COMPARAÇÃO DE CONTAGEM DE PLAQUETAS PELOS MÉTODOS: AUTOMATIZADO, FONIO E O´CONNOR EM AMOSTRAS DE CÃES

Leoberto de Lima, Paulo Cesar Naoum, Flávio Augusto Naoum.

Academia de Ciência e Tecnologia, rua Bonfá Natla, 1860, Bairro Santos Dumont, 15020-130, São José do Rio Preto, SP, a.c.t@terra.com.br , leobertolima@gmail.com

Resumo

A contagem de plaquetas é importante estar dentro dos valores da normalidade porque essas células fazem parte da cogaulação sanguínea do animal acidentado ou portador de patologias, o método mais comum para contagem manual é por Fonio, ou Barbara O´Connor mais recentemente, através de esfregaço sanguíneo corado por corante hematológico e contado em microscopia óptico em aumento final de 1000X, no entando muitos médicos veterinários optam em liberar o resultado somente pelo equipamento automatizado que requer uma atenção maior na sua manutenção preventiva. Foi analisado 38 amostras de cães, fêmeas e machos, e comparado as contagens pelos métodos automatizado, Fonio que é o procedimento mais antigo e padronizado na maiora dos laboratório e pelo método de Barbara O´Connor que é mais rápido no calculos finais e mais recente na literatura. Ambos os métodos manuais demonstraram ser confiáveis e o método Barbara O´Connor apresentou 92% de resultados muito semelhante numericamente ao método de Fonio, podendo ser utilizado em rotina laboratorial veterinário, sempre associado a análise da morfologia das plaquetas em outros campos se for necessário para confirmação do valor alterado.

Palavras-chave: Plaquetas. Fonio. Hematologia.

Área do Conhecimento: Biomedicina.

Introdução

As plaquetas dos animais são produzidas a partir do citoplasma de megacariócitos na medula óssea, pela formação de uma estrutura conhecida na medicina veterinária como pró-plaquetas, que se fragmenta em várias plaquetas distintas e migram para a corrente sanguínea (REAGEN et al, 2011).

Trombócitos ou plaquetas na corrente sanguínea são morfologicamente muito semelhantes nas espécies domésticas e de animais de laboratório, são células pequenas, anucleadas, discóides, normalmente apresentam de 2 a 4µm de diâmetro. Porém, se estiverem ativadas durante o procedimento de coleta, as plaquetas podem apresentar múltiplas projeções delicadas. Se uma quantidade suficiente de plaquetas estiver ativada, elas vão coalescer e formar agregados grandes. Às vezes é difícil distinguir as plaquetas isoladamente nesses agregados (REAGEN et al, 2011). O estresse no animal pode aumentar temporariamente a contagem de leucócitos e plaquetas na corrente sanguínea mesmo em condições normais de saúde, principalmente em felinos, e nos cães que não estão acostumados com o convívio de pessoas diferentes do seu ambiente habitual (NEVES, 2021). Esse estresse pode ativar as plaquetas formando pequenos agregados que no equipamento automatizado poderá contar como sendo apenas uma plaqueta (SOUZA, 2025). Para evitar liberação de falsos resultados com plaquetopenia no laudo do hemograma é rotineiro ser realizado contagem de plaquetas manualmente, pelo método de fonio, e liberar esse resultado no laudo mesmo quando muito próximo do valor obtido no equipamento. Como o laboratório não tem como saber qual animal passou por estresse no momento da coleta torna necessário, como garantia de qualidade nos resultados, realizar contagem de plaquetas manualmente em todas amostras de hemograma.

