

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Ana Martiele Engelmann

**ASSOCIAÇÃO DA AMICACINA COM EDTA NA
PSEUDOTROMBOCITOPENIA EM FELINOS**

Santa Maria, RS
2019

Ana Martiele Engelmann

**ASSOCIAÇÃO DA AMICACINA COM EDTA NA PSEUDOTROMBOCITOPENIA
EM FELINOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cinthia Melazzo de Andrade

Santa Maria, RS
2019

Engelmann, Ana Martiele
ASSOCIAÇÃO DA AMICACINA COM EDTA NA
PSEUDOTROMBOCITOPENIA EM FELINOS / Ana Martiele
Engelmann.- 2019.
45 p.; 30 cm

Orientador: Cinthia Melazzo de Andrade
Coorientador: Andressa Bueno
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2019

1. Agregados plaquetários 2. Aminoglicosídeo 3.
Hematologia 4. Gato I. Melazzo de Andrade, Cinthia II.
Bueno, Andressa III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Fatta CRB 10/1728.

© 2019

Todos os direitos autorais reservados a Ana Martiele Engelmann. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

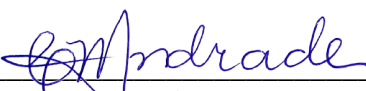
Fone: (55) 9 9900-9773 – e-mail: anamartiele@gmail.com

Ana Martiele Engelmann

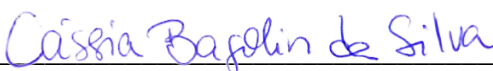
**ASSOCIAÇÃO DA AMICACINA COM EDTA NA PSEUDOTROMBOCITOPENIA
EM FELINOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.


Aprovado em 15 de fevereiro de 2019:



Cinthia Melazzo de Andrade, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Cássia Bagolin da Silva, Dra. (UFSM)



Raqueli Teresinha França, Dra. (UCS)

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar sabedoria, oportunidade, paciência e fôlego para viver mais um dia a cada amanhecer. Sem Ele nada seria.

Aos meus pais que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Por todo o apoio, carinho, amizade e orgulho que sempre mostraram em relação ao sonho de me vir a tornar Mestre em Medicina Veterinária. Aqui lhes deixo os meus mais eternos agradecimentos.

Ao meu noivo Leonardo por todo o carinho, apoio, ajuda, incentivo, companheirismo e toda paciência nos momentos de maior dificuldade. O meu muito obrigada por todos os sorrisos e abraços sinceros e pela presença, sempre tão gratificante, e que em muito contribuiu para o que sou hoje.

À minha orientadora, Prof. Dr^a. Cinthia Melazzo de Andrade, por toda a atenção, confiança, carinho e ensinamentos durante esses dois anos. Por ter me cobrado nos momentos certos e incentivando nos momentos difíceis. Sem dúvidas você foi importante para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Alexandre Krause pelos conhecimentos repassados e por toda a ajuda prestada em relação a esta pesquisa.

À minha co-orientadora, Dr^a Andressa Bueno por toda a paciência, amizade e confiança. Agradeço a todos os conselhos e a toda ajuda prestada não somente em relação a este estudo, mas também a todos os outros trabalhos desenvolvidos durante esses dois anos.

À toda equipe do LACVet/UFSM pelo apoio, ajuda e carinho, em especial às minhas queridas colegas Camila, Fabiane, Lara e Thaís que sempre me auxiliaram em tudo e permitiram que esse trabalho fosse realizado.

Às meninas da UIPA/HVU, Patrícia, Vanessa e Suana por todas as coletas de sangue felino por vocês realizadas, sem o trabalho de vocês este estudo não seria possível.

Ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade e a CAPES pelos recursos financeiros.

Enfim, agradeço a todos os tutores que confiaram em nosso trabalho e que disponibilizaram seus gatos para que pudéssemos realizar este estudo.

A todos meu MUITO OBRIGADA!

