

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

FALCÃO SODRÉ BLACK

**ESTUDO COMPARATIVO DA CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS POR
MICROSCOPIA E POR ANALISADOR HEMATOLÓGICO AUTOMÁTICO**

REALEZA

2024

FALCÃO SODRÉ BLACK

**ESTUDO COMPARATIVO DA CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS POR
MICROSCOPIA E POR ANALISADOR HEMATOLÓGICO AUTOMÁTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Medicina
Veterinária da Universidade Federal da
Fronteira Sul (UFFS), como requisito para
obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Pereira Machado

REALEZA

2024

FALCÃO SODRÉ BLACK

**ESTUDO COMPARATIVO DA CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS POR
MICROSCOPIA E POR ANALISADOR HEMATOLÓGICO AUTOMÁTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Medicina
Veterinária da Universidade Federal da
Fronteira Sul (UFFS), como requisito para
obtenção do título de Médico Veterinário.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 01/11/2024.

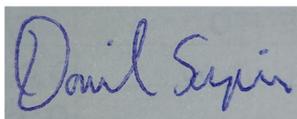
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Luciana Pereira Machado – UFFS
Orientadora



Prof. Dra. Dalila Moter Benvegnú – UFFS
Avaliadora



Farm. Daniel Scapin – UFFS
Avaliador

RESUMO

O hemograma é um exame laboratorial que avalia os eritrócitos, leucócitos e plaquetas do sangue. Atualmente se utiliza de contadores automáticos para a realização deste e apresentam alta precisão nos seus resultados. Entretanto, ainda se faz necessário a análise citológica por um profissional capacitado, para confirmar os resultados e identificar possíveis alterações celulares. O objetivo deste trabalho foi analisar comparativamente a contagem diferencial leucocitária em microscopia com a realizada por um analisador hematológico automático. Para isso, 71 hemogramas caninos foram utilizados, sem critérios de inclusão, desde que realizados pelo analisador hematológico ProCyte DX. Foram utilizados os valores de leucócitos totais (LT) e individuais de cada série leucocitária fornecidos pelo aparelho e pela contagem manual em microscópio óptico. Os animais foram divididos em dois grupos, hígidos e doentes, neste último ainda, foram formados outros 3 grupos, segundo a contagem total de leucócitos: leucocitose; leucopenia e LT normal. Os resultados da contagem diferencial de leucócitos nos dois métodos foram analisados pelos testes de *Mann-Whitney* ou *t-test*, com significância de $p < 0,05$ e pelo teste de correlação de *Spearman*. Houve correlação positiva para a maioria dos parâmetros de boa a excelente. Os resultados demonstraram similaridade entre as técnicas para a maioria dos parâmetros, exceto para a contagem de basófilos (em todos os grupos), e nos valores de neutrófilos do grupo doente/leucocitose, que apresentaram diferença significativa. Na contagem do analisador hematológico os valores de basófilos foram superiores em todos os grupos. Para neutrófilos bastonetes e segmentados, do grupo leucocitose, a contagem automatizada foi inferior à contagem por microscopia, induzindo tendência de aumento compensatório nos linfócitos. Conclui-se que a contagem diferencial de leucócitos do analisador automático é semelhante a contagem manual em microscopia óptica em cães com leucócitos totais normais e que apesar disso faz-se necessário a conferência microscópica principalmente para pesquisa de alterações morfológicas. Para cães com leucocitose é indispensável a contagem diferencial microscópica.

Palavras-chave: ProCyte DX, Leucograma, Citometria de Fluxo, Hemograma.

ABSTRACT

The complete blood count (CBC) is a laboratory test that evaluates red blood cells, white blood cells, and platelets in the blood. Nowadays, automated counters are widely used for this test, providing highly accurate results. However, cytological analysis by a trained professional remains necessary to confirm these results and to identify potential cellular abnormalities. The aim of this study was to comparatively analyze the differential leukocyte count obtained via microscopy with that performed by an automatic hematology analyzer. For this purpose, 71 canine CBCs were included, with no specific inclusion criteria, provided they were performed using the ProCyte DX hematology analyzer. Total leukocyte (TL) counts and individual leukocyte subsets, as provided by the device and from manual counts using an optical microscope, were utilized. The animals were divided into two groups: healthy and sick. The latter group was further subdivided into three categories based on total leukocyte counts: leukocytosis, leukopenia, and normal TL. The results from both methods of differential leukocyte counting were analyzed using the Mann-Whitney test or t-test, with a significance level of $p < 0.05$, and by Spearman's correlation test. A positive correlation ranging from good to excellent was observed for most parameters. The results demonstrated similarity between the two techniques for most parameters, except for the basophil count (in all groups) and the neutrophil count in the sick/leukocytosis group, where a significant difference was found. Basophil counts were higher in all groups when analyzed by the hematology analyzer. In the leukocytosis group, the automated counts for band and segmented neutrophils were lower than those obtained via microscopy, leading to a compensatory increase in lymphocyte values. It was concluded that the differential leukocyte count obtained by the automatic analyzer is similar to the manual count under optical microscopy in dogs with normal total leukocyte counts. However, microscopic verification remains essential, particularly for detecting morphological changes. In dogs with leukocytosis, microscopic differential counts are indispensable.

Keywords: ProCyte DX, Leukogram, Flow Cytometry, Hemogram.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 IDENTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS	7
2.2 IDEXX PROCYTE DX.....	8
2.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	15
5 CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

O hemograma é um exame laboratorial muito solicitado na rotina, auxiliando o médico veterinário no diagnóstico, prognóstico, controle evolutivo de doenças, monitoramento de enfermidades crônicas, emergências médicas e antes da realização de intervenções cirúrgicas (Athanasίου *et al.*, 2016; Carmo *et al.*, 2020).

Este é dividido em eritrograma, leucograma e plaquetograma e é responsável por fornecer valores quantitativos e qualitativos dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas presentes no sangue de cada paciente. Para interpretação os valores obtidos são comparados com os valores de referência, com base na idade e espécie do animal (Rizzi *et al.*, 2010; Meireles *et al.*, 2018).

Laboratórios especializados utilizam da automação para a realização do hemograma, possibilitando assim uma maior produtividade e análise mais rápida da amostra, além de apresentar mais reprodutibilidade e um maior grau de precisão nos resultados fornecidos (Lauzin, 2017). Com o avanço tecnológico, inúmeros contadores hematológicos e equipamentos demonstraram confiabilidade nos seus resultados, permitindo a sua utilização em laboratórios de diferentes portes, garantindo também mais agilidade na realização de exames (Villiers; Ristić, 2016).

O analisador hematológico ProCyte Dx (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) utiliza três tecnologias para realizar a contagem hematológica, garantindo uma melhor confiabilidade dos resultados. Este opera com os métodos de citometria de fluxo a laser, impedância de fluxo laminar e a fluorescência óptica (IDEXX, 2021).

A junção das técnicas de diferenciação e contagem de leucócitos garantem uma maior segurança nos resultados fornecidos pelo contador automático. Um estudo descreveu relação razoável à excelente na contagem diferencial de leucócitos em amostras de 59 cães, apresentando inadequação apenas na contagem de monócitos (Fujino et al., 2013). Outro estudo em felinos, apresentou classificações errôneas de neutrófilos imaturos, que foram contabilizados principalmente como linfócitos (Tvedten et al., 2017).

Portanto, mesmo com a confiabilidade dos contadores automatizados, ainda é essencial a análise citológica por um médico veterinário habilitado, através de um esfregaço sanguíneo fixado e corado corretamente. Assim garantindo uma adequada diferenciação celular e identificação de possíveis alterações morfológicas, confirmando os resultados obtidos pelo equipamento hematológico (Bandeira *et al.*, 2014).

Sendo assim, essa pesquisa buscou apresentar uma análise comparativa da contagem diferencial de leucócitos realizada pelo contador hematológico ProCyte Dx (IDEXX

Laboratories, Westbrook, ME, USA) em relação à contagem manual por microscopia óptica. A precisão de análises é fundamental para a avaliação de cada paciente e o laboratório é responsável por determinar resultados precisos e confiáveis na rotina, garantindo a correta situação de saúde em que o animal se encontra no momento em que foi realizado o exame.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IDENTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS

Os leucócitos ou glóbulos brancos são as células que participam da resposta imune do organismo animal. Estão presentes no sangue, linfa, órgãos linfóides e tecidos conjuntivos, apresentando diferentes características, quantidades e funções. Estes podem ser divididos em dois grupos, os polimorfonucleares ou granulócitos e os mononucleares ou agranulócitos (Thrall *et al.*, 2015).

Os granulócitos, apresentam o núcleo polimorfo, ou seja, com formatos variados, entre formas de feijão, circular e lobulado. Seu citoplasma apresenta grânulos contendo enzimas hidrolíticas, e são representados pelos neutrófilos, eosinófilos e basófilos, nos mamíferos. Já os agranulócitos não apresentam grânulos visíveis e seus núcleos são arredondados, sendo representados pelos linfócitos (T e B) e monócitos (Junqueira; Carneiro, 2017).

Essas células são formadas na medula óssea, a partir de outra com pluripotencial, chamada de célula-tronco. A partir de determinados estímulos esta origina os diferentes leucócitos e quando atingem certa maturação são liberados na corrente sanguínea até chegarem no tecido alvo (Junqueira; Carneiro, 2017)

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico de cães. Esta célula madura apresenta um núcleo alongado e lobulado, corado de roxo escuro e apresenta um padrão de cromatina aglomerado com áreas de heterocromia. Seu citoplasma é comumente claro, podendo ser discretamente eosinofílico. Já os grânulos, nos cães, são pouco evidentes, sendo dificilmente corados e visualizados à microscopia. (McCourt *et al.*, 2022)

Quando imaturos, os neutrófilos, apresentam um núcleo alongado, sem lobulações e constrições. A cromatina tende a ser menos condensada e de coloração mais clara e seu citoplasma se assemelha ao de um neutrófilo maduro (McCourt *et al.*, 2022)

Os eosinófilos, são encontrados em menores números no sangue periférico. Tendem a ser maiores que os neutrófilos e sua característica marcante são os grânulos eosinofílicos eminentes. O citoplasma pode apresentar-se levemente basofílico e seu núcleo, geralmente, é menos lobulado que o dos neutrófilos maduros, podendo ter dois a três lóbulos (Burton, 2024).

