

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
ESPECIALIZAÇÃO EM PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA**

**CONTROLE DA QUALIDADE HEMATOLÓGICO EM LABORATÓRIOS DE
ANÁLISES CLÍNICAS VETERINÁRIAS**

Layara Pestana Sarmento

PORTO ALEGRE, RS

2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
ESPECIALIZAÇÃO EM PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA**

**CONTROLE DA QUALIDADE HEMATOLÓGICO EM LABORATÓRIOS DE
ANÁLISES CLÍNICAS VETERINÁRIAS**

Layara Pestana Sarmento

Trabalho de conclusão de curso com o objetivo de obtenção do título de Especialista, apresentado a Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Veterinária, curso de Especialização em Patologia Clínica Veterinária.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Amanda Muliterno
Domingues Lourenço de Lima
Supervisora: Prof.^a Dr.^a Stella Faria Valle

PORTO ALEGRE, RS

2023

AGRADECIMENTOS

Nós somos seres sociais e vivemos em comunidade, cada troca, cada conversa jogada fora nos corredores com as colegas até as pessoas mais próximas que seguram minhas mãos nos momentos de surtos de autossabotagem são importantes, me impactaram e fazem parte desse ciclo.

Da mesma forma que pessoas me acolheram e me impulsionaram, só desejo também ser luz e amor por onde eu passar.

DEDICATÓRIA

Dedico à todas as Mulheres que abriram caminhos para eu chegar até aqui hoje, e abro caminhos para outras irem além.

Aos meus sobrinhos Ernesto, Augusto e Anjinho a caminho, amores da vida de tia Lalá, que essa nova geração rompa com os ciclos de comportamento e vivam além dos limites de capacidade impostos.

Ao Lilo (*in memoriam*) e a Moazinha, que apenas por suas existências me relembram diariamente o meu propósito de vida.

“Por que você tem tanto medo do seu potencial? As pessoas morrem sem saber o porquê de suas vidas, e você descobriu o seu propósito assim... cozinhando. Isso é muito raro! E você vai deixar de fazer por quê tem medo?” Isalcir B. Oliva

RESUMO

O hemograma é um exame complementar que se tornou parte da rotina médica por fornecer informações importantes sobre o estado hematológico do paciente aos veterinários solicitantes. Com a alta demanda associada ao avanço da tecnologia, desenvolveu-se analisadores hematológicos com o intuito de otimizar o processamento de amostras. Entretanto, para garantir que os resultados emitidos sejam correspondentes aos valores fisiológicos, os estabelecimentos que executam os ensaios de Análises Clínicas Veterinárias devem implementar o Programa de Controle da Qualidade. O desafio para a hematologia veterinária envolve a diversidade de espécies com possíveis influências de outros fatores como as raças. A ausência ou ineficiência desse programa para análises hematológicas pode contribuir com resultados incompletos, equivocados, errôneos e não confiáveis com o potencial de interferir na interpretação e conduta dos Médicos Veterinários no diagnóstico e tratamento dos pacientes. Este trabalho tem como objetivo realizar uma revisão da literatura dos últimos cinco anos (2018 a 2023) sobre o Controle de Qualidade de análises hematológicas, analisar o quanto a ineficiência e a ausência desse programa interferem nos resultados dos ensaios e pontuar a necessidade de aliar a validação de equipamentos nas análises hematológicas com a expertise da avaliação do Patologista Clínico Veterinário.

Palavras-chave: Controle da Qualidade; Hematologia Veterinária; Análises Clínicas Veterinárias.

ABSTRACT

The hemogram is a complementary test that has become part of the medical routine exam because it provides important information about the patient's hematological status to requester veterinarians. The high demand associated with the advancement of technology, hematological analyze were developed to optimize the processing. However, to ensure that results corresponding the physiological values, the laboratories that perform the Veterinary Clinical Analysis must implement a Quality Control Program. The challenge for Veterinary hematology involves diversity of species another and possible influences from factors such as breeds. The absence or inefficiency of this program for hematological analyzes can contribute to incomplete, erroneous and unreliable results with the potential to interfere the interpretation and conduct of Veterinarians in the diagnostic and treatment of patients. This work aims to research a literature review of the last five years (2018 to 2023) on the Quality Control of hematology analyze, how much the inefficiency and absence of this program interferes in the results of the exam and point out the need to combine the validation of equipment in hematological analyzes with the expertise of the evaluation of the Veterinarian Clinical Pathologist.

Keywords: Quality Control; Veterinary Hematology; Veterinary Clinical Analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASVCP - American Society of Veterinary Clinical Pathology

ABPCV - Associação Brasileira de Patologia Clínica Veterinária

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária

CHCMr - Concentração de Hemoglobina Reticulocitária Média

CQ – Controle de Qualidade

CV – Coeficiente de Variação

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ICSH - Conselho Internacional de Padronização em Hematologia

LAE - Limites Aceitáveis de Erro

PCQ – Programa de Controle de Qualidade

RDC – Resolução de Diretoria Guiada

SD – Desvio Padrão (do inglês, Standard Deviation)

SEM – Erro Padrão da Média (do inglês, Standard Error of Mean)

TEa - Erro Total Permitido (do inglês, Total Error Allowable)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens de microscopia óptica de extensão sanguínea em lâmina de cão, microfilárias.	11
Figura 2 – Imagens de microscopia óptica de extensão sanguínea em lâmina de cão, semelhanças dos leucócitos com metarrubricitos.	21
Figura 3 – Imagens de microscopia óptica de câmara de Neubauer para contagem manual de leucócito.	22
Figura 4 – Imagens de microscopia óptica de extensão sanguínea em lâmina de amostra de <i>Galus galus domesticus</i> em demonstração de leucócitos e eritrócitos nucleados.	23
Figura 5 - Imagem de microscopia óptica de extensão sanguínea em lâmina de felino em demonstração de agregado plaquetário.	24
Figura 6 - – Imagens de microscopia óptica de extensão sanguínea em lâmina de cão, semelhanças entre eritrócitos e plaquetas com maior volume.	25
Figura 7 – Imagens de microscopia óptica de extensão sanguínea em lâmina de cão em demonstração de poiquilocitoses, metarrubricitos e neutrófilos bastonetes.	25
Figura 8 – Imagens de microscopia óptica de extensão sanguínea em lâmina de felino, demonstração de reticulócitos felinos.	29

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	OBJETIVOS	12
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.	RESULTADOS	13
5.	DISCUSSÃO	15
5.1	Leucograma	19
5.2	Plaquetas	23
5.3	Reticulócitos	26
6.	CONCLUSÃO	27
7.	REFERÊNCIAS	28
	APÊNDICE	30