RESUMO

ASSOCIAÇÃO DA AMICACINA COM EDTA NA PSEUDOTROMBOCITOPENIA EM FELINOS

AUTORA: Ana Martiele Engelmann
ORIENTADORA: Cinthia Melazzo de Andrade

A pseudotrombocitopenia (PTP) consiste numa falsa diminuição na contagem de plaquetas, sendo este um fenômeno que ocorre *in vitro*, resultante da ativação plaquetária e consequente aglutinação secundária à punção venosa laboriosa, acondicionamento inadequado ou exposição do sangue ao anticoagulante. Fisiologicamente, as plaquetas dos felinos possuem particularidades que as tornam mais reativas e propensas à aglutinação. A presença desses agregados plaquetários interfere na contagem dessas estruturas tanto pelos métodos automatizados quanto manuais. O uso do aminoglicosídeo amicacina em conjunto com o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) tem se mostrado eficiente em relação à prevenção de agregados plaquetários em casos de PTP em humanos. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da amicacina, associada ao EDTA, na prevenção da formação de agregados plaquetários em amostras de sangue felino, bem como investigar os possíveis efeitos da substância sobre os parâmetros hematológicos. Para isso, foi coletado 1mL de sangue de 100 felinos comprovadamente saudáveis, sendo 0,5mL armazenado em tubos com EDTA (grupo EDTA) e 0,5mL com EDTA e 10µL de amicacina (grupo EDTA-AMK). As amostras foram processadas em aparelho automatizado por impedância para obtenção da contagem plaquetária e dos demais parâmetros hematológicos. Esfregaços sanguíneos também foram confeccionados afim de se verificar a presença de agregados plaquetários. Constatou-se a presença de agregados plaquetários em 56% das amostras do grupo EDTA. No grupo EDTA-AMK, esse percentual foi de apenas 5%. Na análise das 56 amostras que apresentaram agregados plaquetários em lâmina, houve diferença estatística ($p < 0,05$) para as amostras do grupo EDTA-AMK em relação às do grupo EDTA, com redução nos valores da contagem de eritrócitos (ERIT), da concentração de hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM) e da contagem de leucócitos totais (LEUC), bem como aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), da contagem de plaquetas (PLT) e do plaquetócrito (PCT). As proporções das alterações sobre esses índices hematimétricos com o uso da amicacina, são em média pouco expressivas para ERIT (-1,73%), HGB (-1,89%), HCT (-3,82%), VCM (-2,12%) e CHCM (2,02%). Por outro lado, para a PLT, PCT e LEUC as alterações médias nos resultados com a adição do aminoglicosídeo foram de 47,73%, 53% e -17,70% respectivamente. Na comparação das 44 amostras do grupo EDTA nas quais não se observou os agregados plaquetários, com as amostras correspondentes do grupo EDTA-AMK, obteve-se resultados semelhantes acerca da influência desse aminoglicosídeo sobre os parâmetros avaliados. Entretanto, as diferenças na PLT, PCT e LEUC do grupo EDTA-AMK em relação ao grupo EDTA foram proporcionalmente menos representativas (18,23%, 19,69% e -9,34%) nas amostras sem a identificação de agregados plaquetários do que naquelas nas quais estes foram observados. Portanto, a adição da amicacina mostrou-se eficaz na prevenção de agregados plaquetários em amostras sanguíneas de felinos, aumentando assim, a acurácia tanto da contagem plaquetária quanto dos leucócitos totais. Diante destes resultados, pode-se recomendar o emprego deste fármaco na rotina laboratorial afim de se aumentar a precisão dos resultados das contagens plaquetária e leucocitária de amostras sanguíneas de felinos destinadas à realização do hemograma.

Palavras-chave: Agregados plaquetários. Aminoglicosídeo. Hematologia. Gato.

ABSTRACT

AMIKACIN ASSOCIATION WITH EDTA IN FELINE PSEUDOTHROMBOCYTOPENIA

AUTHOR: ANA MARTIELE ENGELMANN
ADVISOR: CINTHIA MELAZZO DE ANDRADE

Pseudothrombocytopenia (PTP) consists in a false decrease of platelet counts, is a phenomenon that occurs in vitro, resulting from platelet activation and consequent agglutination secondary to laborious venipuncture, inadequate blood storage or blood exposure to anticoagulant. Physiologically, felines platelets have particularities that make them more reactive and prone to agglutination. The presence of these platelet aggregates interferes with platelet counts by automatic counters and manual methods. The use of aminoglycoside amikacin in association to ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) has been shown to be efficient in preventing platelet aggregates in cases of PTP in humans. In this sense, the aim of this study was to evaluate the efficacy of amikacin, associated with EDTA, in the prevention of platelet aggregates in feline blood samples and to investigate its possible effects on hematological parameters. For this, was collected 1mL of blood from 100 healthy cats, 0.5mL stored in tubes with EDTA (EDTA group) and 0.5ml in tubes with EDTA and 10 μ L amikacin (EDTA-AMK group). The samples were processed in an impedance automated device to obtain the platelet count and other hematological parameters. Blood smears were also made in order to verify the presence of platelet aggregates. The presence of platelet aggregates was found in 56% of the EDTA group samples, in EDTA-AMK group, this percentage was only 5%. In the analysis of the 56 samples that presented platelet aggregates in the blood smear, there was a statistical difference ($p < 0.05$) for the EDTA-AMK group in relation to the EDTA group, with a reduction in red blood cells count (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV) and total white blood cells count (WBC), as well as increased mean corpuscular hemoglobin (MCHC), platelet count (PLT) and plateletcrit (PCT). The proportions of the changes in these hematimetric indexes with the use of amikacin are, on average, not very expressive for RBC (-1.73%), HGB (-1.89%), HCT (3.82%), MCV (2.12%) and MCHC (2.02%). However, the mean changes in the results with the addition of this aminoglycoside were 47.73%, 53% and -17.70%, respectively, for PLT, PCT and for WBC. In the comparison of the 44 samples from the EDTA group in which the platelet aggregates were not observed, with the corresponding samples from the EDTA-AMK group, similar results were obtained regarding the influence of this aminoglycoside on the parameters evaluated. However, the differences in the PLT, PCT and WBC in the EDTA-AMK group in relation to the EDTA group were proportionally less representative (18.23%, 19.69% and -9.34%) in the samples without the identification of platelet aggregates than in those in which they were observed. Then, the addition of amikacin has been shown to be effective in preventing platelet aggregates in feline blood samples, thus increasing the accuracy of both platelet count and total leukocytes. In view of these results, the use of this drug can be recommended in the laboratory routine in order to increase the accuracy of the results of the platelet and leukocyte counts of felines blood samples destined to perform the blood count.

