

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**VALIDAÇÃO DO ANALISADOR HEMATOLÓGICO
AUTOMÁTICO BC-2800 VET[®] PARA REALIZAÇÃO DE
HEMOGRAMAS DE MUARES**

Gislaine Matias Dantas Miranda
Médica Veterinária

ARAÇATUBA-SP

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**VALIDAÇÃO DO ANALISADOR HEMATOLÓGICO
AUTOMÁTICO BC-2800 VET[®] PARA REALIZAÇÃO DE
HEMOGRAMAS DE MUARES**

Gislaine Matias Dantas Miranda

Orientador: Prof. Luiz Claudio Nogueira Mendes

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Clínica Médica e Cirúrgica de Grandes Animais).

ARAÇATUBA – SP

2014

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Miranda, Gislaine Matias Dantas

M672v

Validação do analisador hematológico automático BC-2800 VET® para realização de hemogramas de Múes / Gislaine Matias Dantas Miranda. – Araçatuba: [s.n], 2014.
35 f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2014.
Orientador: Prof. Adj. Luiz Claudio Nogueira Mendes

1.Hemograma. 2. Contador de células. 3. Granulócitos. 4. Viés I. T.

CDD 616.07561



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Validação do analisador hematológico automático BC-2800 Vet® para realização de hemogramas de muare

AUTORA: GISLAINE MATIAS DANTAS MIRANDA

ORIENTADOR: Dr. LUIZ CLÁUDIO NOGUEIRA MENDES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dra. LINA MARIA WEHRLE GOMIDE


Dr. RAIMUNDO SOUZA LOPES


Dr. LUIZ CLÁUDIO NOGUEIRA MENDES

DATA DA REALIZAÇÃO: 28 de fevereiro de 2014.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. LUIZ CLÁUDIO NOGUEIRA MENDES
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GISLAINE MATIAS DANTAS MIRANDA – Nascida em Araçatuba - SP em 02 de outubro de 1986. Iniciou e concluiu o curso de Medicina Veterinária nas Faculdades Adamantinenses Integradas - FAI, em Adamantina, São Paulo (2004-2008). Realizou o estágio curricular no Matadouro Frigorífico e Fabrica de Conservas – JBS/SA – unidade de Andradina-SP (2008). Trabalhou no Matadouro Frigorífico e Fabrica de Conservas – JBS SA – Unidade de Andradina e Presidente Epitácio como médica veterinária responsável técnica e supervisora da garantia da qualidade (2009-2011), também como responsável técnica da fabrica de conservas JBS/SA – Unidade de Guararapes – SP (2012-2013). Atualmente exerce a função de gerente do controle de qualidade no matadouro frigorífico Ask Foods Imp. Exp. Ltda – unidade de Guararapes-SP (2011 – atual). Iniciou e concluiu o programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Mestrado), na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, São Paulo (2012-2014).

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Rosa e Matias, que nunca mediram esforços para que meus sonhos pudessem ser realizados.

Ao meu marido Reginaldo, pelo apoio e simplesmente por existir em minha vida.

Ao meu irmão Marcelo e cunhada Karina, por torcerem e rezarem por mim.

GRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele.

Aos meus pais: Adelino Jacó Matias Dantas e Rosalina da Cunha Matias Dantas; pessoas magníficas e incomparáveis pelo qual recebi o dom mais precioso do universo: a vida. Por isso seria infinitamente grata. Mas, não se contentaram em presentear-me apenas com ela. Revestiram minha existência de amor, carinho, dedicação e confiança. Cultivaram em mim todos os valores que me transformaram num adulto responsável e consciente. Abriram a porta do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o estudo. Trabalharam dobrado, sacrificaram seus sonhos em favor dos meus, não foram apenas pais, mas amigos e companheiros, mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes, inatingíveis... e o estudo um fardo pesado demais. Muitas foram às vezes que o meu cansaço e preocupações foram sentidos e compartilhados, numa união que me incentivava a prosseguir. Obrigada por se orgulharem de minhas conquistas e me apoiarem em meus tropeços. Vocês serão sempre meus melhores amigos e eternos mestres. Hoje é com profundo amor e gratidão que dedico essa vitória a vocês.

Meu marido, Reginaldo de Lima Miranda, ser humano perfeito que me ensinou que o amor é o maior dos sentidos, que o carinho é essencial, que a vida é uma dádiva de Deus, que cada gesto é um grande gesto; que o caminho certo está lá, basta querer vê-lo; que é possível sonhar quando já não há mais esperanças. Obrigada por todo o apoio, carinho, compreensão e incentivo; por tornar minha vida mais completa, por ter feito dos seus sonhos, nossos sonhos; por viver minhas dificuldades e comemorar minhas conquistas; por estar ao meu lado e ser perfeito. Tudo foi mais fácil porque você estava do meu lado. Eu te amo!

Ao meu orientador Prof. Luiz Claudio Nogueira Mendes por todo o conhecimento transmitido, pela paciência, carinho, compreensão, por acreditar

em mim e aceitar ser meu orientador. Além de agradecer por tudo que fez por mim, peço-lhe desculpas pelas falhas. Serei eternamente grata a você!

Ao amigo Whelerson Vitro e ao professor Carlos Belluzzo, por me incentivar a iniciar o programa de pós-graduação – mestrado. Valeu!

Ao amigo Anderson Diego por sempre ajudar quando precisei. Obrigada pelo companheirismo e amizade!

A todos os colegas que participaram deste projeto, direta ou indiretamente.

Todos do setor de pós-graduação e em especial a Isabel funcionária da biblioteca que muito contribuiu para que meu trabalho ficasse perfeito.

A Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – Araçatuba, pela viabilização do projeto.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

Página

SUMÁRIO	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS	
CAPÍTULO II – VALIDAÇÃO DO ANALISADOR HEMATOLÓGICO AUTOMÁTICO BC-2800® VET PARA REALIZAÇÃO DE HEMOGRAMA DE MUARES.....	
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3. RESULTADOS.....	22
4. DISCUSSÃO	25
5. CONCLUSÃO	27
6. REFERÊNCIAS.....	30

LISTA DE TABELA

Página

Tabela 1- Valores médios, desvio padrão, equação de regressão, correlação de Pearson e diferença média de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, granulócitos, linfócitos e monócitos no sangue venoso de 30 muaras, usando o analisador automático BC-2800 Vet [®] e o método de contagem manual de células	25
--	-----------

LISTA DE FIGURA

	Página
FIGURA 1 - Gráficos de Bland-Altman representando os resultados das amostras de sangue venoso de muarees analisados pelo BC-2800vet [®] e a contagem manual de células. As diferenças entre os resultados destes métodos estão representadas no eixo y e o valor médio de cada variável para ambos os métodos está plotado no eixo x. A diferença média (viés [linha sólida]) e os limites de concordância de 95% (viés \pm 2 desvios padrão [linhas pontilhadas]) estão representados. Os valores localizados fora dos limites de concordância de 95% são considerados “outliers”	26

VALIDAÇÃO DO ANALISADOR HEMATOLÓGICO AUTOMÁTICO BC-2800 VET[®] PARA REALIZAÇÃO DE HEMOGRAMAS DE MUARES.

RESUMO - Neste estudo foram comparados os valores do hemograma completo realizado em 30 muares com idade entre 4 e 8 anos, obtidos pelo uso de um analisador hematológico automático e pela contagem manual de células sanguíneas. A análise dos resultados revelou que a concordância entre os dois métodos foram considerados bons uma vez que o viés (média das diferenças) foi pequeno, sendo que os intervalos de confiança de 95% para o viés apresentaram-se estreitos e apenas um “outlier” foi observado, para eritrócitos, monócitos e granulócitos (nenhum valor caiu fora dos limites de concordância [viés \pm 2 desvios padrão]). Não houve diferença significativa para os valores de eritrócitos, hemoglobina, leucócitos e granulócitos. Os valores médios de monócitos obtidos pelo contador automático de células foram significativamente maiores do que aqueles obtidos pelo método manual. A análise dos resultados revelou ainda um viés positivo para hematócrito e nenhum viés foi detectado para eritrócitos, hemoglobina, leucócitos, granulócitos e linfócitos. Foi observada boa concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos para eritrócitos, hemoglobina, leucócitos, granulócitos, linfócitos e monócitos nessa faixa etária. Podendo o Analisador hematológico automático BC-2800Vet[®], ser utilizado para realização de hemogramas em muares.

Palavras-chave: contador de células, hemograma, granulócitos, viés

VALIDATION OF AUTOMATED HEMATOLOGY ANALYZER BC-2800 VET[®] FOR PERFORMING BLOOD COUNTS MULES.

ABSTRACT - In this study the values of complete blood counts performed in 30 mules aged 4 and 8, obtained by using an automated hematology analyzer and the manual blood counts were compared. The results showed that the correlation between the two methods were considered good since the bias (mean difference) was small, and the confidence intervals of 95 % for the bias showed up narrow and only one "outlier" was observed for erythrocytes, monocytes and granulocytes (no value fell outside the limits of agreement [bias \pm 2 standard deviations]). There was no significant difference in the values of erythrocytes, hemoglobin, leukocytes and granulocytes. The average values obtained from monocytes by an automatic cell counter were significantly higher than those obtained by the manual method. The results also showed a positive bias for hematocrit and no bias was detected in erythrocytes, hemoglobin, leukocytes, granulocytes and lymphocytes. Good agreement between the results obtained by the two methods for erythrocytes, hemoglobin, leukocytes, granulocytes, lymphocytes and monocytes was observed in this age group. Can the automated hematology analyzer BC-2800Vet[®] be used to perform complete blood counts in mules.

Keywords: counter of cells, hemogram, granulocytes, bias

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A hematologia clínica é uma importante área de estudo sobre o estado de saúde dos animais, tendo o hemograma como um método auxiliar para a avaliação de diagnóstico e prognóstico de enfermidades (SWENSON, 1988; JAIN, 1993). O hemograma é um dos exames complementares de diagnóstico, por permitir uma quantificação dos elementos celulares do sangue. É constituído pelo eritograma, leucograma e contagem de plaquetas (DESCAT, 2002; FAILACE, 2003).

Um analisador automatizado pode avaliar de dez mil a trinta mil células em um único processo, tornando este muito mais sensível uma vez que o encontro de células raras torna-se mais freqüente. Além disso, a análise da distensão sanguínea não só consome tempo, mas requer também intensa carga de trabalho de profissionais altamente treinados. A necessidade de um diagnóstico consistente requer a necessidade de um analista experiente durante tempo integral, uma vez que a classificação manual é subjetiva, com significativa variação inter e intralaboratorial, o que poderia justificar o alto coeficiente de variação nas contagens manuais (BORGES, et al. 2009).

O Conselho Internacional para Padronização em Hematologia (ICSH) define precisão como sendo uma medida de acordo entre a estimativa do valor e o valor verdadeiro, usando técnicas independentes (MORITZ, 2000). Portanto a comparação entre técnicas é o método aceito para avaliar instrumentos de hematologia, no entanto, no caso de diferenças entre os métodos, é necessário identificar qual método é impreciso.

Atualmente, há um aumento do uso de analisadores hematológicos automáticos introduzindo uma variedade de novas tecnologias para análises sanguíneas com interesse em se reduzir o trabalho manual e aumentar a exatidão da contagem. O maior avanço na contagem plaquetária tem se desenvolvido utilizando a citometria de fluxo (SEGAL et al., 2005). Os

contadores de células sanguíneas apresentam alto nível de precisão, mas a variação entre os instrumentos deve ser considerada (LEWIS, et al.1990).

