



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS EM CÃES SAUDÁVEIS:
EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E TIPO DE ANTICOAGULANTE**

NICOLE R. C. HLAVAC

PORTO ALEGRE

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS EM CÃES SAUDÁVEIS:
EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E TIPO DE ANTICOAGULANTE**

Autor: Nicole R. C. Hlavac

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS
como requisito parcial da obtenção do título de

Mestre

Orientador: Félix H. D. González

Porto Alegre, 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Hlavac, Nicole Regina Capacchi
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS EM CÃES
SAUDÁVEIS: EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E TIPO DE
ANTICOAGULANTE / Nicole Regina Capacchi Hlavac. --
2012.

53 f.

Orientador: Félix Hilário Diaz González.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. canino. 2. efeitos pré-analíticos. 3.
hematologia veterinária. 4. contagem de plaquetas.
I. González, Félix Hilário Diaz, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos que me orientaram: Félix e Luciana,

À equipe plaquetas: Amanda, Elisa, Mari e Chico

Aos amigos: Alexandre, Carolina e Luciana

Ao apoio e amor incondicional dos meus pais Graciela e Volmar, e do meu namorado

Ricardo.

A tantos que com muito carinho me ajudaram a chegar ao fim de mais esta jornada

“A physician, who depends in the laboratory to make his diagnosis, is probably inexperienced; one who says that he does not need a laboratory is uninformed. In either instance the patient is in danger.”

J. A. Halsted

Nicole R. C. Hlavac

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS EM CÃES SAUDÁVEIS: EFEITOS
DA TEMPERATURA, TEMPO E TIPO DE ANTICOAGULANTE

Aprovado em 02 de março de 2012.

Prof. Dr. Félix H. D. González
Orientador e Coordenador da Comissão Avaliadora

Prof. Dr. Carlos Termignoni (UFRGS)
Membro da Comissão Avaliadora

Prof^a. Dr^a. Regina Takahira (UNESP)
Membro da Comissão Avaliadora

Prof. Dr. Cláudio Roberto Scabelo Mattoso (UDESC)
Membro da Comissão Avaliadora

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS EM CÃES SAUDÁVEIS: EFEITOS DA TEMPERATURA, TEMPO E TIPO DE ANTICOAGULANTE

Autor: Nicole R. C. Hlavac

Orientador: Félix H. D. González

RESUMO

A contagem de plaquetas é um exame de rotina utilizado no auxílio do diagnóstico de diversos distúrbios hemostáticos, além de ser usada no monitoramento de pacientes, portanto existe a necessidade de obter parâmetros fidedignos para assegurar a existência de plaquetopenia ou plaquetose e alterações morfológicas destas células. A comum ocorrência de agregação plaquetária “*in vitro*” dificulta a análises destes parâmetros, evento devido ao uso incorreto da metodologia de coleta, armazenamento inadequado da amostra, assim como o uso incorreto do anticoagulante. O diagnóstico errôneo de plaquetopenia ou plaquetose pode ter como consequência o direcionamento terapêutico inadequado do paciente. O objetivo deste estudo foi comparar quantitativa e qualitativamente os parâmetros plaquetários em amostras com diferentes anticoagulantes, e diferentes tempo e temperatura de armazenagem. Além disso, foram também objetivos averiguar a diferença entre os métodos de contagem de plaquetas (automático, manual e estimado em lâmina), e a correlação entre o volume plaquetário médio (MPV) e a porcentagem de macroplaquetas, assim como definir um intervalo de referência para a porcentagem de macroplaquetas em uma população de cães saudáveis. Amostras de sangue foram coletadas através do sistema a vácuo em tubos de EDTA K₂ e citrato de sódio 3,2% de 54 cães clinicamente saudáveis. As amostras foram separadas em duas alíquotas e posteriormente armazenadas em pares, um par a temperatura ambiente (25°C) e outro a 4°C por até 6 horas após coleta. Cada alíquota foi avaliada em três momentos diferentes, nos quais as contagens plaquetárias, o MPV, e o escore de agregação foram realizados. A porcentagem de macroplaquetas foi feita apenas nas amostras de EDTA armazenadas a 25°C, no tempo zero após a coleta. Foi observada uma diminuição significativa nas contagens plaquetárias com o passar do tempo e em amostras sob refrigeração, e uma tendência ao aumento dos valores de MPV. As contagens realizadas em amostras de EDTA foram mais elevadas do que aquelas em citrato, e não houve correlação entre o volume de plaquetário médio e a porcentagem de macroplaquetas e, além de que a frequência de aglomeração foi maior em amostras citratadas armazenadas a 4°C.

Palavras chave: canino, efeitos pré-analíticos, hematologia veterinária, contagem de plaquetas.

**EVALUATION OF PLATELET PARAMETERS IN HEALTHY DOGS:
TEMPERATURE, TIME AND ANTICOAGULANT EFFECTS**

Author: Nicole R. C. Hlavac

Advisor: Félix H. D. González

ABSTRACT

The platelet count is a routine examination used in the diagnosis of bleeding disorders and patient monitoring. Therefore, reliable parameters are needed to ensure the existence of thrombocytopenia or thrombocytosis and morphological changes of these cells. The common occurrence of platelet aggregation difficult the analysis of these parameters, this often occurs due to incorrect venipuncture methodology, improper storage of the sample, as well as the incorrect use of anticoagulants. The misdiagnosis of thrombocytopenia or thrombocytosis may result in inappropriate treatment guidance. The aim of this study was to compare the quantitative and qualitative platelet parameters in samples with different anticoagulants, times and temperatures. Additional objectives were to, ascertain the difference between platelet count methods (automatic, manual and estimated) and to verify a possible correlation between the mean platelet volume (MPV) and macroplatelets percentage, as well as to define a reference range for macroplatelets percentage in a healthy population of dogs. Blood was collected from 54 clinically healthy dogs via vacuum system into EDTA K₂ and sodium citrate 3.2% tubes. The samples were separated into two aliquots and then stored in pairs, one pair at room temperature (25°C) and another at 4°C for up to 6 hours post sampling. Each sample was evaluated at three different times, in which platelet counts, MPV, and clumping scores were performed. The macroplatelets percentage was done only in EDTA samples stored at 25°C, at zero hour post sampling. The authors observed a statistically significant decrease in platelet counts over time and in refrigerated samples, and a tendency to increased values of MPV. Counts performed in EDTA samples were higher than those in citrate, and there was no correlation between the mean platelet volume and macroplatelets percentage; and besides the frequency of clumping was higher in citrated samples stored at 4°C.

Key words: canine, preanalytical effects, veterinary hematology, platelet count.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

Figure 1. Line graphs representing the trend of decrease in platelet counts (PC) and increase in MPV values over time.....46

Figure 2. Scatter plot showing separate measures and the lack of correlation between the MPV values and the macroplatelets percentage.....47

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Planilha utilizada durante o experimento para registro de resultados.....30

ARTIGO

Table 1. Mean and standard deviation values of platelets parameters in the different time, temperature and anticoagulant of storage.....42

Table 2. Correlation between platelet count methodologies in relation to standard methodology, considered here as automatic platelet count.....43

Table 3. Frequency of platelet clumping in the different time, temperature and anticoagulant of storage44

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	12
2.0 OBJETIVOS	13
2.1 GERAL.....	13
2.2 ESPECÍFICOS.....	13
3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 AS PLAQUETAS.....	14
3.2 DESORDENS PLAQUETÁRIAS.....	15
3.3 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS: TESTES LABORATORIAIS.....	17
3.3.1 <i>Contagem de plaquetas</i>	17
3.3.2 <i>Volume plaquetário médio</i>	18
3.3.3 <i>Plaquetas reticuladas e macroplaquetas</i>	20
3.3.4 <i>Outros parâmetros</i>	21
3.4 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS: INFLUÊNCIAS PRÉ-ANALÍTICAS	23
3.5 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS: INFLUÊNCIAS ANALÍTICAS.....	24
3.6 PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS: INFLUÊNCIAS PÓS-ANALÍTICAS	25
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS	27
4.2 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS	27
4.3 ANÁLISES LABORATORIAIS	28
4.4 ETAPAS DO EXPERIMENTO.....	29
4.5 CONTROLE DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO.....	29
4.6 ANÁLISES LABORATORIAIS DOS PARÂMETROS PLAQUETÁRIOS	30
5.0 RESULTADOS.....	31
5.1 ARTIGO	31
5.1.1 <i>Evaluation of platelet parameters in healthy dogs: effects of temperature, time and anticoagulant</i> ..	32
6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS	53

1. INTRODUÇÃO

As plaquetas são o terceiro componente celular do sangue periférico, depois de eritrócitos e leucócitos, ainda que muitas vezes negligenciado na avaliação quantitativa e qualitativa do sangue periférico. O significado clínico destas células não deve ser subestimado, uma vez que em torno de 90% das doenças hemorrágicas em cães e gatos resultam de anormalidades no número ou na função de plaquetas (REBAR, 2004).

A contagem de plaquetas é um exame de rotina que auxilia no diagnóstico de diversos distúrbios de hemostasia, além de ser usada no monitoramento de pacientes, portanto existe a necessidade de obter parâmetros fidedignos para assegurar a eventual existência de plaquetopenia ou plaquetose e alterações morfológicas destas células (THOMAS, 2010). A comum ocorrência de agregação plaquetária “*in vitro*” dificulta a análises destes parâmetros, e a agregação muitas vezes ocorre devido ao uso incorreto da metodologia de coleta, armazenamento e escolha de anticoagulante. O diagnóstico errôneo de plaquetopenia ou plaquetose pode ter como consequência o direcionamento terapêutico inadequado do paciente (NORMAN et al., 2001; STOKOL & ERB, 2007).

É importante que os pacientes com anormalidades plaquetárias quantitativas ou qualitativas sejam tratados de maneira correta o mais rápido possível, sendo assim, o diagnóstico fornecido pelo patologista clínico deve ser preciso e sofrer o mínimo de interferências pré-analíticas e analíticas. Além disso, o conhecimento das possíveis interferências é essencial tanto para que o patologista clínico libere laudos contendo diagnósticos precisos, quanto para o laboratório, o que evita gastos desnecessários e a repetida abordagem do paciente para realizar novas amostragens para o mesmo teste (ANDRIOLO et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Comparar quantitativa e qualitativamente os parâmetros plaquetários em amostras de sangue colhidas em diferentes anticoagulantes, e conservadas em diferentes tempo e temperatura.

2.2. Específicos

- Averiguar a diferença entre os métodos de contagem de plaquetas (automático, manual e estimado em lâmina) com uso de diferentes anticoagulantes, tempo e temperatura de armazenamento.

- Determinar se há alterações nas contagens plaquetárias e no volume plaquetário médio (MPV) com diferentes anticoagulantes, tempos de espera até a análise e temperaturas de armazenamento das amostras.

- Averiguar a possível correlação entre MPV e porcentagem de macroplaquetas

- Definir um intervalo de referência para macroplaquetas na população de cães clinicamente sadios estudada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 As plaquetas

As plaquetas são as menores células sanguíneas, originadas de fragmentos do citoplasma do megacariócito. Estas pequenas células tem uma importância crítica na manutenção da hemostasia, além de atuarem em eventos como inflamação e neovascularização. As plaquetas são responsáveis pela interrupção inicial temporária do fluxo de sangue após lesão no leito microvascular. Para realizar estas funções, as plaquetas sofrem uma série de eventos descritos coletivamente como ativação plaquetária. Estes eventos envolvem a adesão de plaquetas à parede vascular, agregação plaquetária e liberação da reação. Entretanto, mesmo que estes eventos possam ser descritos sequencialmente, na vida real, é um processo dinâmico com muitos eventos ocorrendo simultaneamente (GEORGE, 2000; BAKER, 2007).

A trombopoietina é o principal hormônio envolvido no controle do desenvolvimento do megacariócito, mas muitas outras citocinas e hormônios participam deste controle, incluindo as interleucinas 3, 6 e 11. Na medula óssea, os megacariócitos estão localizados perto das paredes sinusóides, o que facilita a saída de grandes segmentos de seu citoplasma para a circulação periférica. Quando ativadas, as plaquetas mudam sua forma para uma esfera compacta com longas extensões dendríticas que facilitam a adesão. O citoplasma plaquetário é rico em actina e miosina, o que facilita a mudança de forma e a retração do coágulo. As plaquetas possuem em sua estrutura duas classes de grânulos secretórios. Existem grânulos densos que secretam ADP e cálcio, reforçando a agregação e as reações relacionadas com a coagulação na superfície plaquetária. O outro tipo são os grânulos α que secretam proteínas como o fator de von Willebrand, fator plaquetário 4, fibrinogênio, albumina e IgG. Os receptores glicoprotéicos de membrana mediam a adesão ao tecido subendotelial e a subsequente agregação para formar o tampão hemostático inicial. A maior glicoproteína é chamada de I e a menor de IX. As letras a e b são adicionadas a fim de separar as diferentes bandas protéicas (ex. glicoproteína I torna-se glicoproteína Ia e Ib). A glicoproteína IIb-IIIa é a proteína de superfície mais abundante, a qual sofre mudanças conformacionais durante a ativação plaquetária para expressar sua função receptora, principalmente para o fibrinogênio. A ligação do glicoproteína IIb-IIIa ao fibrinogênio media a agregação plaquetária. Uma particularidade da espécie canina é que esta não possui grânulos α , portanto praticamente não armazenam o fator de von Willebrand. Então diferente das outras espécies o fator de von

Willebrand é liberado principalmente pelas células epiteliais. (PIDARD et al., 1986; BOUDREAUX, 2010).

As plaquetas de cães sobrevivem por aproximadamente 5 a 7 dias na circulação, enquanto que as de gatos não sobrevivem mais de um dia, sendo que as plaquetas mais jovens têm melhor capacidade funcional. O baço seqüestra continuamente um terço das plaquetas circulantes. Muitas plaquetas são removidas da circulação por monócitos/macrófagos quando se tornam senescentes, mas uma fração pequena e constante é removida pelo envolvimento na manutenção da integridade vascular. A definição de todas estas reações ajuda a entender as manifestações clínicas decorrentes de desordens de sangramento. Entender a participação das plaquetas na hemostasia e a definição das desordens causadas pela função anormal destas células são fundamentais para instituição de novas terapias e identificação correta de desordens plaquetárias (MEYER & HARVEY, 1998; GEORGE, 2000).

3.2 Desordens plaquetárias

As desordens plaquetárias podem ser classificadas em duas grandes categorias: anormalidades quantitativas e anormalidades qualitativas.

As anormalidades quantitativas incluem trombocitose (plaquetose) e trombocitopenia (plaquetopenia), sendo a última mais importante e prevalente na clínica de pequenos animais. Clinicamente, a trombocitose é menos comum, podendo ocorrer secundariamente à contração esplênica, terapia com glicocorticóides ou esplenectomia. A trombocitose também pode ser uma característica de doença primária da medula óssea. A leucemia primária de plaquetas pode ser manifestada de duas formas: trombocitemia primária com trombocitose persistente na circulação periférica, ou leucemia megacarioblástica com proliferação massiva de precursores plaquetários na medula óssea. Nas duas condições podem-se observar morfologias bizarras ao avaliar o sangue periférico. A leucemia megacarioblástica é rara. O uso de agente quimioterápicos como a vincristina também pode resultar em trombocitose por estimulação dos megacariócitos (REBAR, 2007; STOKOL, 2010).

A trombocitopenia pode ocorrer por quatro mecanismos distintos: (1) aumento da utilização secundária a perda de sangue ou coagulação intravascular disseminada (CID); (2) destruição plaquetária por fator imunomediado; (3) seqüestro secundário a endotoxemia, hipotermia, hepato ou esplenomegalia; (4) diminuição da produção devido à doença medular (SCOTT & JUTKOWITZ, 2010; THOMAS, 2010).

As anormalidades qualitativas incluem defeitos hereditários de função plaquetária, como doença de von Willebrand ou síndrome de Chediak-Higashi; e defeitos adquiridos, geralmente associados a medicações ou doenças sistêmicas. Geralmente estas anormalidades são diagnosticadas quando as outras causas de sangramento são descartadas. São necessários outros testes, além dos exames hematológicos básicos, para realizar o diagnóstico definitivo (BROOKS & CATALFAMO, 2010).

Antes de definir as possíveis causas de qualquer anormalidade plaquetária deve-se ter conhecimento da abordagem diagnóstica correta. As desordens de hemostasia exigem o trabalho de uma equipe multidisciplinar que inclua, além do clínico responsável pelo paciente, o patologista clínico e um técnico de laboratório que domine as metodologias utilizadas. Muitas desordens plaquetárias são diagnosticadas erroneamente, sendo que as causas destes erros incluem desde o uso da técnica laboratorial incorreta, solicitação de exame inadequado para o caso em questão, amostra mal coletada até o uso do anticoagulante incorreto (NORMAN et al., 2001; ANDRIOLO et al., 2010; RUSSEL, 2010).

Wills & Wardrop (2008) relatam o caso de um canino diagnosticado com pseudotrombocitopenia secundária aos efeitos do EDTA, um fenômeno *in vitro*, não patológico, mas que pode ser clinicamente significativo se o tratamento for iniciado baseando-se na trombocitopenia observada no contador hematológico. Nestes casos observam-se contagens plaquetárias muito baixas e agregação plaquetária no esfregaço sanguíneo. Ao coletar a amostra usando citrato de sódio ou heparina como anticoagulante, observa-se que a contagem plaquetária encontra-se dentro dos valores de referência. Da mesma forma, amostras com uma alta porcentagem de macroplaquetas pode apresentar uma baixa contagem plaquetária, pois as plaquetas grandes podem ser excluídas da contagem em alguns contadores hematológicos automáticos. Nestes casos, a contagem de plaquetas manual e estimada em lâmina, deve fornecer resultados mais fidedignos (THOMAS, 2010).

Stokol (2010) descreve que amostras que contenham debris celulares, eritrócitos ou leucócitos pequenos, hemolisados e/ou fragmentados, analisadas em qualquer método de contagem de plaquetas podem reportar pseudotrombocitose. Nestes casos, a avaliação morfológica em esfregaço sanguíneo é fundamental. Mesmo que a contagem estimada de plaquetas tenha acurácia questionável, as anormalidades que causam pseudotrombocitose poderão ser rapidamente identificadas.

3.3 Parâmetros plaquetários: testes laboratoriais

3.3.1 Contagem de plaquetas

A contagem de plaquetas é um componente fundamental do plaquetograma e pode ser realizado através de três metodologias distintas: contagem manual, estimada em lâmina ou automática. A contagem manual foi o método de referência estabelecido até 2001 pelo *International Council for Standardization in Hematology* (ICSH), também chamado de Método Brecher & Cronkite (1950). Este método fundamenta-se na determinação direta das plaquetas em hemocítmetro de Neubauer, após diluição de sangue total em solução hipotônica que lise os eritrócitos. O líquido diluidor é uma solução de oxalato de amônio a 1%. Esta técnica foi descrita pela primeira vez em cães por Weed et al. (1965) e ainda é descrita nos livros de hematologia como uma alternativa quando a contagem automática não pode ser realizada, além de poder ser utilizada para as demais espécies domésticas. A contagem manual e estimada também é aconselhada por Russel (2010) quando as contagens plaquetárias estão abaixo do limite de sensibilidade e linearidade dos contadores automatizados, ou seja, entre 5.000 a 20.000/ μL . Este mesmo método também pode ser realizado utilizando o hemocítmetro e um teste comercial (Unopette, Becton Dickinson), disponível no Brasil (LASSEN & WEISER, 2007; OLIVEIRA, 2007).

A estimativa da contagem global de plaquetas é parte fundamental do plaquetograma. Apesar de a contagem não ter acurácia significativa ao realizar a estimativa, é possível avaliar a morfologia destas células e identificar possíveis alterações. Dentre as alterações podem-se incluir agregação plaquetária, presença de macroplaquetas ou plaquetas reativas, além de inclusões parasitárias como o *Anaplasma platys*, ou outras riquetsias, protozoários, fungos, metazoários ou agentes virais associados a desordens plaquetárias (THOMAS, 2010). Os métodos atuais para estimativa de plaquetas em lâmina foram desenvolvidos com base em estudos com contadores automatizados, que, através da multiplicação por um fator, transforma o número de plaquetas por campo em número de plaquetas por mm^3 . A contagem estimada foi relatada pela primeira vez na medicina veterinária por Tveden et al. (1988). Na contagem, que deve ser feita por um patologista clínico experiente, a escolha pelo campo de contagem é fundamental para obter um bom resultado. Entretanto, segundo Oliveira (2007), este tipo de conduta laboratorial indireta deve ser restrita a procedimentos de triagem para verificar possíveis discrepâncias nas contagens diretas automatizadas.

Os métodos de contagem manual e estimada em lâmina são demorados e dependem da habilidade do operador. Além disso, uma avaliação rápida da contagem de plaquetas é

essencial em casos de desordens plaquetárias. Nestes casos os contadores hematológicos podem fornecer resultados rápidos, confiáveis, e ainda determina outros parâmetros como o volume plaquetário médio (MPV). Entretanto, os métodos manual e estimado ainda são utilizados para testes comparativos com contadores automáticos, para determinar contagens em animais com outras anormalidades plaquetárias ou discrepâncias em contagens realizadas pelo método automático (NORMAN et al., 2001; OLSEN et al., 2004; WILLS & WARDROP, 2008; TVEDTEN, 2010).

Muitos sistemas automatizados de contagem de células usando diferentes técnicas estão disponíveis comercialmente para determinar a concentração plaquetária em sangue total. Os analisadores por impedância diluem as células sanguíneas em um meio de condução elétrica e passam as células através de pequenos canais entre dois eletrodos. A mudança na impedância elétrica, proporcional ao tamanho da célula é gerada cada vez que a célula passa por este canal. A quantidade de mudanças na impedância determina o número de células. As contagens realizadas por citometria de fluxo são baseadas na interrupção do feixe de luz, onde a mudança na dispersão da luz dá informações sobre o tamanho da célula. Então, independente do método utilizado, as plaquetas são separadas dos eritrócitos com base no tamanho celular. A contagem por citometria de fluxo é mais precisa, pois utiliza anticorpos plaquetários específicos e indicadores de cor, enquanto que na impedância utiliza-se apenas a mudança na condutividade elétrica (STOCKHAM & SCOTT, 2002; OLSEN et al., 2004; ZANDECKI et al., 2007).

