

Uso do vórtex como dissociador de agregados plaquetários na pseudotrombocitopenia em pequenos animais

Use of the vortex as dissociator of platelet aggregates in pseudothrombocytopenia in small animals

Maurício Eduardo Mezaroba *¹(ORCID 0000-0001-8508-3869), **Angela Patrícia Medeiros Veiga** ²(ORCID 0000-0003-0236-2913), **Vanessa Peripolli** ³(ORCID 0000-0002-0463-4727) **Soraya Regina Sacco Surian** ¹(ORCID 0000-0001-6874-0732)

¹Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC, Brasil. *Autor para correspondência: mauricio.mezaroba@gmail.com

²Instituto Federal Catarinense, Araquari, SC, Brasil.

³Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba, SC, Brasil.

Submissão: 21/01/2024 | Aceite: 09/05/2024

RESUMO

A pseudotrombocitopenia é a falsa diminuição na contagem plaquetária causada, na maioria das vezes, por erros pré-analíticos, representando um importante problema na clínica de caninos e felinos. Objetivou-se avaliar o uso de agitador vórtex para resolução laboratorial da pseudotrombocitopenia nessas espécies. Executou-se o projeto com amostras de caninos (n=100) e felinos (n=100) oriundas da rotina laboratorial, que apresentavam diminuição na contagem plaquetária, além da presença de agregados plaquetários. As plaquetas foram avaliadas quantitativamente pré e pós-tratamento pela contagem automatizada por bioimpedância e por estimativa em lâmina. O tratamento foi realizado por agitação em vórtex a 3600 rotações por minuto durante três minutos. Paralelamente avaliou-se a frequência de variações na plaquetometria de 100 caninos e 100 felinos. Verificou-se diferença significativa entre as plaquetas pré e pós-tratamento ($p < 0,001$ para caninos e $p = 0,0097$ para felinos), obtendo-se valores maiores em todos os pacientes avaliados após o tratamento com agitação, com médias de plaquetas dentro dos valores de referência para as espécies avaliadas. Felinos apresentaram a maior frequência de pseudotrombocitopenia e agregados plaquetários, e também foi a espécie que teve menor dissociação de agregados, considerando que a dissociação plaquetária se mostrou proporcional à intensidade de agregados pré-agitação nas duas espécies. Conclui-se que o uso de agitador no protocolo proposto é capaz de diminuir a incidência de pseudotrombocitopenia, diminuindo a faixa de contagem subestimada. Porém, a técnica não deve ser usada como único parâmetro para resolução da pseudotrombocitopenia, considerando que a dissociação dos agregados através da agitação não é total, embora minimize os falsos diagnósticos e auxilie o clínico em uma conduta terapêutica mais adequada.

PALAVRAS-CHAVE caninos; felinos; hematologia; patologia clínica; trombocitopenia.

ABSTRACT

Pseudothrombocytopenia is a false decrease in platelet count caused, most of the time, by pre-analytical errors, representing an important problem in canine and feline medicine. The objective was to evaluate the use of a vortex shaker for laboratory resolution of pseudothrombocytopenia in these species. The project was carried out with samples from canines (n=100) and felines (n=100) from the laboratory routine, which showed a decrease in platelet count in addition to the presence of platelet aggregates. Platelets were quantitatively evaluated pre- and post-treatment by automated bioimpedance counting and slide estimation. The treatment was carried out by vortex agitation at 3600 rotations per minute for three minutes. In parallel, the frequency of variations in platelet measurements of 100 canines and 100 felines was evaluated. There was a significant difference between pre- and post-treatment platelets ($p < 0,001$ for canines and $p = 0,0097$ for felines), obtaining higher values in all patients evaluated after treatment with agitation, with mean platelets within the reference values for the species evaluated. Felines had the highest frequency of pseudothrombocytopenia and platelet aggregates, but also the species that had the lowest dissociation of aggregates, considering that platelet dissociation was proportional to the intensity of pre-agitation aggregates in both species. It is concluded that the use of a shaker in the proposed protocol is capable of reducing the incidence of pseudothrombocytopenia, reducing the underestimated counts. However, the technique should not be used as the only parameter for resolving pseudothrombocytopenia, considering that the dissociation of aggregates through agitation is not complete, although it minimizes false diagnoses and helps the clinician in a more appropriate therapeutic approach.

KEYWORDS: canines; cats; clinical pathology; hematology; thrombocytopenia.

INTRODUÇÃO

A parte fundamental da avaliação da hemostasia plaquetária inclui a plaquetometria, que é a avaliação quantitativa plaquetária, e, deve-se encontrar em valores adequados para exercer seu papel hemostático (TORRES et al. 2020). Quando ocorre uma queda nesses valores denomina-se trombocitopenia, e, no aumento desses valores, denomina-se trombocitose (KUTER 2019). A agregação plaquetária pode produzir valores de plaquetas totais falsamente diminuídos, assim sendo denominados de pseudotrombocitopenia (RIOND et al. 2015).

A pseudotrombocitopenia é uma alteração decorrente de fenômenos *in vitro*, associada a coletas sanguíneas mais laboriosas, na qual ocorre uma subestimação da plaquetometria, podendo acontecer por diferentes motivos, sendo o principal a agregação plaquetária. Observa-se subestimação plaquetária também por um erro analítico em contagens automatizadas, principalmente por impedância, devido à presença de macroplaquetas que acabam por não ser diferenciadas de hemácias que possuem tamanho semelhante na espécie felina. Menos comumente em animais, o satelitismo plaquetário é uma das causas de pseudotrombocitopenia (RUSSEL 2010, THOMAS 2010). De acordo com RIVERA et al. (2023), o satelitismo plaquetário é evidenciado no hemograma quando duas ou mais plaquetas encontram-se unidas na membrana citoplasmática de um leucócito.

