



PADRONIZAÇÃO DO ANALISADOR HEMATOLÓGICO AUTOMATIZADO VETERINÁRIO Sysmex poch-100iV Diff PARA MICOS-DE-CHEIRO, *Saimiri sciureus* (PRIMATES: CEBIDAE).

Camila da Silva Longa¹, Sabrina Destri Emmerick Campos¹, Aline Moreira de Souza², Sávio Freire Bruno², Nádia Regina Pereira Almosny².

¹Aluna do curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil. E-mail: mila.longa@gmail.com;

²Professor Doutor da Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil.

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

RESUMO

O uso de contadores hematológicos automáticos é uma realidade crescente que tem incorporado o hemograma na rotina diária de médicos veterinários. *Saimiri sciureus*, pequeno primata da família Cebidae, tem ampla distribuição na região da Amazônia e consiste em uma espécie de grande interesse no mercado pet e na pesquisa biomédica de doenças neotropicals, o que torna importante a adoção de métodos que aperfeiçoem a realização de exames complementares na espécie. Objetivou-se padronizar o analisador hematológico Sysmex Poch-100iV Diff para hemograma de *S. sciureus*, comparando os resultados obtidos com o hemograma manual tradicional. Foram utilizadas amostras de sangue de 38 animais. O analisador automatizado foi calibrado e todas as amostras de sangue foram submetidas ao hemograma automatizado e manual. Após a realização dos testes, procedeu-se análise de variância (ANOVA) entre os dois grupos, a qual apresentou um p-valor maior do que 0,05 em todas as variáveis propostas, demonstrando boa acurácia do aparelho utilizado. Concluiu-se que o analisador hematológico Sysmex Poch-100iV Diff foi eficaz para realização do hemograma em mico-de-cheiro e que o mesmo apresentou vantagens em relação ao hemograma manual.

PALAVRAS-CHAVE: Automação, hemograma, métodos hematológicos, primata.

STANDARDIZATION OF AUTOMATED Sysmex Poch-100iV Diff VETERINARY HEMATOLOGY ANALYZER TO SQUIRREL MONKEY, *Saimiri sciureus* (PRIMATES: CEBIDAE).

ABSTRACT

The use of automated hematology analyzers is a growing reality that has incorporated the complete blood count (CBC) into the daily routine of veterinarians. *Saimiri sciureus*, a Cebidae small primate, is widespread in the Amazon and is a species of great interest in the pet market and in biomedical research of neotropical diseases, which makes it important to adopt methods that improve the performance of their laboratory tests. The aim of this study was to standardize the automated Sysmex Poch-100iV Diff hematology analyzer for CBC of *S. sciureus*, comparing the results with the traditional blood count. Blood samples of 38 animals were used. The

automated analyzer was calibrated and all blood samples were subjected to automated and manual CBC. After the tests, analysis of variance (ANOVA) was proceeded between the two groups, which showed a p-value greater than 0.05 for all variables proposed, showing good accuracy of the automated hematology analyzer. It was concluded that the Sysmex Poch-100iV Diff hematology analyzer was effective for the CBC in squirrel monkey and that it has benefits when compared to manual blood count.

KEYWORDS: Automation, complete blood count, hematological methods, primate.

INTRODUÇÃO

O hemograma é uma das ferramentas mais utilizadas em clínicas e consultórios veterinários na avaliação quantitativa e qualitativa das células sanguíneas circulantes e na investigação de anormalidades ou resposta às doenças (GROTTO, 2009, RIZZI et al., 2010). A disponibilidade de contadores hematológicos automáticos é uma realidade cada vez mais crescente que tem permitido ao médico veterinário incorporar o hemograma como teste de triagem em sua rotina diária (RIOND et al., 2011). Entretanto, para os clínicos de animais silvestres tradicionalmente se observa a necessidade de hemogramas manuais em detrimento dos métodos eletrônicos (ALMOSNY & SANTOS, 2001).

