



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA PROFISSIONAL EM
SAÚDE ANIMAL E COLETIVA
FACULDADE DE VETERINÁRIA

ANA BÁRBARA UCHOA SOARES

Análise comparativa entre dois métodos de estimativa da contagem manual de plaquetas em esfregaços de sangue periférico de cães

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE RESIDÊNCIA

Porto Alegre

2021

ANA BÁRBARA UCHOA SOARES

Análise comparativa entre dois métodos de estimativa da contagem manual de plaquetas em esfregaços de sangue periférico de cães

Monografia apresentada a Faculdade de Veterinária como parte dos requisitos necessários para a conclusão do Programa de Residência em área Profissional Saúde Animal e Coletiva na Área de Patologia Clínica Veterinária

Orientadora: Prof. Dra. Stella de Faria Valle

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Soares, Ana Bárbara Uchoa
ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DOIS MÉTODOS DE
ESTIMATIVA DA CONTAGEM MANUAL DE PLAQUETAS EM
ESFREGAÇOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES / Ana Bárbara
Uchoa Soares. -- 2021.

23 f.

Orientadora: Stella de Faria Valle.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Veterinária, Medicina Veterinária, Porto Alegre,
BR-RS, 2021.

1. Microscópio. 2. Plaquetas. 3. Estimativa de
plaquetas. I. Valle, Stella de Faria, orient. II.
Titulo.

Agradecimentos

Conquistar mais um objetivo de vida não é algo que se consegue sozinho, portanto, eu me sinto grata a cada pessoa que me ajudou nessa jornada tão desafiadora e que, certamente, me fez amadurecer, não apenas no aspecto profissional, mas me transformou como ser humano. Em meio às constantes desvalorizações do ensino público, vem sofrendo nos últimos anos, obter um título de pós-graduação em uma universidade federal é prova de que o acesso à educação de qualidade modifica não só a comunidade acadêmica, mas a sociedade.

Gostaria de agradecer à minha família por ter me apoiado em mais uma ideia mirabolante, sair de casa e morar a mais de 3000 km deles em busca de um sonho.

Obrigada Prof. Stella, por ter me dado a oportunidade de conhecer o LACVET desde a época do estágio curricular e está disposta a colaborar constantemente com a existência e o pleno funcionamento do laboratório.

Aos meus R2, Bruno e Daiani, por terem me ensinado tanto e compartilharem os momentos bons e ruins.

À Fernanda, que teve que aguentar muito choro e conselhos de vida muito pessimistas. Laura e Stephanie vocês são maravilhosas, sempre dispostas a ensinar e ajudar a todos no laboratório. Aleja, tua doçura e acolhimento me confortaram nos momentos mais difíceis. Larissa, sou eternamente grata pela tua amizade, espero que a nossa convivência tenha feito teus dias melhores. Felipinho, nosso estagiário, te agradeço pela ajuda nos perrengues da rotina do laboratório. Su, por ter feito os melhores almoços e ser a pessoa mais acolhedora do mundo. Kauana e Ana, vocês foram a melhor surpresa de 2020, nunca que poderia imaginar que a vida poderia me dar R1s tão perfeitas.

Às minhas amigas/irmãs gaivotas: Belle, Ívila e Rose. Nossa amizade é tão forte que nem a distância e o tempo puderem separar a gente. Bárbara Leal e Sabrina por terem me feito rir e não me sentir sozinha.

Ao Júlio, o melhor companheiro de casa, sempre disposto a me ajudar e conversar, mesmo tendo ideias tão diferentes de mim. Luís e Bruno, por me acolherem nas horas mais difíceis, certamente jamais esquecerei da nossa amizade. A todos os integrantes do grupo Herdeiros da Aninha, que trouxeram um pouquinho de Nordeste pro Sul.