As plaquetas felinas são mais propensas a agregados plaquetários devido a vários fatores exclusivos dessa espécie, como sua propensão a agregar, o grande tamanho das plaquetas, maior concentração de serotonina, liberação de grânulos quando exposto a serotonina e agregação irreversível em baixas quantidades de adenosina difosfato (ADP) (RIOND et al. 2015). Em estudo realizado por DE MELO et al. (2020) observaram que os agregados plaquetários foram o erro pré-analítico mais prevalente em amostras de felinos, estando presente em 35% das amostras da rotina laboratorial. Outros estudos demonstram a alta frequência dessa alteração em felinos, atingindo 36% (MORITZ & HOFFMAN 1997), 62% (ZELMANOVIC & HETHERINGTON 1998) e até 71% (NORMAN et al. 2001) das amostras felinas coletadas com EDTA.

Em humanos o uso de agitação por vórtex em amostras com pseudotrombocitopenia é recomendado por GULATI et al. (1997) para minimizar as interferências. Nestes casos os autores recomendam que se informe o valor de plaquetas pós-uso do tratamento em laudo, quando a diferença for maior que 10% em comparação ao valor pré-tratamento. A desagregação plaquetária ocorreu de forma total em 44% das amostras humanas com pseudotrombocitopenia, mas que na maioria a dissociação não é total quando as amostras foram submetidas de 1 a 2 minutos de agitação na velocidade maior do vórtex (entre 8 a 10 na escala de 1 a 10). A técnica descrita anteriormente em humanos também foi testada em 42 felinos com agregados plaquetários por TVEDTEN & CORCAL (2001) aumentando o total plaquetário em todas, exceto em uma das amostras, quando submetida a agitação por um minuto no S8223 Vortex Genie mixer (VWR Scientific Products, Chicago, Ill, USA) a 3000 rotações por minuto. Havia a presença de agregados plaquetários na maioria das amostras, resultando em uma desagregação total em apenas 12% dos pacientes testados.

Embora haja a indicação de notificar sempre que a diferença for maior que 10% na Medicina por GULATI et al. (1997), TVEDTEN & CORCAL (2001) relatam que uma diferença importante em felinos seria maior igual a 100%, ou nos aumentos de mais de 100.000 plaquetas/microlitro, nesses casos indicando que há pseudotrombocitopenia e não uma trombocitopenia verdadeira. Ademais, segundo os autores pode-se suspeitar fortemente de uma trombocitopenia verdadeira em felinos quando a diferença com o tratamento for menor ou igual que 50.000 plaquetas/microlitro. Até o presente momento, não se encontra na literatura avaliação da técnica para caninos.

Objetivou-se nesse estudo avaliar o uso de agitador vórtex como alternativa para resolução laboratorial da pseudotrombocitopenia em caninos e felinos com um grupo amostral maior que os presentes na literatura até o momento, verificando as diferenças de dissociação entre caninos e felinos e submetidas a uma agitação de maior intensidade por mais tempo em comparação ao estudo realizado por TVEDTEN & CORCAL (2001). Ademais, avaliou-se a frequência de agregados plaquetários e variações de plaquetometria nessas espécies em um laboratório veterinário na região de Videira, Santa Catarina.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

Executou-se o projeto no Laboratório Amigovida – Análises Veterinárias (Videira, Santa Catarina) com

amostras coletadas pelas clínicas veterinárias conveniadas, oriundas de cidades da região do meio oeste catarinense (Caçador, Lebon Régis, Rio das Antas, Arroio Trinta, Salto Veloso, Treze Tílias, Fraiburgo, Campos Novos, Tangará) no período de janeiro a julho de 2022.

Frequência de variações da plaquetometria e de agregados plaquetários

Realizou-se a avaliação de 100 amostras de caninos e de 100 amostras de felinos coletadas em tubo de EDTA de potássio que não apresentassem presença de coágulos no tubo, estivessem em tubos dentro da data de validade e fossem coletados de acordo a quantidade correta indicada no tubo exclusivamente durante o mês de maio de 2022 até obter 100 amostras de cada espécie visando estabelecer a frequência das variações de plaquetometria e de agregados plaquetários observados em esfregaço sanguíneo, enquanto outras amostras continuaram a serem selecionadas desde janeiro até julho de 2022 para serem utilizadas na avaliação do desempenho do vórtex na dissociação de agregados. Foram consideradas quatro variações: pseudotrombocitopenia (diminuição dos valores de referência de plaquetas totais na contagem por impedância elétrica adjacente a presença de agregados plaquetários e satelitismo plaquetário em esfregaço sanguíneo); Trombocitopenia (diminuição dos valores de plaquetas totais perante os valores de referência sem apresentar agregados plaquetários), trombocitose (valores plaquetários aumentados perante os valores de referência) e normoplaquetometria (valores plaquetários do paciente de acordo com os valores de referência). Consideraram-se os valores mínimos de referência estabelecidos no laboratório de acordo com 175.000 plaquetas/microlitro para caninos e 200.000 plaquetas/microlitro para felinos e os valores máximos de referência estabelecidos no laboratório de 500.000 plaquetas/microlitro em caninos e 800.000 plaquetas/microlitro em felinos. Não se incluiu como pseudotrombocitopenia amostras com valores plaquetários diminuídos perante os valores de referência e com presença de macroplaquetas, pois se considerou como erro analítico e visando não ocorrer, todas as amostras tiveram concordância com desvio de 20% entre a estimativa em lâmina e contagem automatizada por impedância elétrica.

