# formula para a regressao
eq <- function(x,y) {
m <- lm(y ~ x)
as.character(

```

```

as.expression(
  substitute(italic(y) == a + b %.% italic(x)**", "~italic(r)^2~"="~r2,
    list(a = format(coef(m)[1], digits = 4),
        b = format(coef(m)[2], digits = 4),
        r2 = format(summary(m)$r.squared, digits = 3)))
)
)
}

ggplot(aes(x =(Contagem_manual_eritrócitos), y =(Contagem_automática_eritrócitos)
),
  data =Resultados_LCR_bck) + geom_point()+ geom_smooth(method
='lm',formula= y~x, se=FALSE ) +
  ggtitle('Contagem de eritrócitos')+
  geom_text(x = 700, y = 3500, label =
eq(Resultados_LCR_bck$Contagem_manual_eritrócitos,
    Resultados_LCR_bck$Contagem_automática_eritrócitos),
  parse = TRUE)

p1<- ggplot(aes(x =(Contagem_Manual_leucócitos), y
=(Contagem_Automática_leucócitos) ),
  data =Resultados_LCR_bck) + geom_point()+ geom_smooth(method
='lm',formula= y~x, se=FALSE )+
  ggtitle('Antes da remoção do outlier')+
  annotate("text", x = 500, y = 20, label = "Outlier") +
  annotate("segment", x = 600, xend = 750, y = 20, yend = 70,
    colour = "red", linewidth = 1, arrow = arrow()+
  geom_text(x = 300, y = 400, label =
eq(Resultados_LCR_bck$Contagem_Manual_leucócitos,
    Resultados_LCR_bck$Contagem_Automática_leucócitos),
  parse = TRUE)

# bland altman
bland.altman.plot(Resultados_LCR_bck$Contagem_manual_eritrócitos,
Resultados_LCR_bck$Contagem_automática_eritrócitos ,
  main="Bland-Altman Eritrocitos", xlab="Means",
  ylab="Differences",conf.int=.95, pch=19)

bland.altman.stats(Resultados_LCR_bck$Contagem_manual_eritrócitos,
Resultados_LCR_bck$Contagem_automática_eritrócitos)

## Avaliar o nivel de concordancia
"text"))
Teste_de_reprodutibilidade <- read_excel("Downloads/OneDrive-2023-04-30/Teste de
reprodutibilidade.xlsx")

CV=sd(Teste_de_reprodutibilidade$Leucócitos) /
mean(Teste_de_reprodutibilidade$Leucócitos)
CV

```

```
## CURVA ROC ### FIXME ##
data_long <- gather(Resultados_LCR, condition, measurement,
Contagem_Manual_leucócitos:Contagem_Automática_leucócitos, factor_key=TRUE)
data_long
#define object to plot
ROC_leucocitos <- roc(condition ~measurement , data = data_long, smooth = FALSE )

#create ROC plot
ggroc(ROC_leucocitos)

coords(ROC_leucocitos,x="best", as.list=TRUE,best.method=c('youden'))
auc(ROC_leucocitos)

## test normal distribution
ks.test(Resultados_LCR_bck$Contagem_Manual_leucócitos, "pnorm")

## test normal distribution
ks.test(Resultados_LCR_bck$Contagem_automática_eritrócitos, "pnorm")

# IQR and median for data
# Leucocitos
summary(Resultados_LCR$Contagem_Automática_leucócitos)
summary(Resultados_LCR$Contagem_Manual_leucócitos)
summary(Resultados_LCR$Contagem_Automática_leucócitos)
summary(Resultados_LCR$Contagem_Manual_leucócitos)
# Eritrocitos
summary(Resultados_LCR$Contagem_automática_eritrócitos)
summary(Resultados_LCR$Contagem_manual_eritrócitos,na.rm = TRUE)
summary(Resultados_LCR$Contagem_automática_eritrócitos,na.rm = TRUE)
summary(Resultados_LCR$Contagem_manual_eritrócitos,na.rm = TRUE)
```

Anexo V – Autorização concelho de ética do IPOLFG



INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DE LISBOA
FRANCISCO GENTIL, E.P.E.

Unidade de Investigação Clínica

185201

NOTA DE SERVIÇO

De: Unidade de Investigação Clínica
Conceição Costa

Data: 08/11/2022

Para: Dra. Lucília Salgado
Diretora Clínica

N.º : 85/2022

Assunto: Projeto de investigação “Quantificação celular no Líquido Cefalorraquidiano: estudo comparativo entre método manual e Alinity HQ” – UIC/1540.

Obtidos os pareceres favoráveis do Conselho de Investigação e da Comissão de Ética, submeto para autorização final o estudo mencionado em epígrafe.

Com os melhores cumprimentos,


Conceição Costa
Unidade de Investigação Clínica

Autorizado
Lucília Salgado
20/2/23

LUCÍLIA SALGADO
Diretora Clínica

Anexo VI – Autorização do conselho de ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

CE-ESTeSL-Nº.104 - 2022 - Frederico Bragança

De [Comissão Ética <conselhodeetica@estesl.ipl.pt>](mailto:conselhodeetica@estesl.ipl.pt) em 2022-12-23 13:14

[Detalhes](#) [Cabeçalhos](#) [Texto simples](#)

REFERÊNCIA INTERNA DO PROJETO: CE-ESTeSL-Nº. 104 -2022 – Frederico Bragança

TÍTULO DO PROJETO: Quantificação celular no Líquido cefalorraquidiano: estudo comparativo entre método manual e Alinity HQ

Tipo de Projeto/Estudo: Investigação 2º ciclo

INVESTIGADOR/A RESPONSÁVEL: Frederico Bragança

Equipa: Profª. Doutora Edna Soraia Gregório Ribeiro - ESTeSL

INSTITUIÇÃO PROMOTORA: Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Instituto Politécnico de Lisboa

Instituição(ões) envolvidas: Instituto Português de Oncologia de Lisboa; ESTESL-IPL;

Exma. Senhora Profª. Doutora Edna Ribeiro

Exmo. Senhor Dr. Frederico Bragança, estudante de mestrado

Pela análise do conteúdo da proposta apresentada, conclui-se que a investigação em causa tem pertinência, é clara nos seus objetivos, explícita nas suas opções metodológicas e no essencial dos procedimentos relativos à recolha dos dados. O objetivo fundamental do estudo consiste em comparar duas técnicas laboratoriais de quantificação celular com vista à sua automatização, a partir de amostras de doentes de qualquer serviço do IPOLFG (n – 400), não implicando que os doentes em causa sejam sujeitos a qualquer procedimento adicional ou que sejam usados dados de saúde dos mesmos.

A Comissão de Ética da ESTeSL (CE-ESTeSL) aprovou por unanimidade a emissão de parecer favorável. Não obstante, e como recomendação, sublinhamos a salvaguarda de que os dados sejam anonimizados previamente a serem entregues ao investigador.

Lembramos que todos os estudos que envolvem a autorização dos participantes e a recolha de amostras e dados anonimizados e/ou codificados têm de cumprir com o estabelecido no Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados de 27 de abril de 2016.

Por último, solicita-se que, ao abrigo do artº 19 da Lei 21/2014 de 16 de abril e do disposto no nº 23 da atual versão da Declaração de Helsínquia, seja dado conhecimento à CE-ESTeSL do relatório final, com as conclusões do estudo, bem como de eventuais alterações ao protocolo de investigação e demais informações tidas por relevantes.

Aproveitamos ainda para desejar o maior sucesso no desenvolvimento deste trabalho.

Com os melhores cumprimentos

Rute Borrego

Anexo VII – Cronograma de atividades

Atividades	2022				2023					
	9	10	11	12	01	02	03	04	05	06
Redação da tese	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Pesquisa Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Criação e otimização do protocolo	X	X	X	X	X					
Processamento de amostras				X	X	X	X			
Tratamento estatístico				X	X	X	X			
Interpretação de resultados				X	X	X	X	X		
Conclusões						X	X	X	X	
Validação e implementação							X	X	X	
Entrega da tese										X