

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

ESTUDO COMPARATIVO DOS HEMOGRAMAS DE CÃES REALIZADOS NO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA UEMASUL: EM SISTEMA SEMIAUTOMATIZADO E CONTAGEM MANUAL

LUIZA DOMINGUES DO AMARAL¹, LUCIANO SANTOS DA FONSECA²

AFILIAÇÃO

¹Bolsista PIBIC/FAPEMA - CCA/UEMASUL – Avenida Agrária, 100, Colina Park, Imperatriz-MA, 65900-001;

² Professor Adjunto II do curso de Medicina Veterinária - CCA/ UEMASUL – Avenida Agrária, 100, Colina Park, Imperatriz-MA, 65900-001.

RESUMO

O hemograma é um exame fundamental na medicina veterinária para avaliar a saúde dos animais. Ele fornece informações cruciais sobre os elementos celulares presentes no sangue, sendo essencial para detectar e monitorar várias condições clínicas em animais. O hemograma é dividido em três partes: eritrograma, leucograma e plaquetograma, que avaliam as hemácias, glóbulos brancos e plaquetas, respectivamente. Tradicionalmente, a contagem das células sanguíneas é feita manualmente, mas esse método é demorado e requer mão de obra especializada. Com avanços tecnológicos, surgiram os analisadores hematológicos automatizados, que oferecem eficiência e precisão, podendo analisar cerca de 150 amostras por hora. No entanto, esses dispositivos podem falhar em identificar algumas alterações hematológicas clinicamente significativas. O objetivo deste estudo foi comparar os resultados do hemograma em cães obtidos por métodos semiautomatizados e manuais. Foram realizadas coletas de amostras de sangue de cães, e a equipe foi treinada para realizar tanto a análise manual quanto a automatizada. Os resultados foram comparados em relação a diversos parâmetros hematológicos, como hematócrito, eritrócitos, leucócitos totais e plaquetas. Os resultados mostraram que, com base em um conjunto de 10 amostras, não houve diferenças significativas entre os métodos. No entanto, quando todas as 24 amostras foram analisadas, foram observadas diferenças significativas nos níveis de eritrócitos e leucócitos totais entre os dois métodos. Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato de que o analisador semiautomatizado utiliza o princípio da impedância elétrica para contar as células sanguíneas, o que pode resultar em imprecisões quando várias células passam pela abertura de leitura ao mesmo tempo. Embora o estudo tenha mostrado que o método semiautomatizado é útil e eficaz para análises hematológicas em cães, é importante destacar que o método manual ainda é relevante em certos contextos, como na identificação de alterações morfológicas, detecção de hemoparasitas e identificar inclusões celulares que não podem ser detectadas pelo sistema semiautomatizado.

PALAVRAS-CHAVE: Hemograma; Canino; Técnicas hematológicas.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

INTRODUÇÃO

O hemograma é um dos exames complementares comumente realizados na rotina da medicina veterinária para a avaliação da saúde dos animais (Carmo, et al., 2020). Esse exame fornece informações essenciais sobre a quantidade e qualidade dos elementos celulares presentes no sangue, sendo fundamental na detecção e monitoramento de diversas condições clínicas tanto no homem quanto nos animais (Grotto, 2009).

Tradicionalmente, a contagem das células sanguíneas tem sido realizada manualmente, exigindo um grande investimento de tempo, pois leva em média 40 minutos para ser feito, como também requer mão de obra capacitada, por isso acaba sendo inviabilizado para uma quantia grande de amostras (Schweirgert, 2010). No entanto, com os avanços das tecnologias, surgiram os analisadores hematológicos semiautomatizados e automatizados, que são equipamentos especializados para a contagem e classificação celular, oferecendo uma alternativa mais eficiente e precisa (Borges et al., 2014), pois muitos desses aparelhos conseguem analisar cerca de 150 amostras por hora (Oliveira, 2007). Entretanto, em alguns casos, é necessário a análise em microscopia das distensões sanguíneas para a confirmação de anormalidades morfológicas (Veloso et al., 2011). Embora esses aparelhos proporcionam resultados confiáveis, tais dispositivos podem falhar em identificar algumas alterações hematológicas que podem ser clinicamente significativas (Failace, 2004).

Contudo, nem todas as instituições de ensino públicas e iniciativa privada (laboratórios veterinários particulares) possuem em sua infraestrutura aparelhos hematológicos semiautomatizados e automatizados, desse modo se enfatiza a importância de se conhecer e saber executar a técnica do hemograma manual.

