

Quantificação de células totais no líquido cefalorraquidiano: Poderá o Alinity hq ser uma alternativa eficaz?

Total cell quantification in Cerebrospinal Fluid: Can Alinity hq be an effective alternative?

Frederico Bragança^{1,2}, Rui Barreira¹, Edna Ribeiro^{3*} 

¹Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, R. Prof. Lima Basto 1099-023, Lisboa, Portugal.

²Escola Superior de Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Av. D. João II, lote 4.69.01, Parque das Nações, 1990-096 Lisboa, Portugal.

³H&TRC- Health & Technology Research Center, ESTeSL- Escola Superior de Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Av. D. João II, lote 4.69.01, Parque das Nações, 1990-096 Lisboa, Portugal.

*Autor correspondente/Corresponding author: edna.ribeiro@estesl.ipl.pt

Recebido/Received: 25-03-2026; Revisto/Revised: 04-05-2026; Aceite/Accepted: 08-05-2026

Resumo

Introdução: A quantificação celular no líquido cefalorraquidiano (LCR) é um método crítico para o diagnóstico de hemorragia subaracnoidea, patologias neuroinflamatórias e neoplásicas. Apesar dos inúmeros avanços tecnológicos em analisadores hematológicos automáticos, a contagem de células do LCR ainda é um procedimento manual em diversos laboratórios de patologia clínica. Como consequência tem-se um procedimento mais moroso e laborioso, que exige profissionais experientes e não obstante apresenta alta variabilidade intra e interoperador. **Métodos:** Para avaliar a possibilidade de automatizar a contagem de células do LCR, foi realizado um estudo comparativo-descritivo para validar e implementar o método. Foi realizada uma comparação entre o método manual de contagem de células do LCR (método de referência) e o analisador automático Alinity hq em 222 amostras do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil. Os dados foram analisados estatisticamente pelo método de Bland-Altman para determinar os limites de concordância entre ambos os métodos e a capacidade do Alinity hq (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Hematology, 2012, Santa Clara, CA, EUA) para discriminar amostras patológicas (≥ 5 leucócitos/ μL) de amostras normais (< 5 leucócitos/ μL). **Resultados:** Os leucócitos apresentaram uma diferença média entre a contagem manual e a contagem automática de $-2,0$ leucócitos/ μL e uma concordância de $[-30,18$ a $26,18$ leucócitos/ μL]. Para a contagem de eritrócitos, obtivemos uma diferença média de $-106,36$ eritrócitos/ μL e uma concordância de $[-934,64$ a $721,96$ eritrócitos/ μL]. **Conclusão:** O baixo conteúdo celular do LCR e os valores de referência clinicamente aceites impostos para o método são um obstáculo à implementação da automatização na prática clínica.

Palavras-chave: Líquido cefalorraquidiano; Hemocitómetro; Automação; Contagem diferencial de células.

Abstract

Introduction: Cell quantification in the cerebrospinal fluid (CSF) is a critical method for the diagnosis of subarachnoid bleeding, neuro-inflammatory and neoplastic pathologies. Despite the numerous technological advances in automatic hematology analyzers, CSF cell count is still a manual microscopy procedure in several clinical pathology laboratories and therefore a technique not only time-consuming but also labour-intensive, requiring experienced laboratory staff and with a high intra- and inter-operator variability. **Methods:** To assess the possibility of automating the CSF cell count, a comparative-descriptive study was conducted to validate and implement the method. A comparison between the manual CSF cell counts method (reference method) and the Alinity hq automatic analyzer was performed on 222 samples from the Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil. Data was analyzed statistically by Bland-Altman to determine the limits of agreement between both methods and the ability of Alinity hq (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Hematology, Santa Clara, CA, USA) to discriminate pathological samples (≥ 5 leucocytes/ μL) from normal samples (< 5 leucocytes/ μL). **Results:** Leucocytes demonstrated a mean difference between manual count and automatic count of $-2,0$ leucocytes/ μL and an agreement of $[-30,18$ to $26,18$ leucocytes/ μL]. For erythrocyte counts, we obtained a mean difference of $-106,36$ erythrocytes/ μL and an agreement of $[-934,64$ to $721,96$ erythrocytes/ μL]. **Conclusion:** The CSF's low cellular content and the clinically accepted reference values imposed for the method are a hindrance to implementing automation in clinical practice.

Keywords: Cerebrospinal fluid; Hemocytometer; Automation; Cell differential count

1. INTRODUÇÃO

O líquido cefalorraquidiano (LCR) tem sido foco de interesse de vários grupos de investigação, nomeadamente daqueles que realizam diagnóstico utilizando técnicas moleculares, e os desenvolvimentos alcançados trouxeram novas perspectivas relativamente ao diagnóstico de inúmeras patologias, tratamentos e até novos campos de investigação (Ferdinand-Otto *et al.*, 2022). A automatização nos laboratórios de patologia clínica tem impulsionado avanços tecnológicos, principalmente no que diz respeito à padronização de procedimentos, rapidez na obtenção de resultados, segurança dos profissionais e redução de erros (Claudia-Archetti *et al.*, 2017). Embora a contagem celular no LCR seja um procedimento fundamental num serviço de patologia clínica, particularmente na área da hematologia, quando existem suspeitas de doenças neuroinflamatórias, hemorragias subaracnoideais e doenças hemato-oncológicas (Carl-Kjeldsberg *et al.*, 1993), o procedimento continua a ser realizado manualmente por microscopia e requer a disponibilidade total de profissionais altamente qualificados (Manfred-Wick *et al.*, 2021). Até à data, a metodologia de referência para este procedimento é a contagem manual num hemocitómetro (Pauline-Herroelen *et al.*, 2022) (e.g., com uma câmara de contagem de Fuchs-Rosenthal ou Nageotte), seguida de contagem diferencial por microscopia (Manfred-Wick *et al.*, 2021). A implementação de contadores celulares automáticos para LCR apresenta vários desafios, sobretudo relacionados com a amostra, incluindo o baixo conteúdo celular, bem como a identificação de células anormais/não hematopoiéticas que possam estar presentes nas amostras (Manfred-Wick *et al.*, 2021). Apesar de alguns equipamentos possuírem protocolos específicos para a contagem de células nucleadas totais em fluidos biológicos, a sua baixa sensibilidade analítica traduz-se numa limitação tecnológica, com implicações na validade prática do método. Além disso, se os contadores celulares não forem capazes de diferenciar valores normais de valores patológicos, a sua utilização permanece questionável (Pauline-Herroelen *et al.*, 2022; Linda-Sandhaus *et al.*, 2017).

Embora alguns laboratórios já tenham implementado a contagem celular do LCR utilizando contadores automáticos (G.-Bourner *et al.*, 2014), vários estudos sustentam a necessidade de validação e verificação internas para assegurar especificações de desempenho que podem não estar contempladas nos dados do fabricante (G.-Bourner *et al.*, 2014).

Neste estudo, tivemos como objetivo comparar a contagem celular do LCR tradicionalmente realizada por microscopia manual já implementada no nosso laboratório, com o analisador hematológico Alinity hq, de forma a avaliar a sua eventual implementação para amostras de LCR. Procurámos também compreender que tipo de informação adicional, fornecida pelo Alinity hq (e.g., *flags* e citogramas), poderia ser útil para o subsequente exame citomorfológico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS

As amostras (N=222) obtidas para fins de diagnóstico de rotina por punção lombar foram recolhidas em tubos de centrifugação não estéreis com fundo cónico, tampa de

1. INTRODUCTION

Cerebrospinal fluid (CSF) has been a focus of interest of several research groups, namely those who make diagnoses using molecular techniques, and the developments achieved have brought new perspectives about the diagnosis of numerous pathologies, treatments, and even new fields of research (Ferdinand-Otto *et al.*, 2022). Automation in clinical pathology laboratories has endorsed technological advances, mainly concerning the standardization of procedures, speed of results, safety of professionals, and reduction of errors (Claudia-Archetti *et al.*, 2017). Although CSF cell count is a fundamental procedure in a clinical pathology service, particularly in the area of hematology, when neuro-inflammatory diseases, subarachnoid hemorrhages, and hemato-oncological diseases are suspected (Carl-Kjeldsberg *et al.*, 1993), the procedure is still carried out by manual microscopy and requires the full availability of highly qualified professionals (Manfred-Wick *et al.*, 2021). To date, the reference methodology for the procedure is manual counting in a hemocytometer (Pauline-Herroelen *et al.*, 2022) (e.g., with a Fuchs-Rosenthal or Nageotte counting chamber), followed by differential counting by microscopy (Manfred-Wick *et al.*, 2021). The implementation of automatic cell counters for CSF has several challenges, mostly sample-related, including low cellular content, as well as the identification of abnormal/non-hematopoietic cells that might be present in the samples (Manfred-Wick *et al.*, 2021). Even though some equipment has specific protocols for counting total nucleated cells in biological fluids, their low analytical sensitivity translates into a limitation of the technology, which has implications for the practical validity of the method. Furthermore, if cell counters are not capable of differentiating normal from pathological values, then their use remains questionable (Pauline-Herroelen *et al.*, 2022; Linda-Sandhaus *et al.*, 2017).

Although some laboratories have already implemented CSF cell counting using automatic counters (G.-Bourner *et al.*, 2014), several studies support the need for internal validation and verification to ensure performance specifications that may be absent from the manufacturer's data (G.-Bourner *et al.*, 2014).

In this study, we aimed to compare the CSF cell counting traditionally performed by manual microscopy already in place in our laboratory, and Alinity hq haematology analyzer, to assess its eventual implementation for CSF samples. We have also tried to understand what kind of further information, provided by the Alinity hq (e.g., *flags* and cytograms), could be useful for the subsequent cytomorphological examination.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. SAMPLES

Samples (N=222) obtained for routine diagnostic purposes by lumbar puncture were collected in non-sterile centrifuge tubes with a conical bottom, with a screw cap, without anticoagulants or additives, according to standard collection procedures. Samples originated from patients with haematologic malignancies, in which central nervous system (CNS) involvement is a serious complication and early detection and management of CNS involvement significantly influence the prognosis. The sampling method was non-probabilistic and performed by rational choice (Marie-Fortin, 2006). CSF

rosca, sem anticoagulantes ou aditivos, de acordo com os procedimentos padrão de colheita. As amostras tiveram origem em doentes com neoplasias hematológicas, nas quais o envolvimento do sistema nervoso central (SNC) constitui uma complicação grave e cuja detecção e abordagem precoces influenciam significativamente o prognóstico. O método de amostragem foi não probabilístico e realizado por escolha racional (Marie-Fortin, 2006). Foram selecionadas amostras de LCR com volume mínimo de 0,5 mL, considerado suficiente para contagem celular manual numa câmara de Nageotte, contagem celular automatizada no Alinity hq e, no caso de amostras patológicas, citocentrifugação com eventual concentração celular.

2.2. CONTAGEM CELULAR MANUAL

As amostras foram processadas assim que chegaram ao laboratório. Após receção, foi realizada uma observação macroscópica preliminar para caracterizar a amostra como límpida, turva, hemática ou xantocrômica.

A contagem celular manual na câmara de Nageotte foi realizada através de procedimentos padronizados. Resumidamente, após homogeneização da amostra, uma câmara de Nageotte limpa e seca foi humedecida com água destilada e coberta com uma lamela fina, sendo posteriormente preenchida adequadamente. Após sedimentação celular, foi efetuada análise microscópica utilizando uma objetiva de 40X, sendo contabilizados os leucócitos e/ou eritrócitos presentes na amostra. Para a contagem de leucócitos em amostras hemáticas, os eritrócitos foram lisados utilizando ácido acético (60,05 g/mol) misturado com a amostra em partes iguais. As amostras hemáticas consideradas resultantes de punção traumática foram reportadas ao clínico e classificadas como contaminadas. Para as amostras de doentes com leucemia linfoblástica aguda (LLA), os eritrócitos foram contados e, quando necessário, a amostra foi diluída com solução de cloreto de sódio a 0,9% (diluição 1:2).

2.3. CONTAGEM CELULAR NO CONTADOR AUTOMÁTICO ALINITY HQ

O Alinity hq é um analisador hematológico que não possui modo para fluidos biológicos e utiliza apenas princípios óticos para todas as medições. A tecnologia de contagem celular é a *Multi-Angle Polarized Scatter Separation* (MAPSS™), já previamente testada noutros sistemas de contagem celular (Yolien-Van der Beken et al., 2019). As contagens celulares no Alinity hq foram realizadas praticamente em simultâneo com as contagens manuais, em modo aberto (após homogeneização manual) e após leitura do background, de forma a assegurar que o contador cumpria os critérios de desempenho necessários e evitar contaminação da amostra. Considerando o baixo conteúdo celular do LCR, o limite para leitura de background foi de 1 leucócito/ μ L.

2.4. EXAME CITOMORFOLÓGICO

Para as amostras cujos resultados de contagem manual ultrapassaram os valores de referência, foi realizada uma contagem diferencial celular após citocentrifugação da amostra

samples with a minimum volume of 0.5 mL were selected, as it was considered sufficient volume for manual cell counting in a Nageotte chamber, automated cell counting in Alinity hq, and, in case of pathological samples, cyto centrifugation with eventual cell concentration.

2.2. MANUAL CELL COUNT

Samples were processed as soon as they arrived at the laboratory. Upon receipt, a preliminary macroscopic observation was made to characterize the sample as clear, cloudy, hematic, or xanthochromic.

Manual cell counting in the Nageotte chamber was performed through standard procedures. Briefly, after homogenizing the sample, a clean and dry Nageotte chamber was moistened with distilled water and then covered with a thin coverslip and properly filled. After allowing the cells to settle, microscopic analysis was carried out using a 40X objective, and leukocytes and/or erythrocytes present in the sample were counted. For leukocyte count in hematic samples, erythrocytes were lysed using acetic acid (60.05g/mol) mixed with the sample in equal quantities. Hematic samples that were considered to be the result of a traumatic puncture were reported to the clinician and classified as contaminated. For the acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients' samples, erythrocytes were counted and, when necessary, the sample was diluted with a 0.9% sodium chloride solution (1:2 dilution).

2.3. CELL COUNTING IN ALINITY HQ AUTOMATIC CELL COUNTER

Alinity hq is a haematology analyzer that has no body fluids mode, and it only uses optical principles for all measurements. The cell counting technology is the *Multi-Angle Polarized Scatter Separation* (MAPSS™), which has already been tried and tested in other cell counting systems (Yolien-Van der Beken et al., 2019). Cell counts on the Alinity hq were conducted practically at the same time as the manual counts, with the open mode (after manual homogenization) and following a background reading, in order to ensure that the counter meets the necessary performance criteria and to avoid sample contamination. Considering the low cellular content of CSF, the limit for background reading was 1 leukocyte/ μ L.