Critérios de seleção de amostras para o tratamento

Selecionaram-se as amostras de tubos contendo anticoagulante etilenedinitrilotetraacetato de potássio (EDTA) que fossem aprovadas nos critérios de qualidade de amostra: sem apresentar coágulos, nem fibrina durante análise visual do tubo e que apresentavam diminuição na contagem plaquetária. Após a aprovação dos critérios de qualidade foram incluídos no grupo amostral para avaliação da eficácia do tratamento os animais que apresentassem valores plaquetários inferiores aos valores de referência estipulados pelo laboratório na contagem por impedância elétrica adjacente a presença de agregados plaquetários na lâmina de esfregaço sanguíneo. Utilizou-se amostra de animais hígidos e doentes, sem diferenciação por sexo, idade ou raças.

Gradação dos agregados plaquetários das amostras pré-tratamento

A presença de agregados plaquetários foi avaliada em esfregaço sanguíneo corado com May-Grunwald Giemsa de acordo com especificações do fabricante (Laborclin®, Brasil) considerando a presença de agrupamentos com três ou mais plaquetas como positivos. A quantificação de agregados plaquetários foi estabelecida de forma subjetiva de acordo com metodologia adaptada de SILVA (2017), na qual se considerou leve sendo representada por pequenos agregados (de três a dez plaquetas) na cauda do esfregaço; moderada representada por alguns agregados pequenos e medianos (de dez a vinte plaquetas) na borda lateral do esfregaço e na cauda; e; intensa representada por agregados pequenos, medianos e grandes (contendo mais que vinte plaquetas) em qualquer local.

Contagem plaquetária por impedância elétrica

A contagem por impedância elétrica foi realizada após homogeneização da amostra em homogeneizador automático (Agrot-1213, Spinlab®) por 18 rotações por minuto, por, no mínimo, 10 minutos. Durante o decorrer do projeto, o analisador hematológico (SDH-3-VET, Labtest®) passava por controle de qualidade interno diário (Controllab®) com aplicação do gráfico de Levey – Jennings e regras de Westgard e ensaio de proficiência trimestral.

Contagem plaquetária por estimativa em lâmina

As amostras além da contagem plaquetária por impedância elétrica tiveram contagem realizada por estimativa em esfregaço sanguíneo adaptado de metodologia proposta por SILVA et al. (2007). Realizou-se a média de 10 campos de imersão (aumento total de 1.000x) avaliados entre o corpo e a franja na porção em que as hemácias ficavam próximas, mas não sobrepostas, e, multiplicou-se por 15.000 obtendo as plaquetas/microlitro. Regiões que apresentassem agregados plaquetários não eram inclusas na contagem para estimativa em lâmina.

Protocolo de tratamento das amostras pelo uso de vórtex

Após a contagem plaquetária por impedância elétrica, estimativa em lâmina e classificação da intensidade de agregados plaquetários, as amostras eram submetidas ao tratamento. O tratamento corresponde à agitação em vórtex (Na3600, FORTECIENTÍFICA®) na velocidade de 3600 rotações por minuto (r.p.m.) durante três minutos. Posteriormente realizou-se homogeneização da amostra por, no mínimo, 10 minutos em homogeneizador automático (Agrot-1213, Spinlab®) na velocidade de 18 rotações por minuto.

Após o tratamento, realizou-se a confecção de outra lâmina que foi corada da mesma maneira seguido da reavaliação da contagem plaquetária por estimativa em lâmina e por impedância elétrica.

Análise estatística dos dados

Os dados obtidos sofreram análise descritiva e teste de normalidade (Shapiro Wilk) através do programa SAS (2013). Para analisar as relações entre o número de plaquetas por microlitros com as variáveis de tempo, método de contagem plaquetária e espécie, os dados foram submetidos as análises de correlação de Spearman (PROC CORR). Para as variáveis paramétricas utilizou-se teste *t de student* ao nível de significância de 5% para comparação de médias pré e pós-tratamento e teste de *Odds ratio* (razão de chances) no qui quadrado para comparação da probabilidade de agregados plaquetários em caninos e felinos e da frequência das variações da plaquetometria.

RESULTADOS

A frequência de normoplaquetometria foi a maior dentre as variações de plaquetometria em caninos, representando 64% dos animais avaliados, enquanto 12% apresentaram trombocitose, 14% pseudotrombocitopenia verdadeira (excluído animais que apresentavam baixa de plaqueta devido presença de macroplaquetas (Figura 1)) e a menor frequência foi de trombocitopenia verdadeira, presente em 10% das amostras. Na avaliação de frequência de agregados plaquetários, indiferente da plaquetometria, amostras de caninos com agregados representam 34% das amostras avaliadas nesse período.