O aparelho poch-100iV Diff (Sysmex do Brasil Indústria e Comércio Ltda®, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) é um analisador hematológico automatizado de uso veterinário para amostras sanguíneas de cães, gatos, cavalos e bovinos, permitindo ainda a adição de 13 novas espécies (RIOND et al., 2011). Este aparelho utiliza as tecnologias de impedância e de fluxo com foco hidrodinâmico, que previne a recirculação ou coincidências de células, além do uso do método de hemoglobina livre de cianeto.

O Serviço de Criação de Primatas Não Humanos do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (SCPrim/Cecal/Fiocruz), Rio de Janeiro, Brasil, consiste em um plantel com colônias de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*), macaco-cynomolgus (*Macaca fascicularis*) e mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), utilizados em pesquisa biomédica. A colônia de micos-de-cheiro foi criada em 1987 com animais trazidos da região Amazônica (ANDRADE et al., 2004).

Saimiri sciureus apresenta-se amplamente distribuído em grande parte da Amazônia Brasileira, estendendo-se para Colômbia, Bolívia, Peru, Equador, Guianas, Venezuela, Costa Rica e Panamá, sendo frequentemente encontrado perto de assentamentos humanos e apesar de raramente caçados, estes animais são cada vez mais capturados para o mercado pet (JACK, 2007).

Tendo em vista o interesse por esta espécie como animal de companhia e como modelo na pesquisa biomédica, particularmente, de doenças neotrópicas, torna-se fundamental a adoção de métodos para aperfeiçoar a realização de exames complementares na espécie. Assim, o objetivo deste estudo foi padronizar o uso do analisador hematológico Sysmex Poch-100iV Diff para hemograma de micos-de-cheiro (*S. sciureus*) pertencentes à colônia do SCPrim/Cecal/Fiocruz, comparando os resultados obtidos com os resultados do hemograma manual tradicional.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo hematológico foram utilizadas amostras de sangue de 38 micos-de-cheiro pertencentes à colônia SCPrim/Cecal/Fiocruz, alojados desde 2007 em recintos-padrão de 19,95 m², com um macho reprodutor para em média cinco

fêmeas reprodutoras e sua prole, com aproximadamente nove animais em cada gaiola.

No dia precedente à coleta das amostras de sangue, a colônia recebeu arraçoamento ao fim do dia e os animais permaneceram em jejum até o final do procedimento, que teve início cerca de 15 horas após a oferta do alimento seco (ração peletizada). Para a coleta, primeiramente, os animais foram contidos fisicamente com o auxílio de puçá e, posteriormente, foi feita a contenção química utilizando cloridrato de cetamina (10mg/kg) associado ao midazolam (0,04mL/kg) aplicados por via intramuscular, conforme descreve FASANO (2010).

Foram obtidos 2,5 mL de sangue por punção da veia femoral, acondicionados em frascos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante e esfregaços sanguíneos foram confeccionados após a coleta. O material foi identificado e armazenado em embalagens térmicas, conforme Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004 da Anvisa e Norma para o Transporte de Material Biológico Externo ao Campi Fiocruz. Os hemogramas foram realizados no Laboratório de Pesquisa Clínica e Molecular Marcílio Dias do Nascimento na Universidade Federal Fluminense – UFF, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. O transporte foi realizado por veículo autorizado.

Cada amostra de sangue (n=38) foi submetida simultaneamente ao hemograma automatizado e ao hemograma manual, a fim de evitar discordância de resultados em função de tempo. Os métodos manuais foram utilizados para comparação com os resultados do analisador automatizado.

A calibração do aparelho Sysmex Poch-100iV Diff foi acompanhada por técnico especializado e seguiu as recomendações do fabricante, baseada em estudo prévio sobre parâmetros hematológicos de referência para *S. sciureus* sob protocolo anestésico similar ao empregado no presente estudo (ANDRADE et al., 2004).

Utilizou-se método do hemocítômetro (Câmara de Neubauer Improved®) para as contagens manuais totais de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, conforme ALMOSNY & SANTOS, (2001) e as contagens manuais foram realizadas em duplicata sempre pelos mesmos profissionais, conforme recomendações para estudos envolvendo métodos comparativos (JENSEN & KJELGAARD-HANSEN, 2006).

Para determinação do hematócrito foi realizado o preenchimento com sangue total de $\frac{3}{4}$ de tubo capilar sem heparina (Perfecta®, São Paulo, São Paulo, Brasil), vedado em uma de suas extremidades pelo calor. Os tubos foram submetidos a cinco minutos de centrifugação (11089 g) em microcentrifuga (Micro spin®, Spin Lab, Ribeirão Preto, São Pulo, Brasil), e leitura em régua para microhematócrito (ALMOSNY & SANTOS, 2001). A hemoglobina foi determinada em espectrofotômetro semi-automático (BIO-200F, Bioplus®, São Paulo, São Paulo, Brasil), pelo método da cianometemoglobina com reagente de Drabkin, utilizando kit comercial (Labtest®, Labtest Diagnóstica AS, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), conforme recomendações do fabricante.

As mesmas amostras de sangue total em EDTA de cada animal foram submetidas à análise automatizada, com contagens totais de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, e determinação do hematócrito e hemoglobina.

Os esfregaços sanguíneos foram fixados em metanol, corados em solução de Giemsa (Merck®, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) e avaliados em objetiva de imersão de forma a conferir os resultados encontrados e avaliar a morfologia das células sanguíneas.

As variáveis hematimetria, hemoglobinometria, hematócrito, plaquetometria e leucometria global dos hemogramas manuais e automatizados foram armazenadas em uma planilha eletrônica (Microsoft Excel®, 2010, São Paulo, São Paulo, Brasil). Foram calculadas as médias e desvios-padrão e procedeu-se análise de variância (ANOVA) entre os dois grupos a fim de verificar se havia diferença significativa ($p < 0,05$) entre os métodos.

Este estudo hematológico obteve aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais da FIOCRUZ sob licença nº LW-24/11.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias e os desvios-padrão para as variáveis estudadas encontram-se na tabela 1. A ANOVA entre os grupos para cada variável apresentou um p-valor maior do que 0,05, o qual denota que não houve diferença significativa entre eles, demonstrando boa acurácia do aparelho Sysmex Poch-100iV Diff após calibração para a espécie mico-de-cheiro e sua consequente validação frente aos métodos manuais tradicionais.

TABELA 1. Médias, desvios-padrão e p-valor, segundo análise de variância, para hematimetria, hemoglobinometria, hematócrito, leucometria global e plaquetometria, analisados sob a metodologia manual e automatizada, em 38 exemplares de mico-de-cheiro, *Saimiri sciureus*.

| Variável | Média* ± Desvio-padrão | | p-valor |
|---|---------------------------|------------------------------|---------|
| | Hemograma manual | Sysmex Poch-100iV Diff | |
| Hematimetria ($\times 10^6/\mu\text{L}$) | 7,4 ^A ± 1,154 | 7,7 ^A ± 0,440 | 0,0929 |
| Hemoglobinometria (g/dL) | 14,4 ^A ± 0,744 | 14,5 ^A ± 0,513 | 0,6677 |
| Hematócrito (%) | 42,5 ^A ± 3,065 | 42,9 ^A ± 3,308 | 0,5642 |
| Leucometria Global ($\times 10^3/\mu\text{L}$) | 11,8 ^A ± 3,535 | 11,9 ^A ± 3,262 | 0,9425 |
| Plaquetometria ($\times 10^3/\mu\text{L}$) | 354 ^A ± 91,518 | 411,6 ^A ± 110,868 | 0,3965 |

*Médias seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente.

Em relação à avaliação morfológica dos esfregaços sanguíneos em objetiva de imersão, não foram encontradas atipias linfocitárias ou toxicidade de neutrófilos. Normocromia e normocitose foram observadas nos eritrócitos.

