

ADAPTAÇÕES DO PANÓTICO RÁPIDO PARA AVALIAÇÃO DO LEUCOGRAMA EM CÃES¹

RAFAELA NOGUEIRA DA COSTA^{2*}, FALCÃO SODRÉ BLACK³, PATRÍCIA ELOISA MUNZLINGER³, DANIEL SCAPIN⁴, FERNANDA BERNARDO CRIPA⁵
VICTOR MATHEUS PRASNIEWSKI⁶, LUCIANA PEREIRA MACHADO⁷

1 Introdução

O hemograma é um exame essencial na medicina veterinária, como ferramenta para diagnóstico e monitoramento de diversas doenças. Dividido entre eritrograma, leucograma e plaquetograma (Meireles et al., 2018). Embora a automação laboratorial agilize os processos, é indispensável a análise microscópica dos esfregaços sanguíneos pelo médico veterinário para identificar alterações morfológicas (Black et al., 2025).

A técnica do esfregaço sanguíneo envolve a distensão de uma gota de sangue em uma lâmina de vidro, formando uma fina camada (Meireles et al., 2018). Seguida por coloração, com corantes derivados de Romanowsky, como Giemsa e Wright, ou métodos rápidos como o Panótico, muito utilizados na rotina laboratorial (Zebral et al., 2011). Embora o Panótico ofereça vantagens como rapidez e baixo custo no processamento de coloração, apresenta limitações na demarcação celular, dificultando a distinção entre leucócitos e a identificação de inclusões (Zebral et al., 2011).

2 Objetivos

Avaliar diferentes protocolos de coloração com corante rápido tipo Panótico em leucogramas caninos.

1 Adaptações do Panótico rápido para avaliação do leucograma em cães.

2 Discente de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza, **Bolsista FA/PIBIC**, contato: rafaela.costa@estudante.uffs.edu.br

3 Discente de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza.

4 Mestre, Farmacêutico, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza.

5 Técnica de laboratório de Análises Clínicas, Universidade Federal da Fronteira Sul.

6 Técnica de laboratório de Biologia, Universidade Federal da Fronteira Sul.

7 Professora associada, Doutora, Médica Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza, **Orientadora.**

3 Metodologia

Projeto desenvolvido no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária (SUHVU) da Universidade Federal da Fronteira, Campus Realeza / PR, com aprovação da CEUA (Parcer nº 7551261124).

Foram selecionadas 30 amostras de sangue de cães, independente do sexo, idade, peso, raça, como critério de exclusão, não foram utilizadas as amostras com fibrina e/ou com alterações tóxicas de neutrófilos. As amostras foram coletadas em tubos com EDTA (Vacuette K2 EDTA®) e utilizadas para preparar cinco esfregaços sanguíneos cada. Após a distensão do sangue na lâmina, esta foi seca ao ar, em temperatura ambiente.

Foram definidos cinco protocolos de tratamento, sendo o primeiro o de May Grünwald-Giemsa como grupo controle, seguindo o procedimento técnico do fabricante (NewProv®) e a coloração por Panótico rápido (RenyLab®), seguindo quatro protocolos diferentes baseados no estabelecido pelo fabricante com modificações .

Pelo método de May Grünwald-Giemsa, os esfregaços sanguíneos foram cobertos com o corante May-Grünwald por três a quatro minutos e após esse tempo, adicionou-se água destilada na mesma proporção do corante, aguardando-se mais um minuto. Passado o tempo, se desprezou a solução de May-Grünwald, para então cobrir a lâmina com uma solução de água destilada misturada ao corante de Giemsa (3 gotas de corante para cada 2 mL de água destilada) por 15 a 20 minutos. Passado o tempo, o esfregaço foi lavado com água corrente e posto em posição vertical para secar.