Aos animais, vocês são o verdadeiro combustível para eu continuar a minha jornada tão árdua dentro da Medicina Veterinária.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
INTRODUÇÃO.....	10
ARTIGO CIENTÍFICO COMPLETO.....	12
INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS	13
RESULTADOS.....	15
DISCUSSÃO	17
CONCLUSÃO	21
CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
REFERÊNCIAS	22

RESUMO

A contagem de plaquetas é uma parte essencial do hemograma que fornece informações para a correta interpretação de diversas enfermidades. A precisão e exatidão dos contadores eletrônicos de células é melhor em comparação com a contagem manual, principalmente porque um número muito maior de células é contado. Mesmo com a existência de técnicas automáticas para contagem de plaquetas cada vez mais sofisticadas, não pode competir com o discernimento humano por critérios morfológicos por causa de interferências que resultam na presença de células ou partículas com tamanhos ou características ópticas semelhantes às das plaquetas, que não podem ser suficientemente discriminados dessas. O contínuo estudo dos métodos de contagem existente e a elaboração de novas metodologias promove um resultado laboratorial mais confiável. O objetivo do estudo foi propor um método de estimativa de plaquetas, denominado de estimativa relativa, na qual as amostras são divididas em diferentes grupos, baseados no valor do hematócrito, comparando com dois tipos de contagem já existente: estimativa em esfregaço sanguíneo, nomeada de estimativa tradicional, e a contagem automatizada por citometria de fluxo pelo Procyte. Foram utilizadas amostras de sangue com **EDTA-K₂ (Ácido Etilenodiamino tetra-acético)** para hemograma de 80 cães de diferentes faixas etárias, raças e condições de saúde. As amostras que continham coágulos, agregados plaquetários, observados na revisão do esfregaço sanguíneo, ou possuíam desproporção na quantidade de anticoagulante foram excluídas do estudo. Essas amostras submeteram-se a contagem automatizada por citometria de fluxo, estimativa plaquetária em esfregaço sanguíneo e a estimativa relativa, na qual houve a classificação em 6 diferentes grupos, baseados no valor de hematócrito. Esses três tipos de contagem foram correlacionados pelos métodos de Passing Block e Bland-Altman. Foi possível observar que a estimativa relativa não apresentou alta correlação com a contagem automatizada. Além disso, não foi observado um viés proporcional

durante a comparação do novo método de estimativa proposto e a contagem por citometria de fluxo. Houve uma alta correlação entre a estimativa tradicional e a contagem automatizada. O estudo concluiu que há uma baixa correlação entre o novo método de contagem plaquetária proposto e a contagem automatizada por citometria de fluxo.

Palavras-chave: contagem automatizada, plaquetas e estimativa de plaquetas

ABSTRACT

Platelet counting is an essential part of the blood count that provides information for the correct interpretation of various diseases. The precision and accuracy of electronic cell counters is better compared to a manual count, mainly a much larger number of cells are counted. Even with the existence of automated techniques for platelet counting that are increasingly sophisticated, it cannot compete with human judgment for morphological criteria because of interferences that result in the presence of cells or particles with cells or optical characteristics parallel to the platelets, which cannot sufficiently discriminated against platelets. The continuous study of the existing counting methods and the development of new methodologies promotes a more reliable laboratory result. The aim of the study was to propose a new method of platelet estimation, called relative estimation, in which the samples are divided into different groups, based on the hematocrit value, comparing with two types of existing count: blood smear estimate, named traditional estimation, and automated flow cytometry counting by Procyte.

Blood samples with EDTA-K2 were used for the complete blood count of 80 dogs of different age groups, breeds and health conditions. Samples that contained clots, platelet aggregates, seen in the blood smear review, or had a disproportionate amount of anticoagulant were excluded from the study. These samples were subjected to automated counting by flow cytometry, platelet estimation in blood smear and the relative estimate, in which there was classification in 6 different groups, based on hematocrit. These three types of counting were correlated by the Passing Block and Bland-Altman methods. It was possible to observe that the relative estimate did not show a high correlation with automated counting. In addition, a proportional bias was not observed when comparing the proposed new estimation method and flow cytometry counting. There was a high correlation between traditional estimation and automated counting.

The study concluded that there is a low correlation between the proposed new platelet counting method and automated counting by flow cytometry. In addition, the relative estimate took a long time in the opinion of the authors, making this method ineffective in the laboratory routine.

Keywords: platelets, platelet estimation e automated counter

1 INTRODUÇÃO

Distúrbios hemorrágicos são comuns em animais domésticos, podendo causar trombocitopenia, trombocitopatia, coagulopatia ou vasculopatia. A trombocitopenia, por exemplo, se constitui em uma importante pista para a investigação de infecções, neoplasias e inflamação (1). Dois procedimentos analíticos são comumente usados para contagem de células sanguíneas: o manual e a contagem automatizada, que foram, primeiramente, desenvolvidos para a análise de amostras humanas, sendo posteriormente adaptado para outras espécies (2).

A estimativa de plaquetas no esfregaço sanguíneo, é um método considerado como o padrão ouro, resultando em uma “verificação interna” da contagem de plaquetas, porém é bastante impreciso (3). As principais desvantagens desse método são a maior demanda de tempo e as desvantagens estatísticas porque, em comparação com os métodos automatizados, são contadas consideravelmente uma menor quantidade de plaquetas. Vários fatores podem interferir na estimativa de plaquetas. Esses fatores incluem a qualidade do esfregaço, os procedimentos de coleta de amostra, manuseio e armazenamento inadequados, a área do esfregaço usado para a avaliação (as plaquetas são mais abundantes onde mais células sanguíneas estão presentes), a experiência do observador e a capacidade visual e, o campo do microscópio (quanto mais amplo o campo, mais células visualizadas) (3).

Já em relação aos analisadores automáticos, as metodologias mais populares são a citometria de fluxo e a de impedância. Na veterinária, os contadores às vezes, fornecem contagens imprecisas em animais, como em alguns casos de trombocitopenia falsa (na presença de macroplaquetas) ou quando há agregados plaquetários (3). Aparelhos automatizados, principalmente os de impedância, também podem sugerir uma trombocitose falsa, que pode estar associada à presença de microcitose ou poiquilocitose pois, nesses casos, pequenos eritrócitos ou fragmentos de células são contados como plaquetas (4). Portanto, mesmo os analisadores hematológicos mais modernos requerem a avaliação do esfregaço de sangue periférico, principalmente em felinos. Nesses

casos, a avaliação microscópica da contagem de plaquetas é um componente importante da revisão do esfregaço de sangue.

Como mencionado anteriormente, as plaquetas são mais facilmente encontradas em áreas do esfregaço sanguíneo que existam mais células (3), e tendo em vista as desvantagens de cada método de contagem, foi sugerida uma estimativa que desse maior consideração a influência da anemia ou policitemia na estimativa de plaquetas em esfregaços sanguíneos.

Comparative analysis between two methods of estimating manual platelet count in peripheral blood smears from dogs

Ana B.U. Soares; Bruno A. de Almeida; Stella de F. Valle.

1.Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: stella.valle@ufrgs.br

1.1 INTRODUÇÃO

A contagem de plaquetas é um componente essencial dos testes hematológicos de rotina. É usado como um importante marcador laboratorial e monitoramento do tratamento de diversas enfermidades hemostáticas(5) Na medicina veterinária, três métodos analíticos são comumente usados: a contagem manual em câmara de Neubauer, estimativa de plaquetas no esfregaço sanguíneo corado e a contagem automatizada (6). O método manual é o padrão-ouro, mas essa técnica também está associada a altos coeficientes de variação, dependendo da experiência do veterinário, o que causa resultados divergentes entre observadores (7). O principal problema do método manual utilizando a câmara de Neubauer é a identificação das plaquetas. Elas podem ser facilmente confundidas com partículas celulares e não celulares como fragmentos de hemácias, agregados lipídicos ou protéicos. Outro ponto de impedimento analítico é o aumento do volume plaquetário (3), e largura de distribuição plaquetária, o que sugere plaquetas imaturas na corrente sanguínea (8). Na contagem automatizada de plaquetas, resultados discrepantes são comuns em amostras de sangue com agregados plaquetários. Além desses agregados, as macroplaquetas também influenciam na contagem incorreta de hemácias no método de impedância (9). A análise pela citometria de fluxo em amostras de sangue é o padrão ouro em hematologia (15). Normalmente, essa tecnologia combina as técnicas de impedância e citometria de fluxo, minimizando os erros causado pelo uso apenas da medição da diferença de voltagem causado por células de tamanhos diferentes (15).

Até o presente momento, a estimativa de plaquetas nos esfregaços de sangue periférico corado continua sendo um componente crucial para completar e conferir a contagem de plaquetas automatizadas. Isso é especialmente verdadeiro em amostras sinalizadas; cuja citometria de fluxo detecta algum distúrbio na contagem automatizada (11). Portanto, a avaliação do esfregaço sanguíneo é altamente recomendada em cães trombocitopênicos para descartar discrepância de interferência na amostra pobre em plaquetas e morfologia alterada das plaquetas (10).

Este estudo tem como objetivo comparar dois métodos de estimativa de plaquetas em esfregaços de sangue canino para confirmação automatizada da contagem, por meio de uma metodologia que procura descartar a interferência do número de hemácias existentes e a sua influência na estimativa plaquetária.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Para o presente estudo, foram usadas amostras de sangue de 80 cães de diferentes raças, faixas etárias e condições de saúde, oriundos da rotina do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, durante o período de julho de 2019 a outubro de 2020. As amostras de sangue foram coletadas da veia jugular ou cefálica por meio do sistema à vacuo ou seringa, utilizando agulhas de calibre 21G ou 22G, sendo armazenadas em tubos contendo anticoagulante **EDTA-K₂** (**Ácido etileno diamino tetracético**) e homogeneizadas por 20 inversões imediatamente após a coleta. As amostras que continham agregados plaquetários, verificados macroscopicamente no tubo, ou microscópicos no esfregaço sanguíneo, além de desproporção da quantidade de sangue e anticoagulante foram excluídas do estudo.

Contagem de plaquetas automatizada

Como método de referência, a contagem de plaquetas automatizada foi executada em um contador hematológico veterinário de citometria de fluxo, Procyte Dx, Idexx Laboratories, Westbrook, Estados Unidos, enquanto a

contagem de estimativa plaquetária manual se realizou de duas formas, ambas feitas no esfregaço sanguíneo corado com Panótico Rápido.

Estimativa de plaquetas no esfregaço sanguíneo corado

No primeiro método (estimativa tradicional), em cada amostra, foi realizada uma contagem de plaquetas no esfregaço sanguíneo corado com Panótico rápido em microscópio óptico na objetiva de imersão (aumento de 1000X), na área de monocamada do esfregaço. Foram contados 10 campos diferentes e a média foi multiplicada pelo fator 20.000 para estimar o número de plaquetas por microlitro (18)

Estimativa relativa de plaquetas

Se refere a relação entre o número de eritrócitos e plaquetas na amostra. No segundo método (estimativa relativa), no mesmo esfregaço sanguíneo, foram contadas 1000 células entre eritrócitos e plaquetas, de onde se determinou a porcentagem de plaquetas. Dessa porcentagem, foi realizada uma proporção com a contagem do número total de eritrócitos (*RBC: "Red Blood Count"*), mensurado pelo contador automatizado Procyte, que representou 100%, resultando no número de plaquetas por microlitro (12).

Grupos

Através do hematócrito e da concentração de plaquetas obtidos pelo método automatizado, as amostras foram divididas em 6 grupos. Os 4 primeiros grupos possuíam plaquetas dentro do intervalo de referência (200 a 500.000 plaquetas/ μ L) e conforme o hematócrito, as amostras foram classificadas em Grupo 1 com Ht <13%; Grupo 2 com Ht de 13 a 24%; Grupo 3 com Ht de 25 a 35% e Grupo 4 com Ht >36%. Nos grupos 5 e 6, o hematócrito estava dentro do intervalo de referência (36 a 56%), porém amostras com concentração de

plaquetas menores que <200.000 plaquetas/ μL que foram agrupadas no Grupo 5 e amostras com valores superiores a >500.000 plaquetas/ μL constituíam o Grupo 6. A classificação das amostras em grupos de hematócritos foi realizado devida ao fato das plaquetas serem mais facilmente encontradas em áreas do esfregaço sanguíneo onde existam mais células (3). Logo, houve a necessidade de se averiguar a relação de animais anêmico, geralmente com menor quantidade de células, e a presença de alterações nas estimativas em esfregaço sanguíneo.

Análise estatística

A análise de regressão Passing-Bablok e o método Bland-Altman (MedCalc Statistical Software versão 16.1, Ostend, Bélgica) foram realizados para determinar a concordância dos procedimentos de estimativa realizados com a contagem automatizada.

3 RESULTADOS

Para a determinação da contagem de plaquetas, foi encontrado um viés sistemático negativo ($P < 0,001$) entre a estimativa relativa de plaquetas e a contagem automatizada (Figura 1). Além disso, na estimativa de plaquetas usando o método tradicional e a automação, nenhum viés sistemático significativo foi observado. Para ambos os métodos, os limites de concordância de 95% variaram dentro dos limites de aceitação.