Nos caninos os basófilos são raramente encontrados em esfregaços sanguíneos. São maiores que neutrófilos, seu núcleo é mais alongado e torcido, apresentam pequenos e dispersos grânulos citoplasmáticos corados de roxo. Seu citoplasma adquire coloração azul-acinzentada a levemente roxa (Burton, 2024).

Os linfócitos, no sangue periférico, podem ser de dois tipos, os médios e pequenos, sendo os segundo mais abundantemente encontrados. Estes tendem a ter um núcleo densamente corado, variando de redondos a ovais e a cromatina densamente aglomerada. Possuem uma pequena quantidade de citoplasma, como uma fina borda, que tende a não circundar totalmente o núcleo, de coloração azul-clara (Villiers; Ristić, 2016; McCourt *et al.*, 2022)

Já os linfócitos de tamanho médio sua principal característica que os distingue dos pequenos é seu citoplasma ligeiramente maior, circundando totalmente o núcleo. Podem também apresentar pequenos grânulos em seu citoplasma, de coloração rosa-púrpura, contidos em um aglomerado ao lado do núcleo (Villiers; Ristić, 2016; McCourt *et al.*, 2022)

E os monócitos são células grandes e apresentam núcleo de formato variável, podendo ser redondo, multilobulado em forma de bastão ou em “S”. Estes, em formato de bastão, tendem a ser mais largos, podendo ter as extremidades arredondadas, o que facilita na diferenciação de neutrófilos jovens (Thrall *et al.*, 2015; McCourt *et al.*, 2022)

A cromatina nuclear destas células é menos condensada, seu citoplasma moderado a abundante de coloração cinza-azulado a profundamente basofílico. E nos cães podem apresentar inúmeros vacúolos citoplasmáticos claros como também grânulos azurófilos, que se assemelham a poeira, espalhados por todo o citoplasma (Thrall *et al.*, 2015; McCourt *et al.*, 2022).

2.2 IDEXX PROCYTE DX

O analisador hematológico ProCyte DX (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) é um analisador sanguíneo automático, que avalia e fornece resultados de 27 parâmetros para cada amostra, em cerca de dois minutos, exclusivo para uso veterinário. Este conta com três tecnologias de ponta para realizar a análise, sendo elas, a fluorescência óptica, citometria de fluxo a laser e a impedância de fluxo laminar (IDEXX, 2021).

A fluorescência óptica utiliza corantes que se ligam aos ácidos nucleicos e organelas citoplasmáticas da célula e são ativados pelo laser vermelho, gerando uma emissão de luz. Esta informação da fluorescência é capturada em um comprimento de onda maior que a luz normal, dispersada lateralmente, por um espelho dicróico (**Figura 1**). Essa tecnologia é realizada juntamente a citometria de fluxo, oferecendo uma sensibilidade maior para diferenciar os leucócitos. São dois os corantes utilizados pelo equipamento, um específico para leucócitos, constituído de corante polimetina (0,002%), metanol (3,0%) e etileno glicol (96,9%) e o outro

para coloração de reticulócitos constituído de corante polimetina (0,03%), metanol (7,1%) etileno glicol (92,8%) (IDEXX, 2021; Bergstrand *et al.*, 2022).

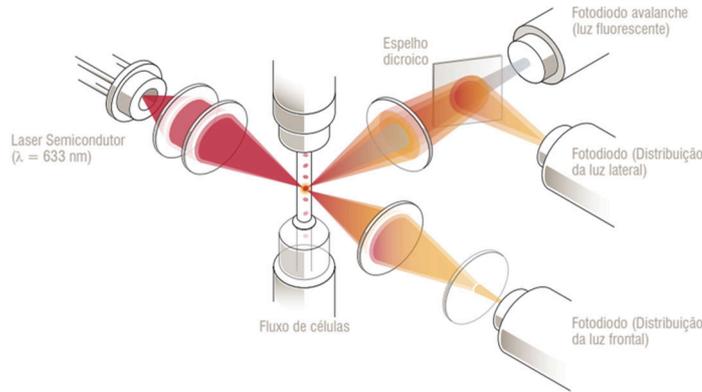


Figura 1 - Esquema de operação do analisador hematológico Procyte Dx

Fonte: IDEXX ProCyte Dx* Hematology Analyzer Operator's Guide. USA. 2021.

O método de citometria de fluxo é responsável por realizar duas análises, a óptica de eritrócitos maduros, reticulócitos e plaquetas e o diferencial de leucócitos, diferenciando as células em cinco partes. Neste ensaio, as células são suspensas e hidrodinamicamente focadas por um orifício exposto ao laser vermelho. Esta luz então se dispersa frontalmente e lateralmente para posteriormente serem coletadas, pelos três receptores de luz, para cada célula. Isto fornece características ópticas gerando informações sobre o tamanho, fluorescência e granularidade de cada célula (Costa 2020; IDEXX, 2021).

Já a impedância de fluxo laminar é uma tecnologia utilizada para analisar o tamanho e número de eritrócitos e plaquetas. É feito a diluição de uma parte da amostra e focada através do centro de uma abertura de detecção. A presença de cada célula gera uma interrupção de um sinal elétrico, a resistência então é mensurada para determinar o tamanho e tipo da célula (IDEXX, 2021).