Para coloração por Panótico rápido, foram avaliados quatro protocolos distintos, alterando a substância de fixação e o tempo/modo como a lâmina foi submersa em cada corante. O protocolo um (P1) seguiu o mesmo descrito na bula pelo fabricante, com fixador (Triarilmetano) e corantes fornecidos pelo fabricante e tempo em cada um de 30 segundos, o segundo (P2) utilizou o fixador Triarilmetano, porém modificou a forma de fixação/coloração e para 5 a 10 mergulhos em cada (definidos de acordo a observação individual), o terceiro (P3) utilizou o metanol como fixador por três minutos, com o tempo de 30 segundos em cada corante e o quarto (P4) também utilizou o metanol como fixador por três minutos, realizando de 5 a 10 mergulhos em cada corante. No final, todas as lâminas ficaram em posição vertical em temperatura ambiente para secar.

Cada lâmina passou pela leitura no microscópio óptico (Olympus® CX 21 - Ningbo, China), com óleo de imersão em objetiva de 100x. Em cada esfregaço sanguíneo foi realizada a

contagem diferencial de leucócitos em 100 células, utilizando um contador manual de leucócitos. Posteriormente, para avaliar a qualidade tintorial, três observadores distintos realizaram a análise, de forma que nenhum observador tenha conhecimento do protocolo utilizado. Cada observador atribuiu um escore de 1 a 4, para cada estrutura (núcleo e citoplasma) corada do esfregaço leucocitário, baseado na capacidade de distinção tintorial, caracterização e delimitação das estruturas.

Os resultados das análises, foram tabulados em planilha Excel e analisados estatisticamente. Para os escores de coloração, empregou-se o Teste Exato de Fisher no software R, enquanto a contagem diferencial de leucócitos foi analisada por meio de ANOVA one way e Teste de Tukey no programa SigmaStat 3.0.

A qualidade de coloração foi definida a partir da soma das pontuações atribuídas aos parâmetros núcleo e citoplasma, variando de 0 a 8, sendo estabelecido um valor limite (cut-off) para a classificação. Considerou-se aceitável apenas a coloração em que nenhum dos parâmetros recebesse pontuação 0 ou 1, exigindo, obrigatoriamente, escore final ≥ 4 . Com base nesses critérios, avaliou-se a ocorrência de associações significativas entre os grupos e as classificações, utilizando o Teste Exato de Fisher no software R, considerando-se como nível de significância $p > 0,05$.

4 Resultados e Discussão

Em relação a qualidade tintorial, houve diferença significativa entre protocolos ($\chi^2 = 27,953$; $gl = 4$; $p < 0,001$) (Tabela 1). O controle apresentou menor média (3,33) e apenas 44,44% de lâminas aceitáveis, possivelmente influenciado pelo pH da água destilada utilizada que se apresentou ácida, prejudicando a coloração. Os protocolos de coloração com Panótico apresentaram médias entre 4,78 e 5,78, com proporções de lâminas aceitáveis de 77,78% a 91,11%, nos moldes em que a pesquisa foi conduzida a coloração panótica foi superior ao May Grünwald-Giemsa, por ser um corante que não necessita diluição e por isso não sofreu interferência da qualidade da água. Discordando de Zebral et al. (2011), que relatam dificuldades na distinção celular com o corante panótico, porém o autor estudou amostras de peixe da espécie *Odontesthes bonariensis*, ao em vez de cães como no estudo.

Os protocolos P1 e P3 foram semelhantes estatisticamente e apresentaram os melhores desempenhos. O P1 que manteve o protocolo recomendado pelo fabricante e utilizou a técnica de coloração em tempos fixos, superou os protocolos de modificação com coloração por mergulhos (P2 e P4), sugerindo que as modificações propostas não inferem melhoria

significativa no protocolo. Dessa forma, a escolha da coloração adequada é crucial para a visualização e diferenciação das células, (Meireles et al., 2018; Barger et. al., 2015).

Tabela 1. Desempenho dos protocolos de coloração, utilizando May Grünwald-Giemsa e diferentes protocolos de coloração com Panótico rápido, baseados na qualidade tintorial (escore Núcleo+Citoplasma) e percentual de lâminas aceitáveis (escore ≥ 4).