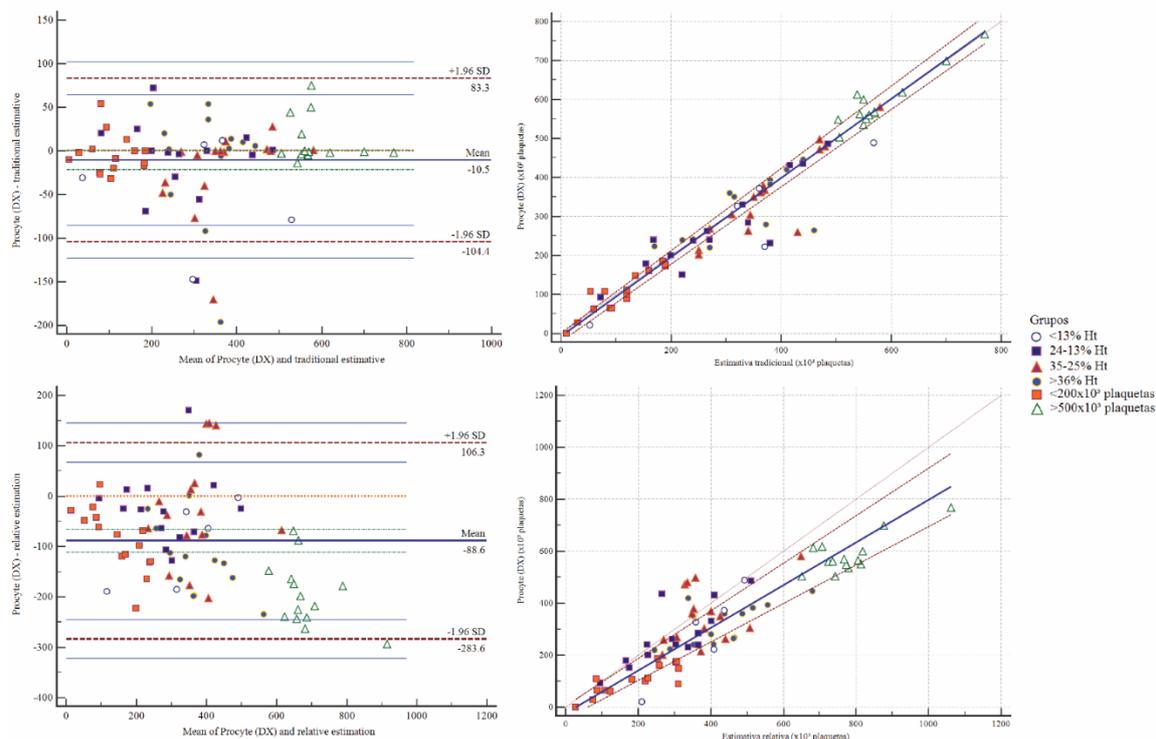


Figure 1. Análises de Bland-Altman e regressão Passing-Bablok. Comparação das contagens tradicionais e relativas com as contagens automatizadas (Procyte Dx). Nos gráficos de diferença Bland-Altman (à esquerda), a linha horizontal tracejada laranja (0 no eixo y) é a linha de identidade, e a linha azul contínua indica o viés (diferença média entre os métodos), com seus intervalos de confiança em verde linhas tracejadas (90%). As linhas horizontais tracejadas em marrom são os limites de concordância de 95% com seus intervalos de confiança como linha contínua azul clara (90%). Nos gráficos de regressão Passing-Bablok (à direita), a linha tracejada vermelha curta é a linha de identidade ($y = x$) e o azul contínuo é a linha de melhor ajuste com linhas horizontais tracejadas marrons que representam os limites de 95% de concordância.

A regressão Passing-Bablok indicou um viés proporcional significativo na estimativa relativa de plaquetas. (Tabela 1)

Table 1. Agreement between the results of platelet estimates with the reference method (automated counting)

Estimativa plaquetária					Cusum	N
	Intercept*	Slope*	Residual Standard Deviation†	test (P- value)		
Tradicional	-6.86 (-21.56 to 1.38)	1.01 (0.99 to 1.06)	34.50 (-33.13 to 102.13)	0.24	77	
Relativa	-22.98 (-47.07 to 4.83)	0.82 (0.74 to 0.91)	64.23 (-61.66 to 190.12)	0.26	77	

*Numbers in parentheses are 95% confidence intervals.

†Numbers in parentheses are 95% limits of agreement.