O equipamento também gera dois gráficos de pontos para cada célula contabilizada, um para leucócitos e o outro para eritrócitos e plaquetas. Os leucócitos que coram mais fortemente, com o corante fluorescente, se apresentam ao longo do eixo Y (fluorescência), já os que apresentam maior complexidade celular, como os eosinófilos, são apresentados no eixo X (granularidade) (**Figura 2**). Os eritrócitos e plaquetas são apresentados em um gráfico a partir do seu tamanho e fluorescência (IDEXX, 2021; Bergstrand *et al.*, 2022).

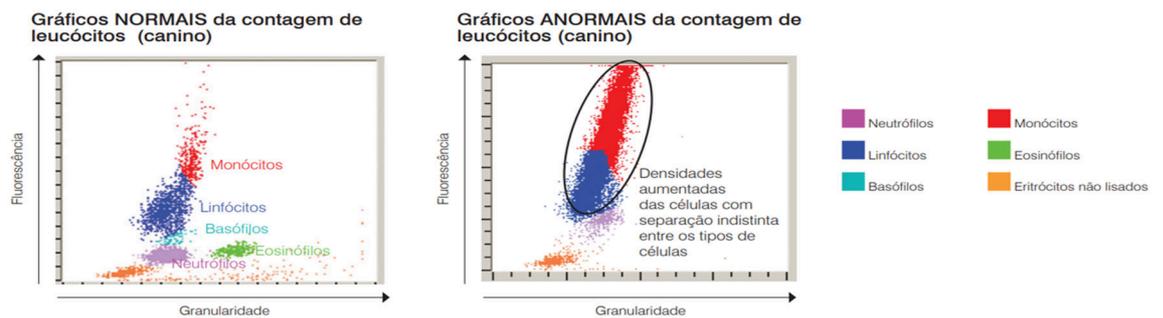


Figura 2 - Exemplos de gráficos de pontos de contagem leucocitária normal e anormal, fornecidos pelo analisador hematológico ProCyte Dx.

Fonte: IDEXX ProCyte Dx* Hematology Analyzer Operator's Guide. USA. 2021.

A interpretação dos gráficos permite identificar dificuldades de diferenciar populações celulares. Gráficos anormais demonstram que não houve distinção clara das populações, nota-se um contínuo (**Figura 2**) entre as nuvens de cores de linfócitos e monócitos. Indicando assim, que o analisador está com dificuldades para fazer caracterizações precisas dos diferentes tipos de leucócitos, tornando necessário a conferência dos resultados em esfregaço sanguíneo.

Outra funcionalidade do dispositivo é de gerar *SmartFlags** (**Figura 3**). Isto acontece quando o analisador hematológico suspeitar que a precisão da avaliação celular esteja comprometida. O alerta pode ser sinalizado com um asterisco (*), indicando o questionamento do equipamento à presença de uma população celular anormal, ou ainda como sinal gráfico (-.-), quando não foi possível ter o retorno de um resultado do parâmetro em especial. Em ambos os casos, é necessário fazer a consulta de um esfregaço sanguíneo, para confirmação, pois a mensagem de alerta serve somente para controle interno do equipamento (IDEXX, 2021; Bergstrand *et al.*, 2022).

Fonte: arquivo pessoal, 2024.

2.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

O esfregaço sanguíneo é realizado a partir de uma gota de sangue sobreposta em uma lâmina de vidro e com auxílio de uma lâmina extensora é feita a distribuição da amostra. Essa técnica é utilizada para formar uma fina camada de sangue no final da lâmina, assegurando, assim, a visualização de uma camada de células não sobrepostas, garantindo uma melhor avaliação morfológica e sua diferenciação (Thrall *et al.*, 2015).

Esta lâmina precisa ser seca à temperatura ambiente e posteriormente passar por um processo de fixação e coloração. Utiliza-se corantes específicos como o de Giemsa, May-Grünwald e o Panótico® rápido, este último, o mais utilizado na rotina laboratorial atualmente, devido a sua facilidade e velocidade de preparo. Posteriormente, o esfregaço sanguíneo está

pronto para ser observado em microscópio óptico, realizando a leitura das células presentes em aumento de 1000x (Barger *et al.*, 2015; Thrall *et al.*, 2015).

O corante Panótico® rápido, conta com três reagentes separados, um deles responsável pela fixação, constituído de metanol e triarilmetano. Alguns laboratórios utilizam somente o metanol nesta etapa. Esta, possibilita que os corantes, utilizados posteriormente, adentrem a membrana celular e se fixem a estruturas pelas quais têm mais afinidade. Garantindo que as células sejam bem coradas e visíveis para análise microscópica (Barger *et al.*, 2015; Renylab, 2017).

Os dois outros reagentes são constituídos de corantes, sendo uma solução de xantenos (0,1%) e a outra de tiazinas (0,1%) adicionados a água deionizada (99,9%) (Renylab, 2017). Estes são responsáveis por corar as estruturas celulares, sendo as substâncias catiônicas agentes que dão cor às estruturas celulares ácidas, como o material nuclear, adquirindo cor azul. Enquanto as aniônicas, apresentam afinidade por constituintes básicos, tingindo-as de vermelho (Barger *et al.*, 2015).

