

## **AVALIAÇÃO DO ERRO ANALÍTICO NA CONTAGEM AUTOMATIZADA DE PLAQUETAS EM FELINOS TROMBOCITOPÊNICOS: ESTUDO RETROSPECTIVO**

Victor Nowosh<sup>1</sup>; Sântila Antunes Cardoso Bravo<sup>2</sup>; Beatriz Teixeira Gomes da Silva<sup>3</sup>; Joylson de Jesus Pereira<sup>3</sup>; Aline Moreira de Souza<sup>4</sup>

1 Médico Veterinário Mestrando do Programa de Pós Graduação em Clínica Médica e Reprodução Animal da Universidade Federal Fluminense (nowosh.mv@gmail.com) Niterói, Rio de Janeiro - Brasil.

2 Aluna de Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica pela Universidade Federal Fluminense.

3 Médico Veterinário Residente do Programa de Residência Multiprofissional em Saúde da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

4 Professora do Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

---

**Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014**

### **RESUMO**

Precisão na contagem automática de plaquetas em Medicina Veterinária é um desafio já que a difícil contenção e coleta predispõem a ativação e agregação plaquetária, levando a erros na leitura do histograma, além de poder haver sobreposição da leitura entre plaquetas e hemácias devido ao baixo volume globular médio em muitas espécies. O objetivo deste estudo foi avaliar o erro analítico na leitura automática de plaquetas por impedância em gatos com trombocitopenia. Recolheram-se dados de resultados de hemogramas de 217 gatos trombocitopênicos (<200.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>) realizados ao longo de 30 meses em uma população hospitalar. Seguindo os procedimentos operacionais padrão, as amostras foram acondicionadas em tubo com EDTA e processadas no Contador Hematológico Automatizado Veterinário Poch 100iV Diff (Sysmex®) dentro de uma hora pós-coleta. A confirmação da trombocitopenia e detecção de alterações na morfologia plaquetária foram realizadas por análise microscópica do esfregaço sanguíneo. A análise estatística demonstrou não haver correlação entre a liberação de “flag” plaquetário e a presença de alterações morfológicas em plaquetas. Além disso, muitos exames foram corrigidos pela estimativa de plaquetas em lâmina, pois o aparelho tende a acentuar a trombocitopenia presente. Isto reforça a importância de uma avaliação microscópica cuidadosa de plaquetas em felinos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Agregados Plaquetários; Ativação Plaquetária; Automação em plaquetometria.

## EVALUATION OF ANALYTICAL ERROR IN AUTOMATED PLATELET COUNT METHOD IN THROMBOCYTOPENIC FELINES: RETROSPECTIVE STUDY

### ABSTRACT

Accuracy in automated platelet counts in Veterinary Medicine turns out to be challenging, since difficult restraining of patients during blood sampling leads to activation and clumping of platelets, causing histogram reading error, besides a possible overlapping of red cells and platelet readings due to the low mean corpuscular volume in some species. This report main goal is to evaluate analytical error in automated platelet count method in cats with thrombocytopenia. Complete blood counts (CBC) records of 217 thrombocytopenic cats (less than 200,000 platelets/mm<sup>3</sup>) were reviewed. Following the standard operational procedure for blood sampling and analysis, a blood sample was collected in EDTA tube and analyzed in poCH-100iV Diff Automatic Veterinary Counter (Sysmex<sup>®</sup>) in an hour post-sampling period. Blood smears were observed by optical microscopy in order to confirm thrombocytopenia and to scan for platelet morphology alteration. Statistical analysis showed that there was no correlation between platelet series flag report and morphological alterations in the blood smears. Plus, many platelet counts were corrected by estimation of platelet count from the blood smear, since the equipment tends to emphasize the thrombocytopenia. Thus, this reinforces the importance of a careful microscopic evaluation of platelet series in feline samples.

**KEYWORDS:** Automatic Platelet Counting; Platelet activation; Platelet clumping.

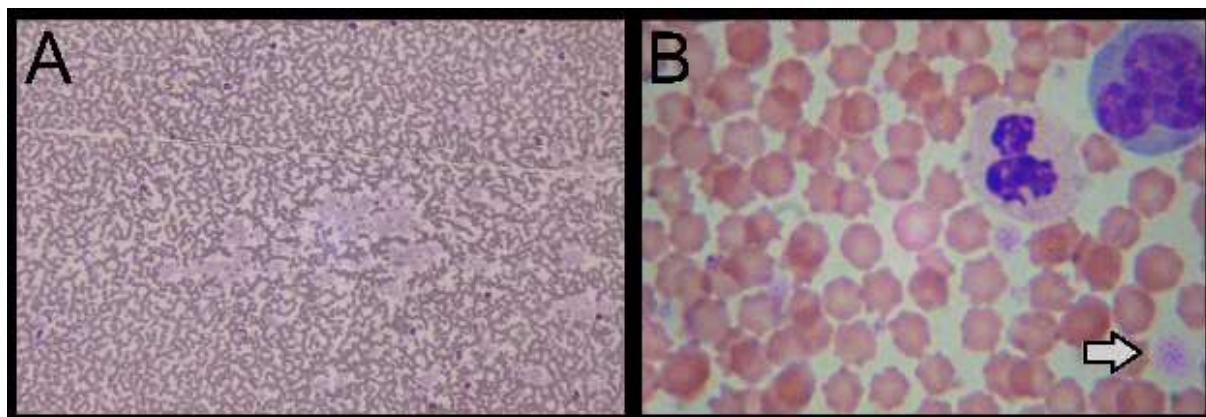
### INTRODUÇÃO

Plaquetas são pequenas células anucleadas originadas a partir da fragmentação do citoplasma de megacariócitos na medula óssea. A linhagem celular das plaquetas é a segunda mais numerosa no sangue circulante e elas são essenciais na coagulação, manutenção da integridade vascular e controle da hemostasia, entre outras funções (RUSSELL, 2010). Sendo a primeira linha de defesa contra sangramentos, as plaquetas possuem uma série de receptores de membrana responsáveis por reconhecer sinais ambientais e ativarem funções plaquetárias, como adesão e agregação plaquetária e liberação de grânulos (BOUDREAUX & CATALFAMO, 2010).

A trombocitopenia é a desordem hemostática adquirida mais comum em pequenos animais (RUSSELL, 2010). Apesar disso, não é tão comum em gatos, sendo mais frequente encontrar uma trombocitopenia falsa ou pseudotrombocitopenia (NORMAN et al., 2001). Os mecanismos que podem levar à trombocitopenia são: produção diminuída ou defeituosa de plaquetas; consumo ou perda; destruição plaquetária; e sequestro plaquetário. Pseudotrombocitopenia pode ser causada por dificuldade durante a coleta (RUSSELL, 2010).

Uma vez que é um distúrbio de grande importância clínica, os exames para detecção de plaquetas fazem parte da rotina do laboratório clínico veterinário. Métodos manuais incluem a contagem em hemocitômetro, embora ela seja pouco prática para a rotina de um laboratório comercial (BECKER et al., 2008; LILLIEHÖÖK & TVEDTEN, 2009; SCHWEIRGERT et al., 2010). Também é possível calcular um valor estimado da plaquetometria com base no número médio de plaquetas por campo microscópico durante a hematoscopia, podendo atingir uma boa correlação (SCHWEIRGERT et al., 2010).

A contagem automatizada de plaquetas é extremamente desejável para aumentar a produtividade e reduzir o tempo gasto na contagem. Apesar disso, os métodos automáticos são muito susceptíveis a erros de leitura da plaquetometria em Medicina Veterinária, já que, devido à dificuldade de coleta de amostras, principalmente em felinos, há predisposição à formação de agregados plaquetários (Figura 1A). Assim como há sobreposição da leitura entre hemácias e plaquetas, especialmente macroplaquetas (Figura 1B), devido ao volume globular reduzido das hemácias (NORMAN et al., 2001; BECKER et al., 2008; TVEDTEN & JOHANSSON, 2010; GRANNAT et al., 2011).



**FIGURA 1** A- Agregados plaquetários em esfregaço sanguíneo de paciente felino. Aumento de 40x. B-Presença de macroplaqueta (seta) em esfregaço sanguíneo de paciente felino. Aumento de 1000x. Comparar seu tamanho com as hemácias a seu redor. Coloração Instantânea. **Fonte:** Arquivos do Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. 2014.

Erros de leitura do histograma pelo aparelho devem ser detectados automaticamente e informados ao patologista como “flags”. A série plaquetária possui “flags” específicos que indicam presença de macroplaquetas, presença de agregação plaquetárias, anisocitose plaquetária e baixa contagem de plaquetas. Nestes casos, é recomendável avaliar a lâmina para detectar a causa do “flag” (SYSMEX, 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar a confiabilidade de um método analítico automatizado de impedância na determinação do número de plaquetas em gatos trombocitopênicos e na detecção de alterações na série plaquetária.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um levantamento de dados de pacientes felinos atendidos em um período de 30 meses no Hospital Universitário de Medicina Veterinária Professor Firmino Mársico Filho da Universidade Federal Fluminense (HUVET-UFF). Os critérios de inclusão para este estudo eram ser felino, atendido no HUVET-UFF, e estar com resultado de exame automatizado indicando trombocitopenia, considerando-se como trombocitopenia um valor de plaquetometria abaixo de 200.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. Foram incluídos neste estudo um total de 217 pacientes.

As amostras de sangue em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foram recebidas e processadas no Laboratório de Patologia

Clinica do HUVET-UFF em até uma hora pós-coleta. O método de contagem utilizado pelo aparelho é o método de impedância elétrica (SYSMEX, 2007).

Esfregaços sanguíneos foram confeccionados e corados em corante instantâneo (Panóptico Instant Prov<sup>®</sup>) para análise microscópica em aumento de 1000X, confirmando a trombocitopenia e buscando alterações morfológicas nas plaquetas.

A partir dos resultados obtidos, observou-se nos resultados dos exames se o aparelho acusou a presença de “flags” envolvendo a série plaquetária. De acordo com SYSMEX (2007), o contador hematológico utilizado reconhece erros no histograma da leitura de plaquetas correspondentes a macroplaquetas, aglutinação e agregação plaquetária.

Os resultados da automação foram comparados com alterações hematoscópicas detectadas em morfologia plaquetária na lâmina. Os resultados foram tabulados e foi realizada análise estatística por meio do “software” Epi-info<sup>®</sup> 7.1.4 (EPI, 2014) com nível de significância de 95%, utilizando-se para tal o teste de qui-quadrado.

## RESULTADOS

Os resultados encontrados foram tabulados e estão demonstrados na Tabela 1 a seguir.

Um total de 181/217 (83,4%) exames apresentaram “flag” na série plaquetária, sugerindo a presença de agregação plaquetária ou de macroplaquetas, enquanto em 36/217 (16,6%) exames não houve indicação de alteração de série plaquetária no histograma.

Ao confrontar os dados de hematoscopia, entretanto, não foram observadas alterações em um total de 96/217 (44,2%) exames, dentre os quais 80/181 (44,1%) apresentaram indicação de alteração no histograma pelo método automático e em apenas 16/36 (48,4%) não houve indicação de erro. Os demais 121/217 (55,8%) apresentaram algum tipo de alteração morfológica em lâmina, dentre os quais 88/217 (40,6%) apresentaram ativação e agregação plaquetária e 33/217 (15,2%) apresentaram plaquetas ativadas e macroplaquetas sem agregação associada.

Dos exames que apresentaram agregação plaquetária, 74/181 (40,9%) se enquadraram nos exames com “flag” pelo método automático, enquanto em 14/36 (38,9%) não houve acusação de erro no histograma. Já, dos exames que apresentaram apenas macroplaquetas, 27/181 (14,9%) se enquadraram nos exames com “flag” e em 6/36 (16,7) não houve acusação de erro. Dessa forma, o total de exames com erro detectado tanto pela microscopia quanto pela máquina foi de 101/181 (55,8%) e o total de exames com alterações microscópicas em que o método automático foi incapaz de detectar erro foi de 20/36 (55,6%).

**TABELA 1** Tabela de contingência comparando a relação causa-efeito entre as variáveis de alterações morfológicas em plaquetas no exame e “flag” no histograma plaquetário em pacientes felinos trombocitopênicos ao longo de 30 meses de atendimento no Hospital Universitário de Medicina Veterinária Professor Firmino Mársico Filho da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. 2014.

			“Flag” no histograma		
			Presente	Ausente	Total
Alterações morfológicas em plaquetas no exame	Presente	Valor absoluto	80	16	96
		% linha	83,33%	16,67%	100,00%
		% coluna	44,20%	44,44%	44,24%
	Ausente	Valor absoluto	101	20	121
		% linha	83,47%	16,53%	100,00%
		% coluna	55,80%	55,56%	55,76%
	Total	Valor absoluto	181	36	217
		% linha	83,41%	16,59%	100,00%
		% coluna	100,00%	100,00%	100,00%

$X^2 = 0,0007$ ;  $p = 0,9783$

Convém citar que muitas das fichas revisadas para o presente estudo continham, além dos resultados liberados pelo contador hematológico, resultados estimados durante a avaliação da lâmina para correção da contagem de plaquetas, realizada durante avaliação hematoscópica, gerando diversos resultados mais altos do que os valores liberados pelo contador automático.

## DISCUSSÃO

A contagem manual de células, especialmente de plaquetas, em hemocítometro está propensa à baixa precisão, além de requerer um tempo excessivo, tornando-se impraticável para uso na rotina (BECKER et al., 2008; LILLIEHÖÖK & TVEDTEN, 2009; SCHWEIRGERT et al., 2010). Os contadores hematológicos utilizados rotineiramente em laboratórios comerciais demonstram ser extremamente úteis ao reduzirem o tempo de análise, e são considerados altamente precisos devido à grande quantidade de células contadas, aplicação de métodos de controle de qualidade, manuseio por técnicos treinados e manutenção rotineira dos equipamentos (BECKER et al., 2008).

Apesar disso, o presente estudo demonstrou que os resultados liberados por contadores hematológicos para a série plaquetária em felinos devem ser avaliados com cautela devido à possibilidade de erros na detecção de “flags” e na contagem correta de plaquetas. Estes achados corroboram com diversos autores que reforçam a necessidade de avaliar cuidadosamente a lâmina para confirmar os resultados do método automático (NORMAN et al., 2001; BECKER et al., 2008; SCHWEIRGERT et al., 2010).

À análise estatística, observou-se baixa relação de causa-efeito entre “flags” na série plaquetária as alterações encontradas na lâmina ( $p = 0,9783$ ). O valor de  $p$  próximo a 1 indica grande tendência à distribuição de resultados ao acaso, demonstrando que o “flag” em animais trombocitopênicos não pode ser considerado

uma ferramenta útil. BECKER et al. (2008) chegaram a uma conclusão semelhante ao detectarem grande número de exames com resultados normais e “flags” incorretos e resultados questionáveis sem “flags” em um estudo com amostras de cães, gatos e equinos saudáveis e doentes, o que demonstra que mesmo nas demais espécies, os “flags” têm pouca utilidade prática.

Uma vez que os “flags” são detectados pelas características do histograma, eles podem estar associados à dificuldade de leitura de plaquetas em felinos. Usualmente, contadores automatizados detectam pseudotrombocitopenia para essa espécie e a trombocitopenia verdadeira é incomum, podendo ser confundida com um resultado falso e subestimada quando presente (NORMAN et al., 2001). Durante o levantamento, foram observados muitos resultados corrigidos de plaquetas em felinos, uma vez que apresentavam plaquetometria baixa pelo método automático em comparação à avaliação da lâmina. De acordo com SCHWEIRGERT et al. (2010), recomenda-se a utilização de mais um método além do automático quando houver trombocitopenia para confirmar a alteração e minimizar o erro, detectando em seu estudo uma boa correlação entre a estimativa e o hemocítmetro, sendo a primeira mais rápida e adequada à rotina.

Resultados de plaquetometria falsamente reduzidos pelo método automático corroboram com diversos estudos. BECKER et al. (2008) compararam a precisão de diferentes equipamentos hematológicos automatizados para leitura de amostras veterinárias e, apesar de encontrarem alta correlação em algumas linhagens celulares, foram detectados grandes alterações envolvendo a plaquetometria em todos os aparelhos. DEWHURST et al. (2003) também encontraram um coeficiente de correlação relativamente baixo entre os resultados do aparelho e contagens manuais, recomendando interpretação dos resultados automáticos com cautela, reforçando a necessidade de avaliação microscópica.

Uma possível causa para interferência na plaquetometria e na leitura do histograma é a sobreposição da leitura de plaquetas e hemácias em aparelhos que se utilizam da impedância elétrica (NORMAN et al., 2001; BECKER et al., 2008). Os achados de LILLIEHÖÖK & TVEDTEN (2009) confirmam a participação da sobreposição no erro de leitura, afirmando que o método óptico, que se baseia no padrão de dispersão de luz e não leva o tamanho em consideração, leva à maior precisão na contagem de plaquetas em felinos com macroplaquetas quando comparada aos métodos de impedância. SCHWEIRGERT et al. (2010) também relataram que o método óptico apresenta alta sensibilidade e correlação com a contagem em hemocítmetro. Relata-se, no entanto, que o erro analítico ainda pode estar presente quando há agregação plaquetária, pois plaquetas agregadas apresentam padrão de dispersão diferente de plaquetas isoladas (NORMAN et al., 2001).

Outra possibilidade de interferência é a presença de agregados sequestrando plaquetas e sendo detectados como uma única célula gigante nos aparelhos que utilizam o método de impedância (NORMAN et al., 2001). As plaquetas dos felinos são mais reativas e agregam mais facilmente que de outras espécies (RUSSELL, 2010). Outros autores também relatam a agregação plaquetária como uma causa importante de pseudotrombocitopenia (NORMAN et al., 2001; TVEDTEN & JOHANSSON, 2010; GRANNAT et al., 2011). No presente estudo, foi observada agregação plaquetária em 40,6% dos exames, demonstrando a importância desta alteração. Visando a tentar contornar esta interferência, estão sendo estudadas substâncias que inibam a formação de agregados, como a prostaglandina E1

(TVEDTEN & JOHANSSON, 2010) e a associação do EDTA a anticoagulante citrato, teofilina, adenosina e dipiridamol (GRANNAT et al., 2011).

Sendo assim, a avaliação do esfregaço sanguíneo e análise morfológica não podem ser descartadas, pois são as únicas formas de avaliar corretamente as alterações plaquetárias em lâmina (TASKER et al., 2001; SCHWEIRGERT et al., 2010).

### CONCLUSÃO

Conclui-se que os resultados automáticos para a série plaquetária em felinos devem ser considerados com muita cautela, uma vez que a presença de “flags” não possui correlação com as alterações morfológicas observadas na hematoscopia, sendo esta essencial para a interpretação dos resultados e para correção de pseudotrombocitopenia quando esta for detectada.

### REFERÊNCIAS

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. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 37, n. 4, p. 273-384, 2008.

BOUDREAUX, K. B; CATALFAMO, J. L. Platelet Biochemistry, Signal, Transduction and Function. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup> ed. Ames: Blackwell publishing ltd, 2010. Cap.76, p. 569-575.

DEWHURST, E. C.; CRAWFORD, E.; CUE, S.; DODKIN, S.; GERMAN, A.J.; PAPASOULIOTIS, K. Analysis of canine and feline haemograms using the VetScan HMT analyser. **Journal of Small Animal Practice**. v. 44, n. 10, p. 443-448, 2003.

EPI Info™ for Windows, version 7.1.4. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. Division of Public Health Surveillance and Informatics, 2014. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/epiinfo/7/index.htm/>>. Acesso em: 01 set. 2014.

GRANAT, F.; GEFFRÉ, A; BRAUN, J. P.; TRUMEL, C. Comparison of platelet clumping and complete blood count results with Sysmex XT-2000iV in feline blood sampled on EDTA or EDTA plus CTAD (citrate, theophylline, adenosine and dipyrindamole). **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 13, n. 12, p. 953-958, 2011.

LILLIEHÖÖK, I.; TVEDTEN, H. Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 38, n. 2, p. 163-174, 2009.

NORMAN, E. J.; BARRON, R. C. J; NASH, A. S.; CLAMPITT; R. B. Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 30, n. 3, p. 137-140, 2001.

RUSSELL, K. E. Platelet Kinetics and Laboratory Evaluation of Thrombocytopenia. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup> ed. Ames: Blackwell publishing ltd, 2010. Cap.77, p. 576-585, 2010.

SCHWEIRGERT, A.; REZENDE, F. H.; FANTONI, D. T.; MOROZ, L. R. Avaliação da contagem plaquetária pelo contador automático QBC Vet Autoread® comparado com estimativa em esfregaço sanguíneo e contagem em hemocitômetro. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 31, n. 4, p. 1001-1008, 2010.

SYSMEX. *poch-100iV Diff*: instructions for use. Kobe: Sysmex Corporation, 2007.

TASKER, S.; CRIPPS, P. J.; MACKIN, A. J. Evaluation of methods of platelet counting in the cat. **Journal of Small Animal Practice**. v. 42, p. 326-332, 2001.

TVEDTEN, H.; JOHANSSON, P. Feline platelet counting with prostaglandin E1 on the Sysmex XT-2000iV. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 39, n. 2, p. 190-192, 2010.