METODOLOGIA

O estudo foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária (LPCVET) da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL) em parceria com o Ambulatório Veterinário da Instituição, no qual foram colhidas amostras de sangue de cães adultos hígidos e ou não, de sexo, idade, raça e peso variadas. Os animais foram selecionados a partir da rotina de atendimento do Ambulatório Veterinário da UEMASUL.

Para o início do hemograma manual, foi realizado o esfregaço sanguíneo e sua identificação e coloração com panótico rápido (Laborclin®), em seguida determina-se o microhematócrito, no qual são preenchidos com sangue um tubo capilar e submetidos a

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

centrifugação a 1100 RPM. Após a leitura é quebrado o tubo capilar para utilizar o plasma sanguíneo no refratômetro para obtenção das proteínas plasmáticas totais (PPT).

Para a determinação do número de hemácias e leucócitos, foi utilizado o hemocitômetro (câmara de Neubauer Improved®), com diluição em pipetas de Thomas, sendo utilizado como diluentes os líquidos de Turk (Newprov®) para leucócitos e líquido de Hayen (Newprov®), para contagem de eritrócitos. Para o diferencial em 100 células foi utilizado os esfregaços sanguíneos devidamente corado e a leitura das lâminas ocorreu em microscopia de luz modelo Zeiss, na objetiva de 100X, em óleo de imersão.

Para processamento em sistema semiautomatizado, foi utilizado o Analisador Hemacounter 60-RT 7600® conforme recomendação do fabricante. Já a análise estatística dos dados tabulados foi realizada utilizando-se o programa estatístico SAS OnDemand versão 9.3. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk como critério de decisão para uso de testes paramétricos ou não-paramétricos e para verificar se haverá diferença significativa das variáveis numéricas entre as duas técnicas testadas (manual e semiautomatizada), submetendo-os à análise estatística pelo método dos quadrados mínimos em caso de teste paramétrico, e o teste de Wilcoxon e Kruskal-Wallis em caso de não-paramétrico, utilizando os procedimentos Glm e Npar1way (SAS 9.3).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Coletou-se um total de vinte e sete (27) amostras de sangue total, entretanto, apenas vinte e quatro (24) foram consideradas passíveis de comparação para as duas técnicas hematológicas, excluindo as não advindas do ambulatório da instituição e outras que apresentavam intensa presença de fibrina ou coágulo sanguíneo, para que fosse evitado danos ao aparelho semiautomatizado. Com base nos resultados hematimétricos e qualidade das amostras, foram selecionadas dez (10), optando-se por aquelas que apresentavam os parâmetros hematológicos mais próximos dos padrões de referência, onde as mesmas foram obtidas pelo método semiautomatizado, tendo seus parâmetros demonstrados na tabela 1.

Já na Tabela 2 retrata a análise do mesmo conjunto de dez (10) amostras, contudo elas foram processadas utilizando o método de hemograma manual.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA**Tabela 1:** Variáveis obtidas pelo método semiautomatizado das 10 amostras selecionadas.

Hemograma Semiautomatizado						
Amostra	Variável Hematológica	Eritrócitos (106/mm ³)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	Leucócitos (103/mm ³)	Plaquetas (103/mm ³)
A02		5,32	30	55,0	20,5	449.000
A03		6,58	40	60,4	10,7	356.000
A05		4,31	30	68,2	36,5	271.000
A11		5,86	37	63,0	14,4	209.000
A12		5,75	36	63,7	28,5	301.000
A13		5,79	35	60,6	10,0	349.000
A14		5,39	35	65,4	9,2	205.000
A15		6,27	41	65,1	10,0	323.000
A25		4,99	34	68,3	31,3	256.000
A27		7,38	46	62,3	20,8	528.000

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 2: Variáveis obtidas pelo método manual das 10 amostras selecionadas.

Hemograma Manual						
Amostra	Variável Hematológica	Eritrócitos (106/mm ³)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	Leucócitos (103/mm ³)	Plaquetas (103/mm ³)
A02		6,4	36	56,2	26,9	417.000
A03		6,7	42	62,6	15,5	303.000
A05		6,2	36	58,0	40,0	348.000
A11		6,94	42	60,5	24,4	462.000
A12		6,33	42	66,3	38,7	291.000
A13		5,81	38	65,4	9,9	222.000
A14		6,18	39	63,1	11,5	213.000
A15		8,0	48	60,0	12,5	333.000
A25		5,62	40	71,1	35,0	255.000
A27		7,07	55	77,0	23,5	209.000

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tendo em vista apenas 10 amostras qualificadas, cada um dos parâmetros expôs um p-valor maior do que ($p < 0,05$). Logo, não evidenciaram diferenças significativas entre as duas técnicas utilizadas, como demonstrado na Tabela 3. E a partir dos dados foram geradas as comparações entre as médias, constatações dos desvios-padrões e os intervalos de confiança.