Com o esfregaço sanguíneo fixado e corado, está pronto para realizar a leitura em microscópio óptico. Para isso deve se utilizar a objetiva de aumento 1000x com óleo de imersão e contabilizar 100 leucócitos na monocamada da amostra, em zigue-zague. A partir dos valores relativos é então realizado o cálculo do número absoluto de cada série leucocitária presente no sangue, por meio do número de leucócitos total e da porcentagem de cada leucócito obtida (Barger *et al.*, 2015; Thrall *et al.*, 2015; McCourt, Rizzi, 2022).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido de forma retrospectiva. Para isso foram selecionadas fichas de exames de hemograma, realizados pelo Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU) no período de julho de 2023 a agosto de 2024. Foram analisados os resultados do hemograma de 71 cães, sem qualquer especificidade, desde que tenha sido processado no analisador hematológico automático, com conferência por análise microscópica em lâmina.

As análises foram realizadas por meio de sangue total, coletados previamente na clínica veterinária e armazenado em tubo a vácuo com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) (Vacuette K2 EDTA® - Greiner Bio-One, Americana, Brasil) e posteriormente encaminhadas para o laboratório.

Inicialmente foram confeccionados esfregaços sanguíneos, em lâmina de vidro e posteriormente, estes, passaram por processo de fixação e coloração com Panótico® rápido (Corante Rápido - RenyLab - Barbacena, Minas Gerais, Brasil) para ser realizado a contagem manual do diferencial de leucócitos em microscópio óptico (Olympus® CX 21 - Ningbo, China).

As amostras foram processadas em analisador hematológico automático ProCyte Dx (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA), obtendo-se resultados do eritrograma, leucograma e plaquetograma. Também foram registrados os alertas (*) ou avisos, de necessidade de confirmação em esfregaço sanguíneo, emitidos pelo contador hematológico em que este sugere alguma inadequação ou equívoco no valor fornecido. Os registros identificados com esta sinalização foram analisados e confirmados em esfregaço sanguíneos e descritos individualmente. Na série leucocitária os alertas possíveis são os de “Suspeita de neutrófilos imaturos e/ou tóxicos” e “Suspeita de nEritrócito”, que sinaliza a possibilidade de metarrubríctos no sangue.

Os dados do ProCyte DX utilizados na pesquisa foram os valores de leucócitos totais e do diferencial leucocitário. Também foi utilizado a contagem diferencial de leucócitos em microscopia realizada por integrantes do projeto de extensão intitulado “Prestação de serviços e treinamento em Análises Clínicas Veterinária”. De modo que, para todas as amostras foram realizados dois protocolos de contagem diferencial de leucócitos: ProCyte Dx e microscopia óptica.

Os dados foram tabulados em planilha do Google Sheets e posteriormente divididos em dois grupos distintos, um para animais hígidos e outro para os que apresentavam alguma doença.

Ainda, o segundo grupo, foi classificado de acordo com o valor de leucócitos totais, constituindo três subgrupos: leucocitose, leucopenia e leucócitos totais normais (conforme o valor de referência estabelecido pelo laboratório)(Rizzi *et al.*, 2010).

Com o objetivo de comparar os protocolos de contagem, em cada grupo, os resultados dos dois protocolos foram submetidos à análise estatística utilizando o programa *SigmaStat 3.1*, utilizando o *t-test* para valores que apresentaram normalidade e os que não apresentaram foram submetidos ao teste de *Mann-Whitney*. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$. Também foi realizado o teste de *Spearman* para avaliar se houve correlação entre os dois métodos de contagem. Sendo classificado como excelente quando coeficiente de correlação (cc)=0,93-0,99; boa: $cc = 0,8-0,92$; moderada: $cc=0,59-0,79$; e fraca: $cc = <0,59$ (Papasouliotis *et al.*, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a maioria dos parâmetros leucocitários não houve diferença significativa entre os métodos de contagem (**Tabela 1**). Foi observada diferença estatística apenas nos valores de basófilos dos quatro grupos e de neutrófilos (bastonetes e segmentados) do grupo doente/leucocitose. Os leucócitos totais, de cada grupo, foram classificados de acordo com as referências utilizadas pelo laboratório, que varia de 6.000 a 17.000 células/ μL (Rizzi *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Valores de Média \pm Desvio Padrão ou Mediana (Percentil 25; Percentil 75) do leucograma de 71 cães, divididos em 4 grupos segundo a contagem total de leucócitos (LT) e submetidos a duas técnicas de contagem diferencial de leucócitos (ProCyte DX e Microscopia óptica).