Protocolo	Controle	P1	P2	P3	P4
(Média \pm DP)	3.33 \pm 0.74	5.78 \pm 1.48	5.11 \pm 1.44	5.56 \pm 0.74	4.78 \pm 1.48
Aceitáveis (≥ 4)	44.44%	91.11%	84.44%	88.89%	77.78%
Valor de p	Controle*	Controle: < 0.001	Controle: < 0.001	Controle: < 0.001	Controle: < 0.001
		P2: 0.038	P1: 0.038	P1: 0.791	P1: 0.013
		P3: 0.791	P3: 0.607	P2: 0.607	P2: 0.426
		P4: 0.013	P4: 0.426	P4: 0.109	P3: 0.109

Valores expressos como média \pm desvio padrão (DP) e percentual de lâminas aceitáveis.

controle = protocolo controle corado com May Grünwald-Giemsa; P1= coloração panótico segundo fabricante; P2= panótico com do método de mergulhos nos corantes; P3= panótico com fixação utilizando metanol; P4= panótico com fixação utilizando metanol e método de mergulhos nos corantes. Valores de P obtidos por teste Exato de Fisher para comparações entre protocolos.*p < 0,001: altamente significativo vs. controle; p < 0,05: significativo entre protocolos de coloração com panótico.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2025.

A regressão logística, confirmou influência significativa dos protocolos com Panótico na probabilidade de obtenção de lâminas aceitáveis (LRT = 96,281; p < 0,001), assim como efeito dos avaliadores (LRT = 10,498; p = 0,005), mas sem interação significativa entre o protocolo e os avaliador (p = 0,812).

Estatisticamente, as contagens leucocitárias não revelaram diferenças significativas entre os protocolos de coloração. Apresentando médias e medianas próximas entre os grupos, indicando que, o tipo de corante e as modificações dos protocolos de coloração com panótico não influenciaram diretamente na análise diferencial dos leucócitos: neutrófilos (p = 0,386), linfócitos (p = 0,561), eosinófilos (p = 0,502), monócitos (p = 0,144) e basófilos (p = 0,866). No entanto, deve-se considerar que todos os avaliadores tinham experiência na leitura de lâminas, o que poderia ter contribuído para a consistência dos resultados mesmo no controle que a qualidade tintorial foi inferior. Reforçando que a avaliação dos esfregaços sanguíneos por um médico veterinário experiente é indispensável para a confiabilidade dos resultados (Black et al., 2025).

5 Conclusão

O estudo demonstrou que a coloração por Panótico rápido apresenta boa eficiência e os protocolos com técnica de tempo fixo dos corantes melhoram a qualidade tintorial de lâminas de esfregaço sanguíneo de cães, independentemente do fixador utilizado. Assim, a coloração por Panótico seguindo a bula do fabricante ou substituindo o fixador por metanol, se apresenta eficaz e viável, permitindo a acurácia do diagnóstico.

Referências Bibliográficas

BARGER, A. M.; MACNEILL, A. L. Clinical Pathology and Laboratory Techniques: for Veterinary Technicians. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2015. p. 1-17. ISBN 978-1-118-34509-2.

BLACK, F. S.; et al. Estudo comparativo da contagem diferencial de leucócitos por microscopia e por analisador hematológico automático. Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação, v. 11, n. 3, p. 2164-2174, 2025.

MEIRELES, F. E.; ESTEVAM, T. L. M.; LEITE, L. H. M. Sistema embarcado para coloração automática de lâminas hematológicas. Revista e-Xacta, Belo Horizonte, v. 11, n. 2, p. 9-21, 28 dez. 2018.

ZEBRAL, Y.; ZAFALON-SILVA, B.; ROBALDO, R. Teste de corantes para análise e identificação de células sanguíneas em *Odontesthes bonariensis*. Anais, 2011, Pelotas: UFPel, 2011.

Palavras-chave: Leucócitos; hemograma; técnicas de coloração.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2024-0487

Financiamento: