

Utilização da contagem automatizada de granulócitos imaturos para diagnóstico da sepse

Use of automated immature granulocyte counting for the sepsis diagnosis

Vanessa Simone Carvalho Pereira

Resumo

Sepse é a presença de bactérias ou seus produtos tóxicos no sangue, levando ao surgimento de manifestações clínicas, por vezes de difícil prognóstico. Com grande incidência nos Estados Unidos e no Brasil, a sepse vem preocupando cada vez mais os profissionais da área de saúde e exigindo seu diagnóstico rapidamente. O aparecimento de células imaturas no sangue, granulócitos imaturos, pode ser indicio de presença de sepse e a contagem dessas células sanguíneas é feita de forma automatizada através de citometria de fluxo. A detecção dessas células imaturas vem ganhando espaço nos laboratórios de análises clínicas para que o diagnóstico seja mais específico, iniciando uma terapêutica de forma rápida e eficaz.

Palavras-chave

Sepse; Citometria de fluxo; Granulócitos; Bactérias; Automação

INTRODUÇÃO

A atual definição de sepse é tida como a presença de disfunção orgânica associada a infecção, tendo a lactatemia como uma variável. Entretanto, pacientes apresentam grande variabilidade no que diz respeito ao fenótipo, aos resultados clínicos e prognóstico.⁽¹⁾ A partir da Conferência de Consenso de Sepse, realizada em 1991, as novas definições e critérios para o seu diagnóstico, mesmo não sendo de forma específica, permitiram que pesquisadores tivessem a mesma visão e comparassem seus resultados a partir dos ensaios realizados.⁽²⁾ A definição terminológica tem auxiliado na investigação científica e na detecção precoce de casos de pacientes que estejam no leito. Este último elemento, associado ao tratamento adequado, tem se mostrado decisivo para um desfecho mais favorável da sepse.⁽³⁾ A sepse continua sendo um grande desafio para a saúde pública, mesmo depois de anos de estudo e de progressão na compreensão da doença.⁽¹⁾ O seu diagnóstico é o primeiro desafio enfrentado pelos médicos, pelo fato de que sua identificação, quando não for feita de forma precoce, que permita alguma intervenção, poderá resultar em choque, falência orgânica ou até a morte do paciente.⁽²⁾ Contudo o aparecimento de granulócitos imaturos (IG) no sangue periférico fornece informação im-

portante sobre um aumento na produção da medula óssea, contribuindo desta forma para o auxílio no diagnóstico da sepse.⁽⁴⁾

O objetivo da presente revisão foi abordar a relevância da contagem automatizada de granulócitos imaturos no diagnóstico da sepse, buscando desta forma a obtenção de resultados mais precisos.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa descritiva, retrospectiva, realizada por meio de uma revisão bibliográfica de literatura não sistemática, por meio da pesquisa de manuscritos, para levantamento e análise sobre o tema abordado. As bases de dados consultadas foram: *US National Library of Medicine* (PubMed) e *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), no período entre 2004 e 2015, elegendo-se apenas estudos realizados em seres humanos.

A partir de uma lista contendo dezessete artigos, quatro deles relatavam o uso da forma automatizada da contagem de granulócitos imaturos.

Os termos utilizados para pesquisa foram: granulócitos imaturos, contagem automatizada e sepse nos idiomas Inglês, Espanhol e Português. Os descritores em ciências da saúde (DeCS) utilizados para pesquisa foram: sepse,

¹Biomédica. Especialização em Análises Clínicas pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública – Salvador-BA, Brasil.

Instituição: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública – Salvador-BA, Brasil.

Artigo recebido em 18/01/2016

Artigo aprovado em 27/04/2016

DOI: 10.21877/2448-3877.201600457

citometria de fluxo, células sanguíneas, granulócitos, bactérias, laboratório.

EPIDEMIOLOGIA

A cada ano, a sepse adquire maior importância epidemiológica. Conforme relatos do *Center for Disease Control* (Centro de Controle de Doenças), a incidência de pacientes com sepse aumentou em mais de 90% na última década, nos Estados Unidos da América (EUA).⁽⁵⁾ Ainda nos EUA, elevados casos de sepse e mortes relacionadas obtiveram um aumento de 82,7/100 mil habitantes para 240,4/100 mil, ainda que a taxa de mortalidade geral entre os pacientes tenha sido reduzida nos últimos vinte anos.⁽²⁾

Em um grande estudo prospectivo epidemiológico europeu, foram avaliados 14.364 pacientes internados em 28 Unidades de terapia intensiva (UTIs), onde 21,1% apresentaram infecção bruta, e os pacientes internados na UTI por mais de 24 horas, 18,9%, concluindo-se que cerca de 24% das infecções foram associadas a sepse grave, sendo que a mortalidade global de pacientes não infectados foi de 16,9% e a de pacientes com infecções hospitalares foi de 53,6%.⁽⁶⁾ No Brasil, a taxa de mortalidade relacionada a sepse é em torno de 30%, sendo que 1.400 pessoas/dia no mundo vêm a óbito.

A sepse tem sido vista também como a principal causa de morte em UTIs não cardiológicas com altas taxas de letalidade. Assim sendo, ela vem adquirindo uma crescente importância devido ao aumento de sua incidência, seja num melhor atendimento de emergência, fazendo com que pacientes graves sobrevivam, aumento da população idosa e do número de pacientes imunossuprimidos, criando uma população susceptível para o desenvolvimento de infecções graves, assim como o crescimento da resistência bacteriana.⁽⁷⁾ Outro fator relevante é o fato de que recém-nascidos (RN) prematuros apresentam maior risco de desenvolver sepse, pelo fato de que infecções perinatais e neonatais apresentam relação com as alterações do seu neurodesenvolvimento.⁽⁸⁾

Diante desses dados, o laboratório desempenha importante papel na monitoração das estratégias de tratamento, bem como no diagnóstico e determinação do prognóstico dos pacientes sépticos.⁽⁵⁾ Em um estudo, no qual os dados foram analisados em 75 UTIs, correspondendo a 65 hospitais de todas as regiões do Brasil, as regiões sul e sudeste tiveram a maior participação, com 73,8% dos hospitais e 85,8% dos pacientes do estudo, mostrando maior incidência de sepse na rede particular e mortalidade na rede pública.⁽⁹⁾

O Brasil é um país de dimensões continentais com uma população heterogênea e acesso desigual aos serviços de saúde. Medidas para diminuir a prevalência e a mortalidade relacionadas a sepse na população brasileira devem ser incluídos nos programas nacionais de saúde.⁽⁶⁾

FISIOPATOLOGIA

De acordo com a ACCP (Faculdade Americana Especialista em Pneumologia) / SCCM (Sociedade Médica de Cuidados Críticos), tanto a SIRS (Síndrome da resposta inflamatória sistêmica) quanto a sepse são caracterizadas pela ocorrência de, pelo menos, dois de uma das seguintes condições:

1. temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$;
2. frequência cardíaca > 90 batimentos por minuto;
3. frequência respiratória $>$ taxa de 20 respirações por minuto ou $\text{PaCO}_2 < 32$ mm Hg;
4. contagem de células brancas do sangue $> 12.000/\text{mm}^3$, $< 4.000/\text{mm}^3$, ou $> 10\%$ de formas jovens.⁽⁴⁾

A hipotensão induzida por sepse é definida como pressão arterial sistólica (PAS) < 90 mmHg ou pressão arterial média (PAM) < 70 mm Hg ou queda na PAS > 40 mmHg ou menos de dois desvios padrão abaixo do normal para a idade na ausência de outras causas de hipotensão. A hipoperfusão de tecido induzida por sepse é definida como hipotensão induzida por infecção, aumento de lactato ou oligúria.⁽¹⁰⁾ A deficiência progressiva de substratos de energia contribui para alterar a função dos órgãos; e um maior número de disfunção orgânica é o pior prognóstico de sepse na clínica, que, associado ao lactato como elemento importante, é usado para tentar quantificar a magnitude do processo "disóxico" que ocorre no corpo.⁽¹¹⁾ O predomínio global de sepse grave em pacientes que apresentam inicialmente hipotensão com lactato ≥ 4 mmol/L, somente hipotensão, ou somente lactato ≥ 4 mmol/L, é relatado como 16,6%, 49,5% e 5,4%, respectivamente.⁽¹⁰⁾ O diagnóstico precoce no paciente crítico é necessário para tratar a infecção e evitar a perda da eficácia da antibioticoterapia devido à administração tardia. Na fase aguda, as concentrações de muitas proteínas séricas estão elevadas em resposta à inflamação, infecção, trauma ou dano tecidual.⁽⁴⁾