Parâmetro (célula/uL)	Hígido		Doente	
	LT Normal (n=10)	LT Normal (n=37)	LT Leucopênico (n=5)	LT Leucocitose (n=19)
Leucócito Total	10.098 \pm 2.954	10.175 \pm 2.872	5.058 \pm 786	22.601 \pm 6.662
Neut. Bastonete				
ProCyte	0	0	0	0
Microscopia	0	0	0(0;13,8)	190(0;626,8)
P	-	0,317	0,690	0,006*
Neut. Segment.				
ProCyte	5746,5(4733;6638)	6359(4685;7364,7)	2625,2 \pm 739,8	15286(12548,8;17761)
Microscopia	6048,5(5405;7308)	6550(4609,5;7401,5)	2761,6 \pm 868,5	20450(19067,5;23495)
P	0,623	0,846	0,796	0,002*
Eosinófilo				
ProCyte	903,2 \pm 480,9	463(249,5;755,8)	357,2 \pm 240	455(194;801,8)
Microscopia	777 \pm 411,8	459(190,3;805,8)	298,2 \pm 200,4	381(173,5;613,5)
P	0,536	0,812	0,684	0,335
Basófilo				
ProCyte	24,5(14;33)	37(15,5;58,5)	18(9;76)	38(21;74,3)
Microscopia	0	0	0	0
P	<0,001*	0,001*	0,032*	0,001*
Linfócito				
ProCyte	1942,5(1441;2215)	2052(1551;2386,3)	1640,4 \pm 725,2	2750(2219,8;3971)
Microscopia	1734,5(1582;2429)	2054(434,8;2634)	1762,6 \pm 694,5	2216(1394,8;2812,3)
P	0,97	0,762	0,792	0,064
Monócito				
ProCyte	518,6 \pm 147,6	548(397,6;899,8)	377,6 \pm 104,3	1736 \pm 778,8
Microscopia	517,6 \pm 319,9	451(274,3;745,8)	278,8 \pm 139,9	1599 \pm 751,4
P	0,993	0,117	0,241	0,584

*Diferença significativa pelo teste de *Mann-Whitney* quando $p < 0,05$

Fonte: elaborado pelo autor, 2024.

As duas técnicas de contagem diferencial de leucócitos apresentaram coeficiente de correlação de moderada a excelente para a maioria dos parâmetros avaliados (**Tabela 2**). Indicando uma boa similaridade entre as contagens realizadas de modo manual na microscopia e os resultados do analisador hematológico.

Tabela 2 - Resultados do teste de correlação entre os valores de contagem diferencial leucocitária pelos métodos de microscopia óptica e por analisador hematológico (ProCyte Dx), de 71 cães, divididos em quatro grupos.

Parâmetro por grupo	Coefficiente de correlação	Valor de P	Interpretação quanto a correlação
Neut. Segmentado			
Hígido	0,758	0,00870	Moderada
Doente			
LT Normal	0,932	<0.001	Excelente
Leucopênico	1,000	0,0167	Excelente
Leucocitose	0,804	0,000	Boa
Eosinófilo			
Hígido	0,915	<0.001	Boa
Doente			
LT Normal	0,823	<0.001	Boa
Leucopênico	0,900	0,0833	Ausente
Leucocitose	0,763	0,000	Moderada
Basófilo			
Hígido	-	-	-
Doente			
LT Normal	0,360	0,0288	Fraca
Leucopênico	-	-	-
Leucocitose	0,406	0,0819	Ausente
Linfócito			
Hígido	0,709	0,0186	Moderada
Doente			
LT Normal	0,685	<0.001	Moderada
Leucopênico	0,900	0,0833	Ausente
Leucocitose	0,775	0,000	Moderada
Monócito			
Hígido	0,709	0,0186	Moderada
Doente			
LT Normal	0,691	<0.001	Moderada
Leucopenico	-0,400	0,517	Ausente
Leucocitose	0,863	<0.001	Boa

Correlação de *Spearman* significativa quando $p < 0,05$

Neut.: Neutrófilo; LT: leucocitos totais.

Fonte: elaborado pelo autor, 2024.

Com relação aos neutrófilos bastonetes, em animais hígidos, os valores absolutos e relativos são normalmente baixos, e na contagem manual são raros de encontrar, com intervalo

normal de 0 a 300/uL (Rizzi *et al.*, 2010). Como o contador hematológico não distingue células imaturas, observa-se uma discrepância entre as técnicas nas contagens de neutrófilos bastonetes em animais enfermos, com leucocitose, visto que na análise pela microscopia é possível diferenciar os estágios de maturação.

As células jovens possuem mais RNA que neutrófilos maduros, não possuem lobulação nuclear e a cromatina é menos condensada. O contador automático não consegue diferenciá-las e tende a considerar então como linfócitos ou até mesmo monócitos, levando assim a contagens errôneas nestas séries de leucócitos (Papasouliotis *et al.*, 2008; Lilliehook e Tvedten 2009; Goldmann *et al.*, 2012).

A mediana e percentis da contagem de basófilos foi zero em todos os grupos, porém oito animais apresentaram contagem de basófilos. No grupo doente/LT normal foi observado 1% de basófilos, com média de 16 células e no grupo doente/leucocitose 1%, média de 32 células. Os demais grupos não apresentaram nenhum basófilo na contagem diferencial em microscopia óptica e no analisador hematológico foram encontrados de 0,1 a 4,3% de basófilos. Em todos os grupos o número de basófilos permaneceu dentro do intervalo de referência para a espécie, descrito como raro por Rizzi *et al.* (2010) e de 0 a 100/uL pelo fabricante do analisador ProCyte DX.

Essa falta de concordância entre a contagem manual e automática ocorre devido a rara presença de basófilos no sangue periférico de cães. Quando se realiza a contagem diferencial em microscopia óptica, são contabilizadas apenas 100 células observadas, o que não ocorre no analisador hematológico, que faz a contagem de milhares de leucócitos. Levando assim a dificuldade de quantificações semelhantes, visto que mesmo um pequeno número de basófilos contabilizados automaticamente levariam a um aumento considerável demonstrada pela diferença significativa entre as duas contagens. Estudos realizados por Ferreira *et al.* (2024) em animais da subespécie Burro de Miranda, encontraram resultados semelhantes de maior contagem de basófilos pelo ProCyte Dx e menores em microscopia optica, resultando em uma diferença significativa entre as duas formas de contagem.