2.4. CYTOMORPHOLOGICAL EXAMINATION

For samples whose manual counting results were higher than the reference values, a cellular differential count was carried out after cyto centrifugation of the sample and subsequent staining with May-Grünwald-Giemsa (MGG). This procedure was done for the purpose of determining whether certain cell types (e.g. tumor cells) would have greater interference with the cell counts. For sample cyto centrifugation, 100 μ L of previously homogenized CSF was pipetted into a cyto centrifugation funnel and centrifuged for 2 minutes at 20 RCF in the Shandon Cytospin II cyto centrifuge (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA). After drying, the slides were stained according to the established protocol at our laboratory: pure May-Grünwald for 7 minutes (fixing is done in this step), Giemsa diluted 1:10 in distilled water for 10 minutes, followed by washing for 3 minutes with running water and slide

e posterior coloração com May-Grünwald-Giemsa (MGG). Este procedimento foi efetuado com o objetivo de determinar se determinados tipos celulares (e.g. células tumorais) teriam maior interferência nas contagens celulares. Para a citocentrifugação das amostras, foram pipetados 100µL de LCR previamente homogeneizado para um funil de citocentrifugação e centrifugados durante 2 minutos a 20 RCF no citocentrífugo Shandon Cytospin II (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA). Após secagem, as lâminas foram coradas de acordo com o protocolo estabelecido no laboratório: May-Grünwald puro durante 7 minutos (a fixação ocorre nesta etapa), Giemsa diluído 1:10 em água destilada durante 10 minutos, seguido de lavagem durante 3 minutos com água corrente e secagem da lâmina. As amostras coradas foram posteriormente observadas ao microscópio ótico. As amostras com contagem leucocitária inferior a 50 células/µL foram concentradas por centrifugação a 350 RCF durante 10 minutos, de forma a aumentar a sensibilidade do método.

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados através do software R versão 4.2.2. Copyright © 2022. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi inicialmente aplicado para determinar a normalidade da população. A análise de concordância foi realizada para leucócitos e eritrócitos utilizando o método de Bland-Altman, uma vez que permite determinar se existe concordância entre os resultados obtidos, sem comprometer a interpretação clínica dos resultados (J. Martin-Bland et al., 1986; C.-Briggs et al., 2014; Nurettin-Doğan, 2018). Foi elaborado um gráfico de dispersão em que o eixo X representa a média de duas medições $[(M1+M2)/2]$ e o eixo Y representa a diferença entre duas medições $(M1-M2)$. Foram quantificados o valor médio da diferença – $\bar{d}$ (valor médio de $M1-M2$) – e os intervalos de confiança (intervalos de concordância). A média e o desvio-padrão foram calculados com o teste t. Para os leucócitos, de forma a determinar a capacidade do Alinity hq de diferenciar amostras normais (< 5 leucócitos/µL) de amostras patológicas (≥ 5 leucócitos/µL), foi também realizada uma curva ROC (Receiver Operating Characteristic). A AUC (área sob a curva), sensibilidade e especificidade foram obtidas através do índice de Youden.

2.6. 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.

3. RESULTADOS

No presente estudo, foram processadas 222 amostras de LCR obtidas no SPC do IPOLFG para comparar métodos de contagem celular no LCR. Relativamente à análise macroscópica realizada, as amostras foram caracterizadas como límpidas (91,4%), hemáticas (4,5%) e turvas (4,05%). A análise dos dados da contagem de leucócitos revelou que o número mínimo de leucócitos obtido em ambos os métodos foi de 0 leucócitos/µL, enquanto a contagem máxima obtida foi de 810 e 497 leucócitos/µL, respetivamente para o método manual e para o Alinity hq. Relativamente aos eritrócitos, também foi obtida uma contagem mínima de 0 eritrócitos/µL em ambos os métodos, enquanto a contagem

drying. Stained samples were then observed under an optical microscope. Samples with a leukocyte count lower than 50 cells/µL were concentrated by centrifugation at 350 RCF for 10 minutes in order to increase the method's sensitivity.

2.5. STATISTICAL ANALYSIS

The obtained data was analyzed through the R software version 4.2.2. Copyright © 2022. Kolmogorov-Smirnov test was applied first to determine the population's normality. Agreement analysis was performed for leucocytes and erythrocytes using the Bland-Altman method, as it allows for determining whether there is agreement between the results obtained, without compromising the clinical interpretation of the results (J. Martin-Bland et al., 1986; C.-Briggs et al., 2014; Nurettin-Doğan, 2018). A scatterplot was drawn in which the X-axis represents the average of two measurements $[M1+M2]/2$ and the Y-axis represents the difference between two measurements $(M1-M2)$. The average value of the difference – $\bar{d}$ (average value of $M1-M2$) – and the confidence intervals (intervals of agreement) were quantified. Mean and standard deviation were calculated with the t-test. For leucocytes, to determine Alinity hq's ability to differentiate normal (< 5 leucocytes/µL) and pathologic (≥ 5 leucocytes/µL) CSF samples, ROC (Receiver Operating Characteristic) curve was also performed. AUC (area under the curve), sensitivity, and specificity were obtained by the Youden index.

2.6. ETHICAL AND LEGAL CONSIDERATIONS

This study was approved by the IPOLFG Health Ethics Committee, with reference UIC/1540, and by the ESTeSL Ethics Committee, with reference CE-ESTeSL-Nº. 104-2022.

3. RESULTS

In the present study, 222 CSF samples obtained from the IPOLFG SPC were processed to compare CSF cell counting methods. Regarding the performed macroscopic analysis, samples were characterized as clear (91.4%), hematic (4.5%), and turbid (4.05%). Leukocyte count data analysis revealed that the minimum number of leukocytes obtained in both methods was 0 leukocytes/µL, while the maximum count obtained was 810 and 497 leukocytes/µL, for the manual method and Alinity hq, respectively. Regarding erythrocytes, a minimum count of 0 erythrocytes/µL was also obtained in both methods, whereas a maximum of 2640 erythrocytes/µL was obtained with the manual counting and 34000 erythrocytes/µL with Alinity hq. Considering the manufacturer's specifications, although the lowest erythrocyte value is 0/ µL, the following results are then available in 1000/ µL increments. The distribution of leukocyte quantifications by manual and automatic methods was associated with cellular concentrations above and below the normal value (WBC counts $<5/\mu\text{L}$ and $\geq 5/\mu\text{L}$). The vast majority of the samples were considered within normal ranges (< 5 leukocytes/µL), with 87.4% and 84.7% normal samples, respectively, for the manual and the automated methods. The erythrocyte quantification distribution obtained by the two methods was associated with cellular concentrations above and below 1000 erythrocytes/µL, with a higher discrepancy between methods than for leucocytes. 92.8% of manual

máxima foi de 2640 eritrócitos/ μL no método manual e 34000 eritrócitos/ μL no Alinity hq. Considerando as especificações do fabricante, embora o valor mínimo de eritrócitos seja 0/ μL , os resultados seguintes encontram-se disponíveis em incrementos de 1000/ μL . A distribuição das quantificações leucocitárias pelos métodos manual e automático foi associada a concentrações celulares acima e abaixo do valor normal (contagens de leucócitos $<5/\mu\text{L}$ e $\geq 5/\mu\text{L}$). A grande maioria das amostras foi considerada dentro dos valores normais (< 5 leucócitos/ μL), com 87,4% e 84,7% de amostras normais, respectivamente, para o método manual e para o método automatizado. A distribuição da quantificação eritrocitária obtida pelos dois métodos foi associada a concentrações celulares acima e abaixo de 1000 eritrócitos/ μL , verificando-se uma discrepância maior entre métodos do que para os leucócitos. 92,8% das amostras manuais e 82% das amostras analisadas no Alinity hq apresentaram menos de 1000 eritrócitos/ μL .

3.1. QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS

Após obtenção dos resultados e antes da avaliação da concordância, foi executado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se o conjunto de dados apresentava distribuição normal, o que não se verificou.

Os resultados da quantificação de leucócitos demonstraram que as diferenças entre os dois métodos variam na mesma ordem de grandeza, independentemente da classificação do aspeto macroscópico da amostra.

Os dados foram analisados utilizando o método de Bland-Altman, e os resultados encontram-se representados na Figura 1. Os valores médios das contagens celulares realizadas pelos dois métodos estão representados no eixo X e, no eixo Y, estão representadas as diferenças entre os dois métodos. A diferença média calculada ($\bar{d}$) entre as medições foi de -2,00, e os limites superior e inferior de concordância ($\bar{d} \pm 1,96$ desvio padrão) foram de 26,18 e -30,18, respectivamente. O valor crítico identificado para o método (1,96 desvio-padrão - $\bar{d}$) foi de 28,18. A análise do gráfico de dispersão sugere que, para baixas contagens leucocitárias, as diferenças dos métodos em relação ao valor médio se encontram maioritariamente dentro dos limites de concordância; contudo, à medida que as contagens leucocitárias aumentam, observaram-se alguns resultados fora desses limites. No entanto, não foi possível estabelecer um padrão que sugerisse, por exemplo, que quanto maior o número celular, maiores seriam as diferenças entre os métodos.

A grande maioria das amostras analisadas (95,9%) encontrava-se abaixo do valor crítico de leucócitos (28.179 leucócitos/ μL) obtido pelo método de Bland-Altman.

Considerando a elevada relevância da contagem celular do LCR para o diagnóstico e monitorização de diversas patologias, nomeadamente neoplasias hematológicas, considerámos também crucial construir uma curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), de forma a determinar a capacidade do Alinity hq de discriminar se a amostra é patológica (≥ 5 leucócitos/ μL) ou normal (<5 leucócitos/ μL). A Figura 2 representa a curva ROC do Alinity hq para leucócitos, considerando que o teste é negativo se os leucócitos forem $<5/\mu\text{L}$ e positivo se forem $\geq 5/\mu\text{L}$. A sensibilidade obtida através do índice de Youden foi de 0,665, a especificidade foi de 0,543 e a AUC foi de 0,5835.

samples and 82% of Alinity hq samples had less than 1000 erythrocytes/ μL .

3.1. LEUKOCYTE QUANTIFICATION

Upon obtaining the results and before assessing their agreement, Kolmogorov-Smirnov test was executed to test whether the dataset was normally distributed, which did not occur.

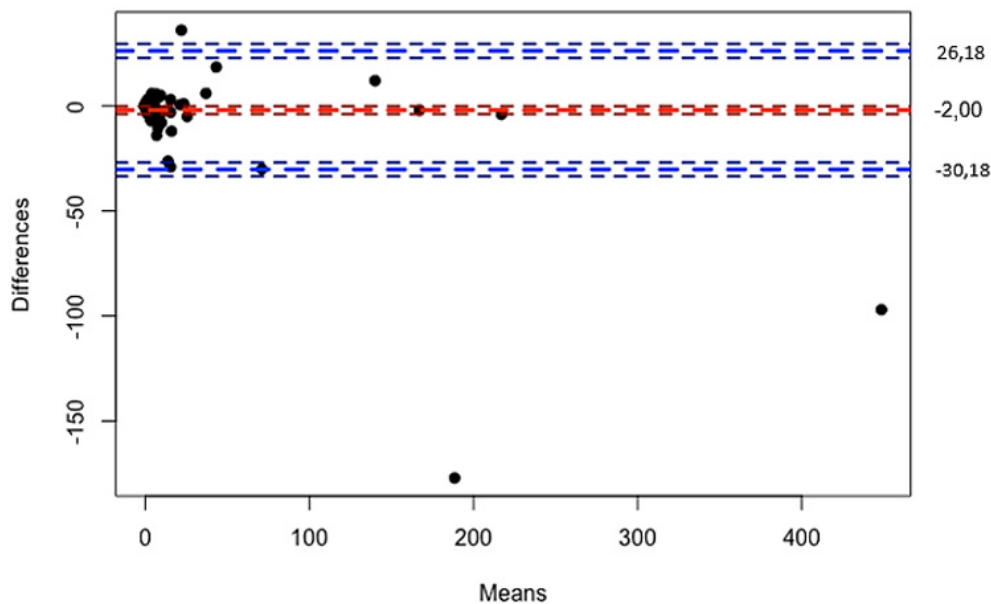
Leukocyte quantification results showed that the differences between the two methods vary in the same order of magnitude, regardless of the classification of the macroscopic appearance of the sample.

Data were analyzed using the Bland-Altman method, and results are shown in Figure 1. The mean values of the performed cell counts obtained by the two methods are represented on the X axis and in the Y axis are represented the differences between the two methods. Calculated mean difference ($\bar{d}$) between measurements was -2.00, and the upper and lower limits of agreement ($\bar{d} \pm 1.96$ standard deviation) are 26.18 and -30.18, respectively. The identified critical value of the method (1.96 standard deviation - $\bar{d}$) is 28.18. Scatterplot analysis suggests that, for low leukocyte counts, the differences of the methods in relation to the mean value are mostly within the limits of agreement, but as the leukocyte counts increase, we found a few results outside these limits. However, we were unable to establish a pattern that suggests, for example, that the higher the cellular numbers, the greater the differences between the methods.

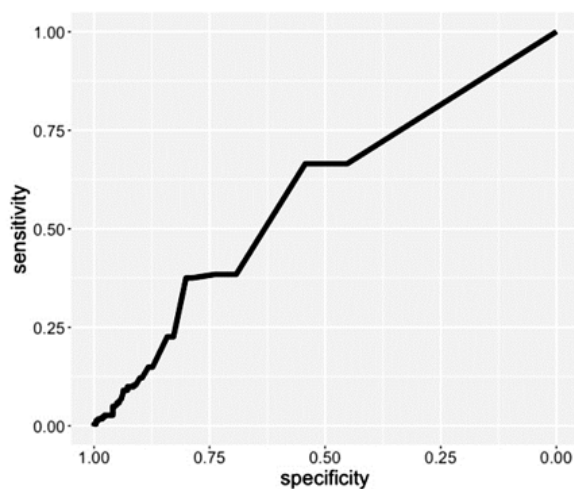
The vast majority of the analyzed samples (95.9%) were below the critical value of leukocytes (28.179 leukocytes/ μL) obtained by Bland-Altman analysis.

Considering the great relevance of CSF cell count for the diagnosis and monitoring of various pathologies, namely haematological malignancies, we also considered it crucial to create a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve to determine the ability of the Alinity hq in discriminating whether the sample is pathologic (≥ 5 leukocytes/ μL) or normal (<5 leukocytes/ μL). Figure 2 represents Alinity hq ROC curve for leukocytes, considering that the test is negative if leukocytes $<5/\mu\text{L}$ and positive if $\geq 5/\mu\text{L}$. The sensitivity obtained by the Youden index was 0.665, the specificity was 0.543, and the AUC was 0.5835.

Bland-Altman Leucocytes



Figura/Figure 1: Gráfico de dispersão da análise de concordância leucocitária, utilizando o método de Bland-Altman. No eixo X encontra-se a média das contagens obtidas pelos dois métodos e, no eixo Y, a diferença entre a contagem manual e a contagem automática. A linha vermelha representa $\bar{d}$ (média das diferenças das contagens) e as linhas azuis representam os limites de concordância (1,96 DP ou 95%)./Scatter plot of leukocyte concordance analysis, using the Bland-Altman method. On the X axis, is the average of the counts obtained by two methods, and on the Y axis, is the difference between manual counting and automatic counting. The red line represents $\bar{d}$ (mean of count differences) and the blue lines represent the limits of agreement (1,96 SD or 95%).



Figura/Figure 2: Curva ROC dos leucócitos, apresentando no eixo X 1 – especificidade (taxa de falsos positivos) e no eixo Y a sensibilidade./ROC curve of leukocytes, showing on the X axis 1 – specificity (false positive rate) and the Y axis the sensitivity

3.2. QUANTIFICAÇÃO DE ERITRÓCITOS

Após obtenção dos resultados e antes da avaliação da concordância, foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se o conjunto de dados apresentava distribuição normal, o que não se verificou.

A concordância dos resultados eritrocitários foi calculada utilizando apenas 208 amostras. Foi utilizado um menor número de amostras devido ao facto da morosidade da contagem manual (Pauline-Herroelen *et al.*, 2022; Vincenzo-Roccaforte *et al.*, 2018; Manfred-Wick *et al.*, 2021) e também porque a própria contagem de eritrócitos possui reduzido valor

3.2. ERYTHROCYTE QUANTIFICATION

Upon obtaining the results and before assessing the agreement, Kolmogorov-Smirnov test was performed to test whether our dataset was normally distributed, which it wasn't.

Erythrocyte results agreement was calculated using only 208 samples. Fewer samples were used due to manual counting taking a longer time (Pauline-Herroelen *et al.*, 2022; Vincenzo-Roccaforte *et al.*, 2018; Manfred-Wick *et al.*, 2021) and also the erythrocyte count itself has little diagnostic value (erythrocytes suggest blood contamination during collection – traumatic tap) (Carl-Kjeldsberg *et al.*, 1993), and thus the result is given as >

diagnóstico (os eritrócitos sugerem contaminação sanguínea durante a colheita – punção traumática)(Carl-Kjeldsberg et al., 1993), sendo por isso o resultado reportado como > 1000 eritrócitos/ μL , o que impossibilita a análise estatística, bem como a comparação entre métodos.

Para a quantificação eritrocitária, o valor utilizado para representar a distribuição das amostras, nomeadamente <1000 eritrócitos/ μL e ≥ 1000 eritrócitos/ μL , corresponde ao limite de detecção do equipamento Alinity hq. A maioria das amostras apresentou contagem eritrocitária $<1000/\mu\text{L}$; contudo, a discrepância entre ambos os métodos foi superior à observada para os leucócitos. Os resultados da contagem manual revelaram contagens eritrocitárias $<1000/\mu\text{L}$ em 92,8% das amostras e $\geq 1000/\mu\text{L}$ em 7,21%; os resultados obtidos no Alinity hq demonstraram contagens eritrocitárias $<1000/\mu\text{L}$ em 82% das amostras e $\geq 1000/\mu\text{L}$ em 18%.

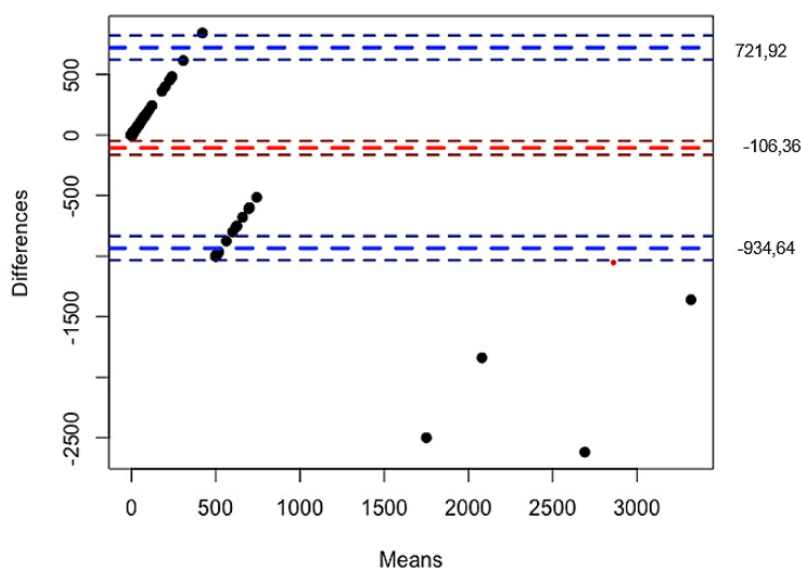
A avaliação da potencial concordância entre métodos para a contagem eritrocitária utilizando o método de Bland-Altman encontra-se representada na Figura 3. Os valores médios das contagens obtidas pelos dois métodos estão representados no eixo X e, no eixo Y, as diferenças entre os dois métodos. A diferença média calculada ($\bar{d}$) entre as medições foi de -106,36, e os limites superior e inferior de concordância ($\bar{d} \pm 1,96$ desvio-padrão) foram de 721,92 e -934,64, respetivamente. O valor crítico do método ($1,96$ desvio-padrão – $\bar{d}$) foi de 828,28. Não foi observada dispersão dos resultados em torno da média em qualquer intervalo de resultados.

1000 erythrocytes/ μL . This makes statistical analysis impossible, as well as the method comparison.

For erythrocyte quantification, the value used to represent the sample distribution, namely <1000 erythrocytes/ μL and ≥ 1000 erythrocytes/ μL , represents the detection limit of the equipment Alinity hq. The majority of samples had an erythrocyte count $< 1000/\mu\text{L}$; however, the discrepancy between the two methods was greater than for leukocytes. Results by manual counting revealed erythrocyte counts $<1000/\mu\text{L}$ in 92.8% of the samples and $\geq 1000/\mu\text{L}$ in 7.21%; results in Alinity hq produced erythrocyte counts $<1000/\mu\text{L}$ 82% of the samples and $\geq 1000/\mu\text{L}$ in 18%.

The assessment of potential agreement of methods for erythrocyte cell counts using the Bland-Altman method is represented in Figure 3. The mean values of the counts obtained by the two methods are represented on the X axis, and the Y axis represents the differences between the two methods. Calculated mean difference ($\bar{d}$) between measurements was -106.36, and upper and lower limits of agreement ($\bar{d} \pm 1.96$ standard deviation) are 721.92 and -934.64, respectively. The critical value of the method (1.96 standard deviation – $\bar{d}$) is 828.28. No dispersion of results around the mean in any range of results was observed.

Bland-Altman Erythrocytes



Figura/Figure 3: Gráfico de dispersão da análise de concordância eritrocitária, utilizando o método de Bland-Altman. No eixo X encontra-se a média das contagens obtidas pelos dois métodos e, no eixo Y, a diferença entre a contagem manual e a contagem automática. A linha vermelha representa $\bar{d}$ (média das diferenças das contagens) e as linhas azuis representam os limites de concordância. Scatter plot of erythrocyte concordance analysis, using the Bland-Altman method. On the X axis, is the average of the counts obtained by two methods, and on the Y axis, is the difference between manual counting and automatic counting. The red line represents $\bar{d}$ (mean of count differences) and the blue lines represent the limits of agreement.

4. DISCUSSÃO

Os laboratórios procuram cada vez mais implementar soluções automatizadas, associadas a ganhos no tempo de resposta e na precisão (Vicente-Aguadero *et al.*, 2018) e, em contextos de escassez de profissionais, permitem utilizar as competências dos profissionais de laboratório clínico onde estas são mais necessárias. A contagem manual de células no LCR pode estar associada a atrasos nos resultados, variabilidade de dados e requer a presença constante de pessoal qualificado (Vicente-Aguadero *et al.*, 2018; Manfred-Wick *et al.*, 2021). Os contadores celulares automáticos são uma realidade nos laboratórios modernos há décadas e, como tal, nos últimos anos, numerosos estudos têm sido realizados para determinar se podem representar uma alternativa para a prática clínica tradicional (Manfred-Wick *et al.*, 2021). Contudo, persistem algumas desvantagens intrínsecas relativamente a estes equipamentos: (1) o seu principal objetivo é contar células no sangue e, por isso, possuem intervalos analíticos de medição (AMR – *Analytical Measurement Range*) inadequados para as baixas concentrações celulares do LCR; (2) a matriz do LCR difere consideravelmente da matriz sanguínea (plasma); (3) em condições patológicas, podem estar presentes no LCR determinadas células não habitualmente observadas no sangue (e.g. células não hematopoiéticas), pelo que o equipamento não consegue classificá-las e estas podem potencialmente interferir na contagem (Vicente-Aguadero *et al.*, 2018). Consequentemente, a incapacidade dos contadores celulares de diferenciar valores normais de valores patológicos resulta numa aplicação prática reduzida ou inviável (Linda-Sandhaus *et al.*, 2017; Manfred-Wick *et al.*, 2021).

O presente estudo teve como objetivo comparar os dados da contagem celular do LCR obtidos utilizando o método manual de referência e o método automatizado no contador celular Alinity hq, de forma a avaliar se o método automatizado poderia ser implementado na rotina laboratorial.

Utilizando o método de Bland-Altman, avaliámos o grau e o significado das diferenças nas contagens celulares entre os dois métodos, apesar de os critérios de aceitação do método terem sido definidos com base em critérios clínicos (Davide-Giavarina, 2015). Para os leucócitos, o valor utilizado para definir a aceitação do método foi de 5 / μ L e, para os eritrócitos, 10 / μ L, valor acima do qual uma punção traumática deve ser considerada (D. Maroeska-Loo *et al.*, 2006).

Considerando que, para a quantificação eritrocitária no Alinity hq, os resultados eram reportados começando em 0 eritrócitos/ μ L e posteriormente em intervalos de 1000 eritrócitos/ μ L, tornou-se evidente que a concordância entre métodos não seria possível e que o método não se adequava ao nosso objetivo. Por outro lado, a análise dos dados leucocitários demonstrou que a grande maioria dos resultados apresentava baixas concentrações celulares. A diferença média ($\bar{d}$) obtida entre os dois métodos (método manual – Alinity hq) foi de -2,00 leucócitos/ μ L, significando que o Alinity hq sobrevaloriza, em média, a contagem do método manual em cerca de 2 leucócitos/ μ L. Através do cálculo do desvio-padrão das diferenças entre ambos os métodos, foi possível calcular os limites de concordância entre os métodos. Os limites de concordância, obtidos pela fórmula: $d \pm 1,96$ desvio-padrão, foram [-30,18 a 26,18]. Estes limites significam que 95% das diferenças obtidas

4. DISCUSSION

Laboratories increasingly seek to implement automated solutions, which are associated with gains in turnaround time and in precision (Vicente-Aguadero *et al.*, 2018) and in a labor shortage environment, it allows the utilization of the skills of medical laboratory professionals where they are most needed. Manual CSF cell counting can be associated with delayed results, data variability, and requires the constant presence of qualified personnel (Vicente-Aguadero *et al.*, 2018; Manfred-Wick *et al.*, 2021). Automatic cell counters have been a reality in modern laboratories for decades, and as such, in recent years, numerous studies have been carried out to determine whether they can represent an alternative to traditional clinical practice (Manfred-Wick *et al.*, 2021). However, there still subsist some intrinsic disadvantages regarding the latter: (1) their main goal is to count cells in the blood and as such have analytical measurement ranges (AMR – *Analytical Measurement Range*) that are not suitable for the low cellular concentrations of CSF; (2) the CSF matrix differs considerably from the blood matrix (plasma); (3) in pathological conditions, certain cells may be present in the CSF that are not usually seen in the blood (e.g. non-hematopoietic cells), therefore the equipment is unable to classify them and potentially they can interfere with the count (Vicente-Aguadero *et al.*, 2018). Consequently, the inability of cell counters to differentiate normal from pathological values results in a decreased or unfeasible practical application (Linda-Sandhaus *et al.*, 2017; Manfred-Wick *et al.*, 2021).

Here, we aimed to compare CSF cell count data, obtained using the standard manual method and the automated method in the Alinity hq cell counter, in order to evaluate whether the automation method could be implemented in the laboratory routine.

Using Bland-Altman analyses, we have analyzed the degree and meaning of the differences in cell counts between the two methods, even though the method acceptance criteria was defined based on clinical data (Davide-Giavarina, 2015). For leukocytes, the value used to define acceptance of the method was 5 / μ L, and 10 / μ L for erythrocytes, the value above which a traumatic puncture should be considered (D. Maroeska-Loo *et al.*, 2006).

Considering that for erythrocytes quantification in Alinity hq, the results were reported starting at 0 erythrocytes/ μ and then at intervals of 1000 erythrocytes/ μ L, it became clear that the agreement of methods would not be possible, and the method would not fit our purpose. On the other hand, leukocyte data analysis demonstrated that the vast majority of results had low cellular concentrations. The average difference ($\bar{d}$) obtained between the two methods (manual method – Alinity hq) was -2.00 leukocytes/ μ L, meaning that Alinity hq overvalues the manual method count, on average, by around 2 leukocytes / μ L. By calculating the standard deviation of the differences between both methods, we can calculate the limits of agreement between the methods. The limits of agreement, obtained by the formula: $d \pm 1.96$ standard deviation, are [-30.18 to 26.18]. These limits mean that 95% of the differences obtained between methods can vary up to ± 28.179 leukocytes/ μ L. This result constitutes the method's

entre métodos podem variar até $\pm 28,179$ leucócitos/ μL . Este resultado constitui o valor crítico do método, representando o valor acima do qual o equipamento poderia ser utilizado, neste caso, muito acima do limite de aceitação estabelecido. As diferenças obtidas nas contagens celulares dentro deste intervalo foram atribuídas a diferenças inerentes aos métodos, enquanto as diferenças fora dos limites identificados resultaram de limitações técnicas do Alinity hq. Como a maioria das amostras apresentava baixas concentrações leucocitárias, consideramos pertinente determinar a capacidade do equipamento de diferenciar amostras normais de amostras patológicas. Para atingir este objetivo, obtivemos uma curva ROC com uma AUC de 0,5835, sugerindo que o Alinity hq apresenta um desempenho discriminatório baixo. Globalmente, considerando que a grande maioria das amostras se encontra abaixo do valor crítico, a implementação desta metodologia como rotina não é viável, exceto possivelmente em situações em que não existam profissionais qualificados disponíveis e apenas como ferramenta de triagem.

As diferenças entre os métodos podem ser explicadas por limitações técnicas inerentes:

(1) O principal objetivo do Alinity hq é contar células no sangue periférico, cujas concentrações celulares são muito superiores. As amostras com baixa celularidade (5 – 30 leucócitos/ μL) são aquelas em que a imprecisão do equipamento é maior (Manfred-Wick *et al.*, 2021) e nas quais diferenças nos valores obtidos, mesmo que pequenas, podem ter implicações clínicas.

Embora os eritrócitos não possuam valores de referência ou valores críticos de decisão no LCR tão rigorosos como os leucócitos, deve pelo menos tentar-se quantificar pequenas contaminações sanguíneas (<1000 eritrócitos/ μL) (Manfred-Wick *et al.*, 2021). Relativamente à utilização do Alinity hq para fornecer uma melhor estimativa de amostras muito hemáticas, e considerando que geralmente o método manual reporta o resultado como >1000 eritrócitos/ μL , deve ter-se em conta que o software do fabricante bloqueia valores inferiores a 1000 eritrócitos/ μL devido à baixa precisão dos resultados (Manfred-Wick *et al.*, 2021) e que o AMR do Alinity hq varia entre $0,1 \times 10^6/\mu\text{L}$ e $8,08 \times 10^6/\mu\text{L}$, o que significa que, para valores dentro deste intervalo, existem garantias de precisão fornecidas pelo fabricante; contudo, poderíamos afirmar o mesmo para valores entre 1000 e 10000 eritrócitos/ μL ? Embora tenhamos algumas amostras quantificadas manualmente com resultados desta ordem de grandeza, o valor crítico obtido pela análise de Bland-Altman (828,28 eritrócitos/ μL) sugere que esta possibilidade é viável. Um desenvolvimento futuro a considerar para contrariar estas limitações seria a instalação de um módulo (software) para fluidos biológicos, já disponível em alguns fabricantes, com menores diluições e utilização de um maior volume de amostra.

(2) O ambiente do LCR é tóxico para as células e limita significativamente a sua sobrevivência (Ferdinand-Otto *et al.*, 2022). Assim, a utilização de reagentes que induzem lise eritrocitária durante o pré-tratamento da amostra pode conduzir a contagens inferiores às obtidas manualmente.

(3) O procedimento do estudo exige que, antes do processamento das amostras de LCR para análise no Alinity

critical value, representing the result above which we can use the equipment, in this case, well above the established acceptance limit. The differences obtained in the cell counts that are within this range are attributed to differences inherent to the methods, and the out-of-bounds differences identified were the result of Alinity hq technical limitations. As most samples had low concentrations of leukocytes, we considered it pertinent to determine the equipment's ability to differentiate between normal and pathological samples. In order to achieve this goal, we obtained a ROC curve with an AUC of 0.5835, suggesting that the Alinity hq does have a low acceptable discriminatory performance. Overall, considering that the vast majority of samples are below the critical value, the implementation of this methodology as a routine is not feasible, with the possible exception, when there are no available qualified professionals, and only as a screening.

The differences between the methods can be explained by inherent technical limitations:

(1) the Alinity hq main objective is to count cells in peripheral blood, whose cell concentrations are much higher. Samples with low cellularity (5 – 30 leukocytes/ μL) are those where the equipment's inaccuracy is greater (Manfred-Wick *et al.*, 2021) and whose differences in values are found, however small they may be, may have clinical implications.

Although erythrocytes do not have CSF reference values or critical decision values as stringent as leukocytes, one should at least try to quantify small blood contaminations (<1000 erythrocytes/ μL) (Manfred-Wick *et al.*, 2021). Concerning using Alinity hq to give a better estimate of very hematic samples, and that generally, the manual method gives the result as >1000 erythrocytes/ μL , it must be taken into account that the manufacturers' software blocks values below 1000 erythrocytes/ μL , due to the low precision of the results (Manfred-Wick *et al.*, 2021) and that the AMR of Alinity hq is from $0.1 \times 10^6/\mu\text{L}$ to $8.08 \times 10^6/\mu\text{L}$, which means that for values within this range, we would have accuracy guarantees from the manufacturer, but could we do so for values between 1000 and 10000 erythrocytes/ μL ? Although we have a few manually quantified samples with results of this order of magnitude, the critical value obtained by Bland-Altman analysis (828.28 erythrocytes/ μL) suggests that this possibility is feasible. A development to be taken into account in the future that could counter these limitations would be the installation of a biological fluids module (software), already available by some manufacturers, with lower dilutions and using a larger sample volume.

(2) CSF environment is toxic to cells and greatly limits their lifespan (Ferdinand-Otto *et al.*, 2022). Therefore, the use of reagents that induce erythrocyte lysis during sample pretreatment may lead to counts that are lower than manual counts.

(3) The study procedure requires that, before processing CSF samples for Alinity hq analysis, one or more background readings must be undertaken to guarantee the performance of the equipment. When performing the background reading, the transfer of blood components from a sample generally with high cellularity to another with low cellularity, or a CSF dilution with a non-blood sample processed previously (carry-

hq, sejam realizadas uma ou mais leituras de *background* para garantir o desempenho do equipamento. Durante a leitura de *background*, deve evitar-se a transferência de componentes sanguíneos de uma amostra geralmente com elevada celularidade para outra com baixa celularidade, ou uma diluição do LCR com uma amostra não sanguínea previamente processada (*carry-over*) (G.-Bourner et al., 2014; Joachim-Pum, 2019). Nos contadores hematológicos, a principal preocupação relativamente ao fenómeno de *carry-over* está associada à sobrevalorização das contagens. Caso ocorra o fenómeno de pré-diluição, o equipamento não cumprirá os seus critérios de desempenho e este facto representará certamente um problema não apenas para as amostras de LCR, mas também para outras amostras biológicas, bem como para os resultados do controlo interno de qualidade. Assim, em todos os contadores celulares que utilizam sistemas de pipetagem automática, deve ser realizado um estudo de *carry-over* (Joachim-Pum, 2019). Considerando a baixa celularidade do LCR, a avaliação do potencial *carry-over* é essencial e, caso os resultados não estejam de acordo com os limites de aceitação, deve ser solicitada manutenção ou intervenção no equipamento (G.-Bourner et al., 2014).

(4) As contagens mais elevadas obtidas com o Alinity hq, comparativamente ao método manual, podem ser explicadas por partículas distintas de leucócitos ou eritrócitos que podem influenciar as contagens (Manfred-Wick et al., 2021). Entre os possíveis interferentes incluem-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 equipamento (Manfred-Wick et al., 2021). O aperfeiçoamento dos algoritmos de leitura de *background* poderá eventualmente ultrapassar estas interferências.

O reduzido número de amostras patológicas obtidas não permitiu recolher dados estatisticamente significativos para determinar que informação poderia ser extraída dos citogramas e *flags* do Alinity hq.

Globalmente, os nossos resultados não suportam a implementação do contador celular Alinity hq para quantificação leucocitária e/ou eritrocitária no LCR na rotina laboratorial.

5. CONCLUSÃO

A contagem e diferenciação celular no LCR são cruciais para o diagnóstico de várias patologias relacionadas com o SNC. Apesar das características tecnológicas do Alinity hq e do facto de cumprir todos os requisitos para os quais foi concebido, as contagens celulares no LCR continuam a representar um desafio, sobretudo devido aos baixos valores de referência. Tanto para leucócitos como para eritrócitos, os valores de concordância obtidos para a implementação da contagem celular não estavam de acordo com os limites de aceitação clinicamente definidos. Assim, o Alinity hq não pode ser considerado útil para a contagem de células do LCR em substituição do método manual tradicional. Adicionalmente, a elevada percentagem de amostras reportadas com resultados abaixo do valor crítico opõe-se à utilização do Alinity hq como ferramenta de triagem.

over), must be avoided (G.-Bourner et al., 2014; Joachim-Pum, 2019). In hematological counters, the main concern with the carry-over phenomenon is associated with counting overvaluation. If the pre-dilution phenomenon occurs, the equipment will not meet its performance criteria, and this fact will certainly not only represent a problem for CSF samples, but also for other biological samples, as well as for the results of the internal quality control. Therefore, on all the cell counters that use auto-pipetting systems, a carry-over study should be conducted (Joachim-Pum, 2019). Considering CSF low cellularity, potential carry-over assessment is essential, and if the results are not in accordance with the acceptance limits, maintenance or intervention on the equipment must be requested (G.-Bourner et al., 2014).

(4) The higher counts obtained with Alinity hq, compared to the manual method, can be explained by particles other than leukocytes or erythrocytes that can influence the counts (Manfred-Wick et al., 2021). Possible interferers include microbial agents (bacteria and fungi), liposomes, cellular debris, and cellular aggregates. According to some authors, it is possible that interferences can be detected in the equipment's cytograms (Manfred-Wick et al., 2021). Improvement of background reading algorithms could eventually overcome these interferences.

The low number of pathologic samples obtained did not allow for the collection of statistically significant data to determine what information could be extracted from cytograms and flags of the Alinity hq.

Overall, our results do not support the implementation of Alinity hq cell counter for CSF leucocyte and/or erythrocyte quantification in the routine laboratory.

5. CONCLUSION

CSF cell counting and differentiation are crucial for the diagnosis of several CNS-related pathologies. Despite the technological characteristics of Alinity hq and the fact that it complies with all the requirements for which it was designed, the CSF cell counts remain a challenge, mostly due to the low reference values. For both leukocytes and erythrocytes, the obtained agreement values for cell count implementation were not in accordance with the clinically defined acceptance limits. Therefore, the Alinity hq cannot be judged useful to count CSF cells, replacing the traditional manual method. Additionally, the large percentage of samples reported with results below the critical value opposes the use of Alinity hq as a screening tool.

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

The authors declare that there are no conflicts of interest

ACKNOWLEDGMENTS

The study took place in the SPC hematology laboratory, located at IPOLFG, without associated funding. H&TRC author gratefully acknowledges the FCT/MCTES national support through the UIDB/05608/2020 and UIDP/05608/2020.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não existirem conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

O estudo decorreu no laboratório de hematologia do SPC, localizado no IPOLFG, sem financiamento associado. O autor H&TRC agradece o apoio nacional da FCT/MCTES através dos projetos UIDB/05608/2020 e UIDP/05608/2020.

CONTRIBUIÇÕES DE AUTORIA

Conceptualização, F.B., R.B. e E.R.; metodologia, F.B.; software, F.B.; validação, R.B.; análise formal, F.B., R.B.; investigação, F.B., R.B.; recursos, F.B., R.B.; curadoria de dados, F.B., R.B.; redação do rascunho original, F.B.; revisão e edição do manuscrito, F.B. e E.R.; visualização, F.B.; supervisão, F.B. e E.R.; coordenação do projeto, R.B. e E.R. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

AUTHORIAL CONTRIBUTIONS

Conceptualization, F.B., R.B. and E.R.; methodology, F.B.; software, F.B.; validation, R.B.; formal analysis, F.B., R.B.; investigation, F.B., R.B.; resources, F.B., R.B.; data curation, F.B., R.B.; writing-original draft preparation, F.B.; writing-review & editing, F.B. and E.R.; visualization, F.B.; supervision, F.B. and E.R.; project coordination, R.B. and E.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES

- Archetti C, Montanelli A, Finazzi D, Caimi L, Garrafa E. Clinical laboratory automation: a case study. *Journal of Public Health Research*, 2017.
- Aguadero V, Cano-Corres R, Berlanga E, Torra M. Evaluation of biological fluid analysis using the Sysmex XN automatic hematology analyzer. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry* 94(5):680-688, 2018.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*:307-310, 1986.
- Bourner G, De La Salle B, George T, Tabes Y, Baum H, Culp N, Keng TB. ICSH guidelines for the verification and performance of automated cell counters for body fluids. *International Journal of Laboratory Hematology* 36(6):598-612, 2014.
- 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. *International Journal of Laboratory Hematology* 36(6):613-627, 2014.
- Doğan NÖ. Bland-Altman analysis: A paradigm to understand correlation and agreement. *Turkish Journal of Emergency Medicine* 18(4):139-141, 2018.
- Fortin MF. Fundamentos e etapas do processo de investigação. *Lusodidata*, 2006.
- Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica* 25(2):141-151, 2015.
- Herroelen P, Demeester S, Damiaens S, Evenepoel A, Jochmans K. Performance of Abbott Alinity hq hematology analyzer for automated cell counting of body fluids. *International Journal of Laboratory Hematology* 44(1):96-103, 2022.
- Kjeldsberg C, Knight J. Body fluids laboratory examination of cerebrospinal, seminal, serous & synovial fluids. *American Society of Clinical Pathologists Press*, Chicago, 1993.
- Otto F, Harrer C, Pilz G, Wipfler P, Harrer A. Cerebrospinal fluid cells in diagnostics and research: State-of-the-art and underutilized opportunities. *Diagnostics* 12(1), 2022.
- Pum J. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. *Advances in Clinical Chemistry* 90:215-281, 2019.
- Roccaforte V, Daves M, Proserpio V, Sciarini F, Sangiorgio R, Costanzo A, Di Pierro AM, Ugo S, Lippi G, Bonato C. Evaluation of body fluid mode of Sysmex XN-9000 for white blood cell counts in cerebrospinal fluid. *Journal of Laboratory and Precision Medicine* 3:22-22, 2018.
- Sandhaus L, Dillman C, Hinkle W, MacKenzie J, Hong G. A new automated technology for cerebrospinal fluid cell counts. *American Journal of Clinical Pathology* 147(5):507-514, 2017.
- 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* 24(15):2332-2336, 2006.
- Van der Beken Y, Van Dalem A, Van Moer G, Segers E, Damiaens S, Hoffmann J, Lakos G, Jochmans K. Performance evaluation of the prototype Abbott Alinity hq hematology analyzer. *International Journal of Laboratory Hematology* 41(4):448-455, 2019.
- Wick M, Gross CC, Tumani H, Wildemann B, Stangel M. Automated analysis of cerebrospinal fluid cells using commercially available blood cell analysis devices – A critical appraisal. *Cells*, 2021.