O gênero *Saimiri* pertence à família Cebidae e atualmente é composto por

cinco espécies (RYLANDS & MITTERMEIER, 2009). *Saimiri sciureus* são pequenos primatas cujos machos e fêmeas adultos atingem aproximadamente 740g e 640g, respectivamente (JACK 2007) tamanho que dificulta a obtenção de grande volume de sangue. O aparelho Poch-100iV Diff utiliza 15µL de sangue total por aspiração, permitindo diminuir o volume total de sangue a ser utilizado no hemograma e favorecendo a utilização da amostra coletada em outras análises como testes sorológicos ou bioquímicos, implementando o diagnóstico para a espécie. Tal fato é importante, uma vez que primatas não humanos podem sucumbir rapidamente às doenças, sendo este um dos maiores desafios no cuidado ambulatorial desses animais em cativeiro, em especial quando jovens (BRADY et al., 2006).

Muitas vezes, situações potencialmente estressantes para animais de experimentação são práticas comuns de manejo, como a contenção física, administração de fármacos, transporte, dor e doenças (ANDRADE et al., 2002). A captura, o manejo e o transporte desencadeiam respostas de estresse que podem acarretar reações potencialmente fatais (FOWLER, 2009). Uma vez que os contadores automatizados realizam os hemogramas com mais agilidade, permitem maior número de análises em um mesmo dia, reduzindo o estresse de vários dias de captura e contribuindo para o bem estar dos animais no cativeiro.

Visando reduzir os fatores estressores da dor e da contenção física prolongada, os animais do presente estudo foram contidos farmacologicamente. O uso da cetamina, na dose de 10mg/kg foi recomendado por ANDRADE et al. (2004) em estudo hematológico de *S. sciureus*. O cloridrato de cetamina promove um estado dissociativo e é comumente utilizado para contenção química e anestesia de primatas não humanos (LEE et al., 2010). O midazolam pode ser utilizado em associação à cetamina por permitir miorrelaxamento, tranquilização, hipnose e amnésia, além de possuir atividade anticonvulsivante (OLKKOLA & AHONEN, 2008). A associação de cetamina e midazolam, tal como a escolhida no presente estudo, já foi utilizada com sucesso em primatas não humanos por CHAGAS et al. (2010).

Cabe ressaltar que os contadores hematológicos fornecem informações adicionais ao hemograma, como os índices de amplitude de distribuição eritrocitária (RDW), cujos valores refletem o grau de heterogeneidade das hemácias (TEMIZEL et al., 2011) e que, futuramente, podem ser úteis no manejo de *S. sciureus*, proporcionando novas abordagens para pacientes com anemia.

Em última análise, os dados obtidos sugerem que o emprego do hemograma automatizado na rotina clínica de animais silvestres de cativeiro configure um ponto-chave no manejo e no diagnóstico precoce das principais alterações clínicas e laboratoriais presentes nos animais.

CONCLUSÃO

Considerando a ANOVA, concluiu-se que os resultados de hematimetria, hemoglobinometria, hematócrito, leucometria global e plaquetometria obtidos por impedância podem ser utilizados com segurança para *S. sciureus*. O analisador hematológico automatizado Sysmex Poch-100iV Diff foi eficaz para realização do hemograma nesta espécie. O rápido processamento, precisão de resultados, consumo de pequeno volume de sangue e o fornecimento de índices adicionais foram vantajosos frente ao hemograma manual.