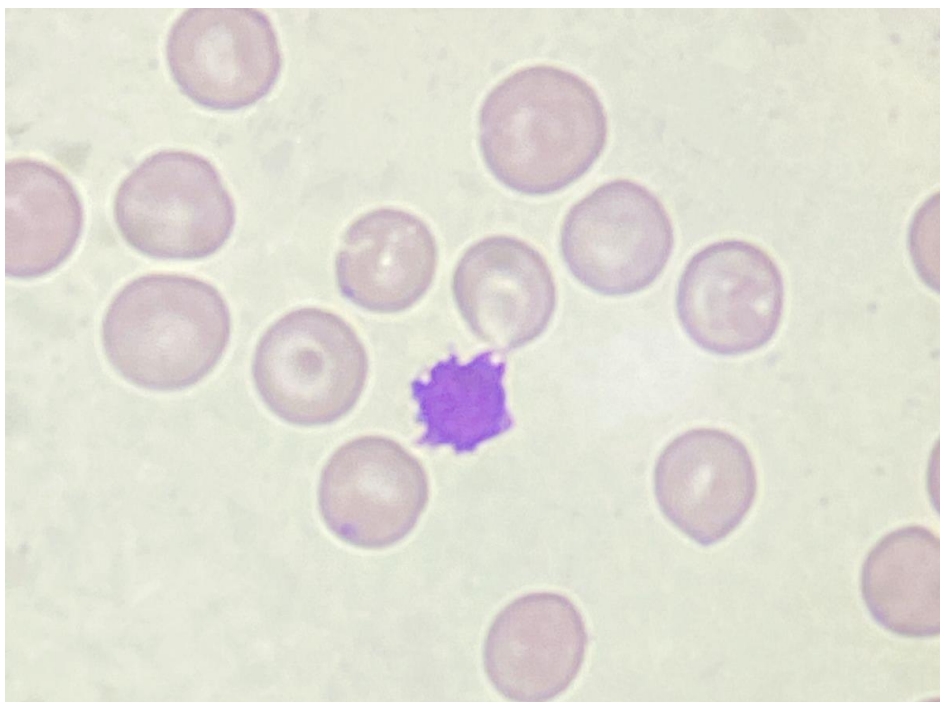


Figura 1. Macroplaquetas de canino em sua forma ativada apresentando pseudópodes (Objetiva de 100x, Coloração de May-Grunwald Giemsa, sob imersão em óleo mineral).

Figure 1. Canine macroplatelets in their activated form presenting pseudopods (100x objective, May-Grunwald Giemsa stain, under painting in mineral oil).

Felinos possuíram uma frequência maior de pseudotrombocitopenia (Figura 2) quando comparadas a caninos, representando o total de 60% das amostras analisadas. Na análise de *odds ratio* evidenciou-se que felinos possuem seis vezes mais chances de ter agregados plaquetários que caninos baseado nessa população com intervalo de confiança de 95% ($p < 0.0001$). Também nota-se que felinos apresentam uma

menor frequência de trombocitopenia e de trombocitose, com apenas 4% das amostras em cada classificação. A normoplaquetometria estava presente em 32% das amostras da espécie felina e 76% das amostras felinas possuíam agregados plaquetários, independente da plaquetometria.

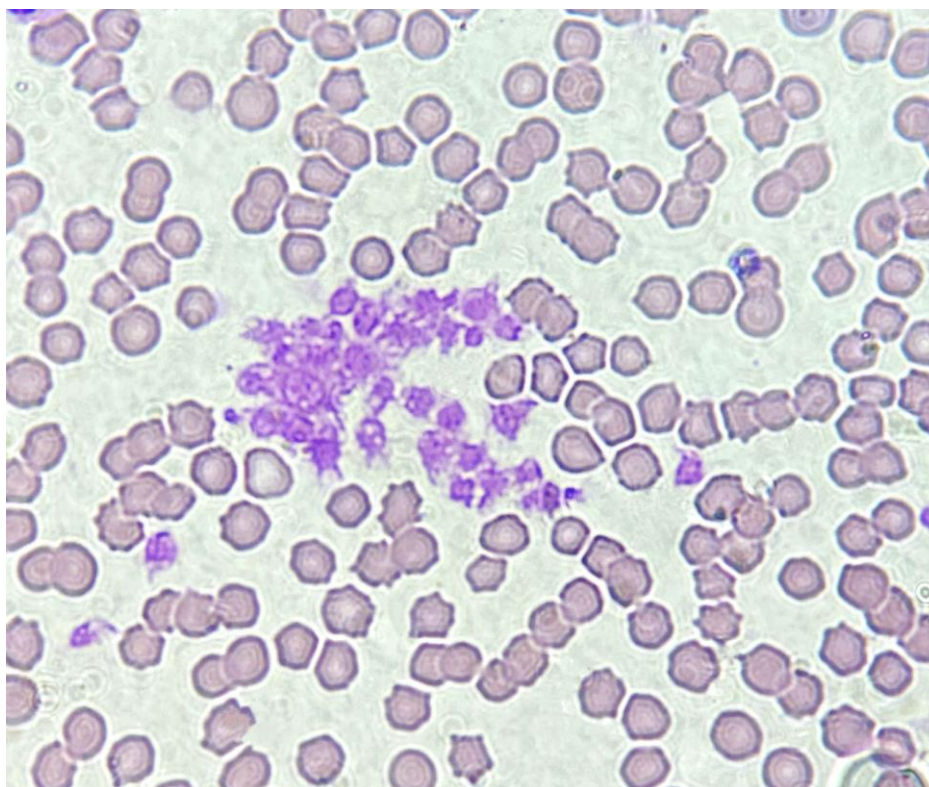


Figura 2. Plaquetas de felinos distribuídas em forma de agregado plaquetário, apresentando macroplaquetas em estado ativado (apresentando pseudópodes e granulação citoplasmática) em meio ao agregado (Objetiva de 100x, Coloração de May-Grunwald Giemsa, sob imersão em óleo mineral).

Figure 2. Feline platelets distributed in the form of a platelet aggregate, presenting macroplatelets in an activated state (presenting pseudopods and cytoplasmic granulation) within the aggregate (100x objective, May-Grunwald Giemsa stain, under immersion in mineral oil).

As médias plaquetárias pré e pós-tratamento em caninos e felinos (Figura 3) tiveram diferença estatística ($p < 0,0001$) e aumentaram em todos os animais do grupo amostral em comparação do valor de plaquetas antes de submeter ao vórtex com o valor após a agitação. No entanto, observa-se que nem todos os animais após o uso do agitador obtiveram valores que se enquadrassem nos valores de referência.

Os resultados evidenciam uma média com diferença mais expressiva entre o momento de antes e depois do tratamento em caninos, em comparação a felinos, sugerindo que a técnica forneça uma dissociação mais efetiva nessa espécie, apesar de haver diferença estatística nas duas espécies pré e pós tratamento ($p < 0,0001$).

A dissociação também sofre interferência da intensidade de agregados plaquetários previamente ao tratamento, mostrando uma dissociação maior e gradativa conforme maior a intensidade de agregados plaquetários em caninos e felinos (Figuras 4 e 5).

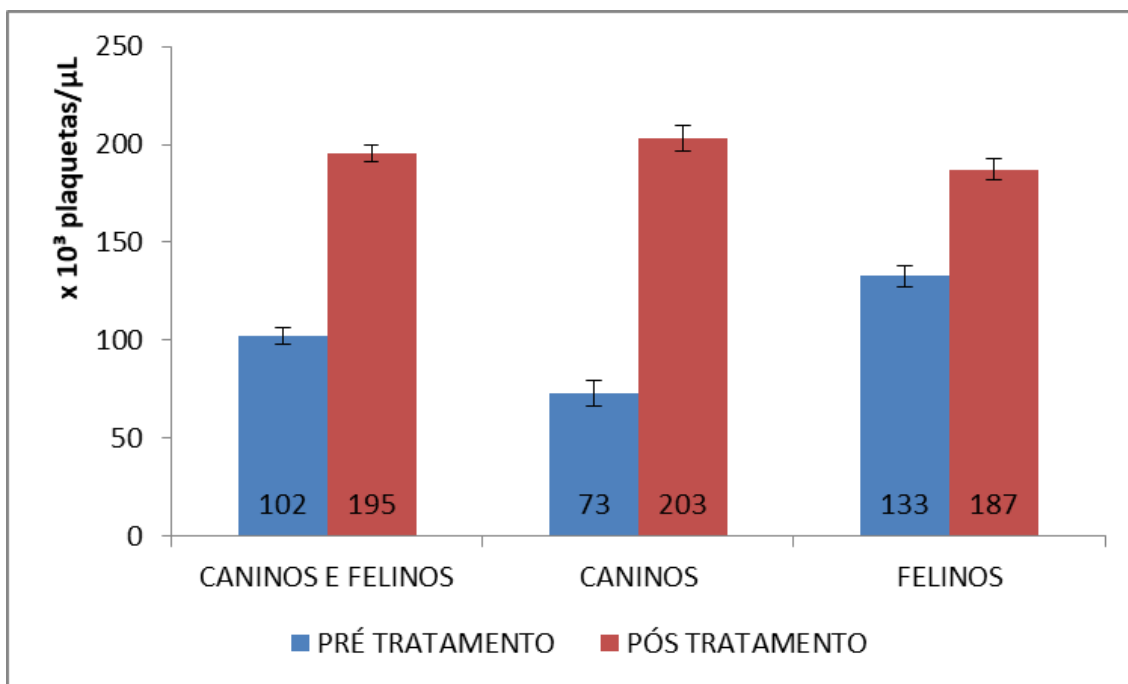


Figura 3. Médias±desvio padrão (DP) (da contagem plaquetária por microlitro em caninos e felinos pré tratamento e pós tratamento com uso de agitação em vórtex a 3600 rotações por minuto durante três minutos através da contagem por impedância elétrica e estimativa em lâmina.

Figure 3. Means±standard deviation (SD) of platelet count per microliter in canines and felines pre-treatment and post-treatment using vortex agitation at 3600 rotations per minute for three minutes using electrical impedance counting and slide estimation.

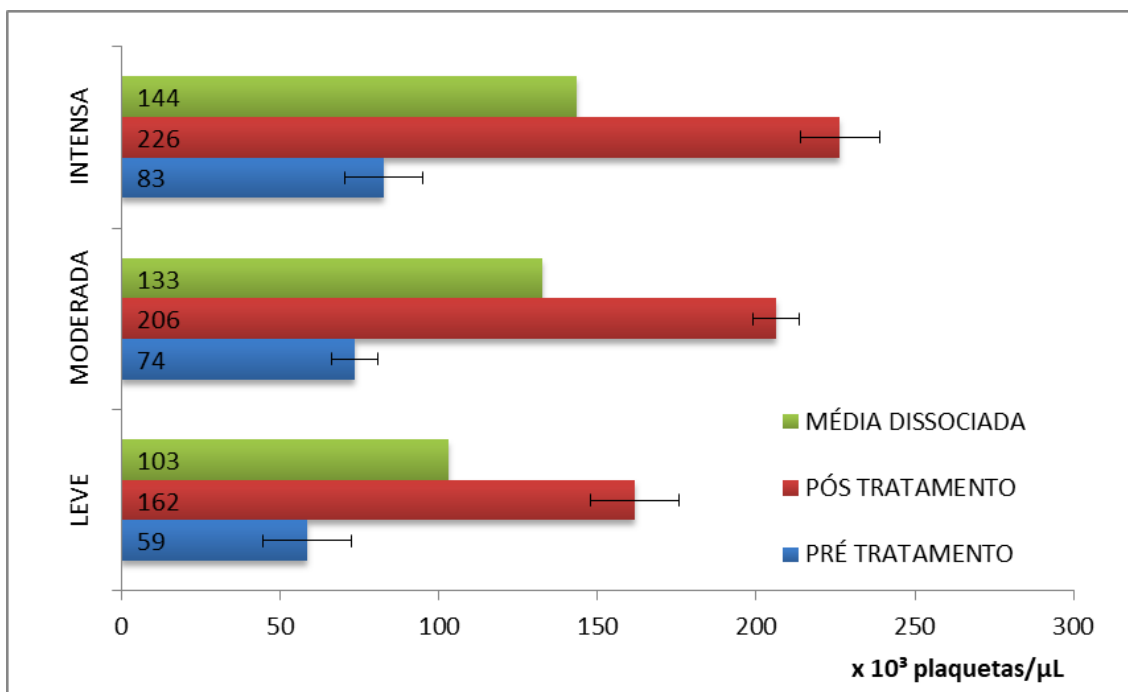


Figura 4. Médias±DP de plaquetas por microlitro em caninos pré-tratamento, pós-tratamento e diferença entre as médias pré e pós tratamento de amostras – média plaquetária dissociada - categorizadas em leve, moderada e intensa presença de agregados plaquetários.

Figure 4. Means±SD of platelets per microliter in canines pre-treatment, post-treatment and difference between pre- and post-treatment means of samples – dissociated platelet mean - categorized into mild, moderate and intense presence of platelet aggregates.

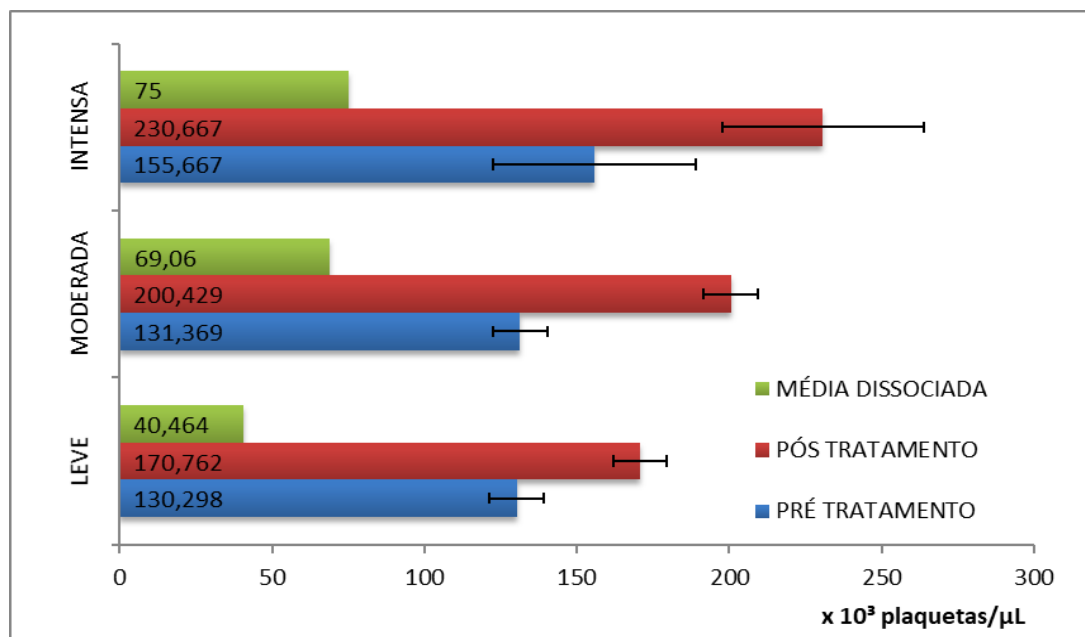


Figura 5. Médias \pm DP de plaquetas por microlitro em felinos pré tratamento, pós tratamento e diferença entre as médias pré e pós tratamento de amostras categorizadas em leve, moderada e intensa presença de agregados plaquetários.

Figure 5. Means \pm SD of platelets per microliter in felines pre-treatment, post-treatment and difference between pre- and post-treatment means of samples categorized as mild, moderate and intense presence of platelet aggregates.

Evidenciou-se que caninos, mesmo com leve presença de agregados plaquetários, tem uma média de diferença pré e pós tratamento de 103.046 plaquetas/microlitro, enquanto, os felinos com presença intensa de agregados tendem a dissociar uma média de 75.000 de plaquetas por microlitro e felinos com presença leve de agregados dissociaram a média apenas de 40.464 plaquetas por microlitro.

Não houve interação entre a variável método (utilização de impedância elétrica ou de estimativa em lâmina para contagem plaquetária) com o tempo (antes ou depois do tratamento com vórtex), indicando que as duas técnicas não têm diferença entre si quanto ao resultado do tratamento ($p=0,0537$).

Apesar de não ter sido evidenciado interação entre o momento e método estatisticamente, em comparação das médias, observa-se uma média plaquetária elevada tanto pré quanto pós-tratamento quando avaliadas em impedância elétrica em comparação a estimativa em lâmina (Figura 2).

DISCUSSÃO

A pseudotrombocitopenia é um problema prevalente em exames de felinos e esse trabalho corrobora com os achados de estudo de DE MELO et al. (2020), obtendo uma alta frequência de pseudotrombocitopenia nessa espécie. O problema também é relatado na medicina humana e quando há a presença de pseudotrombocitopenia em múltiplos anticoagulantes ela é reconhecida como pseudotrombocitopenia a múltiplos anticoagulantes (LARDINOIS et al. 2021). Na população de felinos avaliada no presente estudo resultou em 60% de frequência de pseudotrombocitopenia superando esse achado em comparação aos exames de caninos, corroborando com prevalência dessa variação de plaquetometria de 62% descrita em gatos no estudo de ZELMANOVIC & HETHERINGTON (1998).

TVEDTEN & CORCAL (2001) ao testar o efeito do vórtex sobre dissociação de agregados plaquetários em felinos não obtiveram dissociação em todas as amostras, em comparação a esse estudo que usou um grupo amostral maior e teve dissociação em todos os felinos. Esse resultado vai contra a afirmação de GULATI et al. (1997) de que aumento no tempo de agitação de vórtex acima de dois minutos provavelmente não aumentariam as chances de desagregar plaquetas, devido estudo realizado em humanos, provavelmente estando relacionado a uma diferença interespecie de humanos e felinos. RIOND et al. (2015) também corroboram com a afirmação que agitações por mais de dois minutos potencializam a dissociação plaquetária em felinos, visto que em 24 horas de homogeneização sem agitação em vórtex

obteve-se normoplaquetometria em todos os felinos que apresentavam pseudotrombocitopenia.

Assim como no estudo de RIOND et al. (2015), avaliando o efeito de homogeneização por 24 horas, e TVEDTEN & CORCAL (2001), avaliando o efeito de agitação em vórtex a 3000 rotações por minuto durante um a dois minutos, a dissociação plaquetária não é total no tratamento proposto no presente trabalho, no qual submete-se a uma agitação em vórtex a 3600 rotações por minuto por três minutos, permanecendo os agregados plaquetários após tratamento.

O presente estudo demonstra em caninos a maior média de diferença pré e pós-tratamento, indicando que são eles a espécie que tem maior dissociação plaquetária. Enquanto, os felinos, que apresentaram uma menor dissociação, apresentam nesse estudo como a espécie mais afetada pelos agregados plaquetários e podem ter a dissociação diminuída devido as particularidades da espécie, como a agregação irreversível em baixas quantidades de adenosina difosfato (ADP) de acordo com estudo de RIOND et al. (2015).

Em humanos, indica-se relatar em laudo plaquetas pós vórtex quando a diferença for maior que 10% do valor pré-tratamento por GULATI et al. (1997), TVEDTEN & CORCAL (2001) relatam que uma diferença importante em felinos seria de quando é maior igual que 100% ou com aumento de mais de 100.000 plaquetas/microlitro. No entanto, a média de diferença de pré e pós-tratamento em felinos atingiu 75.000 plaquetas/microlitro nos pacientes que apresentaram maior intensidade de agregados plaquetários na pré-avaliação, enquanto a intensidade leve de agregados plaquetários teve média de 40.464 plaquetas/microlitro, indicando que relatar apenas quando houver aumento de 100.000 plaquetas/microlitro não caberia no estudo e que variações de 10%, conforme a indicação na medicina humana seria mais apropriado. Considerando também que quando o valor de plaquetas após vórtex continuar abaixo do valor de referência não se pode considerar trombocitopenia verdadeira e mais avaliações seriam necessárias para concluir o diagnóstico, visto que a dissociação de plaquetas não ocorre de forma total. No entanto, quando o valor de plaquetas pós vórtex estiver de acordo com o valor de referência descarta-se a trombocitopenia verdadeira.

Caninos, mesmo com a presença leve de agregados plaquetários, tem uma grande dissociação plaquetária de acordo com o estudo atual e relatar em laudo aumento com mais de 100.000 plaquetas/microlitro como proposto em estudo de TVEDTEN & CORCAL (2001) com felinos parece funcionar nos cachorros, no entanto, utilizar o mesmo padrão proposto por GULATI et al. (1997) de relatar variações a partir de 10%, como em humanos, surgiria mais efeito considerando que pseudotrombocitopenias podem apresentar valores próximos no limite inferior do valor de referência.

Mesmo sem haver diferença estatística entre as médias da associação de vórtex com estimativa em lâmina e com contagem plaquetária por impedância elétrica, com p valor de 0,0537, sugere-se que os resultados, baseados na diferença das médias, são melhores com a associação de agitação de vórtex com avaliação por impedância elétrica posterior, mas sempre considerando a importância da avaliação em lâmina para descartar erros analíticos, como uma baixa contagem plaquetária devido macroplaquetas. Essa teoria é compatível com a conclusão de estudo realizado por BARROS et al. (2023) com amostras humanas de que a revisão de lâminas e reavaliação de plaquetas é necessária em laboratórios clínicos que não apresentam contagem de plaquetas por fluorescência e sim por técnicas sujeitas a erro por variação da dimensão habitual, como impedância elétrica.

A média plaquetária inferior da metodologia de estimativa por campo em comparação a contagem por bioimpedância elétrica pode estar aliada ao fator de correção utilizado, que possui variações de recomendações na literatura. Optou-se nesse trabalho por seguir a metodologia de correção de estimativa em lâmina proposta por SILVA et al. (2007), no qual o fator de correção é de 15.000. Entretanto, existem outros fatores de correção na literatura que variam de acordo com o tamanho do campo do microscópio, tipo de luz usada, hematócrito, hemoglobina do paciente e espécie. Em estudo realizado por COMAR et al. (2009) evidenciou-se que a contagem automatizada de plaquetas possui maior precisão, mas está sujeita a erros quando não tem avaliação morfológica adjacente considerando a não identificação de causas de pseudotrombocitopenia e/ou erros na contagem por macroplaquetas, e, que as diferentes metodologias de contagem por estimativa tendem a diminuir o valor total plaquetário devido às plaquetas poderem estar sobrepostas por hemácias ou não serem todas visualizadas.

Nem todos os animais após o uso da metodologia de dissociação proposta nesse trabalho obtiveram valores plaquetários pós tratamento que se enquadrassem nos valores de referência para a espécie em questão. Sustentados também pelo fato da permanência dos agregados plaquetários na avaliação de

esfregaço sanguíneo após tratamento, os dados sugerem que a dissociação de agregados plaquetários não ocorre de forma total. De acordo com essas informações, esse estudo vai de encontro com recomendações na medicina humana por LARDINOIS et al. (2021) da necessidade de relatar-se em laudo a metodologia utilizada para avaliação plaquetária, amostra utilizada em qual tipo de anticoagulante e, no caso de ser utilizada técnica adicional de dissociação, deve também ser relatada.

CONCLUSÃO

A pseudotrombocitopenia em pequenos animais possui alta frequência na região do meio oeste catarinense, com maior proporção na espécie felina quando comparada a caninos apresentando seis vezes mais chances de desenvolver agregados plaquetários. A utilização de vórtex como dissociador de agregados plaquetários, na velocidade de 3600 rotações por minuto durante três minutos, é recomendada visando diminuir as interferências pré-analíticas nas duas espécies, mas com maior eficácia em caninos.

Sugere-se que seja relatado o resultado após dissociação no hemograma a partir da variação de 10% do valor pré-agitação sempre associado com avaliação morfológica plaquetária em lâmina visando descartar falsas trombocitopenias devido erro analítico por indevida contagem de macroplaquetas como hemácias através da bioimpedância. Orienta-se que quando as plaquetas pós vórtex apresentem valores dentro da referência de plaquetometria que se descarte a possibilidade de trombocitopenia verdadeira e que quando não atinjam esses valores, uma coleta seja considerada.

REFERÊNCIAS

- BARROS AEL et al. 2023. Pseudoplaquetopenia: importância da implementação da revisão de lâminas hematológicas por microscopia para correção da contagem de plaquetas e no controle interno da qualidade frente às modernas tecnologias dos contadores automatizadas em um pronto socorro universitário de Pernambuco. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy* 45: S103.
- COMAR SR et al. 2009. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 31: 431-436.
- DE MELO PHM et al. 2020. A prevalência de erros pré-analíticos em exames hematológicos de felinos. Relatório de Pesquisa. Brasília: UniCEUB. 28p.
- GULATI GL et al. 1997. Using a vortex to disaggregate platelet clumps. *Laboratory Medicine* 28: 665-667.
- KUTER DJ. 2019. General aspects of thrombocytopenia, platelet transfusions, and thrombopoietic growth factors. In: KITCHENS CS et al. *Consultative hemostasis and thrombosis*. Elsevier. p.108-126.
- LARDINOIS B et al. 2021. Pseudothrombocytopenia—a review on causes, occurrence and clinical implications. *Journal of clinical medicine* 10: 594.
- MORITZ A & HOFFMANN C. 1997. Contagem de plaquetas no gato. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe Kleintiere Heimtiere* 25: 695–700.
- NORMAN EJ et al. 2001. Prevalência de baixa contagem de plaquetas automatizadas em gatos: Comparação com prevalência de trombocitopenia com base na estimativa de manchas de sangue. *Veterinary Clinical Pathology* 30: 137–40.
- RIOND B et al. 2015. Study on the kinetics and influence of feline platelet aggregation and deaggregation. *BMC veterinary research* 11: 1-8.
- RIVERA AS et al. 2023. Satelitismo plaquetario en linfocitos. *Revista Hematología* 27: 58-60.
- RUSSEL LKE. 2010. Platelet Kinetics and Laboratory Evaluation of Thrombocytopenia In: WEISS DJ & WARDROP KJ. *Schalm's Veterinary Hematology* 6.ed. Ames: Blackwell. p.576-585.
- SAS. 2013. Statistical Analysis System Institute Inc. GRAPH Software: Reference. Version 9.4. Vol 2. Cary: SAS.
- SILVA DCBC. 2017. Avaliação da agregação plaquetária em gatos ambientados e não ambientados, comparando os anticoagulantes Citrato de sódio 3, 2% e EDTA e diferentes métodos de contagem de plaquetas. TCC. (Bacharel em Medicina Veterinária). Areia: UFPB. 53p.
- SILVA SB et al. 2007. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. *Ciência Rural* 37: 1045-1051.
- THOMAS JS. 2010. Non- Immune- Mediated Thrombocytopenia In: WEISS DJ & WARDROP KJ. *Schalm's Veterinary Hematology* 6.ed. Ames: Blackwell. p.596-604.
- TORRES DZ et al. 2020. Enfermedades de la hemostasia primaria. Púrpuras vasculares. *Enfermedades de las plaquetas. Medicina-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 13: 1242-1249.
- TVEDTEN H & KORCAL D. 2001. Vortex Mixing of Feline Blood to Disaggregate Platelet Clumps. *Veterinary Clinical Pathology* 30: 104-106.
- ZELMANOVIC D & HETHERINGTON EJ. 1998. Análise automatizada de plaquetas felinas em sangue inteiro, incluindo contagem de plaquetas, volume médio de plaquetas e estado de ativação. *Veterinary Clinical Pathology* 27: 2–9.