A contagem de plaquetas por microscopia deve ser realizada através de uma extensão de amostra de sangue coletada com anticoagulante ácido etileno-diamino-tetraacético dipotássico (EDTA-2K), por ser de forma não líquida dentro das primeiras três horas após a coleta em um lâmina nova, o esfregaço deve ser contínuo com partes de cabeça, corpo e cauda, analisar na região do corpo que deve estar em monocamada extendida, corado por corante hematológico, verificar possíveis alterações na morfologia das hemácias, leucócitos e plaquetas, pesquisar pela presença de hemoparasitas dentro e fora das células, mesmo que o médico veterinário não tenha solicitado junto com o hemograma (GARCIA-NAVARRO, 2005; ALMEIDA, 2009; VILLALBA, 2021). O valor de referência para caninos é de 200 a 500 mil/mm^3 (WEISS, 2010

Metodologia

Para a obtenção dos resultados foi utilizado 38 amostras de sangue de cães da rotina do Centro de Diagnóstico Laboratorial (CDLAB) da Universidade do Vale do Paraiba (UNIVAP), com a colaboração da médica veterinária Maria Luisa Franchini responsável pela passagem de todas as amostras de sangue animal no equipamento hematológico veterinário EXIGO H400, realizar esfregaços sanguíneos com sangue com edta-2k, corar pelo método Panótico no tempo de coloração protocolado pelo CDLAB, realizar contagem de plaquetas pelo método de Fonio e liberar o laudo com essa contagem manual independente da contagem automatizada porque a classe médica veterinária prefere confiar na contagem de plaquetas por Fonio, foram separadas as lâminas indetificadas pelo cadastro do animal para que esse autor, responsável técnico pelo CDLAB junto a Vigilância Sanitária, realizasse a contagem de Plaquetas pelo método de Barbara O´Conor e realizar as comparações numéricas. Estas 38 amostras foram realizadas entre os períodos de 07 a 22 de janeiro de 2025. Em todas as etapas do trabalho foi mantido o sigilo das informações dos animais e tutores. O trabalho envolve pesquisa com banco de dados provenientes de animais, contudo, não houve necessidade de aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA), de acordo com a normativa nº 22/2015 do CONCEA, conforme orientação do CEUA da UNIVAP. Os dados foram, primeiramente, compilados em uma planilha no Excel®.

Para obtenção dos dados desse trabalho foram utilizados somente animais caninos, independente do sexo, raça e idade, são amostras da rotina coletados na Clínica Veterinária Escola da Universidade do Vale do Paraíba (CVET/UNIVAP) por médicos veterinários, seguindo as orientações de coleta do CDLAB. Os resultados de exames de contagem de plaquetas pelos três métodos foram tabulados e interpretados utilizando os parâmetros de referência do CDLAB, para os cães, machos e fêmeas, é de 200 a 500 mil/mm^3.

O anticoagulante de escolha na patologia clínica veterinária é o ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA) dipotássico (EDTA-K2) por apresentar-se em forma sólida ao contrário do tripotássico (EDTA-K3) ser em solução 15%, evitando desta forma hemodiluição em casos de coletas com volume de sangue inferior ao necessário, para cães de pequeno porte é utilziados microtubos de volume máximo de 0,5mL de sangue com EDTA-K2.

Contagem de plaquetas pelo método eletrônico: o equipamento HEXIGO H400 utiliza o sistema de impedância elétrica aplicado à contagem das plaquetas e tem como base o princípio de “Coulter”, a contagem tem como base quantificar através de alterações numa corrente elétrica durante a passagem de partículas de plaquetas em suspensão numa solução salina isotônica e de boa condução elétrica, através de um pequeno orifício localizado entre dois eletrodos. As células sanguíneas não são condutoras de corrente elétrica por isso a passagem de cada plaqueta através de orifício causa uma diferença de potencial entre os dois eletrodos, essa alteração da corrente elétrica resulta um pulso elétrico proporcional a quantidade de plaquetas da amostra em análise. A metodologia de impedância é utilizada por equipamentos eletrônicos para a contagem de plaquetas e leucócitos com prévia hemólise dos glóbulos vermelhos a partir de uma fração de aspiração de amostra sanguínea. A diferença entre plaqueta e leucócitos são analisados com base no seu volume celular, sendo que as plaquetas não são nucleadas e tem volume menor, portanto, originam um pulso elétrico de menor amplitude; o número de pulsos somados indica o número de plaquetas pelo equipamento (BOULE, 2018).

Confecção e coloração de esfregaço sanguíneo: homogenizar a amostra de sangue por inversão por cinco vezes se for tubo de coleta e por 10 vezes se for microtubo de coleta, com volume máximo de 0,5mL, com o cuidado para evitar hemólise, com ajuda de um capilar transferir uma pequena gota para o início de uma lâmina nova de vidro, fazer a extensão da amostra de modo que tenha cabeça, corpo e cauda de forma uniformizada, secar imediatamente ao ar ou ventoinha não aquecida para que as células possam ficar abertas e facilitar a análise microscópica, principalmente em casos de inclusões e parasitas (POP 05 CDLAB, 2020). A coloração pode ser qualquer corante hematológico, devido aos custos vem sendo utilizado com frequência o corante rápido do tipo Panótico, formado por três reagentes de fácil manuseio porém deve ser utilizado com critérios, manter os frascos em uso sempre fechados quando não em uso, retirar os excesso de corante das lâminas entre um reagente e outro e aumentar o tempo no reagente número 2 de cinco segundos para 10 segundos, com a finalidade em deixar as hemácias mais rosadas e facilitar a visualização de inclusões e parasitas (POP 06 CDLAB, 2020).

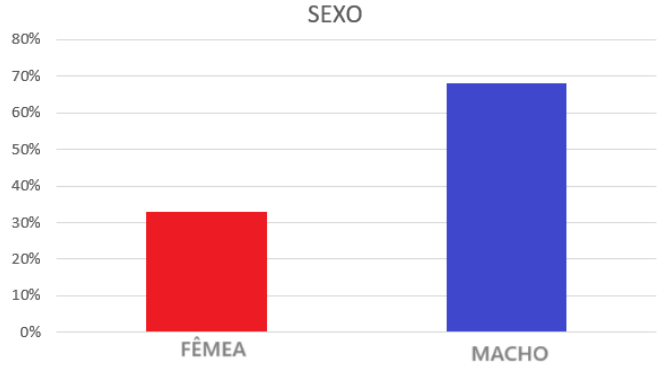
Contagem de plaquetas pelo método de Fonio: utilizar lâminas com esfregaços sanguíneos corados, observar em microscopia óptico com aumento final de 1000X com auxílio de óleo mineral para imersão, optar pelo NUJOL vendido em Farmácias populares porque é transparente e menos viscoso facilitando a limpeza das lentes do microscópio e permite uma análise mais transparente à realidade, procurar por campos onde as hemácias não estejam sobrepostas e evitar a cauda onde a dispersão das hemácias são maiores. Realizar contagem de 10 campos com média de 100 a 200 hemácias por campo, contando as hemácias e plaquetas por campo, realizar somatória e fazer o cálculo: número de plaquetas multiplicado pelo número das hemácias por mm^3 obtido pelo equipamento eletrônico e dividir por 1000, o resultado será o número de plaquetas por mm^3 de sangue (POP 10 CDLAB, 2020; LIMA, 1977).

Contagem de plaquetas pelo método de Barbara H. O´Connor: os mesmos cuidados realizado pelo método de Fonio com relação a localização de campos para contagem nos esfregaços sanguíneos, óleo de imersão em aumento final de 1000X. Realizar contagem de 10 campos aleatórios porém houve o cuidado em não escolher campos onde as hemácias não estavam sobrepostas, somado somente as plaquetas desses 10 campos e, em seguida, calculou-se o valor médio por campo e este valor foi multiplicado por 13000 (constante de multiplicação) para fornecer o valor estimado da contagem de plaquetas por mm^3 de sangue (COMAR, 2009).

Resultados

A coleta dos dados e lâmina hematológica para a análise foi realizada selecionando 38 amostras de sangue de cães entre os dias 07 e 22 de janeiro de 2025, amostras coletadas na Clínica Veterinária Escola da Universidade do Vale do Paraíba (CVET/UNIVAP) onde são atendidos animais com seus tutores através do convênio com a Prefeitura Municipal de São José dos Campos e atendimentos particulares, na sua maioria animais que estão apresentando algum tipo de situação clínica e o hemograma é o exame laboratorial mais comum para auxiliar no diagnóstico clínico veterinário. Essas amostras foram encaminhadas para o CDLAB da mesma Instituição de Ensino, localizado no mesmo bloco, em andar superior, para início das análises. A contagem de plaquetas ocorreu em cães, sendo 68% machos e 33% fêmeas, porém, os valores de normalidade das plaquetas são iguais para ambos os sexos (Figura 1)

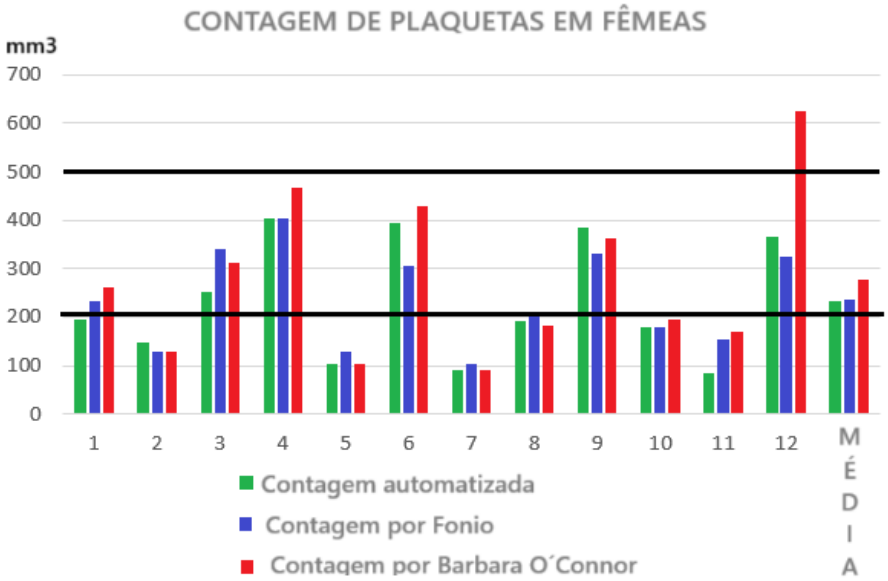
Tabela 1: frequência conforme sexualidade dos cães na pesquisa das plaquetas.



Fonte: Autor, 2025

Das 12 contagens de plaquetas de cães fêmeas cinco amostras tiveram resultados dentro da faixa da normalidade nos três métodos de contagem, e cinco amostras com plaquetopenia foram visualizadas também nos três métodos de contagem, apenas nas amostras 8 e 12 da Tabela 2 demonstrou incoerência nas contagens eletrônico e pelo método de Barbara O´Connor, visualizadas somente após a conclusão das 38 contagens porque em todas as contagens foi realizada somente uma análise sem verificar anteriormente os resultados obtidos pelo equipamento e pelo método de Fonio e não foi realizado nova contagem de plaquetas nestas amostras.

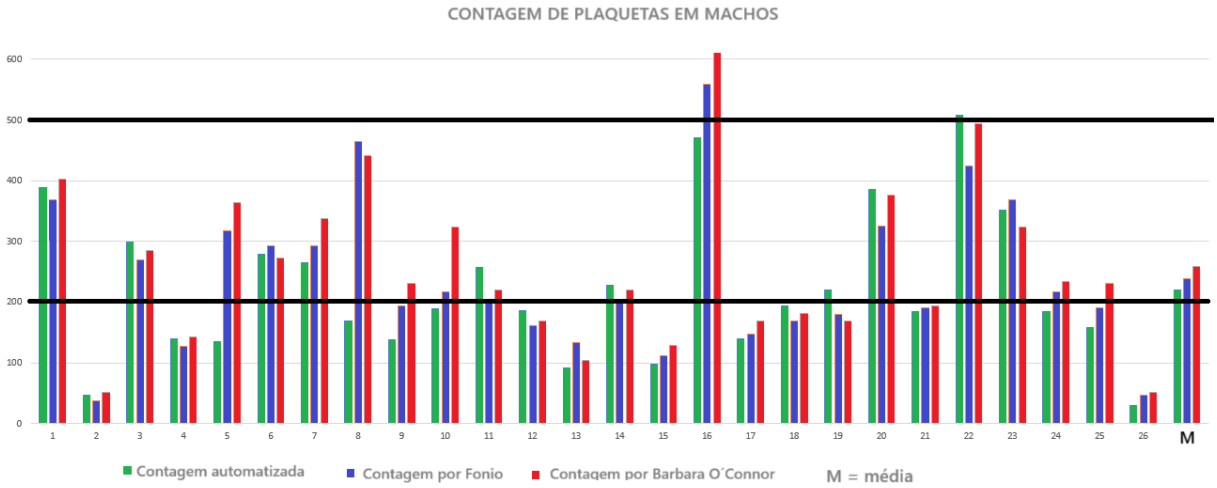
Tabela 2: resultados das contagens de plaquetas nas 12 amostras de cães fêmeas pelos métodos automatizado, Fonio e Barbara O´Connor.