Na análise de Passing-Balock, a estimativa tradicional de plaquetas apresentou uma maior correlação e uniformidade na dispersão das observações que na estimativa relativa. Ainda, a concordância nas menores concentrações plaquetárias também foi maior na estimativa tradicional. As maiores dispersões na estimativa tradicional ocorreram na presença de hematócritos maiores (Grupos 3 e 4), enquanto na estimativa relativa foi na anemia mais branda (Grupos 2 e 3). A comparação entre a estimativa tradicional e a contagem automatizada apresentou um viés menor que a estimativa relativa. Na estimativa tradicional, os Grupos 5 e 2 apresentaram um menor viés, enquanto, no Grupo 6 houve um viés maior.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou duas metodologias para estimativa de plaquetas em esfregaço sanguíneo, rotineiramente aplicadas como conferência da contagem obtida em contador automatizado. Essa é a primeira investigação da estimativa relativa de plaquetas em animais, a qual já foi aplicada em amostras humanas (12). Ainda, e de forma indireta, avaliamos o efeito de diferentes concentrações de eritrócitos na área de contagem através de diferentes grupos, baseados no valor do hematócrito.

A estimativa tradicional apresentou ótima correlação com a contagem automatizada. Apesar dos avanços na automação da hematologia, e a existência

de analisadores hematológicos mais precisos e de melhor qualidade, a estimativa de plaquetas no esfregaço sanguíneo corado se mantém como importante método para validar os resultados de outros métodos de contagem de plaquetas e não pode ser substituída (13). No presente estudo, foram realizadas avaliações prévias do esfregaço sanguíneo procurando por agregados plaquetários, uma fonte potencial de interferência tanto na contagem manual quanto na automatizada (1). Dessa maneira, reforça-se a necessidade de avaliação microscópica do esfregaço sanguíneo corado na rotina de hematologia na medicina veterinária.

Embora a estimativa tradicional seja considerada um ótimo método de conferência, ela apresenta algumas imprecisões e é sujeita a diversos fatores de variação. O primeiro seria a qualidade do esfregaço, pois as plaquetas não podem ser visualizadas corretamente em esfregaços mal executados ou mal corados. O segundo, seria a escolha de uma área diferente da área de contagem, a qual pode ser mais difícil de se estabelecer em esfregaços com reduzido número de eritrócitos como em animais anêmicos (4). Para contornar os problemas decorrentes da execução errada de esfregaços sanguíneos seria importante um maior cuidado da equipe laboratorial, implantando ações como: maior número de inspeções para evitar a presença de esfregaços sanguíneos com falhas de execução. Outra ação seria a realização de trocas constantes do corante utilizado, minimizando a quantidade de artefatos.

Ainda, a experiência do observador e a habilidade visual são fatores que podem afetar a precisão da estimativa tradicional e da relativa (4). Quanto maior o tempo de vivência profissional e o treinamento do patologista clínico, maior a probabilidade de estimativas mais acuradas. Em casos de mais de um observador, com diferentes experiências e escolhas de campos de contagem, levaria a uma maior variação de resultados da mesma amostra referência. Logo, é interessante uma padronização dos critérios a serem usados para a seleção dos campos microscópicos onde as plaquetas devem ser avaliadas, por exemplo, selecionar campos nos quais as plaquetas parecem estar uniformemente distribuídas (4).

Existem alguns estudos que investigaram a correlação entre essas contagens manuais, automatizadas e estimativas em lâmina em várias espécies, sendo a maioria em cães e gatos. A vantagem de um contador eletrônico de células sobre a contagem manual é o alto número de células contadas. Isto resulta em uma melhor distribuição estatística e uma maior precisão de medições (14). Essa maior precisão fez com que houvesse uma menor concordância da estimativa tradicional com a contagem automatizada no grupo 3,4 em que haviam animais com hematócritos maiores, existindo uma maior probabilidade de ocorrer erro na estimativa manual porque há mais partículas para serem identificadas. A maior chance de cometimento de erros, de acordo com o aumento do número de partículas, pode ser confirmado com o menor viés apresentado pelo grupo 5 no qual haviam animais trombocitopênicos, ou seja com menor número de células a serem contados. Na análise por impedância, esta enumera e diferencia as populações celulares com base na passagem de células individuais através de uma abertura entre dois eletrodos, o que resulta em uma mudança na resistência elétrica através da abertura dependente do volume celular (9). O principal problema dessa metodologia, é que as plaquetas não podem ser discriminadas de outras partículas celulares de tamanho semelhante, essas partículas celulares, incluem fragmentos de hemácias e leucócitos. Além disso, a contagem de plaquetas está prejudicada quando o volume plaquetário estiver afastado do limite de referência(3). Uma das limitações dos sistemas baseados em impedância, foi a incapacidade de distinguir grandes plaquetas de hemácias de tamanho semelhante. Em raças como Charles Cavalier King, a macrotrombocitopenia é considerada fisiológica. Considerando essa tecnologia e as características de determinadas raças, recomenda-se sempre a realização das avaliações por estimativa em esfregaço sanguíneo (19). Principalmente quando a ocorrência dessas alterações estiverem presentes nos histogramas e nos esfregaços.