REFERÊNCIAS

- ALMOSNY, N. R. P.; SANTOS, L. C. **Laboratory Support in Wild Animal Medicine**. In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. *Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals*. Ames: Iowa State University Press, 2001. p.500-505.
- ANDRADE, A., PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (orgs). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.
- ANDRADE, M. C. R.; RIBEIRO, C. T.; SILVA, V. F.; MOLINARO, E. M.; GONÇALVES, M. A. B.; MARQUES, M. A. P.; CABELLO, P. H.; LEITE, J. P. G. *Biologic Data of Macaca mulatta, Macaca fascicularis, and Saimiri sciureus Used for Research at the Fiocruz Primate Center*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.99, n.6, p.581-589, 2004.
- BRADY, A. G.; GIBSON, S. V.; WILLIAMS, L. E.; ABEE, C. R. **Squirrel Monkeys as an Example of Primate Nursery Medicine**. In: SACKETT, G. P.; RUPPENTHAL, G. C.; ELIAS, K. (eds). *Nursery Rearing of Nonhuman Primates in the 21st century*. New York: Springer Science+Business Media, Inc., 2006. p.355-370.
- CHAGAS, J. A. B.; OLESKOVICZI, N.; MORAES, A. N.; FLÔRES, F. N.; CORRÊA, A. L.; SOUZA JÚNIOR, J. C.; SOARES, A. V.; COSTA, A. Associação de cetamina S(+) e midazolam pelo método convencional de cálculo e pela extrapolação alométrica em bugios-ruivo (*Alouatta guariba clamitans*): resposta clínica e cardiorrespiratória. **Ciênc Rural**, v.40, n.1, 2010. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n1/a407cr1189.pdf>> acesso em 19 set 2014.
- FASANO, D. M. **Anestesia e Controle da Dor**. In: ANDRADE, A.; ANDRADE, M. C. R.; MARINHO, A. M.; FERREIRA FILHO, J. (orgs.). *Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2010, p.365-383.
- FOWLER, M. E. **Stress**. In: FOWLER, M. E. *Restraint and Handling of Wild and Domestic Animals*. 3ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2009. p.65-68.
- GROTTO, H. Z. W. O hemograma: importância para a interpretação da biopsia. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.31, n.3, p.178-182, 2009.
- JACK, K. 2007. **The cebines: toward an explanation of variable social structure**. In: Campbell, C. J.; Fuentes, A.; Mackinnon, K. C.; Panger, M.; Bearder, S. K. (eds), *Primates in Perspective*, Oxford: Oxford University Press. p.107-123.
- JENSEN, A. L., KJELGAARD-HANSEN, M. Method comparison in the clinical laboratory. **Vet Clin Pathol**, v.35, n.3, p.276-86, 2006.
- LEE, V. K.; FLYNT, K.S.; HAAG, L. M.; TAYLOR, D. K. Comparison of the Effects of Ketamine, Ketamine–Medetomidine, and Ketamine–Midazolam on Physiologic Parameters and Anesthesia-Induced Stress in Rhesus (*Macaca mulatta*) and Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) Macaques. **Am Assoc Lab Anim Sci**, v.49, n.1, p.57–63, 2010.

OLKKOLA, K. T.; AHONEN, J. Midazolam and other benzodiazepines. **Handb Exp Pharmacol**, v.182, p.335–360, 2008.

RIOND, B.; WEISSENBACHER, S.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. Performance evaluation of the Sysmex poch-100iV Diff hematology analyzer for analysis of canine, feline, equine, and bovine blood. **Vet Clin Pathol**, v.40, n.4, p.484–495, 2011.

RIZZI, T. E.; MEINKOTH, J. H.; CLINKENBEARD, K. D. **Normal Hematology of the Dog**. In: WEISS, D. J.; WARDROP, J. K. Schalm's Veterinary Hematology. 6th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p.799-810.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. **The diversity of the new world primates (Platyrrhini): an annotated taxonomy**. In: GARBER, P. A.; ESTRADA, A.; BICCA-MARQUES, J.C.; HEYMANN, E.W.; STRIER, K.B. (eds). South american primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation. Chicago: University of Chicago, p.23-54, 2009.

TEMIZEL, E. M.; CIHAN, H.; YILMAZ, Z.; AYTUG, N. Evaluation of erythrocyte and platelet indices in canine visceral leishmaniasis. **Ankara Üniv Vet Fak Derg**, v.58, p.185-188, 2011.