Tabela 3: Comparação entre as médias, os desvios-padrões e os intervalos de confiança das variáveis hematológicas de cães obtidas pelos métodos semiautomatizado e manual.

Variável Hematológica	Nº	Semiautomatizado			Manual			Teste
		Média	Desvio Padrão	Intervalo confiança (95%)	Média	Desvio Padrão	Intervalo confiança (95%)	P
Eritrócitos (106/mm ³)	10	5,76	0,85	5,72 - 6,54	6,52	0,80	5,70 - 6,47	0,0934
Hematócrito (%)	10	36,41	5,89	36,4 - 42,1	41,8	5,71	35,9 - 41,4	0,0523
VCM (fl)	10	63,2	4,82	61,69 - 66,33	64,05	5,11	61,23 - 66,16	0,4132
Leucócitos (103/mm ³)	10	21,48	10,77	17,2 - 27,6	23,82	10,81	17,6 - 28,0	0,1537
Plaquetas (103/mm ³)	10	324,7	89,52	267.2 - 353.0	305,3	77,95	267. - 341.5	0,1248

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Entretanto, quando realizado a estatística com todas as amostras aptas coletadas, (Tabela 4), os valores referentes às variáveis de eritrócitos ($p < 0,0035$) e leucócitos totais ($p < 0,0343$) apresentaram um p-valor menor que $p < 0,05$, demonstrado diferenças significativas entre os dois métodos de realização do hemograma.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Tabela 4: Comparação entre as médias, os desvios-padrões e os intervalos de confiança das variáveis hematológicas de cães obtidas pelos métodos semiautomatizado e manual com total de 24 amostras.

Variável Hematológica	Nº	Semiautomatizado			Manual			Teste
		Média	Desvio Padrão	Intervalo confiança (95%)	Média	Desvio Padrão	Intervalo confiança (95%)	P
Eritrócitos (106/mm ³)	24	5,39	1,35	5,67 - 6,44	6,73	1,34	5,65 - 6,41	0,0035
Hematócrito (%)	24	34,9	7,86	35,5 - 39,9	40,8	7,82	35,4 - 39,9	0,0506
VCM (fl)	24	64,65	6,78	60,87 - 64,71	61,19	6,84	61,00 - 64,87	0,1570
Leucócitos (103/mm ³)	24	17,4	9,28	17,4 - 22,7	23,2	9,56	19,4 - 27,0	0,0343
Plaquetas (103/mm ³)	24	304,8	9,79	276,7 - 332,8	301,4	9,28	274,8 - 327,9	0,6523

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os resultados alcançados nas estatísticas das 10 amostras corroboram com as constatações de Messias et al., (2009), Longa e Borges (2014), os quais não revelaram diferenças significativas entre as variáveis hematológicas ilustradas na Tabela 3, em decorrência dos analisadores hematológicos apresentarem alta precisão na realização do hemograma (Failace, 2004; Grotto, 2009).

Apesar dos resultados obtidos com as dez (10) amostras não apresentarem um nível de significância considerável, quando realizado a estatística incluindo os demais exemplares coletados como já mostrado na Tabela 4, revela-se diferenças entre os mecanismos de análise (manual e semiautomatizado) referentes às variáveis de eritrócitos ($p < 0,0035$) e leucócitos totais ($p < 0,0343$). Uma das possíveis explicações corresponde ao fato do contador hematológico Hemacounter 60-RT 7600® utilizar o método de impedância para contagem de eritrócitos, plaquetas e leucócitos enquanto para a hemoglobina mensura-se através da colorimetria, de acordo com o manual do fabricante.

O princípio da impedância elétrica, de acordo com Silva et al., (2016) consiste na determinação de mudanças na condutividade de um meio condutor, como uma solução isotônica, durante a passagem de células sanguíneas, não condutoras de eletricidade, por uma

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

pequena abertura entre dois eletrodos. Cada célula que passa pela abertura, causa diminuição da condutividade do meio e aumento da resistividade (impedância), gerando um impulso elétrico que é proporcional ao seu tamanho.