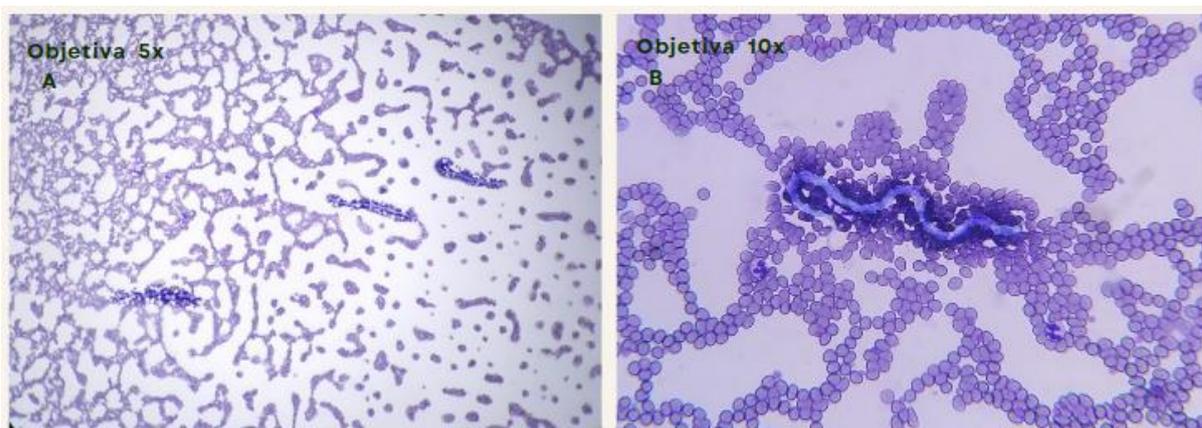
1. INTRODUÇÃO

Os exames complementares para auxílio dos profissionais no diagnóstico de enfermidades e acompanhamento do tratamento nos animais estão cada vez mais presentes na sociedade. Para assegurar que os resultados dos ensaios *in vitro* sejam equivalentes aos valores *in vivo*, identificou-se a necessidade de padronizar os processos buscando anular ao máximo as interferências nas fases pré, pós e analíticas, originando o conceito de Controle da Qualidade (CQ) (Lages, 2010). A regulamentação para tais atividades laboratoriais no Brasil iniciou na década de 1980 com a Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) e a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC), ambas na área da saúde humana, a qual desenvolveram o Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) (Martelli, 2011). No âmbito veterinário, praticou-se as atividades laboratoriais sem legislações específicas até o ano de 2020 que o Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) publicou a Resolução de Diretoria Guiada (RDC) nº1.374 de 02 de dezembro de 2020 com o intuito de abordar tópicos das rotinas laboratoriais de forma mais ampla e abrangendo diferentes especialidades, sendo essa uma base inicial para futuras legalizações dessas atividades (CFMV, 2020).

O hemograma é um exame que pode fornecer informações relevantes sobre o estado geral do paciente, o que se tornou parte da demanda para o diagnóstico clínico veterinário. Por meio da avaliação das diferentes celularidades em circulação periféricas, consegue-se qualificar a linhagem eritróide e a reação do organismo perante as anemias, averiguar a resposta leucocitária do organismo, além da possibilidade de detectar enfermidades infecciosas como os hemoparasitos (**Figura 1**), corpúsculos virais, entre outros achados. Por ser um exame de moderada complexidade e custo, tornou-se uma etapa das etapas de exames comprobatórios para posteriores recomendações a ensaios de especialidades. Em concomitância, a evolução da hematologia afetou diretamente a rotina laboratorial devido ao aumento das solicitações, mas a dificuldade de atender esses profissionais estão relacionadas com os fatores que se contrapõem, como as condições ambientais em conjunto de hábitos e costumes. Diferentemente da hematologia humana, também há os fatores relacionados com a vasta diversidade de espécies por apresentarem padrões hematológicos discrepantes, a possibilidade da influência das raças e também pela interferência direta das alterações patológicas de diferentes níveis. Atrelado às

diferenças analíticas, também se questiona sobre como garantir os níveis de qualidade dos ensaios realizados se não há um padrão que consiga englobar toda as variáveis (De Pádua Costa, 2014; Gonçalves, 2018).

Figura 1: Imagens de microscopia óptica de extensão sanguínea em lâmina de amostra para hemograma de cão. A - Campo em objetiva de 5x que ilustra a visão geral das microfílarias, há 3 no campo. B - Campo em objetiva de 10x para observar com melhor detalhe a morfologia da microfílária.



Fonte: Arquivo pessoal.

Todo o processo de análise é subdividido em três grandes grupos: pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos. A etapa pré-analítica compreende as ações que ocorrem antes do exame dar entrada no laboratório, envolvendo desde a suspeita clínica, o preparo do paciente antes da coleta de amostra, material e técnica para coleta, identificação, acondicionamento, transporte, tempo viável desse material, entre vários outros fatores interferentes na condição dessa amostra. A fase analítica engloba as ações a partir do momento em que esse material está sob responsabilidade do laboratório, desde o correto registro de entrada, com todos os dados de identificação correspondentes, até o final das metodologias em si que produz um resultado. Durante essa fase que ocorre os maiores erros de não conformidades, que podem estar relacionadas com os erros sistemáticos devido a variação de leitura dos equipamentos e do diferencial sob microscopia óptica pela falta da validação dos processos analíticos. A fase pós analítica é mais curta, porém de equivalente importância pois um erro nesta etapa pode comprometer toda a cadeia analítica anterior. Para essa etapa compreende-se que os resultados serão registrados e enviados ao solicitante para posterior arquivamento, e os resíduos serão destinados corretamente ao descarte (Lages, 2010; Martelli, 2011).

Devido à ausência ou ineficiência do Programa de Controle da Qualidade (PCQ) nos estabelecimentos que executam os ensaios de Análises Clínicas Hematológicas Veterinárias, muitas vezes os erros não são detectados e, por consequência, decorrem em resultados com possíveis avaliações incompletas, equivocadas ou até mesmo errôneas, produzindo resultados não confiáveis e que podem interferir na interpretação e conduta dos Médicos Veterinários solicitantes, no diagnóstico e tratamento dos pacientes (Berlitz, 2010; Lages, 2010; Martelli, 2011). A finalidade desse trabalho é pesquisar na literatura, trabalhos que discutam a possibilidade da interferência dos erros analíticos sobre os resultados no diagnóstico hematológico, quando o CQ não é implementado.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral realizar uma revisão da literatura dos últimos cinco anos (2018 a 2023) sobre o CQ de análises hematológicas em estabelecimentos que executam os ensaios em hematologia para as Análises Clínicas Veterinárias.

2.1 Objetivos específicos:

2.1.1 Analisar o quanto a ineficiência ou a ausência de um PCQ interfere nos resultados das análises hematológicas;

2.1.2 Destacar a importância e os desafios para a hematologia veterinária por ser ampla e envolver a análise de diferentes espécies;

2.1.3 Investigar quais os principais PCQ estão sendo utilizados em laboratórios de Análises Clínicas Veterinária nos últimos cinco anos;

2.1.4 Observar a necessidade de aliar a validação de equipamentos nas análises hematológicas com a expertise da avaliação do Patologista Clínico Veterinário.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse é um trabalho de revisão de literatura no qual foram consultados dois repositórios, o *Pubmed* e o *Web of Science*, em 09 de fevereiro de 2023, com a seleção de publicações dos últimos 5 anos (2018 a 2023), utilizando os termos de busca (conforme arquivo Suplementar): “*quality control*”; “*veterinary laboratories*”; “*veterinary clinical analysis*”; “*veterinary clinical pathology*”; “*veterinary hematology*”; “*veterinary hematological*”; “*analytical errors*”. Para a seleção e categorização das referências para a revisão foi utilizado o aplicativo *Rayyan* (disponível em <<https://www.rayyan.ai/>>). Como critérios de exclusão foram retirados os artigos duplicados; não escritos em outro idioma que não fosse inglês; sem acesso ao *abstract*, artigos de revisão, *guidelines*, protocolos, editoriais, cartas ao editor, opiniões, comentários, resumos de conferências e capítulos de livros; artigos não acessíveis ou disponíveis; estudos *in vitro* ou *in silico*. Os critérios de inclusão para essa revisão foram publicações que contemplavam as variações das mensurações dos analisadores hematológicos priorizando os trabalhos que correlacionavam a ausência e/ou presença de PCQ, sem restrições de idade, sexo, espécies, e/ou raças, com dados quantitativos e/ou semiquantitativos apresentados como média \pm desvio padrão (do inglês, Standard Deviation – SD) ou erro padrão da média (do inglês, Standard Error of Mean – SEM).