Na citometria de fluxo, um laser emite um feixe de luz que é direcionado para as células conforme elas passam pela câmara de contagem. As células absorvem e emitem a luz que receberam durante a sua passagem pelo scanner dando informações mais detalhadas sobre a morfologia de diferentes partículas. Em contraste, a impressão digital óptica dos eritrócitos, que essencialmente

possui menor complexidade celular interna, é distintamente diferente da impressão digital óptica de plaquetas que têm características intracitoplasmáticas relativamente complexas (15). Essas diferenças permitem uma melhor diferenciação entre essas células, portanto a análise realizada pela citometria de fluxo, apresenta uma contagem celular mais precisa (15). Porém, mesmo o contador de plaquetas automatizado mais sofisticado não se pode competir com o discernimento humano por critérios morfológicos (3).

Estudos prévios já realizaram a comparação entre métodos de estimativa em lâmina e automatizados, tanto em seres humanos como em animais, sem a execução da contagem de plaquetas na câmara de Neubauer. Em humanos, a contagem na câmara de Neubauer mostrou valores altamente variáveis e dependentes de treinamento individual (13). Ainda, recomendou-se a contagem manual direta pela câmara de Neubauer em pacientes com trombocitopenia extrema, caracterizada por amostras com menos de 30.000 plaquetas/ μL (16). Em cães, a estimativa em esfregaço sanguíneo é considerada uma espécie de conferência da contagem de plaquetas, e fornece resultados com maior repetibilidade (4).

A metodologia manual demanda maior tempo e constitui uma atividade entediante para muitos laboratoristas, promovendo menor acurácia (17). Porém, é recomendada pois realiza uma determinação mais precisa das contagens que os analisadores para espécie canina e felina, devido à sobreposição entre eritrócitos e plaquetas visualizados nos histogramas (17). Esse fator de confundimento é particularmente importante em cães trombocitopênicos, pois a resposta da medula óssea resulta em plaquetas com maior volume celular (10). Portanto, a estimativa de plaquetas no esfregaço sanguíneo tradicional é sempre recomendada para confirmar a contagem de qualquer outro método utilizado (17).

Durante a execução do estudo, o tempo necessário para a realização das estimativas tradicionais e relativas de plaquetas em esfregaços sanguíneos não foi mensurado. Porém, notou-se uma exigência maior de tempo despendidos com a utilização da estimativa relativa. Ainda, estudos prévios demonstraram que o tempo médio demandado para a realização da contagem manual foi de 5

minutos (12), tempo que na opinião dos autores foi maior que uma estimativa de plaquetas em esfregaço sanguíneo.

A metodologia proposta para a avaliação das contagens plaquetárias não se mostrou efetiva devido à baixa correlação com a contagem automatizada por citometria de fluxo e a presença de viés proporcional e sistemático. Além disso, sugere-se que a contagem relativa demandou um maior tempo em sua execução, fazendo com que esse método não seja tão prático no cotidiano laboratorial.

5 CONCLUSÃO

Apesar da tentativa de estimar as plaquetas em animais de diferentes grupos de hematócrito, a estimativa em lâmina tradicional ainda é o método preferível na rotina laboratorial, mesmo que esse método esteja sujeito a variações subjetivas, pois acaba fornecendo informações valiosas sobre a morfologia celular, que é a causa de vários erros cometidos por contadores automáticos, principalmente os de impedância (4). Porém, a contagem automatizada por citometria de fluxo fornece valores mais acurados devido ao maior número de células contadas (14).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mensuração dos valores de plaquetas pelo método automatizado e por estimativa em esfregaço sanguíneo de forma conjunta proporciona resultados mais acurados, minimizando as falhas existentes em cada metodologia. Por mais que se tenha desenvolvido contadores automatizados mais sofisticados, nenhuma máquina pode substituir, completamente, a função do Patologista Clínico Veterinário, profissional mais apto a distinguir características morfológicas das células.

7 REFERÊNCIAS

1. Koplitz SL, Scott MA, Cohn LA. Effects of platelet clumping on platelet concentrations measured by use of impedance or buffy coat analysis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1º de dezembro de 2001;219(11):1552–6.
2. Pastor J, Cuenca R, Velarde R, Viñas L, Lavin S. Evaluation of a hematology analyzer with canine and feline blood. *Vet Clin Pathol.* 1997;26(3):138–47.
3. Sutor AH, Grohmann A, Kaufmehl K, Wündisch T. Problems with platelet counting in thrombocytopenia. A rapid manual method to measure low platelet counts. *Semin Thromb Hemost.* junho de 2001;27(3):237–43.
4. Paltrinieri S, Paciletti V, Zambarbieri J. Analytical variability of estimated platelet counts on canine blood smears. *Vet Clin Pathol.* junho de 2018;47(2):197–204.
5. Stokol T, Erb HN. A comparison of platelet parameters in EDTA- and citrate-anticoagulated blood in dogs. *Vet Clin Pathol.* junho de 2007;36(2):148–54.
6. Hänseler E, Fehr J, Keller H. Estimation of the Lower Limits of Manual and Automated Platelet Counting. *Am J Clin Pathol.* 1º de junho de 1996;105(6):782–7.
7. Rebullá P. Trigger for platelet transfusion. *Vox Sang.* 2000;78 Suppl 2:179–82.
8. Llewellyn EA, Todd JM, Sharkey LC, Rendahl A. A pilot study evaluating the prognostic utility of platelet indices in dogs with septic peritonitis. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* setembro de 2017;27(5):569–78.
9. Bauer NB, Nakagawa J, Dunker C, Failing K, Moritz A. Evaluation of the impedance analyzer PochH-100iV Diff for analysis of canine and feline blood. *Vet Clin Pathol.* junho de 2012;41(2):194–206.
10. Olsen LH, Kristensen AT, Qvortrup K, Pedersen HD. Comparison of Manual and Automated Methods for Determining Platelet Counts in Dogs with Macrothrombocytopenia. *J VET Diagn Invest.* março de 2004;16(2):167–70.
11. Simson E, Gascon-Lema MG, Brown DL. Performance of automated slidemakers and stainers in a working laboratory environment - routine operation and quality control. *Int J Lab Hematol.* fevereiro de 2010;32(1 Pt 1):e64-76.
12. Brahimi M, Osmani S, Arabi A, Enta-Soltane B, Taghezout Z, Elkahili BS, et al. The estimation of platelet count from a blood smear on the basis of the red cell: platelet ratio. *Turk J Haematol.* 5 de março de 2009;26(1):21–4.
13. Anchinmane VT, Sankhe SV. Utility of peripheral blood smear in platelet count estimation. *Int J Res Med Sci.* 25 de janeiro de 2019;7(2):434.

14. Pohland D. Evaluation of the automated haematology analyser Sysmex M-2000. *J Clin Chem Clin Biochem.* janeiro de 1989;27(1):41–7.
15. DeNicola DB. Advances in hematology analyzers. *Top Companion Anim Med.* maio de 2011;26(2):52–61.
16. Oliveira RAG, Takadachi MM, Nonoyama K, Barretto OC de O. The absolute recommendation of chamber Neubauer method for platelets counting instead of indirect methods in severe thrombocytopenic patients. *J Bras Patol Med Lab.* junho de 2003;39(2):139–41.
17. Becker M, Moritz A, Giger U. Comparative clinical study of canine and feline total blood cell count results with seven in-clinic and two commercial laboratory hematology analyzers. *Vet Clin Pathol.* dezembro de 2008;37(4):373–84.
18. Stockham SL, Scott MA. *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária.* 2 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
19. Olsen LH, Kristensen AT, Qvortrup K, Henrit DP. Comparison of manual and automated methods for determining platelet counts in dogs with macrothrombocytopenia. *J Vet Diagn Invest.* 2004; 16: 167-170.