Já no caso dos neutrófilos segmentados de animais com leucocitose nota-se a diferença significativa, com mediana no analisador hematológico de 15.286/uL e manualmente 20.450/ μ l. Ocorrências semelhantes foram encontradas por Bergstrand *et al.* (2022), em cães, onde o contador apresentou contagens falsamente baixas de neutrófilos e em contrapartida resultou em superestimativa de linfócitos. Entretanto, neste presente estudo, não houve diferença significativa na contagem de linfócitos, apenas uma tendência a valores maiores na contagem automatizada.

Dentre os alertas para confirmação em lâmina, das 71 fichas foram identificados 5 alertas, estes estão descritos no **Quadro 1 junto** a descrição se houve confirmação em lâmina e se foi identificada outra alteração que interfere na contagem de leucócitos. Além destes, houve observação em lâmina da presença de bastonetes em 11 animais (três doente/LT normal, um leucopênico e sete leucocitose), estes não apresentaram nenhum alerta do aparelho.

Quadro 1 - *Alertas* identificados nos resultados do hemograma de cinco cães, em 71 realizados pelo analisador ProCyte Dx e os respectivos achados identificados na análise microscópica do esfregaço sanguíneo.

Animal (grupo)	Tipo de alerta	Confirmado em lâmina?	Outra alteração em lâmina?
1 (Doente/ LT normal)	Suspeita de nEritrocito	Confirmado a presença de metarrubricito (03/100)	Presença de bastonetes (4%)
2 (Doente/LT normal)	Suspeita de neutrófilos tóxicos e/ou imaturos	Confirmado a presença de bastonetes (10%), neutrófilos com granulação tóxica e basofilia do citoplasma	Metarrubricitos (18/100)
3 (Doente/Leucocitos e)	Suspeita de neutrófilos imaturos e/ou tóxicos	Confirmado presença de bastonetes (12%)	Não
4 (Doente/Leucocitos e)	Suspeita de neutrófilos tóxicos e/ou imaturos	Confirmado a presença de bastonetes (08%)	Metarrubricitos (06/100)
5 (Doente/Leucocitos e)	Suspeita de neutrófilos tóxicos e/ou imaturos	Confirmado presença de bastonetes (04%)	Não

Fonte: desenvolvido pelo autor, 2024.

Nota-se que o analisador hematológico demonstrou bom desempenho em identificar neutrófilos jovens presentes no sangue, ocasionando a liberação do alerta (*) apenas quando eles estavam presentes em maior porcentagem. Entretanto, foi confirmado por análise em

microscópio óptico outros onze animais com presença de neutrófilos bastonetes, para os quais o analisador não liberou alerta. Destes, nove apresentaram 1 a 3% de neutrófilos imaturos e dois 4%. Sugere que isto ocorra devido ao baixo número dessas células, que provavelmente foram contabilizadas como linfócitos ou monócitos, limitando a capacidade do aparelho de reconhecer a alteração na contagem. Outrossim, é necessário a análise microscópica por um médico veterinário capacitado.

Os metarrubricitos são hemácias jovens nucleadas. Estas são frequentemente contabilizadas como leucócitos, podendo ocorrer o aumento no número total dessas células (Barger *et al.*, 2015; Simões *et al.*, 2020). Dos três animais citados na tabela 2, que apresentaram contagens de metarrubricitos, apenas um deles apresentou o alerta (Suspeita de nEritrócito). Além de outras quatorze fichas com presença destas células, nas quais foram observados de um a três metarrubricitos durante a contagem de leucócitos, que não apresentaram nenhum alerta (*) recomendando a conferência em microscopia ótica.

Como limitações do estudo, destaca-se que pacientes leucopênicos tiveram baixa casuística, sendo necessário mais estudos para verificar se nestes animais o analisador hematológico apresentará resultados fidedignos se comparado a análise microscópica.

5 CONCLUSÃO

Os resultados da contagem diferencial de leucócitos fornecidos pelo analisador hematológico ProCyte Dx são semelhantes aos obtidos pelo método de análise microscópica, em cães com número total de leucócitos dentro do intervalo de referência.

Em cães com leucocitose o analisador tende a apresentar falhas na diferenciação de neutrófilos, levando a uma contagem menor dessas células, e conseqüentemente podendo ocorrer o aumento compensatório nos números de linfócitos.

O analisador hematológico ProCyte Dx demonstra maior habilidade na identificação de basófilos de cães que a análise por microscopia óptica e bons resultados ao informar alertas de presença de neutrófilos bastonetes e/ou tóxicos, quando estes estão presentes em quantidade maior que 4%. Entretanto, na identificação de hemácias nucleadas o analisador hematológico apresentou baixo desempenho em reconhecer a presença destas células

Portanto, apesar do analisador ProCyte Dx apresentar bom desempenho na análise de leucócitos em cães, ainda se faz necessário a avaliação de cada amostra sanguínea em microscópio ótico para confirmar os resultados fornecidos pelo aparelho, principalmente em pacientes com leucocitose. Além da indispensabilidade da avaliação microscópica para identificar possíveis alterações morfológicas das células sanguíneas.

REFERÊNCIAS

Athanasίου, L. V. et al. Effects of pre-analytical handling on selected canine hematological parameters evaluated by automatic analyzer. **Veterinary Research Forum**, v. 7, n. 4, p. 281-285, 2016. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5251349/>. Acesso em: 15 set. 2024.

Bandeira, R.; Magalhães, A. F.; Aquino, H. B. da S. de. Interpretação dos critérios de liberação dos resultados de hemograma através de contadores automatizados em laboratório de urgência. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 7, n. 3, p. 403-408, set./dez. 2014 -ISSN 1983-1870. Disponível em: <https://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/3608/2480>. Acesso em: 20 ago. 2024.

Barger, A.M.; Macneill, A.L. **Clinical pathology and laboratory techniques: for veterinary technicians**. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2015. p. 1-17. ISBN 978-1-118 34509-2.

Bergstrand, E., Tvedten, H. W., Lilliehöök I. Detection of frequent neutrophil misclassification by the ProCyte Dx in sick dogs and how to avoid it. **Journal of Small Animal Practice**, v. 63, 603–608, 2022. DOI: 10.1111/jsap.13499. Acesso em: 14 set. 2024.

Burton, A. G. **Clinical Atlas of Small Animal Cytology and Hematology**. 2. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2016. p. 475-514.

Carmo, B. M. B. et al. Hemograma completo: ferramenta de diagnóstico na medicina veterinária. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 49989-49994, 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-594>. Acesso em: 07 set. 2024.

Coloração panótico rápido. Bula de reagente. Farmacêutica responsável: Renê Vaz de Mello. **RENYLAB QUIM. FARM. LTDA**. Barbacena/MG, jul. 2017. Registro da ANVISA: 80002670086. Disponível em: <https://www.renylab.ind.br/wp-content/uploads/2018/05/Corante-Rapido-1.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2024.

Ferreira, A. M.; et al. Validation of a hematology analyzer in donkey medicine. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.132, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104984>. Acesso em: 20 set. 2024.

Fujino, Y., Nakamura, Y., Matsumoto, H., et al. Development and evaluation novel in-clinic automated hematology analyzer, ProCyte Dx, for canine erythrocytes indices, leukogram, platelet counts and reticulocyte counts. **Journal of Veterinary Medical Science** 75, 1519-1524, 2013. DOI: 10.1292/jvms.13-0264. Acesso em: 21 ago. 2024

IDEXX. ProCyte Dx Hematology Analyzer: Operator's Guide. EUA, 2021. Edição não mencionada. 54 p. Disponível em: <https://www.idexx.com/files/procyte-dx-operators-guide-en.pdf>. Acesso em: 06 set. 2024.

Junqueira, L. C.; Carneiro, J. **Histologia Básica: texto e atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. Cap. 13, p. 841-884.

Lauzin, D. D. B. **Avaliação da acurácia e confiabilidade de dois analisadores hematológicos automatizados**. Rio de Janeiro, 2017. 67 f.; il. Dissertação –Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/34521/2/debora_lauzin_ini_mest_2017.pdf. Acesso em: 20 ago. 2024.

McCourt M. R.; Rizzi T. E. Hematology of Dogs, In: Marjory B. Brooks, Kendal E. Harr, Davis Seelig, K. Jane Wardrop, and Douglas J. Weis (Ed.) **Schalm's Veterinary Hematology**. 7th ed. Estados Unidos. John Wiley & Sons. 2022. Cap. 108, p. 2784-2815.

Meiros, F. E.; Estevam, T. L. M.; Leite, L. H. de M. Sistema embarcado para coloração automática de lâminas hematológicas. **Revista e-Xacta**, Belo Horizonte, v. 11, n. 2, p. 9-21, 28 dez. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.18674/exacta.v11i2.2343>. Acesso em: 07 set. 2024.

Papasouliotis, K.; Cue, S.; Crawford, E. et al. Comparison of white blood cell differential percentages determined by the in-house LaserCyte hematology analyzer and a manual method. **Veterinary Clinical Pathology**, v.35, p.295-302, 2006. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2006.tb00134.x. Acesso em: 06 set. 2024.

Rizzi, T.E.; Meinkoth, J.H.; Clinkenbeard, K.D. 2010. Normal hematology of the dog, In: Feldman B.F., ZINKE J.G.; JAIN N.C. (Ed.) **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Baltimor, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins cap 104, p.799-810.

Simões, P. B. *et al.* Blood from a “half-fish” dog: How modern analyzers deal with nucleated red blood cells. **Veterinary clinical pathology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 8–10, 2020. DOI 10.1111/vcp.12844. Disponível em: <https://research.ebsco.com/linkprocessor/plink?id=07bd53ec-dbd7-32e0-add4-aeddd6c72d4c>. Acesso em: 27 set. 2024.

Thrall, M.A, et. al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2007. p 21-304. ISBN 978-85-277-182659-7.

Tvedten, H. W., Andersson, V. & Lilliehöök, I. E. Feline differential leukocyte count with procyte Dx: frequency and severity of a neutrophil-lymphocyte error and how to avoid it. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 31, 1708-1716, 2017. DOI: 10.1111/jvim.14815. Acesso em: 12 set. 2024.

Villiers, E.; Ristić, J.. **BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology**. 3. ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, 2016.