4. RESULTADOS

A pesquisa por publicações nos repositórios resultou em 154 artigos. A exclusão das publicações duplicadas resultou em 132 artigos. Após a análise utilizando os critérios de exclusão e inclusão do estudo, foram selecionados 9 artigos conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Publicações sobre variações das mensurações dos analisadores hematológicos priorizando os trabalhos que correlacionavam a ausência e/ou presença de PCQ.

Authors	Articles	Species
FLATLAND, Bente; FREEMAN, Kathleen P., 2018	Repeat patient testing shows promise as a quality control method for veterinary hematology testing. Veterinary Clinical Pathology , v. 47, n. 2, p. 252-266, 2018.	Canine
VANYO, Lourdes C. <i>et al.</i> , 2018	Comparison of traditional statistical quality control using commercially available control materials and two patient-based quality control procedures for the ADVIA 120 Hematology System. Veterinary Clinical Pathology , v. 47, n. 3, p. 368-376, 2018.	Canine
CARISCH, Lea <i>et al.</i> , 2019	White blood cell count in birds: evaluation of a commercially available method. BMC veterinary research , v. 15, n. 1, p. 1-7, 2019.	Birds
SCHMIDT, Robert L.; PEARSON, Lauren N., 2019	Estimating the cost of quality of errors in the analytical phase. <i>Clinica Chimica acta</i> ; International Journal of Clinical Chemistry , v. 495, p. 60–66, 2019	NA
ZAHND, Rebeka <i>et al.</i> , 2020	Investigation of the status quo of veterinary point-of-care laboratories in Switzerland: availability, application, and quality management. <i>Schweizer Archiv für Tierheilkunde</i> , v. 162, n. 3, p. 163-173, 2020.	NA
THONGSAHUAN, Sorawat <i>et al.</i> , 2020	Precision and accuracy of the Mindray BC-5000Vet hematology analyzer for canine and feline blood. Veterinary Clinical Pathology , v. 49, n. 2, p. 207-216, 2020.	Canine and feline
GREBERT, Margot <i>et al.</i> , 2020	Validation of the Sysmex XN-V hematology analyzer for canine specimens. Veterinary Clinical Pathology , v. 50, n. 2, p. 184-197, 2021.	Canine
DALY, Susan; FREEMAN, Kathleen P.; GRAHAM, Peter A., 2021	Evaluation of Sysmex XT-2000 i V analyzer performance across a network of five veterinary laboratories using a commercially available quality control material. Veterinary Clinical Pathology , v. 50, n. 4, p. 568-578, 2021.	Canine
DALY, Susan; GRAHAM, Peter A.; FREEMAN, Kathleen P., 2022	Quality control validation for a veterinary laboratory network of six Sysmex XT-2000 i V hematology analyzers. Veterinary Clinical Pathology , v. 51, n. 4, p. 565-576, 2022.	NA

5. DISCUSSÃO

O processo de automação das análises trouxe benefícios para a rotina laboratorial como o aumento da capacidade de exames executados em menor espaço de tempo, um aspecto paralelo à agilidade é a redução da variação pela interferência da manipulação dos profissionais, melhorando a linearidade analítica. Entretanto pondera-se sobre o acerto dos valores apresentados como resultados e se de fato esses valores traduzem os parâmetros reais no organismo dos pacientes. Segundo Daly *et al.* (2021), o PCQ é a base para assegurar que os valores das análises biológicas sejam confiáveis e a avaliação estatística é uma das ferramentas de validação dos resultados. Os equipamentos são calibrados e aprovados previamente para receber a rotina, entretanto apenas analisadores que alcançam os limiares de qualidade determinados estão seguros para que as decisões clínicas sejam embasadas em seus resultados (Daly *et al.*, 2022).

A sensibilidade de um equipamento hematológico é interpretada pela identificação da Probabilidade de Detecção de Erro, ou Erro Total Detectado, já especificidade é embasada na Probabilidade de Falsa Rejeição, ou Total de Falsa Rejeição. Idealmente, a detecção de erro deve ser de 100%, mas como nenhuma metodologia está livre de falhas, a métrica de $\geq 90\%$ é bem aceita. Em contrapartida o nível de Probabilidade de Falsa Rejeição ideal seria de 0% pois o desejável é que nenhum exame seja rejeitado quando não há problemas plausíveis, entretanto, o nível de até $\leq 5\%$ é aceito e percentuais maiores do que isso geram desperdícios e impacto sobre a eficiência da análise. Infelizmente não existe uma fórmula igual aplicável a todos os equipamentos, mas é o desempenho de cada analisador que determinará a quantidade de controles e quais as regras estatísticas que se aplicarão internamente (Vanyo *et al.*, 2018; Daly *et al.*, 2022).

A maioria dos Laboratórios de Análises Clínicas Veterinárias tem uma visão do Controle da Qualidade apenas como custo que encarece o processo dos exames, Schmidt e Pearson (2019) investigaram o impacto desse fator financeiro e pontuam que os erros de imprecisão na fase analítica comumente não estão inclusos nos cálculos para comparação das despesas. Sendo assim, os valores para implementar os programas de qualidade serão maiores e conflitantes financeiramente com sua ausência, o que teoricamente compensaria mais. O objetivo de reduzir as despesas não deve se contrapor ao programa de qualidade e sim se associar a ele para

identificar e quantificar em qual etapa do processo há perdas relacionadas com as falhas a qual possam ser sanadas. Ter essa cultura de comprometimento com a excelência como base da equipe é importante para o sucesso do programa, e para tal empenho Schmidt & Pearson (2019) recomendaram a metodologia que se fundamenta em Prevenção-Avaliação-Falha. No pilar de Prevenção os custos inclusos estão os treinamentos, manutenções preventivas, validações dos processos. Para o pilar da Avaliação estão inseridos as calibrações e o controle da qualidade, esses garantem a conformidade das análises realizadas. O pilar da Falha corresponde a identificação dos erros internos e externos, ao chegar nessa última etapa com considerável volume de correções a serem executadas, percebe-se que as etapas anteriores negligenciaram em algum ponto do ciclo. A pior perspectiva de todo erro é que esse chegue ao paciente e afete a sua saúde por alguma conduta embasada nesse resultado (Schmidt & Pearson, 2019).

Quando voltado para o âmbito veterinário, considera-se que os recursos são mais restritos, as coletas das amostras para os hemogramas têm as limitações de cada espécie devido à manipulação e contenção dos pacientes, além dos recursos dos tutores que por vezes não conseguem pagar por vários exames, demandando uma maior responsabilidade sobre os ensaios autorizados por ter que fornecer as informações importantes aos profissionais com menor margem para erros (Carisch *et al.*, 2019).

Ao avaliar sobre os motivos de implementar o PCQ, percebe-se que ao elevar nível do serviço em saúde prestado toda a população é impactada de forma direta ou indiretamente, sendo essa protegida das consequências do manejo errôneo. Os PCQ têm a capacidade de evitar o desperdício, aumentar a produtividade com menor implicação ambiental, prevenir as possibilidades de transmissão de doenças e fortalecer o desenvolvimento da saúde coletiva. No presente momento a regulamentação para os laboratórios veterinários ainda é apenas um ponto de partida que aborda de forma mais abrangente as diferentes áreas, como a hematologia e bioquímica, microbiologia, imunologia, anatomia patológica, reprodução, parasitologia e toxicologia; necessitando de legislações direcionadas especificamente para cada atividade (Schmidt & Pearson, 2019; Brasil, 2020).

A legislação vigente foi elaborada pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), por meio da publicação da Resolução de Diretoria Guiada (RDC) nº1374 de 02 de dezembro de 2020 no Diário Oficial da União, que tem como objetivo

discorrer sobre a Responsabilidade Técnica das atividades clínico-laboratoriais. Como essa RDC que engloba diferentes áreas de atuação, as exigências são mais simples e de abordagens básicas quando comparadas a legislação laboratorial humana. Em paralelo com o órgão de regulamentação das atividades profissionais dos Médicos Veterinários e Zootecnistas, em outubro de 2021 fundou-se a Associação Brasileira de Patologia Clínica Veterinária (ABPCV) que têm como objetivo estabelecer diretrizes sobre os ensaios a serem padronizados e os critérios de excelência para a especialidade por meio da normatização dos procedimentos técnicos.

Grebert *et al.* (2020) pontuam que para a Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária (ASVCP) em concordância com o Conselho Internacional de Padronização em Hematologia (ICSH), a validação inclui uma avaliação de linearidade, repetibilidade, reprodutibilidade e comparação de métodos. Deve-se observar o aspecto da amostra pois hemólise, lipemia e bilirrubinas podem interferir na contagem e diferenciação celular pelo analisador hematológico. Entretanto ainda não está bem definido qual o nível de interferência pois entre cada equipamento e reagente pode haver diferenças significativas (Grebert *et al.*, 2020).

Nabity *et al.* (2018) recomendam a mensuração por Erro Total Permitido (TEa) nas análises hematológicas como base de padronização. Com o intuito de uniformizar os limites aceitáveis criou-se o “Quality Assurance and Laboratory Standards (QALS), que se propõe a determinar o TEa para cada analito para a hematologia veterinária sempre considerando quais são os níveis importantes para a tomada de decisão clínica e as referências correspondentes. Essa padronização facilita a interpretação dos resultados, em especial quando realizados em momentos ou estabelecimentos diferentes, o que é interessante pois viabiliza a comparação de testes entre laboratórios e clínicas que poderiam estar estatisticamente isolados.

A matéria disponível comercialmente como material-controle para a hematologia é de origem humana, ainda não se sabe o nível de interferência pela variação espécie-específico, mas acredita-se que para alguns analitos essa variante seja relevante. Um dos contrapontos sobre as amostras comerciais para os controles é que esses valores não se aproximam dos valores reais da população que será avaliada localmente, além de algumas variáveis como mudanças de lote ou a frequência, possibilitam que os resultados sejam menos fidedignos. Além disso, Nabity *et al.* (2018) corroboram para que o uso de sangue total como material-controle da espécie de interesse seja utilizado para avaliação completa do analisador

hematológico e garantir que todos os itens do exame estejam dentro limiares aceitáveis, o que melhora a exatidão dos resultados. O desafio para a hematologia de forma geral é a estabilidade das amostras que se degradam rapidamente e por isso os dados sofrem importantes alterações. Para a hematologia veterinária um agravante é a padronização das metodologias sendo que há variações celulares significativas pela particularidade quando se leva em consideração a existência da diversidade de espécies e dentre essas, também há as influências por raças (Thongsahuan *et al.*, 2020). Zahnd *et al.* (2020) abordam que na Suíça as clínicas e laboratórios que executam análises e responderam as pesquisas, afirmaram que utilizam a abordagem de *point-of-care* que são pela metodologia química seca. Na pesquisa os dados demonstraram que apenas 35% dos estabelecimentos executavam o CQ hematológico com frequência de uma vez ao mês e 25% a cada trimestre.

Um novo conceito de testes do próprio paciente tem sido discutido como uma alternativa para a patologia clínica veterinária já que o material comercial para diferentes espécies está indisponível, tanto Nabity *et al.* (2018) quanto Badrick *et al.* (2019) abordam o conceito CQ com base no paciente, que são testes repetidos do próprio indivíduo e que podem superar algumas desvantagens do material-comercial humano. A abordagem denominada “controle de qualidade em tempo real baseado no paciente” utiliza dados do próprio indivíduo em testes separados para detecção erros sistemáticos. Essa perspectiva é uma possibilidade de sistema de controle baseado no próprio espécime a ter as avaliações hematológicas, entretanto esse protocolo não é difundido e recomenda-se inúmeros estudos e testes antes de aplicá-lo (Badrik *et al.*, 2019).

Pesquisas sobre diferentes métodos de CQ para as análises clínicas hematológicas veterinárias têm sido discutidas com maior frequência na busca por alternativas de baixo custo e alta eficiência. Vanyo *et al.* (2018) abordam as possibilidades entre o uso das amostras comerciais, *pool* com amostras dos pacientes e a metodologia baseada na repetição do paciente. Os produtos comerciais alcançaram de TEa de $\geq 90\%$ e Probabilidade de Falsa Rejeição de 0%. Para a técnica de controle em tempo real baseado no paciente, os percentuais alcançados foram de $\geq 85\%$ para TEa, exceto para quantificação de plaquetas que foi de 77%, e 0% para Probabilidade de Falsa Rejeição (Vanyo *et al.*, 2018).

Apesar das despesas elevadas com o material-controle comercial ser considerável, a metodologia de controle com o próprio paciente apresenta o benefício

de baixo custo, entretanto ressalta-se que essa opção precisa ser melhor testada e comprovada para de fato ser recomendada com segurança como substituto confiável (Nabity *et al.* 2018). Na área de hematologia de animais não mamíferos não há amostras controle comercial, logo cada estabelecimento assume um protocolo interno a ser utilizado como controle. O Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Zurich (Clinical Laboratory, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Zurich, Switzerland) realiza as análises de aves de forma que para cada amostra a contagem da câmara é realizada em duplicata e calcula-se a média para as células nucleadas. Caso o desvio entre as duas contagens exceda 15%, o procedimento de contagem é repetido e investigado os possíveis fatores de interferência, entretanto sempre correlacionando com uma avaliação da extensão sanguínea para garantir a plausibilidade dos resultados (Carisch *et al.*, 2019).

A avaliação da performance dos equipamentos não deve ocorrer somente quando demonstrar resultados suspeitos, mas sim de forma precoce quando um analisador é comprado, antes de introduzir na rotina e por meio de testes periódicos. Nabity *et al.* (2018) recomendam que o TEa seja calculado pela fórmula: $TEa = \text{viés}(\%) + 1,65 \times \text{coeficiente de variação}$. Deve-se atenção para o TEa é um valor calculado para pontuar a amplitude desejável, todavia há diferença entre o erro observado que servirá como base para avaliação, esse pode ser calculado por $\text{Erro Total Observado} = \text{viés}(\%) + 2CV$. Para compreender o nível de precisão do equipamento, o primeiro passo pode ser a comparação entre o TEa e o Erro Total Observado, quanto maior essa diferença menor é a precisão da análise (Grebert *et al.*, 2020).

5.1 Leucograma

O diferencial para a contagem leucocitária total é um ponto de discussão sensível pois é uma mensuração com maior possibilidade de erro quando comparado a outros parâmetros analisados, mesmo que o diferencial seja automatizado ou manual. Nabity *et al.* (2018) observaram que nos analisadores hematológicos o erro é maior quando se trata do diferencial para algumas células específicas. Os eosinófilos e os monócitos têm cerca de 50 a 60% de erro total, respectivamente, enquanto para neutrófilos e linfócitos esses números alcançam 15% para ambos.

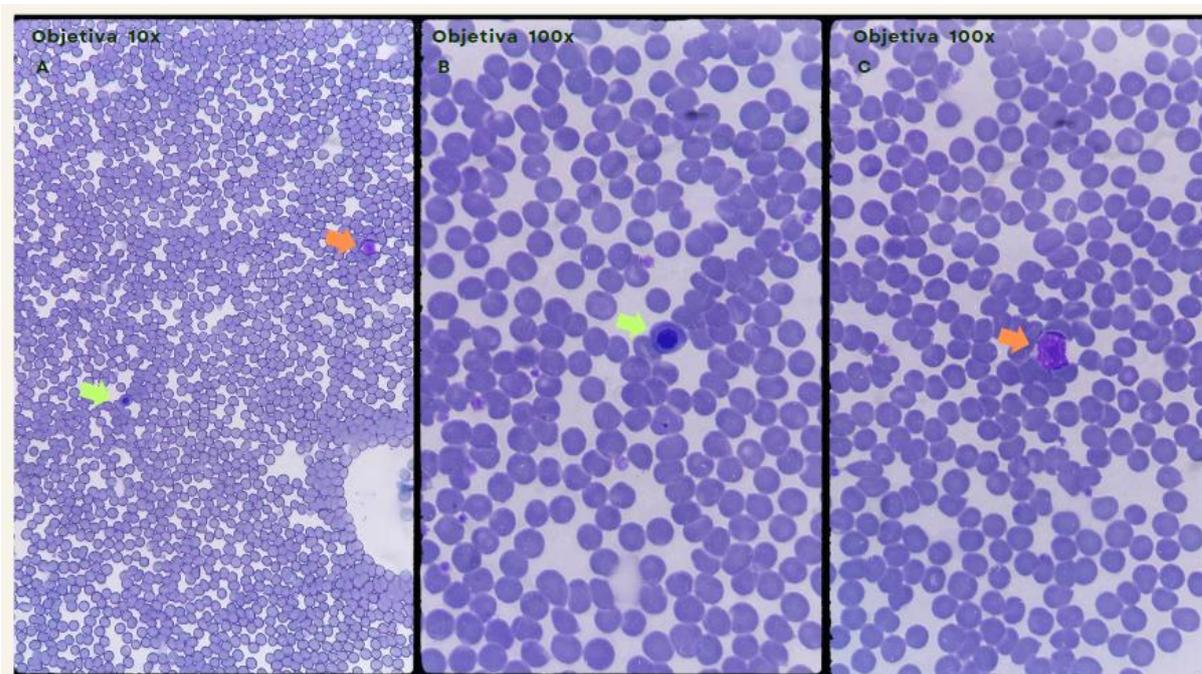
Para os pacientes com desvio à esquerda, as concentrações de bastonetes interferem nos resultados para contagem do diferencial leucocitário, alguns

equipamentos emitem um valor contabilizado, mas com alerta para erro ou avaliação incompleta, além de alterações como neutrófilos tóxicos não serem detectados. Para os pacientes oncológicos, como de leucemia aguda ou linfoma leucêmico, o reconhecimento de células blásticas na circulação periférica é frequentemente contabilizado como monócitos o que prejudica a real avaliação e estadiamento do caso (Grebert *et al.*, 2020).

Grebert *et al.* (2020) avaliaram o desempenho do analisador Sysmex XN-V e concluíram que a imprecisão alcançou <5% para a maioria das variáveis, o que é um nível aceitável para o programa de CQ em geral. Entretanto, nesse mesmo estudo foi notável que a imprecisão para linfócitos, monócitos, eosinófilos, reticulócitos e plaquetas apresentaram um resultado de imprecisão >5%, o que reforça a importância da leitura por microscopia óptica pelo profissional qualificado.

Apesar dos resultados para os diferenciais dos analisadores serem utilizados como ponto de partida, as amostras precisam ser analisadas através da observação das células no esfregaço sanguíneo via microscopia óptica para validar os resultados e observar possíveis achados de alterações morfológicas, em todo estabelecimento de análises clínicas veterinárias. O exemplo que ocorre com frequência na rotina é quando há elevada resposta da medula óssea diante as anemias, os metarrubricitos são liberados no sangue periférico e os equipamentos contabilizam como leucócitos por serem células nucleadas, produzindo uma falsa leucocitose (**Figura 2**) (Nabity *et al.*, 2018).

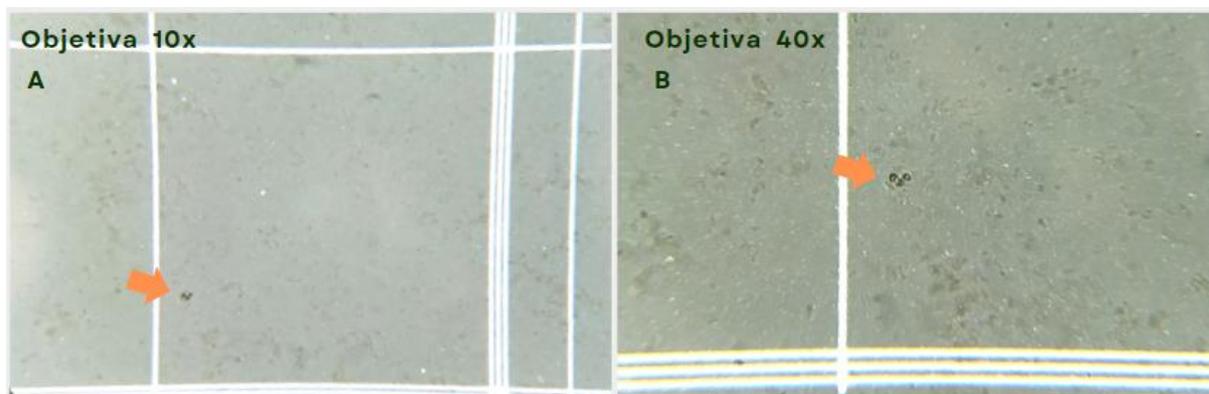
Figura 2: Imagens de microscopia óptica de extensão sanguínea em lâmina de amostra para hemograma de cão. A - Campo em objetiva de 10x que ilustra a visão geral de semelhanças dos leucócitos (setas laranja) com metarrubríctos (setas verdes). B - Campo em objetiva de 100x para observar o detalhe da morfologia do metarrubríctico. C - Campo em objetiva de 100x para observar o detalhe da morfologia do linfócito.



Fonte: Arquivo pessoal.

Para casos como esses, o laboratorista executa como contraprova a contagem manual do total de células nucleadas. Ao ponderar sobre essas contagens, Nabity *et al.* (2018) relembram que apesar das recomendações acima, essa metodologia pode ter maior erro aleatório devido ao fator manipulação, como os erros de diluições, de reconhecimento dos leucócitos no hemocitômetro (a câmara de Neubauer) pois as células não são coradas, ou falhas nos cálculos, por isso é recomendado o relato dessa metodologia em laudo (**Figura 3**). Desta forma ressalta-se a importância do papel do Patologista Clínicos Veterinário e a necessidade de treinamento constante.

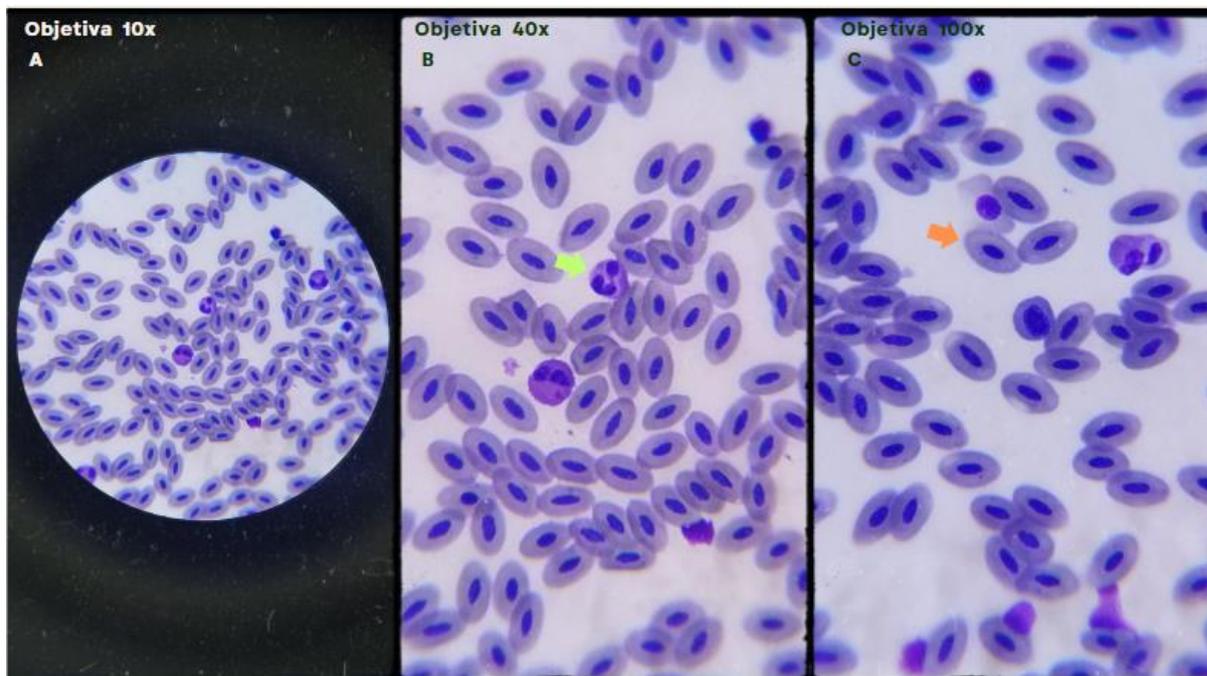
Figura 3: Imagens de microscopia óptica de câmara de Neubauer para contagem manual de leucócitos de mamífero (setas laranja). A - Campo em objetiva de 10x que ilustra a visão geral dos leucócitos, observe que não é utilizado coloração, o que dificulta identificações. B - Campo em objetiva de 40x para observar a detalhes da célula com núcleo segmentado indicando o neutrófilo.



Fonte: Arquivo pessoal.

Carisch *et al.* (2019) abordaram a contagem de leucócitos de aves em sangue total com ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), a principal diferença em relação a morfologia dos eritrócitos com outras classes não-mamíferos, é que essas células também são nucleadas (**Figura 4**). Os analisadores hematológicos automáticos utilizam o método de impedância que opera justamente com essa diferença de células nucleadas e não-nucleadas, o reagente lisa os eritrócitos e as células resultantes desse processo são as nucleadas a qual são contabilizadas. Até o presente momento não é conhecido um reagente com a capacidade atestada de lisar apenas os eritrócitos nucleados e permitir que os trombócitos e leucócitos continuem intactos para a contagem. Esse fato reforça a indagação de que esses contadores automatizados têm a dificuldade de diferenciar as células da linhagem eritroide nucleada (metarrubricitos, rubricitos, entre outros) da linhagem leucocitária mononuclear (linfócitos e monócitos) em mamíferos.

Figura 4: Imagens de microscopia óptica de extensão sanguínea em lâmina de amostra para hemograma de *Galus galus domesticus*. A - Campo em objetiva de 10x para ilustrar a visão geral. B – Campo em objetiva de 40x para observação de leucócitos (seta verde). C - Campo em objetiva de 100x para observação de eritrócitos nucleados (seta laranja).

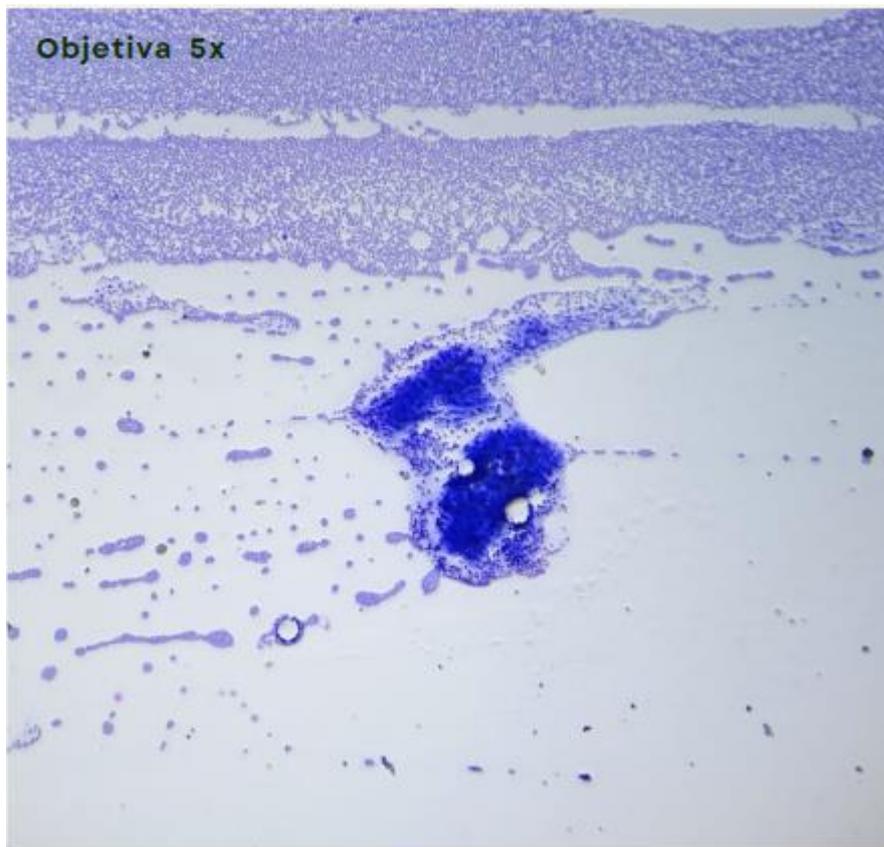


Fonte: Arquivo pessoal.

5.2 Plaquetas

A contagem plaquetária é uma representação do quanto a diferença entre espécies pode ser significativa. Sabe-se que as plaquetas felinas são mais rapidamente ativadas em comparação com outras espécies, observando microscopicamente agregados plaquetários (**Figura 5**) e macroscopicamente fibrinas e coágulos. De forma geral, adota-se o limiar de concentração plaquetária $<50.000/\mu\text{L}$ relacionado como uma imprecisão maior do que os 20% adotado como TEa para esse analito seja em qualquer espécie. A imprecisão aumenta quando há contagens cada vez mais baixas em torno de $10.000/\mu\text{L}$, entretanto apesar de que os erros sejam mais altos, isso não implica que o resultado seja insignificante, um exemplo é quando o valor total de plaquetas emitido pelo analisador seja de $10.000/\mu\text{L}$, e o erro total seja de 50%, logo a variação seria entre 5.000 a $15.000/\mu\text{L}$, clinicamente essa amplitude de valores não terá grande impacto sobre a conduta clínica já que conduta recomendada seria a mesma (Nabity *et al.*, 2018).

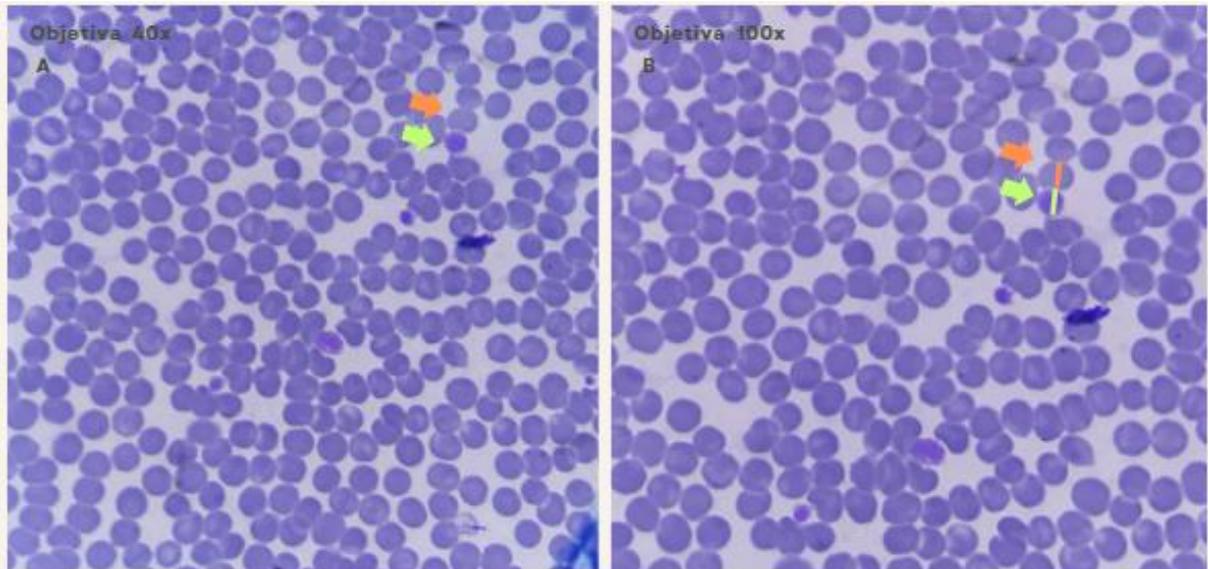
Figura 5: Imagem de microscopia óptica de extensão sanguínea em lâmina de amostra para hemograma de felino. Campo em objetiva de 5x que demonstra visão geral do agregado plaquetário.



Fonte: Arquivo pessoal.

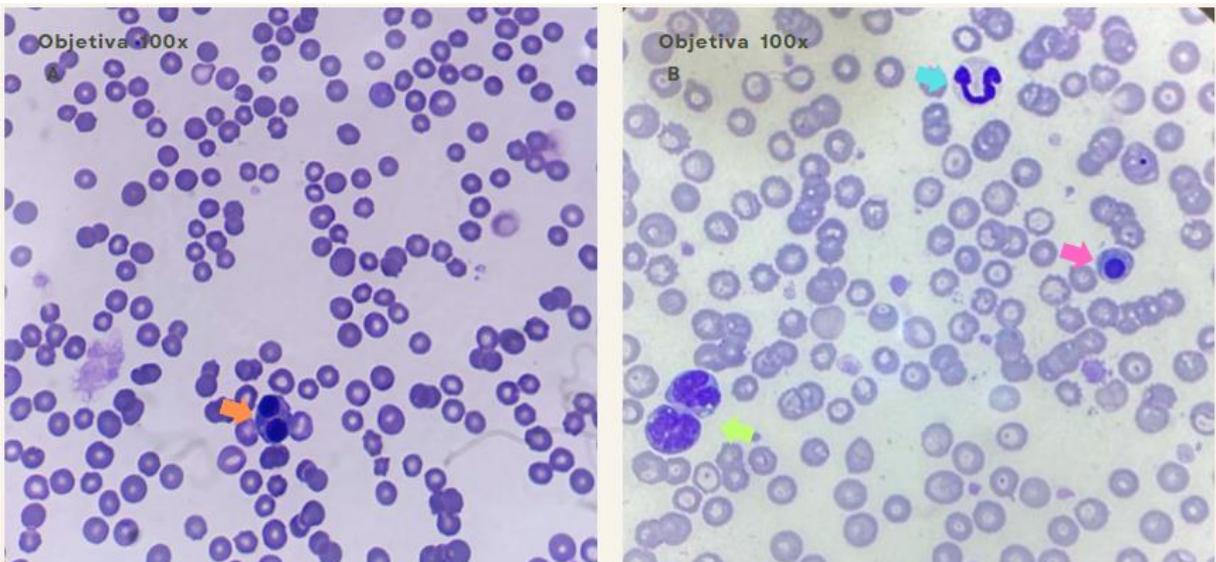
Grebert *et al.* (2020) citam que alguns equipamentos mais modernos incluem como diferencial a fluorescência para análise de plaquetas e a linhagem eritróide nucleada (**Figura 6**). Esse é um benefício que aumenta a especificidade dessas quantificações, pois com maior precisão, a necessidade do laboratorista em realizar as diluições e contagens manuais será reduzida, assim será menor a possibilidade de erros por manipulações. Em contrapartida a avaliação da extensão sanguínea pelo Patologista Clínico permanece como uma ferramenta de CQ para averiguar se as contagens emitidas estão condizentes com o observado em lâmina (**Figura 7**).

Figura 6: Imagens de microscopia óptica de extensão sanguínea em lâmina de amostra para hemograma de cão. A – Campo em objetiva de 40x demonstra visão geral da semelhança entre eritrócitos (setas laranjas) e plaquetas com maior volume (setas verdes). B - Campo em objetiva de 100x evidenciando os detalhes.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 7: Imagens de microscopia óptica de extensão sanguínea em lâmina de amostra para hemograma de cão. A – Campo em objetiva de 100x, metarrubricito binucleado ainda sem divisão citoplasmática (seta laranja). B – Campo em objetiva de 100x, 1 metarrubricito (seta rosa), 2 neutrófilos bastonetes (seta verde) em comparação com neutrófilo segmentado (seta azul). Observe as poiquilocitoses. Essas são alterações morfológicas que o profissional detecta em análise das lâminas e relata nos laudos.



Fonte: Arquivo pessoal.

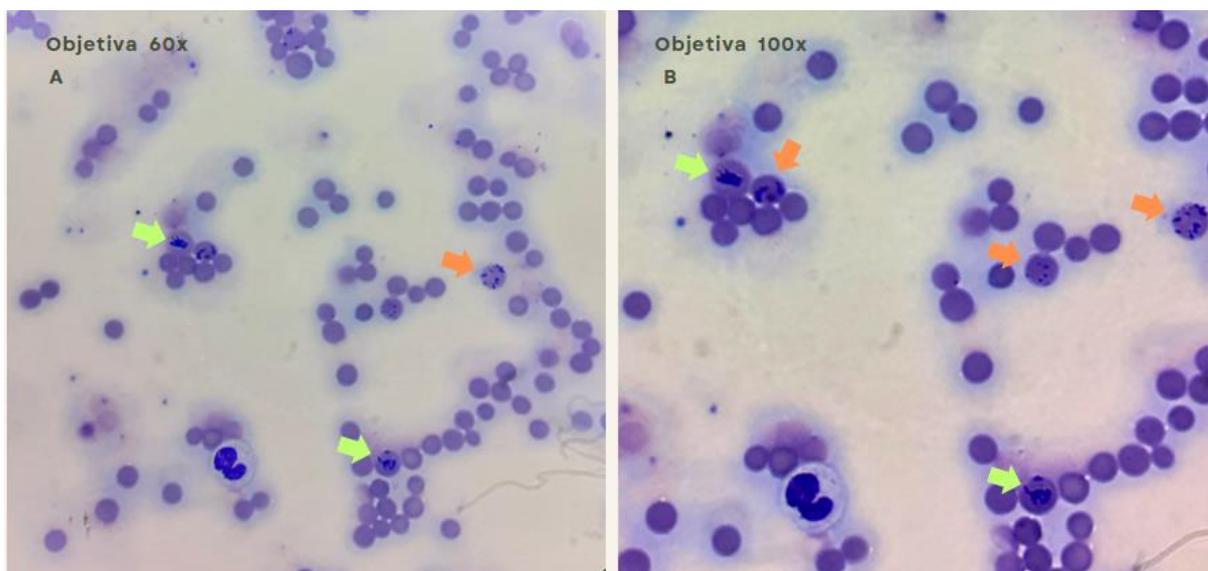
Flatland e Freeman (2018) testaram a metodologia para o CQ baseado em testes repetidos de pacientes e utilizaram como parâmetros a serem testados os

valores de leucócitos totais, eritrócitos totais, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio e plaquetas, dentre os analitos a quantificação plaquetária resultou em maior desvio padrão, coeficiente de variação e TEa. As conclusões foram positivas em diversos aspectos como a ausência de deterioração do material controle ao longo do tempo, possibilidade de utilizar uma amostra que seja espécie-específica, baixo custo, entre outros. Todavia ressaltou-se a necessidade de mais estudos com amostras de pacientes com alterações morfológicas e patológicas para a comparação com pacientes sem modificações celulares, o que corrobora com os pontos abordados por Nabity *et al.* (2018) que avaliaram que quanto maior a variação das plaquetas, maior será a possibilidade de erro sistemático na contagem.

5.3 Reticulócitos

A contagem automatizada de reticulócitos está melhor difundida entre a medicina laboratorial humana, para a medicina veterinária majoritariamente é contabilizada por metodologias manuais. Apesar de haver estreita correlação entre as contagens manual e automatizada, Nabity *et al.* (2018) salientam que o método manual tenha maior variação quando comparada a automatizada. O fundamento da necessidade de controle espécie-específico novamente entra em indagação pois há diferenças fisiológicas consideráveis não apenas na interpretação, mas também no próprio método de contagem. Os reticulócitos felinos são classificados em agregados e pontilhados (**Figura 8**), a qual devem ser contabilizados separadamente pela resposta fisiológica ser distinta, aumentando assim o coeficiente de variação para esse analito. Para os cães não há essa diferenciação, mas o coeficiente de variação necessariamente deve ser inferior pois a pequena diferença pode categorizar a resposta medular como arregenerativa ou regenerativa. A contagem de reticulócitos para equinos não é relevante clinicamente e a metodologia laboratorial pode levar a falhas na interpretação devido a elevada probabilidade de erro quando a concentração for $<60.000/\mu\text{L}$ (Nabity *et al.*, 2018).

Figura 8: Imagens de microscopia óptica de extensão sanguínea em lâmina de amostra para contagem de reticulócitos de felino. A – Campo em objetiva de 60x, reticulócitos pontilhados (setas laranjas) e reticulócitos agregados (setas verdes). B – Campo em objetiva de 100x evidenciando os detalhes dos reticulócitos felinos que serão contabilizados separadamente e relatados em laudo pelo profissional.



Fonte: Arquivo pessoal.

6. CONCLUSÃO

O PCQ é um desafio constante para os Laboratórios de Análises Veterinárias. Para a hematologia veterinária existe a atribuição de diferentes itens a serem quantificados e qualificados perante a diversidade de espécies e raças em seus estados fisiológicos e fisiopatológicos. Programas engessados não se aplicam a todas as realidades pois cada estabelecimento tem sua demanda e esse processo de busca pela melhor metodologia envolve todas as fases analíticas. A revisão da literatura demonstra que esse é um campo com amplo potencial de pesquisa e ressalta que as tecnologias são potentes aliados dos técnicos capacitados para executar as análises, porém não substituem os profissionais qualificados para validar os resultados. Aponta-se a possibilidade de utilizar amostra controle na rotina, o que reduziria os custos e promove a opção de ser espécie-específica. O planejamento para a qualidade tem o potencial de minimizar custos e diminuir erros, gerando resultados precisos e por consequência maior credibilidade a medicina laboratorial veterinária perante o mercado pela sua excelência.

7. REFERÊNCIAS

- BADRICK, T. *et al.* Patient-based real-time quality control: Review and recommendations. **Clinical Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 962–971, 2019.
- BERLITZ, F.A. Controle da qualidade no laboratório clínico: alinhando melhoria de processos, confiabilidade e segurança do paciente. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 5, p. 353-363, 2010.
- CARISCH, L. *et al.* White blood cell count in birds: evaluation of a commercially available method. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 93, 2019.
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). Resolução No 1.374, de 2 de dezembro de 2020. 12 fev. 2020.
- DALY, S.; FREEMAN, K. P.; GRAHAM, P. A. Evaluation of Sysmex XT-2000iV analyzer performance across a network of five veterinary laboratories using a commercially available quality control material. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 50, n. 4, p. 568–578, 2021.
- DALY, S.; GRAHAM, P. A.; FREEMAN, K. P. Quality control validation for a veterinary laboratory network of six Sysmex XT-2000iV hematology analyzers. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 51, n. 4, p. 565–576, 2022.
- DE PÁDUA COSTA, M. **Avaliação hematológica de sangue e medula óssea e bioquímica sérica de cães infectados naturalmente por hemoparasitas**. Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.
- FLATLAND, B.; FREEMAN, K. P. Repeat patient testing shows promise as a quality control method for veterinary hematology testing. *Veterinary clinical pathology*, v. 47, n. 2, p. 252–266, 2018.
- GONÇALVES, V. M. **Alterações hematológicas em cães com suspeita clínica de hemoparasitoses atendidos na rotina clínica do Hospital Veterinário do CCA, UFPB**. Areia, Paraíba.: Repositorio UFPB, 2018.
- GREBERT, M. *et al.* Validation of the Sysmex XN-V hematology analyzer for canine specimens. *Veterinary clinical pathology*, v. 50, n. 2, p. 184–197, 2020.
- LAGES, G.F.G. **Controle de qualidade em hematologia: enfoque para aparelhos automatizados**. Belo Horizonte, MG: Univeridade Federal de Minas Gerais, 2010.
- MARTELLI, A. Gestão da Qualidade em Laboratórios de Análises Clínicas. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**;13(Esp), p. 363–368, 2011.
- NABITY, M. B. *et al.* ASVCP guidelines: Allowable total error hematology. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 47, n. 1, p. 9–21, 2018.
- SCHMIDT, R. L.; PEARSON, L. N. Estimating the cost of quality of errors in the analytical phase. **Clinica Chimica acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 495, p. 60–66, 2019.

THONGSAHUAN, S. *et al.* Precision and accuracy of the Mindray BC-5000Vet hematology analyzer for canine and feline blood. *Veterinary clinical pathology*, v. 49, n. 2, p. 207–216, 2020.

VANYO, L. C. *et al.* Comparison of traditional statistical quality control using commercially available control materials and two patient-based quality control procedures for the ADVIA 120 Hematology System. ***Veterinary Clinical Pathology***, v. 47, n. 3, p. 368–376, 2018.

ZAHND, R. *et al.* Investigation of the status quo of veterinary point-of-care laboratories in Switzerland: Availability, application, and quality management. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, v. 162, n. 3, p. 163–173, 2020.

APÊNDICE

Arquivo Suplementar

("quality control"[MeSH Terms]) AND (("veterinary"[All Fields] AND "laboratories"[All Fields]) OR ("veterinary"[All Fields] AND "clinical"[All Fields] AND "analysis"[All Fields]) OR ("veterinary"[All Fields] AND "clinical"[All Fields] AND "pathology"[All Fields]) OR ("veterinary" [All Fields] AND "hematology" [All Fields]) OR ("veterinary"[All Fields] AND "hematological"[All Fields]) OR ("analytical"[All Fields] AND "errors"[All Fields]))

Repositório: Pubmed

Data da busca: 09 de fevereiro de 2023

Total de acessos: 638 (sem tempo de restrição)

Acessos: 106

Período de restrição: 2018 a 2023

Arquivo salvo como formato: PubMed (.txt)

ALL=("quality control"* AND ("veterinary laboratories" OR "veterinary clinical analysis" OR "veterinary clinical pathology" OR "veterinary hematology" OR "veterinary hematological" OR "analytical errors"))

Repositório: Web of Science

Data da busca: 09 de fevereiro de 2023

Acessos: 151 (sem tempo de restrição)

Acessos: 48

Período de restrição: 2018 a 2023

Arquivo salvo como formato: Arquivo de texto sem formatação (.txt)