Porém, a forma de análise utilizada pelo dispositivo hematológico Hemacounter 60-RT 7600® pode apresentar desvantagem analítica quando duas ou mais células transpassam ao mesmo tempo pela abertura de leitura do aparelho, fazendo com que forneça resultados inexatos (Silva et al., 2016). Além disso, na tecnologia de impedância, a contagem de leucócitos é um método de contagem total de células nucleadas, dessa forma, outras células nucleadas como os metarrubríctos serão contados, interferindo assim, nos valores reais de leucócitos, podendo ser superestimados (Bandeira et al., 2014). Outra hipótese para divergência dos níveis de significância de acordo com a quantidade de amostras utilizadas, seria devido a maior quantidade de dados, possibilitando assim uma análise estatística mais relevante pelo software SAS OnDemand.

CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, pelo método de contagem semiautomatizado do aparelho, foi constatada uma determinada significância com relação ao método manual em decorrência da quantidade de dez (10) amostras analisadas. Diante disto, o método de contagem semiautomatizado é uma ferramenta útil para o uso durante a rotina laboratorial veterinária, principalmente diante da alta demanda deste exame e a necessidade de rapidez na entrega dos resultados de exames.

Embora o método manual possua vantagens, como custos significativamente inferiores em comparação com o sistema semiautomatizado dos analisadores hematológicos, que demandam insumos caros, é importante destacar que o hemograma manual requer um nível substancial de treinamento para o analista, bem como um período de tempo prolongado para a obtenção dos resultados. Isso o torna desafiador de ser implementado em rotinas de larga escala. No entanto, é crucial ressaltar que a abordagem manual ainda mantém uma evidente relevância para análise de esfregaços sanguíneos. Essa metodologia é essencial para identificar alterações morfológicas, detectar a presença de hemoparasitos e identificar inclusões virais que não podem ser constatadas pelo sistema semiautomatizado. Portanto, apesar das limitações, o hemograma manual continua sendo indispensável em determinados contextos clínicos e laboratoriais, onde a precisão na detecção de detalhes morfológicos é fundamental.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Ressalta-se também que a quantificação das amostras no presente estudo foi considerada insuficientes para a correlação da técnica semiautomatizada e técnica manual, sendo necessária a continuidade da pesquisa com essa temática.

APOIO FINANCEIRO

FAPEMA e UEMASUL

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bandeira, Ricardo; MAGALHÃES, Andressa Figueiredo; AQUINO, Hugo Bastos da Silva. interpretação dos critérios de liberação dos resultados de hemograma através de contadores automatizados em laboratório de urgência. **Revista Saúde e Pesquisa**, p. 403-408, 2014
- Borges, Alexandre Secorun et al. Evaluation of zebu nellore cattle blood samples using the Cell-Dyn 3500 hematology analyzer. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, p. 466-472, 2014.
- Carmo, Blênio Magno Bernardes et al. Hemograma completo: ferramenta de diagnóstico na medicina veterinária. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 49989-49994, 2020.
- Failace, Rafael; PRANKE, Patrícia. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de hemogramas através de contadores eletrônicos. **Revista brasileira de hematologia**, 2004.
- Grotto, H. Z. W. O hemograma: importância para a interpretação da biopsia. **Ver. Bras. Hematol Hemoter**, v.31, n.3, p.178-182, 2009.
- Longa, Camila et al. Padronização do analisador hematológico automatizado veterinário sysmex poch-100iv diff para micos-de-cheiro, saimiri sciureus (primates: cebidae). **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, 2014.
- Messias, J. B. Parâmetros hematológicos de *Rattus norvegicus* obtidos através de método automatizado e não automatizado. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 3, n. 2, p. 1-8, 2009.
- Oliveira, R.A.G.; **Hemograma: como fazer e interpretar**. São Paulo: livraria médica paulista editora, 2007.
- Schweirgert, Augusto et al. Avaliação da contagem plaquetária pelo contador automático QBC Vet Autoread® comparado com estimativa em esfregaço sanguíneo e contagem em hemocítômetro. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 1001-1008, 2010.
- Silva, H. P. Et al. Hematologia laboratorial: teoria e procedimentos. Porto alegre: Artmed, 2016.
- Veloso et al. Avaliação dos critérios adotados no interfaceamento dos resultados dos hemogramas automatizados. **Revista saúde e ambiente**, 2011.