Fonte: Autor, 2025

Entre as 26 contagens de plaquetas de cães machos 13 amostras tiveram resultados dentro da faixa da normalidade nos três métodos de contagem, e nas 11 amostras com plaquetopenia foram visualizadas também nos três métodos de contagem, no entanto na amostra 25 na Tabela 3 ocorreu pequena diferença do método de Fonio com relação aos outros métodos, porém não fez parte dessa pesquisa visualizar na lâmina a presença de grumos plaquetários para complementar essa análise, mas o resultado liberado nos laudos do CDLAB são todos pelo método de Fonio. Na amostra 16 é visualizado plaquetose nos métodos Fonio e Barbara O´Connor.

Tabela 3: resultados das contagens de plaquetas nas 26 amostras de cães machos pelos métodos automatizado, Fonio e Barbara O´Connor.



Fonte: Autor, 2025

Discussão

A mensuração por meio da contagem de plaquetas é essencial para conhecer o estado fisiológico dos animais (MENDONÇA, 2004; THRALL, *et al.*, 2015). De acordo com Garcia-Navarro (2005) a célula

fonte orgina a UFCmg (unidade formadora de colônias megacariocíticas) que dá origem ao megacarioblasto que vai originar o megacariócito que possui um citoplasma de tamanho grande, do qual se desprendem fragmento chamados de trombócitos ou plaquetas, que deixam a medula óssea e passam para o sangue periférico, onde contribui muito para o processo da coagulação sanguinea, principalmente na coagulação primária, e para melhor recuperação do animal é necessário que a contagem esteja dentro dos valores de normalidade que para cães é de 200 a 500 mil plaquetas por cada mm^3 de sangue.

Os dados analisados nas Figuras 2 e 3, permitem observar que em 47% das 38 amostras apresentarem contagem de plaquetograma dentro da normalidade pelos três métodos. Conforme REAGAN *et al* (2011) a trombocitopenia em cães é uma situação caracterizada pela redução ou falta severa de trombócitos no sangue e que são fundamentais para a saúde do animal, porque as plaquetas atuam na cicatrização e recuperação nos casosquando o cão se machuca, no entanto, a preocupação é maior quando é decorrente a hemorragias internas e estas tornam mais frequentes diante de extensa possíveis causas. Na pesquisa foi constato e confirmado pelos três métodos 42% de plaquetopenia, abaixo de 200 mil plaquetas por mm^3 de sangue, porém conforme SOBRINHO *et al.* (2024) é mais preocupante as plaquetopenias abaixo de 166 mil/mm^3.

A Patologia Clínica Veterinária ainda carece de mais livros e artigos atualizados na medicina veterinária brasileira, todo tipo de pesquisa será relevante para alimentar a bibliografia.

A recomendação na hematologia veterinária é realizar em todos os hemogramas a confecção da lâmina hematológica não só para a confirmação da contagem de plaquetas como também na pesquisa de hematozoários que na área veterinária não é raro encontrar dentro das hemácias, leucócitos, plaquetas e fora das células, esses parasitas hematológicos em sua grande maioria causam hemólise intravascular contribuindo para o rápido consumo das plaquetas circulantes e de reserva na medula óssea.