AVALIAÇÃO LABORATORIAL

Na última década, inúmeros marcadores têm sido sugeridos para o diagnóstico precoce da sepse, dentre os quais está a dosagem sérica de algumas citocinas: interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e interleucina-10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF), proteínas de fase aguda (proteína C-reativa) e procalcitonina.⁽²⁾ As interleucinas 6, 8 e 10 são as mais utilizadas na dosagem para sepse; entretanto, o alto custo e a meia-vida curta, bem como a necessidade de processamento imediato da amostra ou seu congelamento, são obstáculos importantes ao uso clínico de rotina, estando sua dosagem ainda restrita a laboratórios de pesquisa. Os níveis séricos da Proteína C-reativa atingem seu pico máximo depois de 48

horas e aumentam durante infecções menores, podendo permanecer elevados vários dias após eliminação do foco infeccioso, não se correlacionando com a gravidade da resposta do hospedeiro e não sendo capaz de diferenciar sobreviventes e não sobreviventes da sepse, em diferentes estudos.⁽⁵⁾ A procalcitonina (PCT) é atualmente utilizada como um parâmetro clínico de suporte para esclarecer o diagnóstico, mas devido ao seu elevado valor preditivo negativo (99%) é mais frequentemente usado para descartar sepse.⁽⁴⁾ Mais de trinta estudos cegos randomizados envolvendo 12 mil pacientes mostraram que o uso de anticorpos bloqueadores (antagonista de receptor IL-1, receptor solúvel TNF) não alterou o curso clínico ou a mortalidade de pacientes com sepse, e, algumas vezes, até prejudicou estes pacientes.⁽²⁾

Parâmetros de coagulação são importantes no diagnóstico de sepse porque é um estado de hipercoagulabilidade frequentemente presente antes do aparecimento dos sinais clínicos.⁽¹²⁾ Os neutrófilos são os leucócitos que predominam no sangue periférico e representam defesa contra infecções. Os fatores de crescimento e as citocinas, produzidas pelos macrófagos teciduais e outras células, induzem o aumento da produção de neutrófilos pela medula óssea e faz a liberação, de forma imatura, para o sangue periférico. Em condições normais, os neutrófilos encontrados no sangue periférico estão na sua forma mais madura, a de segmentado. Mas, no surgimento de um processo infeccioso agudo, os granulócitos imaturos (IG) podem ser vistos no sangue periférico, incluindo o aumento da contagem de bastonetes. Assim, o desvio à esquerda significa a elevada contagem de bastonetes, acompanhada ou não da presença de granulócitos imaturos.⁽¹²⁾

Granulócitos imaturos são células encontradas geralmente na medula óssea de pacientes normais e podem estar presentes no sangue periférico devido a alguma alteração fisiológica ou patológica do organismo. São precursores neutrofílicos que são divididos de acordo com o grau de maturação oriundo dos mieloblastos.⁽¹³⁾ Assim, a contagem do IG automatizado pode funcionar como um teste de rastreio para doenças infecciosas e distúrbios mieloides, resultando em diagnóstico precoce e intervenção.⁽¹⁴⁾ A presença de granulócitos imaturos é uma informação importante porque mostra que a medula óssea está ativada e, também, pode fazer a distinção entre pacientes com neoplasias hematológicas dos pacientes com processo infeccioso bacteriano agudo.⁽¹³⁾

Os contadores hematológicos convencionais podem identificar e enumerar apenas leucócitos normalmente encontrados no sangue periférico, isto é, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.⁽¹⁵⁾ É necessária a identificação de formas imaturas utilizando-se a microscopia, um trabalho demorado e intensivo, mas que teria a sua precisão comprometida devido a variáveis como o baixo núme-

ro de células contadas, a variação entre microscopistas exigindo assim o uso de um contador automático mais confiável.⁽¹⁴⁾ A contagem do IG pelo método automatizado pode ser realizada por um analisador multiparamétrico, que oferece a possibilidade de detectar IGs classificados como metamielócitos, mielócitos e promielócitos pela identificação na contagem diferencial de células brancas por citometria de fluxo no canal-DIFF. Além da quantificação das imunoglobulinas, as propriedades físicas de células imaturas e neutrófilos reativados são fornecidas. Por conseguinte, as amostras de sangue são incubadas com um corante fluorescente, normalmente usa-se o Fluorocel, e um reagente, lisando seletivamente a membrana de leucócitos maduros. Células mieloides imaturas não são modificadas no seu tamanho, estrutura e integridade, porque o IG tem um teor de colesterol inferior ao de granulócitos maduros, e a sua composição de fosfolípido tem uma proporção relativamente mais elevada de fosfatidilcolina e uma proporção menor de esfingomielina.

Dependendo do ângulo de dispersão, quando a célula passa no feixe de um laser semiconductor, informações sobre o volume, a estrutura interna e a complexidade, e o conteúdo de DNA/RNA de cada célula são obtidos por uma combinação de luz dispersa para a frente (mede o tamanho celular), de luz dispersa lateral (mede a estrutura interna da célula), e luz fluorescente lateral, que mede o tamanho do núcleo. A luz é recebida por um fóton diodo e um tubo de fotomultiplicador, respectivamente, sendo, então, convertida em impulsos elétricos.⁽¹⁶⁾ A detecção do tamanho da célula, a informação sobre os núcleos e composição do citoplasma são geradas pela resistência da corrente de radiofrequência direta quando as células passam por uma abertura no canal-IMI. O princípio da reação canal-IMI baseia-se em diferenças na composição da membrana entre as células maduras e imaturas.⁽¹⁷⁾ A corrente contínua (DC) de altura de pulso é equivalente ao volume da célula. A frequência de rádio (RF) de medição fornece informações sobre a composição interna da célula (núcleo, grânulos). Diferenças na resistência RF detectadas como impulsos elétricos são representadas num diagrama de dispersão bidimensional que reflete a distribuição de tamanho de célula e do núcleo.⁽¹³⁾

Recentemente, uma empresa que trabalha com esses contadores automatizados, introduziu um *software* modificado de IG, chamado IG Mestre, que foi validado contra uma citometria de fluxo padrão "ouro" e aprovado para uso clínico. Este novo *software* utiliza uma estratégia de *gating* flexível, que pode produzir contagens mais precisas de IG. Até o momento, existem poucos estudos clínicos publicados utilizando este método de IG Mestre que vem sendo usado nos Estados Unidos.⁽¹⁸⁾ Neste cenário, uma variedade de aplicações citofluorimétricas vem sendo desenvolvida e aprimorada, devido a um crescente desenvolvi-

mento dos recursos e tecnologia dos citômetros. Atualmente podemos encontrar no mercado citômetros de fluxo equipados com até seis *lasers*, com maior número de fotosensores capazes de detectar até 11 comprimentos de onda diferentes.⁽¹⁹⁾

A excelente reprodutibilidade da contagem IG é devido à sua elevada fiabilidade estatística quando comparada com o diferencial de 100 células tradicional. O analisador produz valores de IG com um CV (coeficiente de variação) de apenas 7%, enquanto que o diferencial manual de rotina oferece um CV teórico de aproximadamente 50%.⁽¹⁶⁾ Contagens automatizadas de IG permitem oferecer potenciais vantagens de melhoria da exatidão, precisão e tempo de resposta em comparação com contagens diferenciais manuais.⁽¹⁸⁾

DISCUSSÃO

Este estudo abordou a contagem de granulócitos imaturos de forma automatizada, que serve de parâmetro para o diagnóstico de sepse. E de acordo com a Diretriz da campanha de sobrevivência para tratamento de sepse grave e choque séptico, existem distinções entre definições e metas ou limites terapêuticos para que ela possa ser diagnosticada de forma precisa. Essas distinções referem-se ao estado febril ou não do paciente, pressão arterial sistólica e pressão arterial média. De acordo com esses critérios ficou determinado que sepse é toda resposta inflamatória sistêmica a uma infecção, onde o diagnóstico precoce de um paciente crítico torna-se fator determinante para que a terapia tenha eficácia. O índice de casos de sepse chega a 90% nos EUA de acordo com o Centro de Controle de Doenças. E num estudo feito por João Andrade et al., as regiões sul e sudeste do Brasil são tidas como detentoras dos maiores índices de sepse. No auxílio ao diagnóstico, os marcadores interleucina-1(IL-1), interleucina-6(IL-6), interleucina-8(IL-8), interleucina-10(IL-10), fator de necrose tumoral (TNF), proteína C-reativa (PCR) e procalcitonina são usados. Alguns marcadores, como a IL-6,8 e 10, são os mais usados na dosagem para sepse; entretanto, devido ao seu alto custo e à meia-vida curta, deixaram de ser utilizados, voltando-se apenas para a área de pesquisa. A PCR atinge seu pico máximo depois de 48 horas e aumenta durante infecções menores, podendo permanecer elevada vários dias após eliminação do foco infeccioso, não tendo grande valia em diagnosticar um caso de sepse. O TNF não altera o curso clínico ou a mortalidade de pacientes com sepse e, algumas vezes, chega a prejudicar esses pacientes pela baixa especificidade. E a procalcitonina atualmente é usada para descartar a presença de sepse pelo alto valor preditivo negativo que apresenta; seus níveis encontram-se elevados em 3 a 6 horas após o início da infecção e possui uma alta sensibilidade

e especificidade. A contagem de IG nos laboratórios é feita de modo automatizado para que se obtenha uma maior precisão nos resultados. Diante deste fato, o artigo publicado por Fernandes et al. fez uma comparação com três amostras, entre a contagem de IG pelo método manual e pela citometria de fluxo, tida como referência. Houve uma diferença de 0,98% de imprecisão intraensaios e 3,28% de imprecisão total, confirmando-se que o método automatizado proporciona mais exatidão e precisão. Foi realizada também uma comparação por meio de Regressão Linear entre contagem de IG por aparelho automatizado e pela citometria de fluxo, obtendo-se uma satisfatória correlação entre eles, validando desta forma sua utilização na clínica laboratorial. Os contadores automatizados utilizam, na sua contagem diferencial, a identificação de IG por citometria de fluxo no canal – DIFF, o qual, através de feixes, consegue determinar a estrutura interna da célula e o tamanho do núcleo. Por ter tamanha precisão e exatidão na sua execução, um novo padrão "ouro" foi desenvolvido nos Estados Unidos para que a sensibilidade e a especificidade aumentem a cada estudo desenvolvido. Por apresentar tantos benefícios em relação à contagem manual, os laboratórios de análises clínicas vêm usando aparelhos automatizados como auxiliar no diagnóstico de sepse.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do que foi exposto neste artigo fica configurada a importância da contagem automatizada de granulócitos imaturos no diagnóstico da sepse, associada com os resultados dos exames de procalcitonina e lactato, garantindo assim maior agilidade no tratamento, melhor acompanhamento prognóstico e consequente sobrevida aos pacientes acometidos. Não deixando de salientar que, quando o aparelho apresenta flag, é preciso que uma lâmina deste paciente seja feita para que o microscopista também faça a identificação dessas células imaturas, tornando dessa forma seu trabalho indispensável para o fechamento do diagnóstico juntamente com a forma automatizada.

Abstract

Sepsis is the presence of bacteria and their toxic products in the blood, leading to the appearance of clinical symptoms sometimes difficult to predict. Which are prevalent in the United States and Brazil, sepsis is increasingly concerned health professionals and demanding diagnosis quickly. The appearance of immature blood cells, Immature granulocytes, may indicate the presence of sepsis and counting these blood cells is made in an automated way via flow cytometry. Detection of these immature cells has been gaining ground in Clinical Analysis laboratories for the diagnosis to be more specific, starting a therapy quickly and effectively.

Keywords

Sepsis; Flow cytometry; Granulocytes; Bacterial infections; Automation

REFERÊNCIAS

1. Ranzani OT, Monteiro MB, Ferreira EM, Santos SR, Machado FR, Noritomi DT. Reclassifying the spectrum of septic patients using lactate: severe sepsis, cryptic shock, vasoplegic shock and dysoxic shock. *Rev Bras Ter intensiva* [Internet]. 2013;25(4):270-8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4031869&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
2. Carvalho PRA, Trotta EDA. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. *J Pediatr (Rio J)*. 2003;79:195-204. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572003000800009&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572003000800009>.
3. Siqueira-Batista R, Gomes AP, Calixto-Lima L, Vitorino RR, Perez MCA, Mendonça EG De, et al. Sepse: atualidades e perspectivas. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011;23(2):207-16.
4. Nierhaus A, Klatte S, Linssen J, Eismann NM, Wichmann D, Hedke J, et al. Revisiting the white blood cell count: immature granulocytes count as a diagnostic marker to discriminate between SIRS and sepsis - a prospective, observational study. *BMC Immunol* [Internet]. *BMC Immunology*; 2013;14(1):8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3575223&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Introdução. Diagnóstico Laboratorial da Doença Celíaca. :1-3.
6. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al; Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*. 2004; 8(4):R251-60.
7. Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse - Ilas IL-APEDS. Sepse: um problema de saúde pública. Brasília. 2015.
8. Ferreira RC, Mello RR, Silva KS. Neonatal sepsis as a risk factor for neurodevelopmental changes in preterm infants with very low birth weight. *J Pediatr (Versão em Port)* [Internet]. 2014;90(3):293-9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2255553614000640>
9. Sales Júnior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro CTS, et al. Sepse Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. *Rev. bras. ter. intensiva*. 2006;18:9-17.
10. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign. *Crit Care Med* [Internet]. 2013;41:580-637. Available from: [papers2://publication/doi/10.1097/CCM.0b013e31827e83af](https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31827e83af)
11. Leandro M, Muñoz Z, Barragán FJ. Fisiopatología , importancia y utilidad del lactato en pacientes con sepsis. *Iatreia*.2010; 23:278-85.
12. Laboratorial H, Cat U, Federal U. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.14., 2013;99-108.
13. Whisler S, Dahlgren C. Performance evaluation of the Sysmex pocH-100i automated hematology analyzer. *Lab Hematol*. 2005; 11(2): 107-17.
14. Bruegel M, Fiedler GM, Matthes G, Thiery J. Reference Values for Immature Granulocytes in Healthy Blood Donors generated on the Sysmex XE-2100 Automated Hematology Analyser. *Sysmex Journal International*. 2004;14(1):4-6.
15. Fernandes B, Hamaguchi Y. Automated enumeration of immature granulocytes. *Am J Clin Pathol*. 2007;128(3):454-63.
16. Xtra S. The Immature Granulocyte Count - The first to know about inflammation. 2011;(November):1-4.
17. Cimenti C, Erwa W, Herkner KR, Kasper DC, Müller W, Resch B. The predictive value of immature granulocyte count and immature myeloid information in the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50:1429-32.
18. Nigro KG, O'Riordan M, Molby EJ, Walsh MC, Sandhaus LM. Performance of an automated immature granulocyte count as a predictor of neonatal sepsis. *Am J Clin Pathol*. 2005;123:618-24.
19. Plataforma de Citometria de Fluxo Núcleo de Purificação Celular (sorting) IOC - Fiocruz.

Correspondência

Vanessa Simone Carvalho Pereira
 Av. Dom João VI, nº 275 – Brotas
 40290-000 – Salvador-BA, Brasil