Uma vez que há uma gama de analisadores hematológicos no mercado, estudos são desenvolvidos com o intuito de avaliarem sua eficácia nas rotinas clínicas veterinária. Conhecer os equipamentos nos quais se trabalha é importante para saber os alertas não previstos em seu menu e que necessitam obrigatoriamente de revisão de lâmina. A validação tecnológica comparativa entre os dois métodos permite trabalhar com segurança (BACALL,2009).

O hemograma pode ser realizado utilizando-se métodos não automatizados, através da contagem manual e também, por meio de equipamentos automatizados com ampla variação tecnológica eletrônica associada à informática. Várias publicações científicas comparando as metodologias não automatizadas e automatizadas demonstram que os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significantes (BORGES; SIQUEIRA, 2009; FAILACE; PRANKE, 2004; LEITE et al., 2007; MACKELLY, 2009; MATANA et al., 2008; MORESCO et al., 2003). Desta maneira, a tendência é a substituição gradual pelos equipamentos automatizados (NAOUM, 2008).

Muitos estudos foram desenvolvidos em diversas espécies de animais utilizando analisadores automáticos hematológicos, porém em nenhum deles foram utilizados muares, sendo este, de grande importância clínica para essa espécie, uma vez que em nossa região a utilização de muares na lida do campo, atividades esportivas, tais como cavalgadas e provas de marcha, apresenta-se em constante crescimento. Com isso observou-se a comparação dos valores de hemograma completo obtidos pelo uso de um analisador hematológico automático BC-2800 Vet[®] e pela contagem manual de células sanguíneas em 30 muares com idade entre 4 e 8 anos da região de Araçatuba.

CAPÍTULO 2 - VALIDAÇÃO DO ANALISADOR HEMATOLÓGICO AUTOMÁTICO BC-2800 VET[®] PARA REALIZAÇÃO DE HEMOGRAMAS DE MUARES

RESUMO - Neste estudo foram comparados os valores do hemograma completo realizado em 30 muares com idade entre 4 e 8 anos, obtidos pelo uso de um analisador hematológico automático e pela contagem manual de células sanguíneas. A análise dos resultados revelou que a concordância entre os dois métodos foram considerados bons uma vez que o viés (média das diferenças) foi pequeno, sendo que os intervalos de confiança de 95% para o viés apresentaram-se estreitos e apenas um “outlier” foi observado, para eritrócitos, monócitos e granulócitos (nenhum valor caiu fora dos limites de concordância [viés \pm 2 desvios padrão]). Não houve diferença significativa para os valores de eritrócitos, hemoglobina, leucócitos e granulócitos. Os valores médios de monócitos obtidos pelo contador automático de células foram significativamente maiores do que aqueles obtidos pelo método manual. A análise dos resultados revelou ainda um viés positivo para hematócrito e nenhum viés foi detectado para eritrócitos, hemoglobina, leucócitos, granulócitos e linfócitos. Foi observada boa concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos para eritrócitos, hemoglobina, leucócitos, granulócitos, linfócitos e monócitos nessa faixa etária. Podendo o analisador hematológico automático BC-2800Vet[®], ser utilizado para realização de hemogramas em muares.

Palavras-chave: contador de células, hemograma, granulócitos, viés

VALIDATION OF AUTOMATED HEMATOLOGY ANALYZER BC-2800 VET[®] FOR PERFORMING BLOOD COUNTS MULES

ABSTRACT - In this study the values of complete blood counts performed in 30 mules aged 4 and 8, obtained by using an automated hematology analyzer and the manual blood counts were compared. The results showed that the correlation between the two methods were considered good since the bias (mean difference) was small, and the confidence intervals of 95 % for the bias showed up narrow and only one "outlier" was observed for erythrocytes, monocytes and granulocytes (no value fell outside the limits of agreement [bias \pm 2 standard deviations]). There was no significant difference in the values of erythrocytes, hemoglobin, leukocytes and granulocytes. The average values obtained from monocytes by an automatic cell counter were significantly higher than those obtained by the manual method. The results also showed a positive bias for hematocrit and no bias was detected in erythrocytes, hemoglobin, leukocytes, granulocytes and lymphocytes. Good agreement between the results obtained by the two methods for erythrocytes, hemoglobin, leukocytes, granulocytes, lymphocytes and monocytes was observed in this age group. Can the automated hematology analyzer BC-2800Vet[®] be used to perform complete blood counts in mules.

Keywords: counter of cells, hemogram, granulocytes, bias

1 INTRODUÇÃO

Os muares são animais híbridos estéreis. A diferença entre os números dos cromossomos nas células do asno ($2n = 62$; 31 pares) e do cavalo ($2n = 64$; 32 pares) resultam em uma mula ou em um burro com 63 cromossomos. Este número ímpar é responsável pela esterilidade do burro ou da mula, pois cromossomos do cavalo são incapazes de formar os pares de homólogos durante os estágios adiantados da gametogênese, tendo por resultado a morte das células reprodutivas (HELMIG; SEWELL, 2013).

Segundo Oliveira (2006), os muares são utilizados desde o Brasil Império, servindo de montaria para ir à cidade e para viagens distantes, podendo fazer etapas diárias de até 40 km, sem esgotar-se. Sobre o lombo dos resistentes muares transportavam-se alimentos, mercadorias diversas e, até mesmo, armas e munições. Seu papel foi mais extraordinário ajudando a transportar em dado momento, nossas ingentes riquezas: o ouro das minas, o açúcar dos engenhos e o café das fazendas. Nesses contextos, damos ênfase na importância econômica e na pluralidade cultural, pois desde o Brasil Império, os muares estão presentes no transporte de alimentos, nas cavalgadas, feiras de exposição, concursos de marchas, romarias religiosas, no esporte, lazer e estudos científicos. Em todas as modalidades e serviços em que os muares são utilizados, observam-se excelente desempenho produtivo, além da geração de milhares de empregos e riquezas, nas fabricas de insumos, de selarias, de carroças, implementos agrícolas, na lida com o gado e no transporte de variadas cargas.

Atualmente a população mundial de muares é de 11.206.674. A distribuição mundial dos muares entre continentes e/ou países se dá pelos aspectos produtivos, sanitários, legais e culturais (FAO, 2008). No Brasil, a população de asininos e muares é bem expressiva, sendo cerca de 1.313.526 (IBGE, 2008). Diante disso, torna-se necessário um acompanhamento clínico e específico para esta espécie, e para isto o hemograma é um dos exames

complementares mais requisitados pelos veterinários o que denota sua preferência universal como coadjuvante indispensável no diagnóstico das doenças infecciosas, das doenças crônicas em geral, das emergências médicas, cirúrgicas e traumatológicas e no acompanhamento de tratamentos oncológicos (ANDRADE, et al., 2001).

A rapidez e a qualidade das análises tornam-se itens importantes para o resultado de exames laboratoriais. A realização do hemograma automatizado aumentou a capacidade de produção nos laboratórios, permitindo maior agilidade na entrega dos resultados, assim como facilita a rotina laboratorial, pois trabalha com menor volume de amostra e realiza a análise de uma maior quantidade de parâmetros em menor tempo (FAILACE; PRANKE, 2004).

Os métodos manuais, entretanto, dependem muito tempo e dependem da experiência do operador (OLSEN et al., 2004) e seu uso somente é economicamente justificável para um pequeno número de amostras (THIBODEAUX et al., 1989).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 muares com idade entre 4 e 8 anos de idade, ambos clinicamente saudáveis, submetidos ao mesmo tipo de manejo alimentar, oriundos da mesma propriedade rural, localizada na região de Araçatuba-SP.

Realizou-se a punção da veia jugular, retirando 5 mL de sangue e armazenado em tubo contendo anticoagulante EDTA.

Para contagem automática de células hematológicas utilizou-se o analisador hematológico automático BC-2800 Vet (MINDRAY®), no modo para equinos, de acordo com as recomendações do fabricante. O BC-2800 Vet® é um analisador de hematologia compacto, totalmente automático para contagem de sangue total e tecnologia de micro amostragem, cujos parâmetros analisados são: contagem de glóbulos brancos (WBC), contagem de glóbulos vermelhos (RBC), contagem de hemoglobina (HGB), hematócrito, volume corpuscular médio (MCV), concentração corpuscular média de hemoglobina (MCH), média da concentração corpuscular de hemoglobina (MCHC), distribuição das superfícies de eritrócitos isto é, índice que indica a diferença entre o tamanho dos glóbulos vermelhos (RDW), contagem de plaquetas (PLT), volume plaquetário médio (MPV), amplitude de distribuição de plaquetas (PDW), regulação massa plaquetária (PCT), histograma para células brancas, células vermelhas e plaquetas. Onde a metodologia de análise pelo aparelho BC-2800 vet® se faz através de volumetria por impedância para contagem das células e método SFT para Hemoglobina. A interface simples facilita um fluxo de trabalho eficiente, pois permite ser pré-programado para 13 espécies de animais (gato, cão, cavalo, rato, coelho, porco, boi, búfalo, macaco, camelo, ovelha e cabra). Realiza a diferenciação em três partes para contagem de células brancas e os resultados são de 25 amostras por hora, sendo utilizado um volume de 13 ul de sangue total. (MINDRAY, 2014).

A contagem manual foi realizada conforme os métodos clássicos preconizados (JAIN et al., 2000). As variáveis incluídas foram contagem total de eritrócitos, leucócitos e diferencial de células: granulócitos (neutrófilos segmentados, basófilos e eosinófilos), linfócitos e monócitos, realizados através de esfregaço sangüíneo corado pelo método de Leishman e observado em microscópio óptico, aumento 1000x. O Método de Leishman foi escolhido por ser considerado vantajoso, devido ao curto tempo de coloração, por mostrar as estruturas mais detalhadamente e ainda por facilitar a reprodução dos resultados. Tal método consiste em secar as extensões ao ar, cobrir toda a extensão com corante de Leishman, contar o número de gotas e deixar por 5 minutos; cobrir com igual número de gotas de água de coloração e deixar por 10 minutos; lavar em água corrente; lavar em água destilada e secar ao ar (SANTOS, 2001). Para a determinação do número de leucócitos por mililitro de sangue, utilizou-se câmara de Neubauer. Para tal, diluiu-se 20 μ L de sangue com 4 mL do líquido de Türk e contou-se os leucócitos nos quatro quadrados grandes-angulares; multiplicou-se pelo fator 50 (VALLADA,1999). Para a contagem das hemácias foi utilizado o diluente Gower, sendo utilizado 4 mL do diluente para 20 μ L de sangue, contando-se os eritrócitos nos cinco quadrados médios do quadrado central e multiplicando-os por 10.000. Antes das contagens das células, a câmara de Neubauer permaneceu por cinco minutos dentro de uma placa de Petri contendo um filtro umedecido, permitindo assim a sedimentação das células (VALLADA,1999).

A concentração de hemoglobina foi determinada por meio de kit bioquímico (Labtest®) e a determinação do hematócrito se deu pelo método de micro-hematócrito (AYRES, 1994). Os dados foram analisados pelo teste t pareado de Student para comparações entre as médias obtidas pelo analisador automático e a contagem manual de células, considerando-se significativos valores com $p < 0,05$. A regressão linear de Deming e a correlação de Pearson foram determinadas para todas as variáveis obtidas por ambos os métodos ($p < 0,05$). Os dados foram analisados estatisticamente pelo método de Bland-Altman no qual as médias das variáveis obtidas pelo método de referência

(manual) e pelo analisador automático foram comparadas contra a diferença entre dois resultados (média menos referência) com a regressão e limite de confiança de 95% calculados. Os valores localizados fora dos limites de concordância de 95% são considerados “outliers” (BLAND; ALTMAN, 1986).

A concordância entre os dois analisadores foi considerada boa quando o viés (média das diferenças) foi pequeno, os intervalos de confiança de 95% para o viés foram estreitos, e nenhum “outlier” foi observado (nenhum valor caiu fora dos limites de concordância [viés \pm 2 desvios padrão]). Nenhum viés real foi indicado quando o intervalo de confiança de 95% para o viés (média das diferenças \pm 2 erro padrão da média) incluiu o valor zero (BLAND; ALTMAN, 1986, 2007; JENSEN; BANTZ, 1993; PAPASOULIOTIS et al., 2006; TAPPIN et al., 2008; PEIRÓ et al., 2010).

3 RESULTADOS

Não houve diferença significativa para os valores obtidos por ambos os métodos para eritrócitos, hemoglobina, leucócitos, granulócitos e monócitos. Os valores médios dos resultados das análises de sangue venoso de muas obtidos pelo analisador automático foram menores do que aqueles obtidos pelo método manual para hematócrito. A avaliação estatística dos resultados dos métodos mostra um índice de correlação de 95% entre a contagem global de eritrócitos, hemoglobina, leucócitos, granulócitos e monócitos. Ainda dentro desta faixa de avaliação podemos verificar também boa correlação nos diferenciais de monócitos, onde se apresentou maior pela contagem automática do que os obtidos pelo método manual (Tabela 1).

O limite de confiança de 95% foi estreito para os valores de todos os parâmetros analisados. A análise dos resultados revelou, ainda, um viés (média das diferenças ± 2 erro padrão da média) positivo para hematócrito, sendo assim não foi detectado viés para eritrócitos, hemoglobina, leucócitos, granulócitos e linfócitos (Tabela 1). Somente um “outlier” foi detectado no gráfico de Bland–Altman para eritrócitos, leucócitos e granulócitos.

Foi observada concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos para eritrócitos, hemoglobina, leucócitos, granulócitos, linfócitos e monócitos nessa faixa etária (Figura 1).

O analisador automático BC-2800 Vet[®] é economicamente viável por realizar a análise hematológica em várias espécies, analisando grande quantidade de parâmetros em pouco tempo, utilizando uma amostra pequena de sangue, de várias espécies, além de que o aparelho não necessita de manutenção periódica e os reagentes utilizados são de baixo custo, porém não possui capacidade de diferenciação dos granulócitos (eosinófilos, neutrófilos, basófilos), sendo necessária a diferenciação celular através de esfregaço sanguíneo.

Tabela 1 - Valores médios, desvio padrão, equação de regressão, correlação de Pearson e diferença média de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, granulócitos, linfócitos e monócitos no sangue venoso de 30 muare, através do analisador automático e o método de contagem manual de células

Variáveis	Analisador automático BC-2800 Vet [®]	Contagem manual	Equação de regressão linear	p	Diferença média
Eritrócitos (n x 10 ⁹ /L)	7,36 ^a ±0,88	7,15 ^a ±1,13	Y= 0,6854x + 2,455	0,2139	0,206 (0,89)
Hemoglobina (g/dL)	12,54 ^a ±6,27	12,34 ^a ±1,53	Y= 7,423x – 79,05	0,8428	0,205 (5,61)
Hematócrito (%)	36,71 ^b ±4,49	31,07 ^a ±4,39	Y= 1,028x + 4,785	<0,0001	5,65 (2,99)
Leucócitos (n x 10 ⁹ /L)	11,15 ^a ±2,56	10,78 ^a ±3,42	Y= 0,6797x + 3,827	0,3773	0,37 (2,29)
Granulócitos (eosinófilos, basófilos, neutrófilos) (n x 10 ⁹ /L)	5,51 ^a ±1,81	5,05 ^a ±2,58	Y= 0,6430x + 2,262	0,1264	0,46 (1,60)
Linfócitos (n x 10 ⁹ /L)	5,22 ^a ±1,68	5,37 ^a ±2,24	Y= 0,6990x + 1,466	0,5478	-0,15 (1,35)
Monócitos (n x 10 ⁹ /L)	0,42 ^a ±0,15	0,29 ^b ±0,17	Y= 0,1960x +0,3661	0,0029	0,131 (0,22)

Dados expressos em média ± desvio-padrão. Diferença média = valor médio obtido pelo leitor automático – valor médio obtido pela contagem manual de células.

Na equação, y = valor do leitor automático e x = valor da contagem manual de células

^{a,b}Dentro da linha, os valores em sobrescrito diferem significativamente ($p \leq 0,05$ teste t de Student).

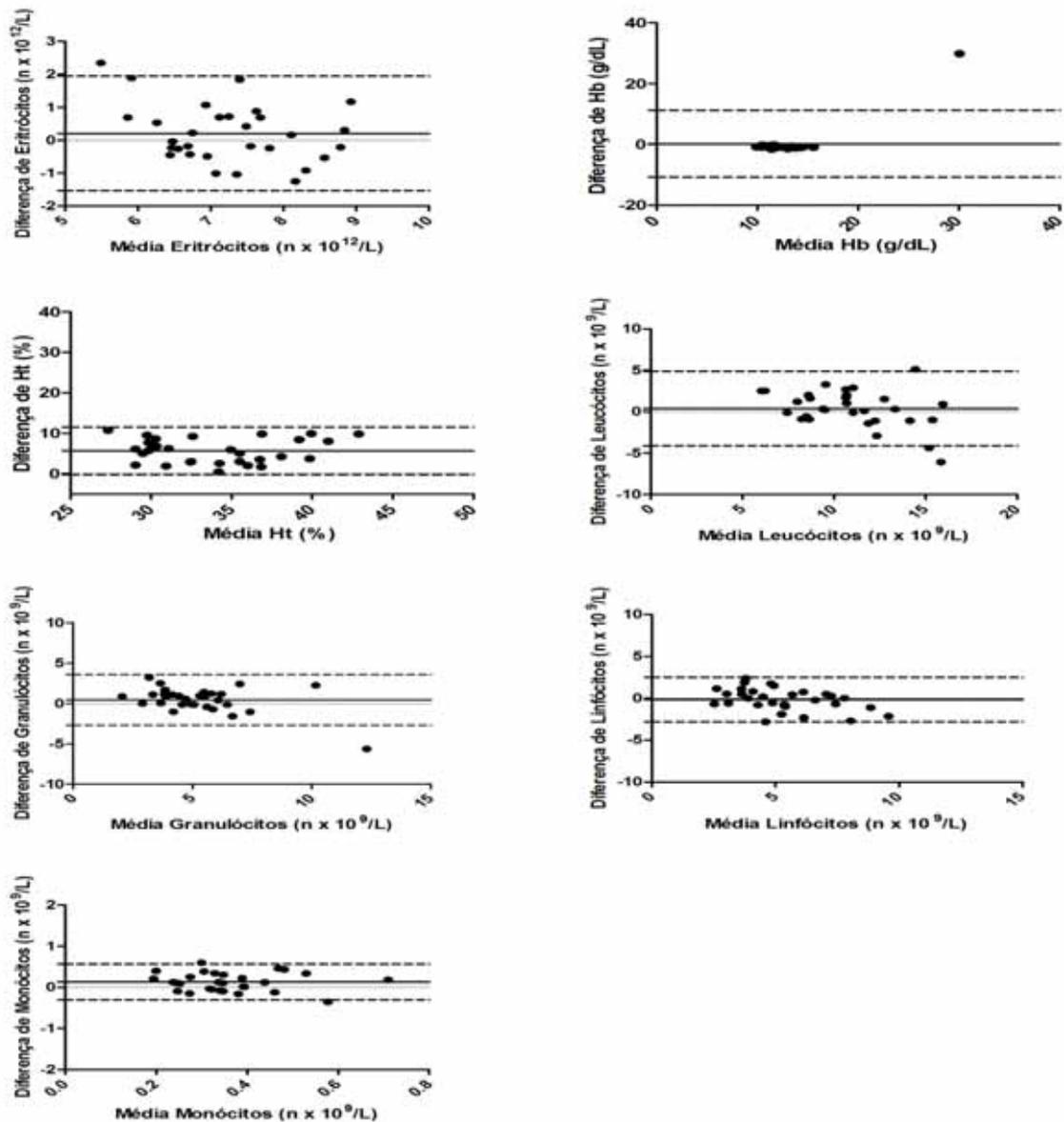


FIGURA 1 – Gráficos de Bland-Altman representando os resultados das amostras de sangue venoso de mueres analisados com o leitor automático e a contagem manual de células. As diferenças entre os resultados destes métodos estão representadas no eixo y e o valor médio de cada variável para ambos os métodos está plotado no eixo x. A diferença média (viés [linha sólida]) e os limites de concordância de 95% (viés ± 2 desvios padrão [linhas pontilhadas]) estão representados. Os valores localizados fora dos limites de concordância de 95% são considerados “outliers”.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, todos os parâmetros hematológicos referentes à série eritrocitária e leucocitária situaram-se dentro dos intervalos para a espécie muar obtidos pelos dois métodos, sendo assim não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) quando se comparou o método automático e o manual para realização do hemograma completo (Figura 1).

Nenhum valor apresentou-se fora dos limites de concordância para o viés (média das diferenças ± 2 erro padrão da média). Sendo assim, nenhum viés foi indicado quando o intervalo de confiança de 95% incluiu o valor zero.

O valor de p para hematócrito foi muito satisfatório sendo $<0,0001$, isto significa que os valores obtidos pelos dois métodos se assemelham, indicando pouca variação entre as técnicas, revelando um viés positivo. Assim o valor de p para monócitos também se fez muito satisfatório mediante comparação entre as técnicas, sendo $p 0,0029$.

A análise dos resultados revelou ainda que não foi detectado viés para eritrócitos, hemoglobina, leucócitos, granulócitos e linfócitos (Tabela 1).

Somente um “outlier” foi apresentado de acordo com o gráfico de Bland–Altman para eritrócitos, leucócitos e granulócitos.

Podemos verificar também boa correlação nos diferenciais de monócitos, onde se apresentou maior pela contagem automática do que os obtidos pelo método manual (Tabela 1). Esses parâmetros podem ter apresentado maior diferença na comparação entre o método automatizado e o manual devido à má distribuição destas células durante a preparação do filme sanguíneo e/ou dificuldade de diferenciação de pequenos monócitos de grandes linfócitos. (BAIN, 2004; FAILARE et al., 2004; GROTTTO et al., 1995; SPADA et al., 1998).

Na (Figura 1) o gráfico para hemoglobina demonstra que os pontos se aproximam da linha sólida (diferença média (viés)), apontando ótimo resultado quando comparados os métodos.

Houve concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos para eritrócitos, hemoglobina, leucócitos, granulócitos, linfócitos e monócitos para os mueres que se apresentam nessa faixa etária (Figura 1).

Alguns estudos foram desenvolvidos utilizando sangue de outras espécies e seus resultados apresentaram-se satisfatórios. Em um desses estudos foi realizada a avaliação independente do analisador automático hematológico Sysmex pocH - 100iV Diff[®] que utiliza a tecnologia de impedância com foco hidrodinâmico, que previne a re-circulação ou coincidências de células, para uma análise precisa de eritrócitos, plaquetas, leucócitos totais e diferencial leucocitária. O seu uso se fez em amostras de sangue de cães saudáveis e doentes, gatos, cavalos e bovinos dentro de um ambiente clínico, onde pode ser observado que o desempenho geral do analisador automático hematológico Sysmex pocH - 100iV Diff[®] para contagem de leucócitos, contagem de plaquetas (exceto para gatos), hematócrito e hemoglobina foi excelente nas quatro espécies. O instrumento só não é capaz de contar plaquetas em felinos. (RIOND et al., 2011).

O analisador hematológico automático CA530-VET[®] onde os resultados são exibidos dentro de 60 segundos, possui software especial de pré-definido para a criação de programas para novas espécies de animais interface de usuário fácil, leitor de código de barras como opção. Foi considerado útil na rotina laboratorial para a análise de amostras sanguíneas de cães, gatos e cavalos. Não deve ser considerado preciso para a contagem de plaquetas em felinos. Funciona de forma rápida e de boa confiabilidade (ROLEFF, 2007).

Outro estudo avaliou a eficiência do analisador hematológico automático alfa Celltac[®] em amostras de sangue de gatos e cães, podendo concluir que é de fácil manutenção e utilização. Leucocitose e leucopenia são confiavelmente detectados pelo Celltac[®]. O instrumento apresenta resultados aceitáveis para a contagem total de leucócitos, granulócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito em amostras de sangue de cães, porém a

contagem plaquetas é estimada, já nas amostras de sangue de gatos, apontou a contagem imprecisa de plaquetas e erro para o hematócrito, assim como para a contagem de linfócitos, granulócitos (eosinófilos, neutrófilos e basófilos) e monócitos, apresentando imprecisão nos resultados, não concordando com as contagens diferenciais manuais (MCDANIEL et al; 2012).

Foram avaliados o desempenho dos analisadores hematológicos: Sysmex XT- 2000iV[®], Advia 2120[®] e CELL- DYN 3500[®] para a detecção de basófilos em amostras sanguíneas de cães, gatos e coelhos com basofilia e foi identificado que basófilos caninos não foram detectados por estes analisadores de hematologia automatizados e apontou a necessidade de examinar esfregaço sanguíneo para basófilos (LILLIEHOOK, 2011).

A qualidade dos dados gerados por sistemas menos avançados para pacientes com parâmetros hematológicos "anormais" é tipicamente inadequada. Para esses pacientes, os sistemas mais avançados oferecem resultados mais exatos e precisos. Para a confiabilidade dos resultados apontados pelas análises, independentemente de qual analisador hematológico seja escolhido, um programa de garantia de qualidade abrangente deve ser desenvolvido para garantir a geração de resultados de qualidade. (RÜMKE, 1959).

Segundo, BLARIN et al., (2006) os contadores eletrônicos hematológicos fornecem uma informação adicional sobre o volume celular no hemograma de rotina, podendo calcular também a distribuição do diâmetro dos eritrócitos, designada RDW (Red Blood Cell Distribution Width) cujo valor reflete, de forma mais objetiva, o grau de heterogeneidade entre as hemácias por meio de uma análise quantitativa. Assim, utilizaram o analisador automático hematológico Cell-Dyn 3500[®] para verificar a influência de um período de 12 meses de treinamento e dos exercícios de diferentes intensidades em equinos da raça Puro Sangue Inglês (PSI) sobre os valores da distribuição do diâmetro dos eritrócitos (RDW) e do volume globular médio (VGM), isto é, tamanho das hemácias, concluindo que os equinos submetidos a exercícios sugerem

aumento do tamanho dos eritrócitos após exercícios de alta intensidade, atribuído a eritrócitos de maior tamanho liberado pelo baço.

Através da análise comparativa entre os métodos se fez possível avaliar a acurácia do BC-2800Vet[®] em relação ao método manual mostrando-se semelhantes, porém de maior rapidez e avaliação de quantidade de parâmetros maior, sendo indispensável para a rotina clínica.

5 CONCLUSÃO

Observa-se que o analisador automático BC-2800 vet[®] não realiza diferenciação dos granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos), para análises. Porém, houve boa concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos para eritrócitos, hemoglobina, leucócitos, granulócitos em geral, linfócitos e monócitos para muare nessa faixa etária, podendo o analisador hematológico automático BC-2800 Vet[®], ser utilizado para realização de hemogramas em muare com alto grau de confiabilidade.

6 REFERÊNCIAS

ANDRADE, S.R.; KRAMER, D.G et al. Estudo comparativo entre os procedimentos manual e automatizado na contagem diferencial dos leucócitos. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v.33(1), p. 35-37, 2001.

AYRES, M. C. C. Eritrograma de Zebuínos (*Bos indicus*, Linnaeus, 1759) da raça Nelore, criados no Estado de São Paulo, influência dos fatores etário, sexual e do tipo racial. São Paulo: [s.n.], 1994.

BACALL, N. S. Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratório clínicos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São Paulo, v.31, n.4, p.218-220, 2009.

BAIN, B. J. Células sanguíneas: um guia prático. 3 ed., Porto Alegre: Artmed; 2004. P.26-59.

BLAND, J.M.; ALTMAN, D.G. Agreement between methods of measurement with multiple observations per individual. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*,v.17, p.571-582, 2007.

BLAND J.M.; ALTMAN D.G. Métodos estatísticos para estimar a concordância entre dois métodos de medição clínica. *Lancet*, p.307-310, 1986.

BLARIN, M. R. S.; LOPES, R.S. et al. Valores da Amplitude de Distribuição do Tamanho dos Eritrócitos (RDW) em eqüinos Puro Sangue Inglês (PSI) submetidos a exercícios de diferentes intensidades. *Brazilian journal veterinary research animal science.*, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 637-641, 2006.

BORGES L.F; SIQUEIRA L.O. Validação de tecnologia 5diff do analisador hematológico Sysmex XS-1000i para laboratório de pequeno/médio porte. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.*, p. 247-51, 2009. v.31, n.4

DESCAT, F. *Hematologie du rat: hemogramme et myelogramme*. Tese – Ecole Nationale Veterinaire, Toulouse, France, p. 105, 2002.

FAILACE, R. *Hemograma: manual de interpretação*. 4. ed. Porto Alegre: Artemed, 2003. p. 298.

FAILACE, R.; PRANKE, P. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de Hemogramas através de contadores eletrônicos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, p.159, 2004. v. 26, n. 3.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#anchor>> Acesso em: 04/11/2013.

GROTTO H.Z.W; GILBERTI M.F.P.; et al. Avaliação laboratorial do analisador hematológico Cobas Argos 5 Diff: parâmetros globais e contagem diferencial leucocitária. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 31, n. 3, p. 88-95, 1995.

HELMIG, M.; SEWELL, S.E.; Horse + Donkey = Mule. Disponível em: <<http://www.ruralheritage.com>> Acesso em: 04 nov. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. *Produção da pecuária municipal*. Brasil. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em: 04 nov. 2013.

JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p. 407.

JAIN, N.C. *Schalm's veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, p.1221, 1986.

JENSEN, AL.; BANTZ, M. Comparando-se os testes de laboratório, utilizando o método de parcelas diferença. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 22, p. 46-48, 1993.

LEITE, L.A.C., Comparação entre a contagem de plaquetas pelos métodos manual e automatizado. *NewsLab*, v.81, p.106-114, 2007.

LILLIEHOOK, I; TVEDTEN, H. Errors in basophil enumeration with 3 veterinary hematology systems and observations on occurrence of basophils in dogs. *Vet Clin Pathol*. v.40(4), p. 450–458, 2011.

MACKELLY, S. *Estudo comparativo de métodos de contagem de reticulócitos para controle de qualidade*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, p. 116, 2009.

MATANA, S.R. *Avaliação da contagem automatizada de plaquetas como um dos critérios de qualidade de hemocomponentes em banco de sangue*. Informativo científico da Roche diagnóstica, São Paulo, ano 1, n.5, 2008.

MCDANIEL, B.; HIRSCHBERGER, J.; WEBER, KARIN. Validation of the Celltac alpha[®] automated hematology analyzer for canine and feline blood samples. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 42, p. 11–18, 2012.

MINDRAY[®] - BC-2800Vet[®]. *Produtos para diagnóstico in vitro*. Disponível em: <<http://www.mindray.com/pt/products/45.html#feature>> Acesso em: 12 fev. 2014.

MORESCO, R.N. Análise comparativa das técnicas manual e automatizada (ADVIA tm 120) para contagem de reticulócitos. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.35, n.1, p.17-18, 2003.

MORITZ A. *The use of automated laser-based multiparameter hematology systems in veterinary medicine*, v.1, p. 138-157, ed. Büchse der Pandora, Wetzlar, Germany, 2000.

NAOUM, P.C. *Academia de ciência e tecnologia*. Disponível em: <<http://www.ciencianews.com.br/cien-news/inter-lab-hemo.htm>>. Acesso em: 16 fev. 2014.

OLIVEIRA, V. B.; BARROS, S. S.; ALMEIDA, F.Q. *Muares: Como tema transversal para o ensino médio e técnico em Agropecuária*. Rio de Janeiro, RJ. Publit. p. 123, 2007.

OLSEN, L. H.; KRISTENSEN, A. T.; QVORTRUP, K.; PEDERSEN, H. D. Comparison of manual and automated methods for determining platelet counts in dogs with macrothrombocytopenia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Columbia, v.16, n.2, p.167-170, 2004.

PAPASOULIOTIS, K.; CUE, S.; CRAWFORD, E.; PINCHES, M.; DUMONT, M. Comparison of white blood cell differential percentages determined by the in-house LaserCyte hematology analyzer and a manual method. *Veterinary Clinical Pathology*, v.35, p. 295-302, 2006.

PEIRÓ, J.R.; BORGES, A.S.; GONÇALVES, R.C.; MENDES, L.C.N. Evaluation of a portable clinical analyzer for the determination of blood gas partial pressures, electrolyte concentrations, and hematocrit in venous blood samples

collected from cattle, horses, and sheep. *Am. J. Vet. Res.*, v.71, p.515–521, 2010.

RIOND, B.; WEISSENBACHER, S. et al. Performance evaluation of the Sysmex pochH-100iV Diff hematology analyzer for analysis of canine, feline, equine, and bovine blood. *Veterinary Clinical Pathology*, v.40, n.4, p. 484–495, 2011.

ROLEFF, S.; ARNDT, G.; BOTTEMA, B.; JUNKER, L.; GRABNER, A.; KOHN, B. Clinical evaluation of the CA530-VET hematology analyzer for use in veterinary practice. *Veterinary Clinical Pathology*. v.36, p.155-166, 2007.

RÜMKE CL. Variabilidade dos resultados nas contagens de células diferenciais em esfregaços de sangue . *Triângulo*, v. 4, p.154-158, 1959.

SANTOS, A. A. *Aspectos morfo-citoquímicos das células sanguíneas e ultraestruturais de trombócitos e granulócitos de Gavião carijó Buteo magnirostris (GMELIN, 1877) (AVE FALCONIFORME)*. Tese (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2001

SPADA, C.; TREITINGER, A.; RAMOS L.F.M. Avaliação da contagem diferencial de células sanguíneas por metodologia automatizada e microscopia. *Rev. Bras. Anal. Clin.* v. 30(4), p. 191-193, 1998.

SWENSON, M.J. Propriedades fisiológicas e constituintes celulares e químicos do sangue. In: *Fisiologia dos animais domésticos*. 10. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.13-25, 1988.

TAPPIN, S.; RIZZO, F.; DODKIN, S. Measurement of ionized calcium in canine blood samples collected in prefilled and self-filled heparinized syringes using

the i-STAT point-of-care analyzer. *Veterinary Clinical Pathology*, v.37, p.66–72, 2008.

THIBODEAUX, J. K.; ROUSSEL, J. D.; ADKINSON, R. W.; GOODEAUX, L. L. An efficient procedure for manual platelet counting. *Veterinary Record*, London, v.125, n.16, p.417-419, 1989.

VALLADA, E. P. *Manual de técnicas hematológicas*. São Paulo: Atheneu, p.423, 1999.