Conclusão

As análises das plaquetas pelos métodos de Fonio e da Barbara O´Connor demonstraram serem bem confiáveis, ficando a critério do profissional a escolha na rotina laboratorial veterinária em amostras de cães, no entanto, para melhor avaliação será necessário uma pesquisa mais ampla e com maior interesse em amostras com felinos principalmente, pelo fato de que os gatos são em sua grande maioria estressados no momento da coleta, sendo necessário nessa espécie animal a obrigatoriedade da contagem de plaquetas pelo método manual e o método de Barbara O´Connor é a mais rápida no cálculo.

Referências

ALMEIDA, L. **Existe diferença entre EDTA K3 e EDTA K2?** Revista Newslab, 31/07/2009. Disponível em: https://newslab.com.br/firstlab-responde-existe-diferenca-entre-edta-k3-e-edta-k2/

BOULE Medical AB©. **Exigo H400 User Manual Veterinary Hematology Analyzer**. March, 2018.

SOBRINHO, L.R.; MARTINS, B.E.; LIMA, L.; OLIVEIRA, M.S. **Análise das citopenais de cães adultos no Centro de Disgnóstico Laboratorial da UNIVAP**. 22° Congresso de Saúde e Qualidade de Vida do Cone Leste Paulista, Anais, pág. 12, 2024.

COMAR, S.R.; DANCHURA, H.S.M.; SILVA, P.H. **Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 31 (6), 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000087

GARCIA-NAVARRO, C.E.K. **Manual de hematologia veterinária**. Editora Livraria Varela, 2o edição, pág. 151, 2005.

LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. Editora Guanabara Koogan, 5o edição, pág. 408, 1977

MENDONÇA, A. J. **Avaliação do perfil hemostático, hematológico e bioquímico de cães com doença hepática**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária. 2004.

NEVES, V.S.; MONTEIRO, M.V.B. **Influência dos erros pré-analíticos do hemograma**. Cartilha veterinária educativa, 2021, pag. 14.

POP 05 CDLAB. **Procedimento técnico de confecção de esfregaços sanguíneos em amostras de sangue de humano e veterinário**. Fevereiro, 2020.

POP 06 CDLAB. **Procedimento técnico de coloração hematológico pelo método rápido em esfregaços sanguíneos em amostras de sangue de humano e veterinário**. Fevereiro, 2020.

POP 10 CDLAB. **Procedimento técnico de contagem de plaquetas pelo método de Fonio em esfregaços sanguíneos em amostras de sangue de humano e veterinário**. Março, 2020.

REAGAN, W.J.; ROVIRA, A.R.I.; DeNICOLA, D.B. **Atlas de Hematologia Veterinária: espécies domésticas e não domésticos comuns**. Editora Revinter, 2º edição, pág. 5 e 55, 2011.

SOUZA, Lais. **Plaquetas e Suas Instabilidades: Compreenda a Complexidade das Análises Clínicas Veterinárias**. Diagnóstico Academy, 11/02/2025. Disponível em: https://www.diagnosticolab.com.br/academia/artigos/plaquetas-e-suas-instabilidades-compreenda-a-complexidade-das-analises-clinicas-veterinarias

THRALL, M.A. *et al*. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

VILLALBA, I.L.; SÁNCHEZ, I.M. **Guia Prático de interpretação laboratorial e diagnóstico diferencial de pequenos animais**. Editora MedVet, pág. 4 e 5. 2021.

WEISS, D.J.; WARDROP, J.K. (Ed.) **Schalm`s Veterinary Hematology**, 6 ed., Ames-USA: Wiley-Blacwell Publication, 1206p., 2010.

Agradecimentos

Agradeço a colaboração da médica veterinária Maria Luisa Franchini (CRMV-SP: 07939) responsável pelos exames laboratoriais veterinários no CDLAB por ter separado todas as lâminas em que realizou a contagem de plaquetas pelo método de Fonio para a realização da contagem pelo método da Bárbara O´Coonor, usar a mesma lâmina foi fundamental para o sucesso desse trabalho.