Os contadores automatizados passaram por uma evolução tecnológica nas últimas duas décadas, resultando em significativa melhoria na eficácia analítica. Entretanto, enquanto para alguns parâmetros consolidados o desempenho analítico é excelente, para outros, em especial, contagem de reticulócitos ou plaquetas, especialmente em baixas concentrações, é menos satisfatório (LEEUWEN & TESKE, 1999; BUTTARELLO & PLEBANI, 2008). Apesar dessas limitações, ainda são desenvolvidos muitos estudos na hematologia humana e veterinária para obter uma padronização e segurança nos resultados obtidos tanto em pacientes hígidos quanto em diferentes patologias (LILLIEHÖÖK & TVEDTEN, 2009; WELLES et al., 2009).

3.3.2 Volume plaquetário médio

Os contadores automáticos, além de realizarem a contagem de plaquetas, também fornecem os valores de volume plaquetário médio ou *mean platelet volume* (MPV), e uma

medida da variabilidade do tamanho plaquetário ou *platelet distribution width* (PDW). A variabilidade do tamanho plaquetário depende do processo de produção, pela fragmentação do citoplasma do megacariócito e formação de pró-plaquetas (OLIVEIRA, 2007; RUSSEL, 2010).

O volume plaquetário está relacionado com grau de maturação e diferenciação do megacariócito, e seu valor reflete a média do volume de todas as células enumeradas como plaquetas. O aumento do MPV, em condições em que há aumento da produção plaquetária, é mediado por várias citocinas (interleucinas 6, 11 e trombopoietina) que afetam a diferenciação megacariocítica e resultam em uma maior produção de plaquetas grandes e reativas. Entretanto, para determinar este valor com a acurácia necessária, a amostra deve estar livre de agregação plaquetária, além do que variáveis como temperatura de estoque, tempo até a análise e tipo de anticoagulante utilizado, podem interferir no resultado (STOCKHAM & SCOTT, 2002; GENTRY et al., 2008).

Segundo Weiser & Kociba (1984), em animais saudáveis observa-se uma correlação inversa entre o MPV e a concentração de plaquetas. O MPV tende a diminuir em animais com altas contagens plaquetárias. Ou seja, a massa plaquetária é relativamente constante dentro de um largo intervalo de contagem plaquetária, e o valor de MPV é expresso em função da concentração plaquetária. Logo, um aumento de MPV é um achado favorável em pacientes trombocitopênicos, pois reflete trombopoiese ativa (GENTRY et al., 2008). Entretanto, a falta de uniformização do intervalo de referência do MPV para as diferentes espécies, limita o seu uso como um teste de triagem para diferentes condições clínicas. Buttarello & Plebani (2008) relatam que, em humanos, no diagnóstico diferencial de trombocitopenias adquiridas, podem-se distinguir as causas em que há de aumento de MPV, (aumento da produção por consumo ou destruição periférica) das causas em que se observa MPV normal ou baixo (defeito na produção em pacientes submetidos a quimioterapia, estados leucêmicos ou com aplasia de medula óssea). O aumento do MPV é um marcador de ativação plaquetária, e muitos estudos têm sido realizados associando seu aumento ao risco de doenças trombóticas ou infarto do miocárdio.

De acordo com Russel (2010), o PDW é um valor fornecido por alguns contadores hematológicos que representa o índice de variação do tamanho plaquetário. Este parâmetro é muito utilizado em laboratórios que não realizam a avaliação rotineira do esfregaço sanguíneo. Em humanos, o PDW está aumentado em pacientes com trombocitopenia imunomediada comparado a pacientes com trombocitopenia decorrente de aplasia de medula. Portanto, este índice pode ser uma ferramenta útil para diferenciar trombocitopenias

hiperdestrutivas de hipoprodutivas. Apesar do potencial de aplicação deste parâmetro em cães, ele não é utilizado na prática clínica diária. Estudos em cães já investigaram o uso do MPV e PDW na interpretação da trombocitopenia em cães com doença sistêmica. Em um destes estudos observou-se que estes parâmetros têm uma relação negativa com a contagem de plaquetas, e esta correlação não é afetada pela variação nos parâmetros hematológicos ou proteínas séricas. Entretanto, a interpretação destes resultados requer referência simultânea à contagem de plaquetas (BOMMER et al., 2008).

Uma grande questão da mensuração do MPV é a influência do EDTA. Quando em contato com EDTA-K₂ ou K₃ as plaquetas mudam rapidamente da forma discóide para esférica. Pidard et al. (1986) descrevem que inicialmente esta transformação é isovolumétrica, mas duas horas após a coleta da amostra, o volume plaquetário tende a mudar progressivamente observando-se um aumento dos valores de MPV nas análises realizadas por impedância, assim como uma diminuição destes valores nas análises pelo método óptico devido à diminuição do índice de refração destas células. Estas mesmas alterações são bem descritas na medicina veterinária, sendo que ainda buscam-se formas de corrigir este fenômeno (WILKERSON & SHUMAN, 2001; ZANDECKI et al., 2007).

Contudo, a falta de padronização e de resultados sobre as variáveis pré-analíticas em cada método de medição utilizado, requer que intervalos de referência diferentes sejam utilizados, não permitindo que haja comparação entre os poucos estudos clínicos realizados.

3.3.3 Plaquetas reticuladas e macroplaquetas

Segundo Garg et al. (1971) a avaliação microscópica de esfregaços sanguíneos tanto para avaliar morfológicamente as plaquetas quanto para reconhecer a presença de agregação plaquetária é uma medida valiosa para o controle de qualidade dos testes hematológicos em cães trombocitopênicos. Como regra, uma maior quantidade de plaquetas grandes (macro ou megaplaquetas) indica atividade trombopoietica ativa secundária à acelerada destruição ou ao consumo plaquetário (MYLONAKIS et al., 2008). Embora os analisadores automáticos gerem valores de MPV que teoricamente refletem as alterações no tamanho das plaquetas, a revisão criteriosa do esfregaço sanguíneo é uma alternativa quando estes equipamentos não estão disponíveis. Ressalta-se também que os valores de MPV estão expostos a interferências de vários fatores pré-analíticos. Mylonakis et al. (2008) são dos poucos autores que abordam este assunto e ressaltam que este é um parâmetro ainda pouco investigado em cães. Um estudo realizado pelos mesmos autores estabeleceu um intervalo de referência para

macroplaquetas em cães saudáveis, mas não conseguiu estabelecer uma possível correlação deste valor com os resultados de MPV e outros parâmetros plaquetários. Ressaltam que clinicamente poderia ser um parâmetro importante para definir a existência de trombocitopenia extra ou intramedular, entretanto sempre levando em consideração as condições pré-analíticas da amostra analisada (SMITH et al., 2005).

A identificação de plaquetas reticuladas tem sido relatada como um parâmetro mais fidedigno que a porcentagem de macroplaquetas. Entretanto, atualmente não é um teste de rotina no laboratório de hematologia. As plaquetas reticuladas são plaquetas jovens recentemente liberadas da medula óssea e contém uma concentração elevada de RNA, seu nome se deve à similaridade com os reticulócitos. Em casos de destruição periférica de plaquetas, a porcentagem de plaquetas reticuladas estará aumentada na circulação, podendo ser um indicador primário de trombocitopenia imunomediada. Pacientes trombocitopênicos que tenham produção plaquetária comprometida tem uma baixa porcentagem de plaquetas reticuladas na circulação (RUSSEL, 2010). Em modelos animais foi observado que as plaquetas reticuladas permanecem na circulação por aproximadamente 24 a 36 horas, tempo durante o qual ocorre uma progressiva degradação do RNA e diminuição do seu volume. Com o uso de citômetro de fluxo e corantes fluorescentes que podem ligar o RNA, é possível realizar a contagem de plaquetas reticuladas. Apesar da falta de intervalos de referências para este parâmetro, existem muitas aplicações clínicas para o diagnóstico e monitoramento de diferentes enfermidades (WILKERSON et al., 2001; STOCKHAM & SCOTT, 2002; BUTTARELO & PLEBANI, 2008).

3.3.4 Outros parâmetros

Ensaio de anticorpos antiplaquetários ou antimegacariocíticos, estudos de qualidade e função plaquetária através de agregometria ou de equipamentos como o PFA-100 (*Platelet Function Analyser*, Bayer), além de citogramas e histogramas fornecidos por analisadores hematológicos, são testes adicionais que podem ser considerados na avaliação das desordens plaquetárias. Entretanto, muitos dos ensaios de função plaquetária estão disponíveis somente em instituições e laboratórios especializados, dificultando o uso na rotina clínica ou em casos clínicos não randomizados (WILKERSON et al., 2001; GENTRY, 2008; RUSSEL, 2010).

A tromboelastometria e tromboelastografia são técnicas, que vem sendo extensivamente estudadas na medicina veterinária nos últimos anos. A tromboelastometria é uma técnica de diagnóstico *in vitro* que integra componentes celulares e solúveis do processo

hemostático a fim de ter um acesso global da hemostasia do paciente. A técnica é baseada da detecção contínua e relato de mudanças nas propriedades viscoelásticas do sangue total no momento da formação do coágulo. Diferente dos testes rotineiros de coagulação, que tem limitações para prever hemorragia ou trombose, a tromboelastografia pode prever toda a cinética de coagulação. Este método está registrado na literatura desde os anos 80, agora está ganhando espaço na medicina veterinária e sendo validado e utilizado na rotina clínica veterinária (KOL, 2010). A tromboelastometria é um método visco elástico, baseado na técnica de tromboelastografia, utilizado para avaliar a interação dos fatores de coagulação com possíveis inibidores, drogas e plaquetas durante o período de coagulação e fibrinólise. Este método permite a identificação de distúrbios de hemostasia com rapidez facilitando a instituição do diagnóstico e tratamento correto (SMITH et al., 2010).

3.4 Parâmetros plaquetários: influências pré-analíticas

Muitos trabalhos contemplam, na avaliação de parâmetros plaquetários, os métodos de coleta de sangue, tipos de anticoagulantes, e a influência do tempo e da temperatura de estoque da amostra (STOKOL & ERB, 2007; ZANDECKI et al., 2007; MYLONAKIS et al., 2008).

A contagem de plaquetas é um componente integral da rotina de testes hematológicos, portanto, é essencial obter resultados acurados para fins diagnósticos e terapêuticos. Mas a acurácia dos resultados pode ser significativamente afetada pela presença de agregados plaquetários, que geralmente diminuem as contagens de plaquetas. Muitas vezes as agregações são severas o suficiente para resultar em aparentes trombocitopenias. A liberação inadvertida de resultados errôneos pode ter consequências imediatas e importantes no tratamento do paciente (OLIVEIRA, 2007; STOKOL & ERB, 2007).

A grande maioria dos estudos realizados avaliando as influências pré-analíticas na determinação dos parâmetros plaquetários, utiliza como método de coleta a punção com agulha e seringa com posterior transferência da amostra para o tubo contendo anticoagulante (MEINKOTH & ALISSON, 2007; MYLONAKIS et al., 2008). Entretanto, alguns estudos indicam que o local de coleta, a dificuldade no momento da punção, a demora entre coleta e a análise, a proporção incorreta entre anticoagulante e amostra e a homogeneização inadequada, podem resultar em agregados plaquetários e resultados errôneos de contagens plaquetárias e de MPV, além da impossibilidade de delinear histogramas ou citogramas corretos. Outra situação reportada é o mau uso do método de coleta a vácuo com preenchimento excessivo dos tubos resultando em contagens plaquetárias baixas devido à inadequada homogeneização e à proporção incorreta de anticoagulante. Dentre os fatores de mau uso está a realização de vácuo manual em tubos reutilizados, a demora no contato do anticoagulante com o sangue e a difícil punção venosa que podem iniciar a coagulação e resultar em agregação plaquetária (SCHNEIDER, 2000; OLSEN et al., 2004; RUSSEL, 2010).

O EDTA-K₂ ou K₃ é o anticoagulante de escolha para avaliação de parâmetros hematológicos. Entretanto, alguns estudos indicam que o uso deste anticoagulante resulta em porcentagem maior de agregação plaquetária quando comparado com o citrato de sódio (WILKERSON & SHUMAN, 2001; NORMAN et al., 2001; BUTTARELLO & PLEBANI, 2008). Em contraste, outros estudos indicam que a agregação plaquetária é mais frequente com o uso do citrato comparado com o EDTA e também que é mais pronunciada em baixas temperaturas (STOKOL & ERB, 2007; MYLONAKIS et al., 2008). Mesmo que a agregação

plaquetária seja resultante da ativação de plaquetas durante a coleta, parece existir uma maior tendência à agregação nas amostras acondicionadas a 4°C do que nas amostras acondicionadas a 25°C. De acordo com Stokol & Erb (2007) o uso do citrato para enumeração plaquetária não é recomendado a não ser que sejam usados valores de referência específicos para este tipo de anticoagulante.

3.5 Parâmetros plaquetários: influências analíticas

Nos laboratórios de patologia clínica veterinária existem três métodos para contagem de plaquetas: automático em analisador hematológico (impedância), estimado em lâmina e manual em câmara hematimétrica (OLSEN et al., 2004; MEINKOTH & ALISSON, 2007). Nos analisadores hematológicos, as plaquetas são contadas simultaneamente com as hemácias. No entanto, como são consideravelmente menores que as hemácias, elas podem ser contadas em um analisador de tamanho de partículas. A maior parte das espécies apresenta pouca ou nenhuma sobreposição entre o volume de plaquetas e o de hemácias, tornando este exame simples e confiável em animais saudáveis. Entretanto, em casos de trombocitopenias ou presença de debris celulares, eritrócitos ou leucócitos fragmentados, a acurácia deste método pode estar comprometida (HANDAGAMA et al., 1986; BUTTARELLO & PLEBANI, 2008). A produção de macroplaquetas ou a presença de plaquetas reticuladas pode resultar em considerável sobreposição entre as distribuições do tamanho de hemácias e plaquetas, desta forma diminuindo a confiabilidade da contagem. Nestes casos é fundamental lançar mão do método manual e estimado para confirmar os valores encontrados (LASSEN & WEISER, 2007).

Em instrumentos que analisam as partículas por impedância (ex. sistema ABX ou Sysmex entre outros), estas partículas são suspensas em uma solução de eletrólitos e a diluição passa através de uma abertura que conecta duas câmaras. As células passam através do orifício, o que causa um aumento momentâneo na resistência elétrica, gerando um pulso. O pulso representa a célula e a intensidade do pulso é proporcional ao tamanho da célula. Após as células serem discriminadas de acordo com o volume, gera-se um histograma. Uma grande vantagem dos contadores hematológicos mais modernos é a identificação de inconformidades durante a avaliação celular. Estas inconformidades são identificadas sempre que algum parâmetro estiver fora do limite de linearidade ou sensibilidade gerando avisos (*flags*) que devem ser interpretados pelo operador (STOCKHAM & SCOTT, 2002; ZANDECKI et al., 2007; RUSSEL, 2010).

Durante a década de 1960 até meados da de 1980, houve um grande progresso no melhoramento da qualidade do controle das técnicas laboratoriais. Resultados rápidos e acurados são as regras em laboratórios, independente de se tratar de uma amostra normal ou não. Entretanto, algumas características da amostra relacionadas a alguma patologia peculiar ou mudanças induzidas após a coleta podem gerar resultados errôneos nos contadores hematológicos. Até a década de 1960, tanto em laboratórios humanos como veterinários, os métodos manuais não permitiam que algumas peculiaridades fossem identificadas, mas a partir da década de 1980 houve um avanço muito rápido dos *softwares* utilizados para esse fim, melhorando a qualidade e a agilidade na liberação dos resultados (BORAL & HENRY, 1996) (ZANDECKI et al., 2007).

Os métodos de qualidade e controle dos dados aumentaram, incluindo vários avisos automáticos dos equipamentos ao identificar as inconformidades, representação gráfica de partículas, enumeração e identificação específica dos componentes sanguíneos. Todavia, para que toda a tecnologia seja empregada da maneira correta, é importante conhecer e eliminar os erros pré-analíticos e analíticos, e os operadores dos instrumentos automáticos devem estar familiarizados com os tipos de avisos e resultados que o instrumento pode acusar. O entendimento do funcionamento do sistema de automação tornou-se pré-requisito básico para os técnicos de laboratório, assim como a correlação entre *flags* com possíveis condições patológicas para os patologistas clínicos (LEEWEN & TESKE, 1999; LILLIEHÖÖK & TVEDTEN, 2009; WELLES et al., 2009).

3.6 Parâmetros plaquetários: influências pós-analíticas

Variáveis pré-analíticas e analíticas devem ser consideradas primariamente no laboratório. Estas variáveis incluem desde erro humano na identificação da amostra, local da punção venosa, homogeneização inadequada, mau funcionamento dos instrumentos e falta de experiência para reconhecer falhas no controle de qualidade, até limpeza inadequada dos equipamentos (ZANDECKI et al., 2007).

Descartadas as possibilidades de erros pré-analíticos e analíticos, existem alguns fatores que podem contribuir para alterações nos resultados e devem ser considerados ainda dentro do laboratório. Algumas situações podem causar diminuições errôneas nas contagens de plaquetas, dentre elas: pseudotrombocitopenia dependente de EDTA, pseudotrombocitopenia relacionada ao satelitismo ao redor de leucócitos, aglutinação plaquetas-neutrófilos dependente de EDTA, presença de macroplaquetas e pseudotrombocitose (ZANDECKI et al., 2007; STOKOL, 2010; THOMAS 2010). Nos casos

de alterações dependentes de EDTA o evento costuma ocorrer alguns minutos após a coleta, e parecem aumentar se a amostra é mantida a temperatura ambiente. Nestes casos devem-se realizar contagens manuais em câmara hematimétrica, contagem estimada em lâmina e avaliação morfológica em lâmina. Aconselha-se que a amostra seja recoletada com outro anticoagulante, por exemplo citrato de sódio e que as análises sejam repetidas (GEORGE, 2000; BIZZARO, 1995).

Algumas situações podem causar aumentos errôneos nas contagens de plaquetas, dentre elas: presença de eritrócitos fragmentados, fragmentos citoplasmáticos de células nucleadas, microorganismos, lipídeos e crioglobulinas. Estas situações são menos comuns, mas devem ser identificadas antes que os resultados sejam liberados (ZANDECKI et al., 2007; STOKOL, 2010; TVEDTEN, 2010).

Dentre as situações citadas acima, a pseudotrombocitopenia dependente de EDTA é a anomalia mais frequente relacionada com resultados suspeitos obtidos através da avaliação dos parâmetros plaquetários em qualquer um dos métodos citados. Este fenômeno já foi relatado em humanos, cães, cavalos e suínos (WILLS & WARDROP, 2008; BIZZARO, 1995).

A identificação das inconformidades em todas as fases, desde a avaliação do animal e a coleta até a liberação dos resultados, é fundamental para que o exame laboratorial tenha uma resposta fidedigna em relação à situação clínica do paciente. Sendo assim, o conhecimento dos métodos de coleta, formas de armazenamento e alternativas de diferentes anticoagulantes que possam ser usados para este fim, são pontos cruciais para a acurácia e rapidez na liberação dos resultados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção dos animais

Foram coletadas amostras de sangue de 70 cães clinicamente saudáveis, machos e fêmeas, provenientes de proprietários particulares da região da Grande Porto Alegre, que foram avaliados e selecionados. Destes animais apenas 54 (22 machos e 32 fêmeas) foram selecionados para o delineamento deste estudo. O uso dos animais teve a permissão do proprietário (Anexo 1), de acordo com recentes conceitos de bioética aplicados à pesquisa animal (*Working Committee for the Biological Characterization of Laboratory Animals / GV-SOLAS, 1985*). Os animais que participaram do estudo tinham idade entre um e seis anos (média de 3,81 anos), 35 tinham raça definida e 19 eram de raça mista. Dentre as diferentes raças, neste estudo, foram avaliados 6 cães da raça Labrador Retriever, 5 Boxer, 3 Schnauzer, 3 Rottweiler, 3 Teckel, 3 Pinscher, 2 Golden Retriever, além das raças Cocker Spaniel, Pastor Alemão, Beagle, Boston Terrier, Poodle, Akita, Yorkshire com um representante de cada.

Dentre os critérios de exclusão destes animais estava: uso de medicação, doença intercorrente, parâmetros hematológicos ou bioquímicos fora dos valores de referência, alterações no exame clínico, vacinação ou vermifugação irregulares, jejum inferior a 6 horas antes da coleta e falta de disponibilidade para se deslocar até o local de coleta das amostras (KANEKO et al., 2008; JAIN, 1993).

4.2. Avaliação dos animais

Antes da coleta, o histórico dos animais era averiguado (vacinação, vermifugação e controle de ectoparasitas regularizados e atualizados). Os cães eram submetidos a um exame clínico (ausculta pulmonar e cardíaca, pressão arterial, eletrocardiograma, temperatura retal e palpação) e a testes laboratoriais de triagem. Após antissepsia adequada, amostras de sangue eram coletadas por punção da veia cefálica, safena ou jugular utilizando sistema a vácuo (Becton, Dickinson). Foram coletadas amostras em um tubo de 3 mL contendo EDTA-K₂ (Becton, Dickinson), um tubo de 5 mL contendo citrato de sódio 3,2% (Becton, Dickinson), e um tubo seco de 5 mL contendo ativador de coágulo para as análises bioquímicas (Becton, Dickinson).

4.3. Análises laboratoriais

Todas as amostras foram processadas imediatamente após a coleta. As amostras em EDTA-K₂ e citrato de sódio foram aliqüotadas em pares. Cada par era armazenado a 25°C e 4°C. Uma alíquota de cada anticoagulante era usada para as análises a 25°C e a outra era refrigerada para as análises a 4°C. O hemograma completo foi realizado com a amostra acondicionada em EDTA-K₂ a 25°C. A contagem total de eritrócitos e leucócitos, dosagem de hemoglobina, volume plaquetário médio (MPV), contagem de plaquetas automática e *red cell distribution width (RDW)* foram realizadas através de aparelho automático (Micros ABCVet, ABX, Horiba Diagnostics). O hematócrito foi determinado pelo método de microhematócrito a 10.000 rpm (9.520 g) por cinco minutos em microcentrífuga (Sigma Laborzentrifugen). A contagem diferencial e a análise do esfregaço sanguíneo corado foram realizados através de microscopia ótica (corante Panótico Rápido, Laborclin). A contagem absoluta de plaquetas foi feita através de diluição com oxalato de amônio 1% e contagem em câmara de Neubauer (Improved, New Optic). Todos os resultados das amostras armazenadas em citrato de sódio foram multiplicadas por 1,1, fator de correção sugerido por Stokol & Erb (2007).

As amostras de sangue para as análises bioquímicas foram centrifugadas, após a retração do coágulo, o soro separado e refrigerado (máximo de 12 horas) até a realização dos testes bioquímicos. Foram realizadas dosagens séricas de creatinina e alanina aminotransferase (ALT) através de aparelho semi-automático (Metrolab 1600DR, Wiener) utilizando kits comerciais (Labtest).

A determinação da porcentagem de macroplaquetas foi realizada em microscópio óptico (Olympus, CX41) com auxílio de retículo micrométrico (10 mm/100 Olympus) calibrado com um micrômetro padrão seguindo a metodologia de Mylonakis et al. (2008).

A contagem estimada de plaquetas foi realizada observando 10 campos consecutivos em microscópio óptico em objetiva de 1.000X, realizava-se a contagem do número de plaquetas em cada campo, fazia-se uma média aritmética e multiplicava-se pelo fator 15.000. Esta metodologia foi descrita por Villers (2010).

A porcentagem de macroplaquetas foi calculada através da observação de 300 plaquetas consecutivas e não agregadas na monocamada com o auxílio de micrometro ocular na objetiva de 1.000X. Para o propósito deste estudo, plaquetas esféricas com um diâmetro $\geq 5 \mu\text{m}$ ou plaquetas alongadas com um comprimento $\geq 5 \mu\text{m}$ foram consideradas macroplaquetas.

O escore de agregação foi realizado através de análise criteriosa do esfregaço sanguíneo corado com corante tipo Romanovsky (Panótico rápido, Laborclin) seguindo a metodologia descrita por Stokol & Erb (2007).

Um único observador que desconhecia a identificação do paciente e do tipo de anticoagulante examinou a borda (objetiva 100X) e monocamada (20 campos com objetiva de 1.000X) de cada lâmina e determinou o escore do número de plaquetas agregadas como segue: 0, nenhum agregado; 1, ≤ 5 pequenos agregados (≤ 20 plaquetas em cada) e/ou 1 grande agregado ($>$ de 20 plaquetas); e 2, > 5 pequenos ou > 1 agregado grande.

4.4. Etapas do experimento

As amostras de EDTA e citrato coletadas foram alíquotadas e separadas em pares, desta forma que, de cada animal coletado, haviam quatro amostras: EDTA 25°C e citrato 25°C; EDTA 4°C e citrato 4°C. Cada par foi alíquotado e armazenado, um a temperatura ambiente (25°C), e outro na geladeira (4°C). Os parâmetros foram avaliados em três tempos: logo após a coleta (0 h), quatro e seis horas após a coleta. Para otimizar o processo em cada tempo de análise o experimento foi realizado em duas etapas.

Na primeira etapa, foram realizados: contagem de plaquetas absoluta e automática, hematócrito, *RDW*, *MPV*, hemoglobina, contagem de leucócitos e eritrócitos, e esfregaço sanguíneo. Na 0 h não foram avaliados as amostras a 4°C (Tabela 1).

Na segunda etapa do experimento foram avaliados: contagem relativa de plaquetas, avaliação morfológica, escore de agregação plaquetária e porcentagem de macroplaquetas.

4.5. Controle das temperaturas de armazenamento

Para fins de controle de temperatura foram usados termômetros digitais (Instrutherm), e a temperatura foi conferida 30 minutos antes de começar o procedimento e a cada 30 minutos durante o procedimento, sendo aceita variação de $\pm 1^\circ\text{C}$. A fim de simular o armazenamento a temperatura ambiente (25°C) as amostras foram mantidas em um isopor semi-tampado, também com termômetro digital. Para manter as amostras a 4°C, foram armazenadas em refrigerador comum (Consul).

Tabela 1. Planilha utilizada durante o experimento para registro de resultados.

ANTICOAGULANTE / T °C	EDTA 25°C			EDTA 4°C		CITRATO 25°C			CITRATO 4°C	
	0h	4h	6h	4h	6h	0h	4h	6h	4h	6h
PLAQUETAS (200 a 500 x10 ³ / µL) *										
Cont. plq estimada										
Cont. plq absoluta										
Cont. plq automática										
MPV (fL)										
DEMAIS PARÂMETROS										
Leucócitos (6000 a 17000 /µL)										
Eritrócitos (5,5 a 8,5 x10 ⁶ / µL)										
Hemoglobina (12 a 18 g/dL)										
Hematócrito (37 a 55%)										
VCM (60 a 77 fL)										
CHCM (32 a 36%)										
PPT (60 a 80 g/L)										
RDW (%)										
MORFOLOGIA										
Escore de agregação										
% Macroplaquetas										
Poiquilocitose										

* Valores de referência de acordo com Jain (1993).

4.6. Análises laboratoriais dos parâmetros plaquetários

As amostras foram analisadas no tempo 0, 4 e 6 horas após a coleta. Depois da análise, procurou-se retornar as amostras o mais brevemente possível para a temperatura de armazenamento. Em cada momento foram avaliados os 16 parâmetros fornecidos pelo contador de células automático ABXmicros (Horiba): leucócitos, eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), RDW, concentração média de hemoglobina (CHM), MPV, contagem de plaquetas, histograma de leucócitos, eritrócitos e plaquetas. O esfregaço sanguíneo e a contagem manual de plaquetas também foram realizados.

5. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em forma de artigo científico que será submetido para publicação em periódico da área. O artigo em questão está formatado de acordo com as normas para envio do periódico *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*.

5.1 Artigo

Evaluation of platelet parameters in healthy dogs: effects of temperature, time and anticoagulant

Nicole Hlavac¹, Luciana A. Lacerda, Elisa B. Neuwald, Francisco O. Conrado, Mariana O. D. Silva, Amanda M. D. Lima, Félix H. D. González

From the Veterinary Clinical Pathology Laboratory – LACVet, Department of Clinical Pathology, Veterinary Faculty, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. ¹ Corresponding Author: Nicole Hlavac, LACVet, Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, Brazil. nicole.hlavac@ufrgs.br

1 **Abstract**

2 The evaluation of platelet parameters is an integral component of routine hematologic testing.
3 However preanalytical issues can compromise the viability of the results. The purpose of this
4 study is to determine the ideal anticoagulant, time and temperature for quantitative and
5 qualitative assessment of platelets. Blood was drawn into vacuum tubes containing
6 dipotassium EDTA and sodium citrate from 54 clinically healthy dogs, and the samples were
7 separated into two aliquots. The tubes were identified and subsequently stored in pairs, one
8 pair at room temperature (25°C) and the other at 4°C for up to 6 hours post sampling. Each
9 sample was evaluated in three different times, when automatic, absolute and estimated platelet
10 counts were performed. Mean platelet volume, frequency of clumping and macroplatelet
11 percentage were evaluated. There was a statistically significant decrease in platelet counts
12 with time and in refrigerated samples, while the mean platelet volume increases. The counts
13 performed in EDTA samples were higher than those in citrate, and there was no correlation
14 between mean platelet volume and macroplatelets percentage and, additionally, the frequency
15 of clumping was higher in citrated samples stored at 4 °C.

16 **Key words:** canine; citrate; ethylenediaminetetraacetic acid; preanalytical

1 **Introduction**

2 The platelet count is an integral component of routine hematological tests. It is a test used to
3 diagnose bleeding disorders, underlying diseases such as cancer, or monitor treatments like
4 chemotherapy that may cause myelotoxicity. Therefore, it is essential to obtain accurate results
5 for diagnostic and therapeutic purposes. However, the accuracy of the results can be markedly
6 affected by the presence of platelet aggregates, inadequate methodology of collection and
7 storage, as well as by the incorrect use of anticoagulants. The misdiagnosis of
8 thrombocytopenia or thrombocytosis can result in inappropriate therapeutic targeting of the
9 patient. It is important that patients with quantitative or qualitative platelet abnormalities
10 receive the specific treatment as soon as possible ^{12,18,20}. To do so, the provided diagnosis
11 should be accurate and suffer the minimal interferences of preanalytical and analytical phases.
12 In addition, knowledge of possible interferences is essential for both, the laboratory technician
13 to release reports containing accurate diagnoses, and the veterinarian to avoid unnecessary
14 costs to the owners and the inconvenience of multiple venipunctures. ^{1,5,11,23} The aim of this
15 study was to compare the quantitative and qualitative assessment of platelets in canine blood
16 samples using different anticoagulants, within different times and temperatures of storage.

17

18 **Materials and methods**

19 **Animals and sample handling**

20 Blood samples from 54 healthy dogs (22 males and 32 females; 35 purebred and 19
21 mixed-breed), ranging in age from 1 to 6 years (median: 3.81 years) were used in this study.
22 The dogs were considered to be healthy based on history, physical examination, CBC and
23 chemistry profile. The dogs belonged to private owners who had brought them for routine
24 check up from July 2009 through July 2011. An informed written consent was obtained from
25 each owner prior the inclusion in this study. The procedures were approved by the

1 institutional animal care and use committee of the Federal University of Rio Grande do Sul
2 (No. 20426).

3 Blood samples were collected by atraumatic puncture of jugular, cephalic or
4 saphenous veins by using a vacuum system^a. Blood was collected into 4.5 mL 3.2% sodium
5 citrate^b tube (CIT), 3 mL dipotassium EDTA tube^c (EDTA) and 4 mL serum tube^d (SER)
6 from each animal. Only “first-stick” samples were further processed and the blood was mixed
7 gently with the anticoagulant by inversion immediately after collection. All samples were
8 obtained at the collection room of the Veterinary Clinical Pathology Laboratory allowing a
9 quickly processing and storage.

10 **Sample processing and storage**

11 Each CIT and EDTA tube was aliquoted in two tubes. The tubes were identified and
12 subsequently stored in pairs (EDTA and CIT), one pair at room temperature (25°C) and the
13 other at 4°C for up to 6 h post sampling. The CIT and EDTA samples stored at 25°C were
14 evaluated at 0, 4 and 6 h post sampling, and the samples stored at 4°C were evaluated 4 and 6
15 h post sampling. The samples at 4°C were stored in a refrigerator and the samples at 25°C
16 were stored in a cooler, in both cases the temperature was controlled with digital
17 thermometers, and checked every 30 minutes.

18 **Determination of platelet parameters**

19 Automatic, estimated and absolute platelet counts (PC) and mean platelet volume
20 (MPV) assessment were performed from each sample. The parameters were evaluated at 0, 4
21 and 6 h post sampling using an automated hematology analyzer^e.⁹ The manual absolute
22 platelet count and its corresponding dilution were done by the same person, considering a
23 previously described method.¹⁴ Platelet histograms were visually inspected for each dog. To
24 compensate the dilutional effect of citrate, all parameters from CIT samples were multiplied
25 by 1.1.^{19,20}

1 **Smear evaluation**

2 Blood smears were prepared from each sample and stained by Romanowsky dye^f. The
3 smears were used to evaluate the estimated platelet count, platelet aggregate score and
4 macroplatelet count. All of them were evaluated by a single observer, blinded for
5 identification number, time, temperature and type of anticoagulant. The estimated platelet
6 count was performed evaluating 10 fields at 1,000 X magnification and calculated as
7 previously described.^{11,18,22} The platelet aggregate score was ranked in three levels following
8 the methodology used by Stokol & Erb²⁰: 0, no aggregates; 1, ≤ 5 small aggregates (≤ 20
9 platelets each) and/or 1 large aggregate (> 20 platelets each); and 2, > 5 small or > 1 large
10 aggregate(s). The macroplatelet count was calculated following the review of 300 consecutive
11 nonaggregated platelets using an ocular micrometer at 1,000 X magnification.¹¹ The
12 macroplatelet count was done in EDTA samples, at 0 h post sampling and 25°C, for further
13 association with MPV value.

14 **Statistical analysis**

15 After testing for normal distribution (Shapiro-Wilk-test) the quantitative variables were
16 described as mean and standard deviation, and compared over time by ANOVA for repeated
17 measures followed by Bonferroni test. Student's t-test was used to compare the parameters
18 between the anticoagulants. For this analysis Statistical Package for Social Sciences^g was
19 used. The quantitative variables included the difference in each platelet parameter over the
20 time with the different anticoagulants and the differences between the two temperatures of
21 storage. Student's t-test and visual comparison of Bland-Altman plots (difference vs. mean)
22 was used to evaluate the agreement between the three different methods of platelet count,
23 considering 95% as a limits of agreement as 5% of significance.⁹ The association of
24 categorical variables, i.e. the platelet aggregation score over the time with different
25 temperatures and anticoagulants, was described by absolute and relative frequencies. The

1 reference intervals of MPV and macroplatelet means percentages were obtained with
2 arithmetic mean and standard deviation. Pearson's correlation coefficient was used to
3 determine the association between the MPV and macroplatelet means. A *P* value of less than
4 0.05 was considered to be significant.

5 **Results**

6 There was a variation in platelet parameters over time (0, 4 and 6 h post sampling) when the
7 samples were stored at 25°C and 4°C. However, a significant variation between the
8 anticoagulants (EDTA x CIT) was observed only in automatic counts carried out at 25°C ($p <$
9 0.05), and MPV values at both temperatures of storage ($p < 0.001$) (Table 1).

10 When comparing individually EDTA and CIT parameters in the different storage
11 temperatures (25°C and 4°C) there was variation over time (0, 4 and 6 h post sampling),
12 however no variation between the storage temperatures was observed. The only exception was
13 that the MPV values in CIT do not seem to vary independent of time and temperature of
14 storage.

15 Assessing the anticoagulants individually for platelets parameters at each temperature over
16 time, it was noted that there was no significant variation in estimated platelet count at both
17 temperatures and absolute platelet count at 4°C in EDTA samples, all the other parameters
18 varied over time. There was no variation in the estimated platelet count and MPV at both
19 temperatures, as well as in automatic platelet count at 25°C in CIT samples (Figure 1).

20 When analyzing the correlation between platelet count methodologies and the standard
21 methodology, considered here as the automatic platelet count, it was observed that there was
22 at least 95% units of agreement in almost all of the counting methodologies. No agreement
23 was found for platelet counts between absolute and automatic counts performed at 6 h post
24 sampling, in both anticoagulants and temperatures ($p < 0.001$). Also, there was some
25 disagreement between estimated and automatic counts performed at 0 h post sampling in

1 EDTA, at both temperatures ($p < 0.001$). The same disagreement was observed between
2 estimated counts performed at 4 and 6 h post sampling in CIT at 4°C storage (Table 2).

3 The higher variation in platelet aggregation score was observed in both anticoagulants at 4°C
4 when comparing 0 and 6 h (81.5 and 90.7%, respectively). Also, significant variation
5 occurred in the aggregation score in samples stored at 4°C when comparing the anticoagulants
6 at 0 and 4 h post sampling ($p > 0.002$) (Table 3).

7 The range intervals of macroplatelet percentage and MPV for the evaluated population were
8 $2.13 \pm 1.35\%$ and 7.92 ± 0.74 fL, respectively. No correlation was observed between the
9 MPV values and macroplatelets percentage (Figure 2).

10 **Discussion**

11 The preanalytical influence that blood sampling has on results does not end when the blood
12 fills the tube. Many errors during the specimen handling, storage, and transportation can
13 significantly alter the results. Preanalytical errors can cause patients to be misdiagnosed, over-
14 or undermedicated, or otherwise be mismanaged in ways that can be life threatening. Such
15 errors comprise 56% of all specimen result errors, while analytical and postanalytical errors
16 account for 13% and 28%, respectively.⁷ Each system has its benefits and drawbacks,
17 including safety, cost and ease of use. Although, many studies have shown the advantages of
18 using the vacuum system, like the sample viability, safety, correct ratio of anticoagulant to
19 blood and reduced preanalytical errors.^{1,6,10,16} However, regardless of which sampling
20 method should be used, it is important to take into account all possible preanalytical errors
21 to ensure the stability of the sample.²

22 The decentralization of sample collection in order to bring convenience to patients requires an
23 appropriate management of all aspects that occur during transport phase, thus ensuring
24 integrity and quality of results. Most authors describe that 2 h post sampling is the maximum
25 time to maintain the stability of diagnostic samples and it should be maintained between 10 to

1 22°C. Others reported that platelet counts can be performed within 5 h of collection but
2 samples should be refrigerated (4°C).^{1,19} The results of the current study indicate that the
3 automatic and absolute PC are higher in EDTA rather than citrate when the blood is stored at
4 25°C, being in agreement with previous studies.¹¹ The results of the estimated PC differ
5 slightly from the others, though that may be associated with the subjectivity of this
6 methodology, as well as reduced stability in the morphological evaluation of blood
7 smears performed over 4 h post sampling.^{1,13} Changes in platelet morphology as a result
8 of exposure to low temperatures have been described, and can help to justify the decrease in
9 scores of samples stored at 4°C.²⁴

10 Regarding the use of EDTA or citrate as anticoagulants for platelet count, some authors report
11 that both can be used. But the platelet concentration of citrated samples has to be corrected for
12 its dilution.^{10,13,18} However, it was described that citrate yields inaccurate results for MPV,
13 lower platelet counts and platelet aggregation.^{11,20} The results of this study reaffirm those
14 previous findings. Platelet counts were lower when performed in citrate, even using
15 the index correction. And when assessing the aggregation score it was observed that there was
16 a greater frequency of platelet aggregation in refrigerated citrated samples and the
17 score tends to increase with storage time. Based on the statistic data, the authors assume that
18 there is a greater tendency for platelet aggregation over time, during storage at 4°C and in
19 citrate anticoagulated samples.

20 In partial disagreement with previous studies, the MPV values increased due to time of
21 storage, and it seems to occur regardless of type of anticoagulant.^{14,20}

22 In cases of unexpected thrombocytopenia, it is essential to consider
23 pseudothrombocytopenia related to EDTA. It is an *in vitro* phenomenon that occurs due to the
24 presence of antiplatelet antibodies that recognize antigens modified by or exposed to EDTA.
25 It results in clumps and low platelet count in patients that have no signs of hemorrhage.

1 Invalid platelet counts will be reported from automated hematology analyzers and also in
2 manual platelet counts. In these cases it is important evaluate the blood smear looking for
3 platelet aggregates and repeat the count in other anticoagulants such as citrate or heparin.
4 ^{15,21,23}

5 Automated blood cell counters have undergone a technological evolution. The results have
6 been an improvement in analytical efficiency. For some consolidated parameters the analytic
7 performance is excellent, however for others, in particular reticulocyte or platelet counts,
8 especially at low concentrations, is less satisfactory. ^{5,9} Despite of these, sometimes it is
9 necessary to use alternative methodologies, like estimated and absolute platelet counts, to
10 ensure the results. When comparing the standard methodology with the estimated and
11 absolute methods it was possible to see that there is a wide variation between the results. It is
12 necessary to consider that the analytical errors could be higher in these methodologies, and
13 even that the estimated PC is a subjective methodology with poor standardization. However,
14 in the absence of a reliable hematologic device these are good tools to provide PC results.
15 Careful examination of blood smears and the estimated PC are required to identify true
16 thrombocytopenias and morphologic alterations. ^{12,23}

17 This study provides a new baseline data on the macroplatelet percentages in the blood of
18 healthy dogs, however further studies have to be done to evaluate the diagnostic value of
19 macroplatelet in different diseases and also a correlation between macroplatelets percentage
20 and reticulated platelets. ^{17,19} The macroplatelet percentage range found in this study was 0.78
21 to 3.48%, but a previous study of 70 healthy dogs suggested a macroplatelet percentage range
22 from 0.8 to 1.2%, and the authors also suggested that it is a useful and cost-effective
23 alternative parameter in determining platelet turnover, overcoming the potential inaccuracies
24 of the MPV, or detecting macroplatelets when the MPV is still normal. ¹¹ According to recent
25 studies, the interpretation of MPV, platelet distribution width (PDW) and macroplatelet

1 values require simultaneous reference to the platelet counts to help in the interpretations of
2 underlying pathological processes.⁴

3 In conclusion, the results indicate that EDTA-anticoagulated samples stored at 25°C and
4 evaluated up to 4 h post sampling have more viability and possibly more accurate results. It is
5 suggested that when monitoring a patient, the veterinarian should use the same anticoagulant
6 and platelet count methodology to monitor the evolution of scores and parameters. In the
7 same way, regardless of anticoagulant, this study suggests that there is lesser variability in
8 scores when the samples are kept at room temperature, and the parameters are evaluated up to
9 four hours of collection.

10 **Declaration of conflicting interests**

11 The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship,
12 and/or publication of this article.

13 **Sources and manufactures**

- 14 a. Vacutainer system, BD - Becton, Dickinson and Company, São Paulo, SP, Brazil
- 15 b. 3.2% sodium citrate, BD - Becton, Dickinson and Company, São Paulo, SP, Brazil
- 16 c. Dipotassium-EDTA, BD - Becton, Dickinson and Company, São Paulo, SP, Brazil
- 17 d. Serum, BD - Becton, Dickinson and Company, São Paulo, SP, Brazil
- 18 e. Micros ABCVet, ABX, Horiba Diagnostics, Montpellier, France
- 19 f. Panótico Rápido, Laborclin, São Paulo, SP, Brazil
- 20 g. SPSS for Windows 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA

21 **References**

- 22 1. Andriolo A, Martins AR, Ballarati CAF, et al: 2010, Procedimentos de coleta de
23 sangue venoso [Procedures for collecting venous blood]. In: Recomendações da
24 Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue
25 venoso, ed Manole, 2nd ed., pp. 16-86, São Paulo, SP. In Portuguese.
- 26 2. Bauer NB, Er E, Moritz A: 2011, Influence of blood collection technique on platelet
27 function and coagulation variables in dogs. *Am J Vet Res* 72 (1): 64-72
- 28 3. Bland JM, Altman DG: 1986, Statistical methods for assessing agreement between
29 two methods of clinical measurement. *Lancet* 1: 307-310.
- 30 4. Bommer NX, Shaw DJ, Milne EM et al: 2008, Platelet distribution width and mean
31 platelet volume in interpretation of thrombocytopenia in dogs. *J Small An Practice* 49:
32 518-424
- 33 5. Buttarelo M, Plebani M: 2008, Automated blood cell counts: state of the art. *Am J*
34 *Clin Pathol* 130: 104-116.
- 35 6. Ernst DJ, Ernst C: 2002, Phlebotomy tools of the trade. *Home and Healthcare Nurse*
36 20 (3): 151-153.

- 1 7. Ernst DJ, Ernst C: 2003, Phlebotomy tools of the trade: Proper handling and storage of
2 blood specimens. *Home and Healthcare Nurse* 21 (4): 266-270.
- 3 8. Handagama P, Feldman B, Kono C et al: 1986, Mean platelet volume artifacts: the
4 effect of anticoagulants and temperature on canine platelets. *Vet Clin Path* 15: 13-17.
- 5 9. Leeuwen MW, Teske E: 1999, De hematologische analyser Vet ABC: Evaluatie voor
6 gebruik bij hond en kat [Evaluation of the use of Vet ABC analyser for canine and
7 feline specimens]. *Tijdschrift Voor Diergeneeskde* 124: 306-309. In German. Abstract
8 in English
- 9 10. Meinkoth JH, Allison RW: 2007, Sample collection and handling: Getting accurate
10 results. *Vet Clin Small Anim* 37: 203-219
- 11 11. Mylonakis ME, Farmaki R, Leontides L, et al: 2008, Effect of anticoagulant and
12 storage conditions on platelet size and clumping in healthy dogs. *J Vet Diagn Invest*
13 20: 774 – 779.
- 14 12. Norman EJ, Barron RCJ, Nash AS et al: 2001, Prevalence of low automated platelet
15 counts in cats: Comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood
16 smear estimation. *Vet Clin Path* 30 (3): 137-140.
- 17 13. Oliveira RAG: 2007, Contagem de plaquetas: bases analíticas. [Platelet count:
18 analytical foundations] In: _____ Hemograma: como fazer e interpretar, ed LMP, 1st
19 ed., pp. 105-113, São Paulo, SP. In Portuguese.
- 20 14. Omana MA, Silvestre-Ferreira AC, Torrent E et al: 2003, Variation of platelet
21 parameters obtained with the ADVIA 120 using three different anticoagulants.
22 [abstract] *Vet Clin Path* 32: 229
- 23 15. Wills TB, Wardrop KJ: 2008, Pseudothrombocytopenia secondary to effects of EDTA
24 in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 44:95-97.
- 25 16. Reynolds BS, Boudet KG, Faucher MR, et al: 2008, Comparison of a new blood
26 sampling device with the vacuum tube system for plasma and hematological analyses
27 in healthy dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 44: 51-59.
- 28 17. Smith III R, Thomas JS: 2002, Quantitation of reticulated platelets in healthy dogs and
29 in nonthrombocytopenic dogs with clinical disease. *Vet Clin Path* 31 (1): 26-32.
- 30 18. Stockham SL, Scott MA: 2002, Basic hematologic assays. In: _____ *Fundamentals of*
31 *Veterinary Clinical Pathology*, ed Blackwell Publishing Company, 1st ed., pp.31-48,
32 Ames, Iowa.
- 33 19. Stockham SL, Scott MA: 2002a, Hemostasis. In: _____ *Fundamentals of Veterinary*
34 *Clinical Pathology*, ed Blackwell Publishing Company, 1st ed., pp.155-225, Ames,
35 Iowa.
- 36 20. Stokol T, Erb HN: 2007, A comparison of platelet parameters in EDTA- and citrate-
37 anticoagulated blood in dogs. *Vet Clin Path* 36 (2): 148 – 154
- 38 21. Thomas JS: 2010, Non-Immune-Mediated Thrombocytopenia. In: Weiss DJ, Wardrop
39 K. *Schalm's Veterinary Hematology*, ed Blackwell Publishing Company, 6th ed.,
40 pp.596-604.
- 41 22. Tveden H, Grabski S, Frame L: 1988, Estimating platelets and leukocytes on canine
42 blood smears. *Vet Clin Path* 17:4-6
- 43 23. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J et al: 2007, Spurious counts and spurious results
44 on haematology analysers: a review. Part I: platelets. *Int J Lab Hem* 29: 4-20
- 45 24. Zucker MB, Borrelli J: 1953, Reversible alterations in platelet morphology produced
46 by anticoagulants and by cold. *Blood* 1: 602-608.

Tables

Table 1. Mean and standard deviation values of platelets parameters in the different time, temperature and anticoagulant of storage. †

PARAMETERS	25°C		4°C	
	EDTA	Citrate	EDTA	Citrate
ESTIMATED PC (10³/μL)				
0 hr	261.8±51.5	265.1±57.2	-	-
4 hr	262.8±46.3	263±52.9	273.2±55.4	268.60±65.46
6 hr	251.1±37.1	244.2±45.4	256.5±62.8	254.8±56.4
<i>P time</i> ‡		0.008*		0.068
<i>P interaction</i> §		0.657		0.827
ABSOLUTE PC (10³/μL)				
0 hr	283.8±61.4	263.8±59.5	-	-
4 hr	261.6±59.4	242.6±59.8	251.9±60.7	244.9±65.4
6 hr	218.3±58.3	212.9±59.3	214.9±68.7	219.4±60.5
<i>P time</i>		0.001*		0.001*
<i>P interaction</i>		0.452		0.210
AUTOMATIC PC (10³/μL)				
0 hr	284.9±59.4	253.6±53.7	-	-
4 hr	249.6±68.6	243±67.2	251.3±78.1	228.1±66
6 hr	238.6±70.6	233.6±76.2	243.6±74	230.6±75.4
<i>P time</i>		0.001*		0.001*
<i>P interaction</i>		0.038*		0.268
MPV (fL)				
0 hr	7.9±0.74	8.6±0.81	-	-
4 hr	8.7±0.86	8.6±0.74	8.7±0.84	8.5±0.74
6 hr	8.73±0.82	8.5±0.71	8.9±0.86	8.7±0.73
<i>P time</i>		0.001*		0.001*
<i>P interaction</i>		0.001*		0.001*

† See text for abbreviations

* P<.05 represents significative differences

‡ Represents the differences along the time of storage

§ Represents the differences between the anticoagulants

Table 2. Agreement between platelet count methodologies in relation to standard methodology, considered here as automatic platelet count. †

		95% limits of agreement		95% limits of agreement		
		Lower limit	Upper limit	Lower limit	Upper limit	
		ESTIMATED PC		ESTIMATED PC		
	0 hr	-107,86	61,675	0 hr	-95,699 118,677	
E D T A 25 °C	4 hr	-134,664	161,076	Cit rat e 25° C	4 hr	-127,619 167,453
	6 hr	-106,752	131,852		6 hr	-123,682 144,842
	ABSOLUTE PC		ABSOLUTE PC			
	0 hr	-96,89	94,71	0 hr	-84,104 104,392	
	4 hr	-151,249	175,327	4 hr	-128,073 127,247	
	6 hr	-106,933	66,463	6 hr	-111,462 70,062	
		ESTIMATED PC		ESTIMATED PC		
	0 hr	-108,861	62,031	0 hr	-95,699 118,677	
E D T A 4° C	4 hr	-153,259	199,233	Cit rat e 4° C	4 hr	-127,105 207,943
	6 hr	-89,868	117,316		6 hr	-93,641 142,055
	ABSOLUTE PC		ABSOLUTE PC			
	0 hr	-97,419	93,041	0 hr	-84,104 104,392	
	4 hr	-186,172	189,516	4 hr	-126,892 160,388	
	6 hr	-144,766	89,114	6 hr	-118,876 96,42	

† See text for abbreviations.

Table 3. Frequency of platelet clumping in the different time, temperature and anticoagulant of storage.

Hours post sampling	Temperature (°C)	Anticoagulant	Score 0	Score 1 and 2	% Clumped platelets
0	25	EDTA	43	11	20.4
		Citrate	39	15	27.8
4	25	EDTA	29	25	46.3
		Citrate	16	38	70.4
	4	EDTA	26	28	51.9
		Citrate	9	45	83.3
6	25	EDTA	16	38	70.4
		Citrate	8	46	85.2
	4	EDTA	10	44	81.5
		Citrate	5	49	90.7

Figures

Figure 1. Line graphs representing the trend of decrease in platelet counts (PC) and increase in MPV values over time.

Figure 2. Scatter plot showing separate measures and the lack of correlation between the MPV values and the macroplatelets percentage.

Figure 1. Line graphs representing the trend of decrease in platelet counts (PC) and increase in MPV values over time.

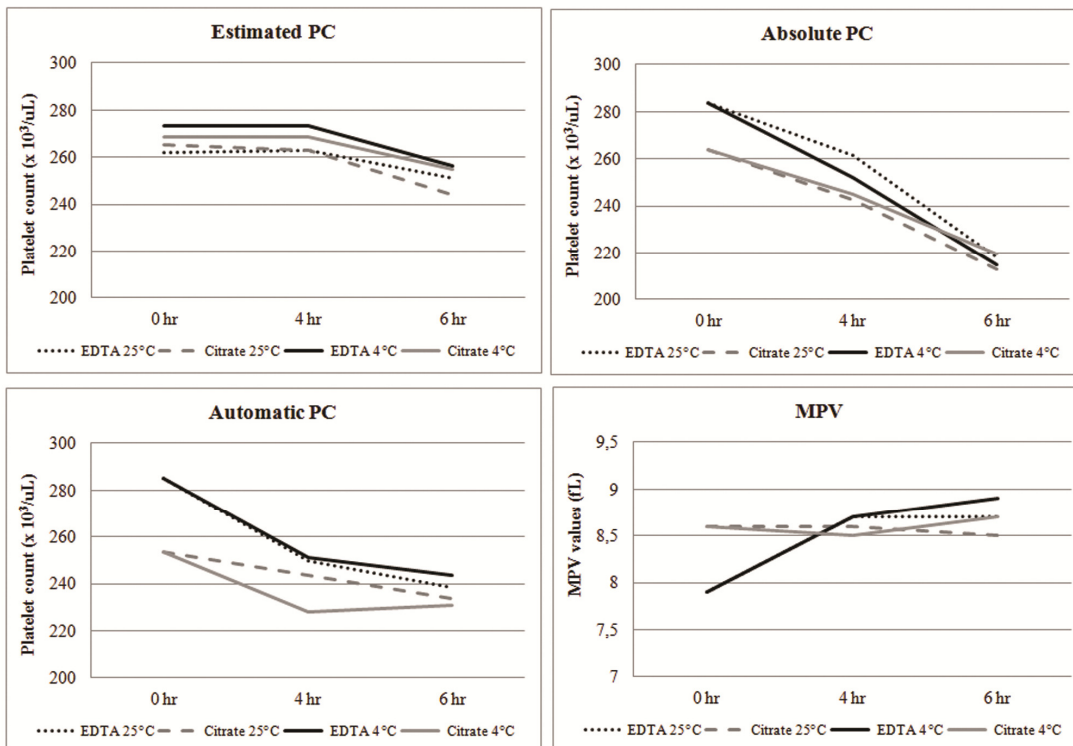
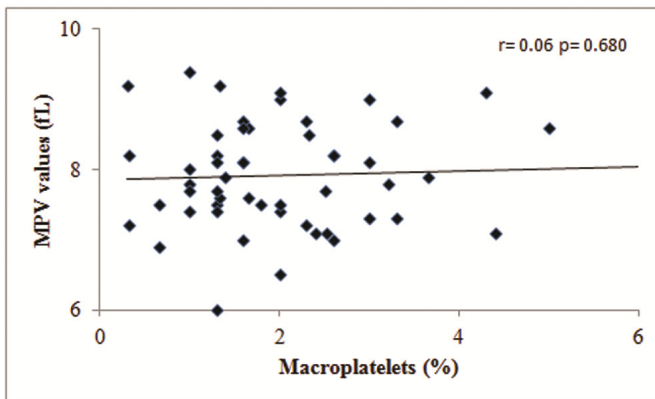


Figure 2. Scatter plot showing separate measures and the lack of correlation between the MPV values and the macroplatelets percentage.



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na realização deste trabalho pode-se observar a escassez de informação sobre alterações analíticas e controle de qualidade em Patologia Clínica Veterinária. Diversos equipamentos, com *softwares* modernos estão disponíveis no mercado, entretanto pouco se conhece sobre a interpretação de erros operacionais e correlação de certos parâmetros como RDW, PDW e MPV com a condição clínica do paciente.

Neste estudo pode-se observar uma diminuição estatisticamente significativa nas contagens plaquetárias com o passar do tempo e em amostras sob refrigeração, enquanto há uma tendência ao aumento dos valores de MPV. As contagens realizadas em amostras em EDTA foram mais elevadas do que aquelas em citrato, e não houve correlação entre o volume de plaquetário médio e a porcentagem de macroplaquetas e, além disso, a frequência de agregação foi maior em amostras citratadas armazenadas a 4°C.

Estes resultados desencorajam a refrigeração da amostra que tem como foco os parâmetros plaquetários, assim como enfatiza a necessidade de processamento rápido e eficaz. Desta forma, ao monitorar um paciente aconselha-se optar sempre pela mesma metodologia, da coleta ao armazenamento, transporte e escolha do método analítico para o processamento da amostra.

Nota-se que é fundamental a correlação interdisciplinar no laboratório clínico. Além da relação do clínico com o patologista clínico, também faz-se essencial a relação do patologista clínico com o técnico laboratorial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRIOLO A., MARTINS A.R., BALLARATI C.A.F. Procedimentos de coleta de sangue venoso. In: **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso**. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Manole. 2010. pp. 16-86.
- BAKER, D. C. Diagnóstico dos distúrbios Hemostáticos. In: THRALL, M.A., **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1ª ed. Roca LTDA: São Paulo. 2007. pp. 170-187.
- BIZZARO, N. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. **American Journal of Hematology**, v.50, n°2, pp. 103 – 109, 1995
- BORAL, L.; HENRY, J. B. **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 1ª. ed. WB Saunders: Philadelphia. 1996. 802 p.
- BOUDREAUX, M.K. Platelet structure. In: Weiss DJ, Wardrop K. **Schalm's Veterinary Hematology**, 6ª ed. Blackwell Publishing Company: Iowa. 2010 pp.561-568.
- BRECHER, G.; CRONKITE, E.P. Morphology and enumeration of human blood platelet. **Journal of Application Physiology**. v. 3. pp. 365-377. 1950
- BOMMER, N.X.; SHAW, D.J.; MILNE, E.M.; RIDYARD, A.E. Platelet distribution width and mean platelet volume in the interpretation of thrombocytopenia in dogs. **Journal of Small Animal Practice**. v.49. pp.518-524. 2008
- BUTTARELO, M.; PLEBANI, M., Automated blood cell counts: state of the art. **American Journal of Clinical Pathology**. v.130. pp. 104-116. 2008
- GENTRY, P.; BURGESS, H.; WOOD, D. Hemostasis. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6ªed. Elsevier Inc: EUA. Pp.287-330. 2008
- GEORGE, J. N. Platelets. **The Lancet** , vol. 355, pp. 1531-1539, 2000
- HANDAGAMA, P.; FELDMAN, B.; KONO, C.; FARVER, T. Mean platelet volume artifacts: the effect of anticoagulants and temperature on canine platelets. **Veterinary Clinical Pathology**, v.15 n°4, pp. 13-17, 1986.
- LASSEN, E.D.; WEISER, G. Tecnologia laboratorial em medicina veterinária. In: THRALL, M.A., **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1ª ed. Roca Ltda: São Paulo. 2007. pp. 3-36
- LEEUWEEN, M.W.; TESKE, E. De hematologische analyser Vet ABC: Evaluatie voor gebruik bij hond en kat. **Tijdschrift Voor Diergeneeskde**. v.124. pp. 306-309. 1999
- LILLIEHÖÖK, I.; TVEDTEN, H. Validation of Sysmex XT-2000 iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. **Veterinary Clinical Pathology**. V.38, n°2. Pp.163-174. 2009.

MEINKOTH, J. H.; ALISSON, R.W. Sample Collection and Handling: Getting Accurate Results. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 37, pp. 203-219, 2007

MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. Evaluation of hemostasis: coagulation and platelet disorders. In: _____ **Veterinary Laboratory Medicine: interpretation and diagnosis**. 2^aed. W.B. Saunders Co.: Philadelphia. 1998. pp.111-137.

MYLONAKIS, M.E.; LEONTIDES, L.; FARMAKI, R.; KOSTOULAS, P.; KOUTINAS, A.F., CHRISTOPHER, M. Effect of anticoagulant and storage conditions on platelet size and clumping in healthy dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, pp. 774-779, 2008

NORMAN, E.J.; BARRON, R.C.J.; NASH, A.S.; CLAMPITT, R.B. Evaluation of a Citrate-Based Anticoagulant with Platelet Inhibitory Activity for Feline Blood Cell Counts. **Veterinary Clinical Pathology**, v.20, pp.137-140, 2001

OLIVEIRA, R.A.G., Contagem de plaquetas: bases analíticas. In: _____ **Hemograma: como fazer e interpretar**. 1^a ed. LMP: São Paulo. 2007 pp. 105-113.

OLSEN, L.H; KRISTENSEN, A.T.; QVRTRUP, K.; PEDERSEN, H.D. Comparison of manual and automated methods for determining platelet counts in dogs with macrothrombocytopenia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.16. pp.167-170. 2004.

PIDARD, D.; DIDRY, D.; KUNICKI, T.J.; NURDEN, A.T. Temperature-dependent effects of EDTA on the membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and platelet aggregability. **Blood**, v. 67, n^o3, pp.604-611, 1986.

KOL, A.; BORJESSON, D.L. Application of thromboelastography/thromboelastometry to veterinary medicine. **Vet Clin Pathology**. v. 39, n^o4, pp. 405-416, 2010.

REBAR, A.H. Platelets in health and disease. In: _____ **Hemogram interpretation for dogs and cats**. 2^a ed. Gloyd Group: EUA. 2004. pp. 27-30.

RUSSEL, K.E. Platelet kinetics and laboratory evaluation of thrombocytopenia. In: Weiss DJ, Wardrop K. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6^a ed. Blackwell Publishing Company; Iowa. 2010. pp.576-585.

SCHNEIDER, A. Principles of Blood Collection and Processing. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5^a ed. Lippincott Williams & Wilkins: EUA. 2000. pp. 827-832.

SCOTT, M.A.; JUTKOWITZ, L.A. Immune-mediated thrombocytopenia. In: Weiss DJ, Wardrop K. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6^a ed. Blackwell Publishing Company: Iowa. 2010. pp.586-595.

SMITH, JW, DAY, TK, MACKIN, A. Diagnosing bleeding disorders. **Comp Cont Educ Pract Vet**. v. 27. 2005. pp. 828-843.

SMITH, S.A.; McMICHEL, M.; GALLIGAN, A.; GILOR, S.; HOH, C.M. Clot formation in canine whole blood as measured by rotational thromboelastometry is influenced by sample handling and coagulation activator. **Blood Coagul. Fibrinolysis**. V.21(7). 2010. Pp.692-702.

STOKOL, T. Essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. In: Weiss DJ, Wardrop K. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6^a ed. Blackwell Publishing Company: Iowa. 2010. pp.605-611.

STOKOL, T.; ERB, N. A comparison of platelet parameters in EDTA- and Citrate-anticoagulated blood in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n° 2, pp. 148-154, 2007

THOMAS J.S. Non-Immune-Mediated Thrombocytopenia. In: Weiss DJ, Wardrop K. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6^a ed. Blackwell Publishing Company: Iowa. 2010. pp.596-604.

TVEDEN H, GRABSKI S, FRAME L., Estimating platelets and leukocytes on canine blood smears. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 17. pp. 4-6. 1988

TVEDTEN, H. What is your diagnosis? Discrepancy in platelet counts determined using a Sysmex XT-2000 iV hematology analyser. **Veterinary Clinical Pathology**. 39, n°3. Pp 395-396. 2010

VILLERS, E. Introduction to haematology. In: VILLERS, E.; BLACKWOOD, L. BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology. BSAVA: Reino Unido. 2^aed. p.23-32, 2010.

WEED, R.I.; CRUMP, L.; SWISHER, S.N. Evaluation of a technic for counting dog and human platelets. **Blood**. v.25, n°2. pp 261-266. 1965

WELLES, E.G.; HALL, A.S.; CARPENTER, D.M. Canine complete blood counts: a comparison of four in-office instruments with the ADVIA 120 and manual differential counts. **Veterinary Clinical Pathology**. v.38, n°1. pp.20-29. 2009

WILLS, T.B.; WARDROP, K.J., Pseudothrombocytopenia secondary to effects of EDTA in a dog. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.44, pp. 95-97. 2008.

WILKERSON, M.J.; SHUMAN, W. Alterations in normal canine platelets during storage in EDTA anticoagulated blood. **Veterinary Clinical Pathology**. v.30, n°3. pp.107-113, 2001

WILKERSON, M.J.; SHUMAN, W.; SWIST, S.; HARKIN, K.; MAINKOTH, J.; KOCAN, A.A. Platelet size, platelet surface-associated IgG, and reticulated Platelets in dogs with Immune-mediated Thrombocytopenia. **Veterinary Clinical Pathology**. v.30, n°3. pp.141-149, 2001

Working Committee for the Biological Characterization of Laboratory animals / GV-SOLAS. Guidelines for specification of animals and husbandry methods when reporting the results of animal experiments. **Laboratory Animals**, v.19, p.106-108, 1985.

ZANDECKI, M.; GENEVIEVE,F.; GERARD, A., GODON, A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: Platelets. **Internal Journal of Laboratory Hematology** , v. 29, pp. 4-20, 2007.

ANEXOS

Anexo 1 – Ficha de consentimento e registro do histórico dos animais participante do experimento.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Veterinária
 Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias – Av. Bento Gonçalves, 9090. Porto Alegre, RS. 91540-000
 Fone: 3308-8033. Fax: 3308-8034. E-mail: favet_lacvet@ufrgs.br

TERMO DE CONSENTIMENTO

NOME DO ANIMAL: _____ RAÇA: _____ IDADE: _____
 SEXO: F M
 NOME DO PROPRIETÁRIO: _____
 CONTATO: _____

- | | | |
|---|------------------------------|------------------------------|
| 1) Possui o animal desde filhote? | <input type="checkbox"/> SIM | <input type="checkbox"/> NÃO |
| 2) O animal recebe todas as vacinas anualmente? | <input type="checkbox"/> SIM | <input type="checkbox"/> NÃO |
| 3) Seu animal recebe vermifugos regularmente? | <input type="checkbox"/> SIM | <input type="checkbox"/> NÃO |
| 4) Alguma outra medicação é utilizada em seu animal? | <input type="checkbox"/> SIM | <input type="checkbox"/> NÃO |
| 5) Seu animal já teve algum problema de saúde? (ex. sangramentos) | <input type="checkbox"/> SIM | <input type="checkbox"/> NÃO |
| 6) Seu animal é castrado? | <input type="checkbox"/> SIM | <input type="checkbox"/> NÃO |
| 7) Seu animal já sofreu alguma cirurgia (com exceção da castração)? | <input type="checkbox"/> SIM | <input type="checkbox"/> NÃO |
| 8) Notou alguma alteração recente em seu animal? | <input type="checkbox"/> SIM | <input type="checkbox"/> NÃO |

Qual? _____

Eu _____, responsável pelo canino _____, estou ciente e concordo com todo o processo que envolve a coleta de sangue e o projeto de pesquisa ao qual estou envolvido. Além disso, dou minha permissão para que a UFRGS utilize qualquer fotografia tirada hoje, do meu cão ou minha, em campanhas de publicidade para educar a população sobre a importância do desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais para avaliação da saúde dos animais de estimação.

Assinatura: _____

Data: _____

Obrigado por permitir que seu animal participe do nosso projeto.