Keywords: Platelet aggregates. Aminoglycoside. Haematology. Cat.

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO

Figure 1 Representative images of blood smears prepared with a blood sample from the same animal. a) Blood smear from the EDTA anticoagulated aliquot (EDTA sample). Note that the arrows showing the platelet clumps. b) Blood smear from the EDTA plus Amikacin anticoagulated aliquot (EDTA-AMK sample).

.....26

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

| | |
|--|----|
| Table 1. Hematological parameters values of feline blood samples with platelet aggregates in EDTA group (n=56), and their counterparts from EDTA-AMK group (n=56) measured by BC-VET 2800..... | 27 |
| Table 2. Hematological parameters values of feline blood samples without platelet aggregates in EDTA group (n=44), and their counterparts from EDTA-AMK group (n=44) measured by BC-VET 2800. | 28 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INTRODUÇÃO

| | |
|------|---|
| ADP | Adenosina difosfato |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| ERIT | Contagem de eritrócitos |
| fL | Fentolítros |
| GP | Glicoproteína |
| IPRO | Iloprost |
| LEUC | Contagem de leucócitos totais |
| PGE1 | Prostaglandina E1 |
| PTP | Pseudotrombocitopenia |
| RBC | Eritrócitos |
| TTPa | Tempo de tromboplastina parcial ativada |
| VPM | Volume plaquetário médio |
| µL | Microlitros |
| µm | Micrômetros |

MANUSCRITO

| | |
|----------|---|
| ADP | Adenosine diphosphate |
| EDTA | Ethylenediamine tetraacetic acid |
| EDTA-AMK | Ethylenediamine tetraacetic acid-Amikacin |
| CBC | Complete cell blood count |
| HCT | Hematocrit |
| HGB | Hemoglobin |
| MCHC | Mean corpuscular hemoglobin concentration |
| MCV | Mean corpuscular volume |
| MPV | Mean platelet volume |
| PCT | Plateletcrit |
| PDW | Platelet distribution width |
| PGE1 | Prostaglandin E1 |
| PLT | Platelet count |
| RBC | Red blood cells count |
| RDW | Red cell distribution width |
| WBC | White blood cells count |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|-----------------------------|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 | MANUSCRITO..... | 19 |
| | Title Page | 20 |
| | Abstract..... | 21 |
| | Introduction..... | 22 |
| | Materials and methods | 23 |
| | Results..... | 25 |
| | Discussion..... | 29 |
| | Conclusions..... | 33 |
| | References..... | 33 |
| 3 | CONCLUSÃO..... | 39 |
| | REFERÊNCIAS | 40 |

1 INTRODUÇÃO

As plaquetas, também denominadas trombócitos, são pequenos fragmentos citoplasmáticos anucleados derivados de megacariócitos (RUSSEL, 2010; STOCKHAM; SCOTT, 2011). O processo de geração de plaquetas circulantes pelas células hematopoiéticas leva em torno de quatro a cinco dias para ser concluído e pode ser dividido em megacariopoiese e trombopoiese (KROLL; KHARGHAN, 2012; RUSSEL, 2010; STOCKHAM; SCOTT, 2011). A megacariopoiese é o processo pelo qual os megacariócitos proliferam e maturam a partir de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes presentes na medula óssea (KROLL; KHARGHAN, 2012). Na trombopoiese, há a formação de plaquetas a partir de megacariócitos maduros e sua liberação para a circulação (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

A trombopoiese ocorre na medula óssea e em outros locais de hematopoiese como baço, fígado e pulmões (KROLL; KHARGHAN, 2012; STOCKHAM; SCOTT, 2011). Na medula óssea, cada megacariócito maduro pode gerar cerca de 10.000 plaquetas durante sua vida útil (SZALAI; LARUE; WATSON, 2006). Contudo, estudos recentes em ratos demonstraram que os pulmões apresentam uma participação maior do que se conhecia na produção plaquetária, podendo contribuir em até 50% da produção total das plaquetas, ou produzir o equivalente a 10 milhões de plaquetas por hora (LEFRANÇAIS et al., 2017).

A trombopoietina é a principal citocina que regula os estágios de proliferação e maturação de megacariócitos até a produção de plaquetas (KROLL; KHARGHAN, 2012; RUSSEL, 2010). Este hormônio é constantemente secretado pelo fígado e, em menor quantidade, pelos rins e pelas células do estroma da medula óssea (RUSSEL, 2010; STOCKHAM; SCOTT, 2011). Uma característica importante observada em estudos com este hormônio é a relação inversa entre a concentração de trombopoietina circulante e a massa de plaquetas (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

Sabe-se que em animais hígdos, a massa de plaquetas é estável e relativamente constante (RUSSEL, 2010). Nesses casos, a trombopoietina liberada rapidamente se liga aos receptores de trombopoietina de alta afinidade, presentes na superfície de plaquetas, sendo então internalizada e degradada (RUSSEL, 2010). Contudo, nos estados trombocitopênicos, um maior nível de trombopoietina livre estará disponível, estimulando assim a produção de plaquetas pela medula óssea (McGAVIN; ZACHARY, 2007; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

A variação da concentração de plaquetas no sangue interespecies é geralmente estabelecida pelas taxas relativas de produção, consumo e destruição de plaquetas bem como

pelo desvio de plaquetas da circulação e para circulação (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Em um indivíduo em repouso, aproximadamente 30% do total da massa circulante das plaquetas está armazenada de forma transitória no baço (RUSSEL, 2010). Em relação ao tempo de circulação, em geral, as plaquetas possuem uma vida média de 5 a 10 dias em indivíduos saudáveis, sendo destruídas e retiradas da circulação por macrófagos presentes no baço e no fígado (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

Apesar de sua morfologia simples no esfregaço sanguíneo, as plaquetas possuem uma estrutura bastante complexa composta por uma porção externa, membrana fosfolipídica e por uma porção interna (BOUDREAUX, 2010; STOCKHAM; SCOTT, 2011). Na membrana fosfolipídica se encontram antígenos, glicoproteínas, e vários tipos de enzimas através dos quais a plaqueta interage com outras células e com a parede dos vasos, sendo essencial para a coagulação. A porção mais interna é composta por microtúbulos, grânulos densos, α -grânulos, sistema tubular denso, mitocôndrias e por reservas de glicogênio (STOCKHAM; SCOTT, 2011). O citosol das plaquetas é rico em actina e miosina o que facilita a mudança de forma e a retração do coágulo (BOUDREAUX, 2010). Os α -grânulos contêm proteínas como o fator plaquetário IV, a β -tromboglobulina, o fator de crescimento derivado de plaquetas, os fatores de coagulação (V, VIII), albumina, fibrinogênio, fator de von Willebrand (FvW) e antagonistas de heparina (PF4), envolvidos na hemostasia e reparação vascular e secretados com estímulos apropriados (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Já, os grânulos densos são compostos por cálcio, magnésio, serotonina, pirofosfato, antiplasmina, difosfato de adenosina (ADP) e trifosfato de adenosina (ATP), todos os quais são secretados estímulos apropriados (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

A principal função das plaquetas é auxiliar na hemostasia e manter o fluxo sanguíneo no interior do vaso (JACKSON, 2011; TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017). Devido à natureza biofísica dos constituintes do sangue e às forças de polaridade no interior vascular, as plaquetas fluem em proximidade com o endotélio dos vasos sanguíneos, permitindo assim, rápida resposta frente a um insulto vascular (HOLINSTAT, 2017). As plaquetas respondem à lesão vascular por meio de uma série de reações que envolvem sua adesão à parede vascular, agregação e liberação dos grânulos, culminando na formação do tampão hemostático primário (BAKER, 2015; MITCHEL et al., 2006).

Em relação às funções não hemostáticas, as plaquetas são importantes nas inflamações aguda e crônica, e na cicatrização de feridas (JAIN, 1993; STOCKHAM; SCOTT, 2011). Elas interagem com leucócitos e liberam aminas vasoativas, citocinas, mitógenos e fatores de

crescimento (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Os fatores de crescimento, contidos nos α -grânulos plaquetários promovem quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização e deposição de matriz extracelular (JAIN, 1993; HOLINSTAT, 2017; WEYRICH; LINDEMANN; ZIMMERMAN, 2003).

A ativação plaquetária pode ocorrer tanto *in vivo* quanto *in vitro* e caracteriza-se por mudanças na expressão dos receptores de superfície (GPIb/IX – receptor de fibrinogênio, glicoproteína IIb/IIIa e receptor de fator von Willebrand), nas concentrações de cálcio, no formato celular, promovendo, além de outras mudanças, a reorganização do citoesqueleto e a centralização de organelas (ESCOLAR; WHITE, 2000). Tais mudanças culminam na alteração da forma discoide para o formato esférico com longas extensões dendríticas (pseudópodes) as quais facilitam a adesão (ESCOLAR; WHITE, 2000). Na análise do esfregaço sanguíneo, as plaquetas ativadas e dispostas em agregados apresentam uma coloração mais pálida devido à perda de seus grânulos, enquanto que as plaquetas das amostras nas quais os agregados plaquetários estão ausentes apresentam uma coloração mais intensa, indicando assim a retenção de seus grânulos (RIOND et al., 2015).

Exames laboratoriais podem ser realizados para avaliar a função plaquetária e a quantidade de plaquetas circulantes no sangue, além dos fatores de coagulação que atuam diretamente na função das plaquetas, e compõem parte da rotina clínica laboratorial veterinária (RUSSEL, 2010). No entanto, alguns cuidados devem ser tomados para a interpretação dos resultados, como informações sobre a coleta e a interpretação conjunta com o histórico clínico do paciente (BAKER, 2015).

A agregação plaquetária representa um problema clínico de grande importância, uma vez que a falha na sua identificação pode resultar na liberação de laudos com contagens plaquetárias falsamente diminuídas, fenômeno conhecido como pseudotrombocitopenia (PTP), o que pode, conseqüentemente, induzir a diagnósticos errôneos, solicitação desnecessária de exames laboratoriais e conduta terapêutica inadequada (ZHOU et al., 2011). Tais condutas podem incluir transfusão de plasma rico em plaquetas, execução de mielograma, esplenectomia e cancelamento de cirurgias em indivíduos com uma concentração plaquetária normal (BERKMANN et al. 1991).

A PTP é um fenômeno que ocorre *in vitro* sendo considerado artefato de técnica resultante da ativação plaquetária e conseqüente agregação secundária à punção venosa laboriosa, acondicionamento inadequado e/ou à exposição do sangue a certos anticoagulantes, em especial ao ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) (RUSSEL, 2010). A natureza

fisiopatológica desse fenômeno ainda é incerta, entretanto, tem sido proposto que o efeito quelante do EDTA sobre os íons cálcio, em conjunto com uma temperatura baixa, conduz a uma alteração conformacional no complexo glicoproteico GPIIb/IIIa e, conseqüentemente, a exposição do epítopo da glicoproteína IIb na superfície plaquetária. Se o indivíduo possuir autoanticorpos antiplaquetários naturais contra este “neoepítopo”, a sua ligação vai estimular a expressão de antígenos ativantes a nível da superfície plaquetária, incluindo a proteína membranar α -granular 140 (PMG140), a glicoproteína da membrana lisossomal (GPL) e a trombospondina, com conseqüente ativação da via de sinalização intracelular tirosina cinase e finalmente a agregação plaquetária (OZCELIK et al., 2012; FIORIN et al., 1998; CASONATO et al., 1994). Estima-se que aproximadamente 0,1% de toda a população possua anticorpos antiplaquetários naturais dependentes de EDTA (GREENBERG & KALED, 2013).

A PTP induzida pelo EDTA foi relatada em humanos, em um canino, em um porco miniatura e em um equino (GOWLAND et al., 1969; HINCHCLIFF; KOCIBA; MITTEN, 1993; RAGAN, 1972; SHREINER; BELL, 1973; WILLS; WARDROP, 2008). Em felinos, a PTP é relatada em 36% (MORITZ; HOFFMANN, 1997), 62% (ZELMANOVIC; HETHERINGTON, 1998) e 71% (NORMAN et al, 2001a) das amostras de sangue de felinos acondicionadas em tubos com EDTA. Em contraste, o quadro de trombocitopenia verdadeira é raro em felinos, com uma prevalência que varia entre 1,2 a 3,2% das amostras acondicionadas em tubos com EDTA (JORDAN; GRINDEM; BREITSCHWERDT, 1993; NORMAN et al., 2001a).

O temperamento dos gatos e a relutância no processo de contenção contribuem para dificuldades no manuseio, sobretudo na punção venosa, o que também pode aumentar a probabilidade de agregação plaquetária *in vitro* (NORMAN et al., 2001a). Para reduzir a formação de agregados, recomenda-se o manuseio suave da amostra, evitando agulhas de pequeno calibre para punção venosa e pressão negativa indevida na seringa, bem como o uso de produtos de vidro siliconados ou recipientes de plástico para a amostra e, também o descarte das primeiras gotas da amostra (NORMAN et al., 2001a; WATSON; AUTHI, 1996).

As plaquetas dos felinos possuem características únicas que fazem com que elas sejam mais reativas do que as plaquetas de outras espécies (RUSSEL, 2010). Essas peculiaridades são relativas ao tamanho das plaquetas, à maior concentração de serotonina nos grânulos, à agregação irreversível e liberação de grânulos quando expostos à serotonina e à agregação irreversível em resposta a baixas concentrações de ADP (RUSSEL, 2010). A agregação

plaquetária irreversível em resposta à liberação de serotonina pelos grânulos densos é única nos felinos (WATSON; AUTHI, 1996).

Na maioria das espécies, o tamanho das plaquetas varia de 2 a 4 μm (BOUDREAUX et al., 2010). Em gatos, o seu tamanho pode variar de 2 a 6 μm ou mais e pode, muitas vezes, se sobrepor ao tamanho dos eritrócitos, tornando, assim, difícil a determinação precisa da concentração plaquetária (BOUDREAUX et al., 2010).

Em função dessa divergência marcante no tamanho das plaquetas dos gatos, o volume plaquetário médio (VPM) nessa espécie é de 11,0 – 18,1 fL, sendo significativamente maior do que o volume encontrado em humanos, caninos e suínos que variam de 7,6 - 8,3 fL (JAIN, 1993; WEISER; KOCIBA, 1984). De acordo com estudos desenvolvidos por Davis et al. (2008) e por Kunishima et al. (2009), uma mutação no gene que codifica o dímero $\beta 1$ -tubulina – que está envolvido na formação dos microtúbulos - está relacionada com a produção de plaquetas de tamanho grande (macroplaquetas) em casos de macrotrombocitopenia hereditária tanto em caninos da raça Cavalier King Charles Spaniel quanto em seres humanos. Na família Felidae também existe uma alteração no mesmo gene, sugerindo assim, que essa variação pode contribuir para a variabilidade observada no tamanho das plaquetas dos felinos (BOUDREAUX et al., 2010).

Nos contadores hematológicos por impedância elétrica, que são amplamente utilizados na prática veterinária, o número de células é determinado a partir da contagem dos impulsos elétricos e o volume de cada célula pode ser determinado pela amplitude do impulso elétrico correspondente (MORITZ; BECKER, 2010; WILLARD; TVEDTEN, 2012). Esses contadores são calibrados eletronicamente para contar apenas células dentro de um intervalo de tamanho apropriado para cada espécie (WILLARD; TVEDTEN, 2012). No caso dos felinos, como o tamanho das plaquetas frequentemente supera o das hemácias, esse tipo de aparelho acaba por computar plaquetas como eritrócitos (ERIT) (NORMAN et al., 2001a; WILLARD; TVEDTEN, 2012). No entanto, essa diferença não afeta a contagem total de ERIT uma vez que a proporção dessas células é muito maior do que a de plaquetas (NORMAN et al., 2001a).

A presença de agregados plaquetários na amostra também interfere na enumeração plaquetária pelos contadores hematológicos por impedância (NORMAN et al., 2001a). Neste caso, o agrupamento de plaquetas é identificado no contador hematológico como uma célula maior, sendo muitas vezes contado como um leucócito (KNOLL; ROWELL, 1996). Assim, na presença de agregados plaquetários, ao mesmo tempo em que se observa um aumento errôneo na contagem leucocitária, há o decréscimo na contagem plaquetária fenômenos conhecidos

como pseudoleucocitose e pseudotrombocitopenia, respectivamente (SCHREZENMEIER et al., 1995; BYRNE et al., 1994; KNOLL; ROWELL, 1996; NORMAN et al., 2001b; RIOND et al., 2015).

A contagem manual de plaquetas por meio do hemocítmetro e a estimativa plaquetária no esfregaço sanguíneo também são afetadas pela presença desses agregados (WILLARD; TVEDTEN, 2012). Nesses casos, além de não ser possível realizar a contagem das plaquetas individualmente, as mesmas estão distribuídas na lâmina de forma desigual, prejudicando a precisão das contagens (WILLARD; TVEDTEN, 2012). Portanto, a determinação precisa da concentração de plaquetas em felinos depende da ausência de agregados (NORMAN et al., 2001a; WILLARD; TVEDTEN, 2012).

A escolha do tipo de anticoagulante utilizado para a avaliação das plaquetas é tão importante que vários estudos se dedicaram à comparação dos mesmos, a fim de determinar qual é o mais eficiente na conservação de amostras para essa finalidade (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2004; MYLONAKIS et al., 2008; NORMAN et al., 2001a). Um estudo realizado com 70 cães, sugeriu que o anticoagulante citrato de sódio é menos eficaz na prevenção da formação de agregados plaquetários quando comparado com o EDTA (MYLONAKIS et al., 2008). Além disso, foi observado que após 24 horas, esses agregados são menos frequentes quando as amostras são mantidas à temperatura ambiente, em vez de submetidas à refrigeração (4° C) (MYLONAKIS et al., 2008). Outro estudo realizado em felinos, comparando o citrato de sódio com o EDTA demonstrou que, além da redução da agregação plaquetária, houve um aumento nas contagens plaquetárias das amostras acondicionadas em citrato de sódio tanto na técnica manual quanto automatizada (FUCK, 2012). A pesquisa também constatou que com o transcorrer do tempo o EDTA se mostrava menos eficaz, causando diminuição do número de plaquetas (FUCK, 2012).

Vários estudos descrevem alternativas para se contornar a problemática da agregação plaquetária em amostras sanguíneas de felinos coletadas com EDTA, como a homogeneização utilizando-se aparelho homogeneizador tipo *vórtex* e o pré-aquecimento das amostras de sangue a 37°C antes da análise hematológica, porém sem sucesso como alternativa para reduzir as agregações *in vitro* (TVEDTEN; KORCAL, 2001; WILLIAMS; ARCHER, 2016). Outros estudos demonstraram que o acréscimo da prostaglandina E1 (PGE1) ao tubo com EDTA é eficaz na prevenção da agregação plaquetária, todavia sua utilização requer manipulação específica, pois a PGE1 deve permanecer congelada a -18°C até instantes antes da coleta da amostra sanguínea (TVEDTEN; JOHANSSON, 2010). Além disso, trata-se de uma técnica

onerosa, por vezes inviabilizando sua aplicabilidade na prática clínica (TVEDTEN; JOHANSSON, 2010).

De forma semelhante, o acréscimo do análogo sintético da prostaglandina I₂, Iloprost (IPRO) ao tubo com EDTA também se mostrou eficaz contra a agregação plaquetária em amostras de felinos, inclusive superando os resultados obtidos pela técnica de suplementação da PGE₁ (RIOND et al., 2015). Trata-se de uma substância que permanece estável por 16 semanas a temperatura ambiente, além de ser mais viável do ponto de vista financeiro (RIOND et al., 2015; TVEDTEN; BÄCKLUND; LILLIEHÖÖK, 2015).

Outro grupo de pesquisadores sugere a adição dos aminoglicosídeos gentamicina, canamicina ou amicacina na amostra sanguínea de seres humanos com PTP dependente de EDTA (AHN et al., 2002; JEON; YANG, 2005; SAKURAI et al., 1997; ZHOU et al., 2011). Os aminoglicosídeos formam um grupo de antimicrobianos heterogêneo quanto à sua composição química, propriedades antibacterianas e farmacológicas (SOUSA, 2006). São substâncias altamente solúveis em água e estáveis em pH entre 6,0 e 8,0. São muito utilizados no tratamento do quadro de sepse provocado por bacilos gram-negativos e cocos gram-positivos (PALOMINO; PACHÓN, 2003; SOUSA, 2006; SOUZA et al., 2008; TOTH et al., 2010).

Diversos trabalhos demonstraram que a amicacina, foco deste estudo, apresenta eficácia tanto na prevenção, quanto na dissolução de agregados plaquetários em casos de PTP em humanos (BOKAEI et al., 2016; SAKURAI et al., 1997; ZHOU et al., 2011). Zhou et al. (2011), ao testarem uma variedade de substâncias descritas anteriormente com capacidade de inibir a agregação plaquetária, tais como, os aminoglicosídeos amicacina e gentamicina, a aminofilina e a vitamina B₆, demonstraram que somente a amicacina foi capaz de prevenir a agregação plaquetária em um paciente com PTP induzida por diferentes anticoagulantes.

Ainda, Bokaei et al. (2016), verificaram que a suplementação de 5mg/mL de amicacina ao tubo com heparina sódica foi capaz de corrigir a contagem plaquetária em dois pacientes com contagens consideravelmente baixas ($5 \times 10^9/L$). Uma concentração de 20 mg/mL de amicacina também foi testada, contudo, não foi verificado nenhum aumento adicional na contagem. Da mesma forma, Lin et al. (2014) constataram que o efeito dissociativo da agregação plaquetária não depende da concentração de amicacina.

Chen, Fei, Ling (2012), investigaram os efeitos dos aminoglicosídeos gentamicina, estreptomicina, etimicina, amicacina e canamicina sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea no plasma rico e pobre em plaquetas, bem como os mecanismos subjacentes. Neste estudo, tanto a amicacina quanto a gentamicina foram capazes de inibir os efeitos da agregação

plaquetária induzida por ADP de maneira dose dependente, ou seja, a medida que se utilizava uma concentração maior desses aminoglicosídeos houve uma redução na taxa de agregação plaquetária do plasma rico em plaquetas e, em contrapartida, uma elevação no tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) do plasma pobre em plaquetas.

O mecanismo pelo qual a amicacina promove a dissociação dos agregados plaquetários ainda permanece desconhecido (BOKAEI et al., 2016). No entanto, acredita-se que um anticorpo que reage de forma cruzada com os aminoglicosídeos é também um anticorpo antiplaquetário (SAKURAI et al., 1997). Logo, a suplementação de aminoglicosídeos em amostras de sangue possui a capacidade de neutralizar a reação de anticorpos antiplaquetários, resultando na prevenção ou dissociação de aglomerados plaquetários (LIN et al., 2014).

A agregação plaquetária é um fenômeno importante, principalmente para a interpretação das contagens dessas estruturas nos felinos, visto que nesta espécie a ativação e agregação dão-se de forma mais rápida e intensa (BYRNE et al., 1994; RUSSEL, 2010). Esses fenômenos geram contagens tanto no contador automático quanto nos métodos manuais aquém dos valores reais (pseudotrombocitopenia), induzindo interpretações e diagnósticos incorretos na análise dos exames laboratoriais (NORMAN et al., 2001a; NORMAN et al., 2001b).

O EDTA é recomendado como o anticoagulante de eleição para a realização da maioria dos testes hematológicos de rotina, pois permite uma boa preservação dos componentes celulares e da sua morfologia, prevenindo também a ativação/agregação plaquetária (BANFI; SALVAGNO; LIPPI, 2007). Substâncias com capacidade antiagregante plaquetária como Iloprost e a própria PGE₂, apesar de terem se mostrado eficazes em associação com o EDTA no sangue de felinos, são de alto custo e de difícil aquisição e, por essas razões, seu emprego na rotina laboratorial veterinária se torna dificultada (TVEDTEN; BÄCKLUND; LILLIEHÖÖK, 2015).

Pesquisas (BOKAEI et al., 2016; SAKURAI et al., 1997; ZHOU et al., 2011) já demonstraram a eficácia da associação da amicacina ao EDTA na prevenção da agregação plaquetária em amostras humanas com pseudotrombocitopenia. Considerando o baixo custo da amicacina, bem como sua fácil aquisição e utilização, torna-se extremamente relevante e promissor avaliar o seu potencial emprego em amostras de sangue de felinos, o que ainda carece de literatura. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da amicacina, associada ao EDTA, na prevenção da formação de agregados plaquetários em amostras de sangue felino, bem como investigar os possíveis efeitos da substância sobre os parâmetros hematológicos.

2 MANUSCRITO

Os resultados deste trabalho encontram-se na forma de manuscrito, o qual será submetido para a revista *Journal of Feline Medicine and Surgery*. As normas da revista podem ser conferidas no site: <https://us.sagepub.com/en-us/sam/journal/journal-feline-medicine-and-surgery#submission-guidelines>

1 **Title Page**

2
3 **Amikacin prevents platelet aggregation in feline venous blood samples**

4
5 **Ana M Engelmann¹, Patrícia A Veleda¹, Camila BE Mello¹, Thaís R**
6 **Mann¹, Fabiane G Roth¹, Lara S Dutra¹, Andressa Bueno¹; Alexandre**
7 **Krause¹, Cinthia M de Andrade¹**

8
9 ¹Department of Small Animal Clinic, Veterinary Hospital, Federal University of
10 Santa Maria, Roraima Avenue, 1000, Santa Maria-RS 97105900, Brazil

11
12 **Corresponding author:**

13 Ana M Engelmann, DMV

14 Department of Small Animal Clinic, Veterinary Hospital, Federal University of
15 Santa Maria, Roraima Avenue, 1000, Santa Maria-RS 97105900, Brazil

16 E-mail: anamartiele@gmail.com

17 Telephone number: 055 55 9 9900-9773

18 ORCID ID: 0000-0001-8449-6223

19 **Keywords:** pseudothrombocytopenia; aminoglycoside; venipuncture; domestic
20 animals.

21

22 **Abstract**

23

24 **Objectives:** The aim of this study was to evaluate the efficacy of amikacin in
25 preventing platelet aggregation in EDTA-containing feline blood samples and to
26 investigate possible effects on haematological parameters.

27 **Methods:** Blood samples (1,0 mL) collected from 100 healthy cats were stored in
28 two EDTA tubes: 0,5 mL in a microtube containing 10 µL of 250 mg/mL amikacin
29 (EDTA-AMK group) and 0,5 mL in a microtube containing only K2 EDTA 10%
30 (EDTA group), performing 200 samples. A Complete Cell Blood Count (CBC) in
31 an automated impedance blood analyser and cytological microscopic
32 examination of blood smears were performed.

33 **Results:** Platelet aggregation was observed in 56% of EDTA group and in only 5%
34 in EDTA-AMK group blood samples. Platelet counts (PLT), plateletcrit (PCT),
35 and white blood cells count (WBC) were significantly higher ($P < 0.001$) in EDTA-
36 AMK group.

37 **Conclusions and relevance:** Amikacin prevent platelets aggregation in feline
38 venous blood samples and did not interfere with other haematological
39 parameters. To our knowledge, this is the first report of the use of amikacin for

40 preventing platelet aggregation in feline blood samples. Our results strongly
41 support the use of amikacin in the routine haematology practice in order to
42 obtain CBC results more reliable for cats.

43

44 **Introduction**

45 Reliable feline platelet counts are difficult to obtain due to the higher
46 occurrence of in vitro platelet aggregation in this species.¹ This event leads to
47 artifactual reduction of platelet count and is reported in 71% of haematological
48 analysis of feline blood samples as the main cause of pseudothrombocytopenia
49 for this species.¹

50 Blood samples are routinely collected in tubes containing EDTA as
51 anticoagulant and several studies have described alternatives to overcome
52 platelet aggregation, such as mixing vortex or prewarming blood samples to 37°C
53 before analysis.^{2,3} Other studies have shown that the addition of prostaglandin
54 E1 (PGE1) to feline EDTA blood samples is effective in preventing the platelet
55 aggregation. However, since it requires special manipulation, is not suitable for
56 routine use.⁴ The addition of Iloprost (IPRO), a synthetic analogue of
57 prostaglandin I2 to the EDTA standard tube has also been shown to inhibits

58 platelet aggregation in feline blood and is more efficient than PGE1.^{5,6} Although
59 substances such as IPRO and PGE1 are effective as anti-aggregant in feline blood,
60 they are expensive and difficult to acquire.

61 In human blood samples with EDTA-dependent
62 pseudothrombocytopenia, the addition of amikacin was effective for prevention
63 and dissolution of platelet aggregates.^{7,8} The mechanism by which amikacin
64 prevents platelet aggregation is unknown.⁹

65 In this context, since amikacin is inexpensive, easy to obtain and to
66 manipulate, the aim of this study was to test its efficacy in preventing platelet
67 aggregation in EDTA feline blood samples and to analyse whether amikacin
68 interferes on the complete blood cells count (CBC).

69

70 **Materials and methods**

71

72 **Blood samples**

73 Blood samples (1,0 mL) collected from 100 healthy cats of different breeds,
74 sex, weight and age were stored in two EDTA tubes: 0,5 mL in a microtube
75 containing 10 µL of 250 mg/mL amikacin (EDTA-AMK group) and 0,5 mL in a

76 microtube containing only K2 EDTA 10% (EDTA group), performing 200
77 samples. The concentration of amikacin was determined according to description
78 for human samples to prevent anticoagulant-dependent
79 pseudothrombocytopenia.^{8,9} The Animal Welfare Ethics Committee (CEUA) of
80 Federal University of Santa Maria (UFSM) officially approved this study (number
81 7769220118).

82

83 Equipment and sample processing

84 All samples were processed in duplicate within 30 minutes after collection.
85 An automated impedance counter (BC-VET 2800; Mindray) was used for a
86 complete blood count, which included total white blood count (WBC), red blood
87 count (RBC), hemoglobin concentration (HGB), haematocrit (HCT), mean
88 corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin concentration
89 (MCHC), platelet count (PLT), mean platelet volume (MPV), plateletcrit (PCT)
90 and platelet distribution width (PDW).

91 A blood smear was stained with Diff-Quick and examined under the
92 microscope (X 40 and X 100) for morphological evaluation of blood cells and to

93 identify platelet aggregates. The samples were classified in two subgroups: with
94 or without platelet aggregation.

95

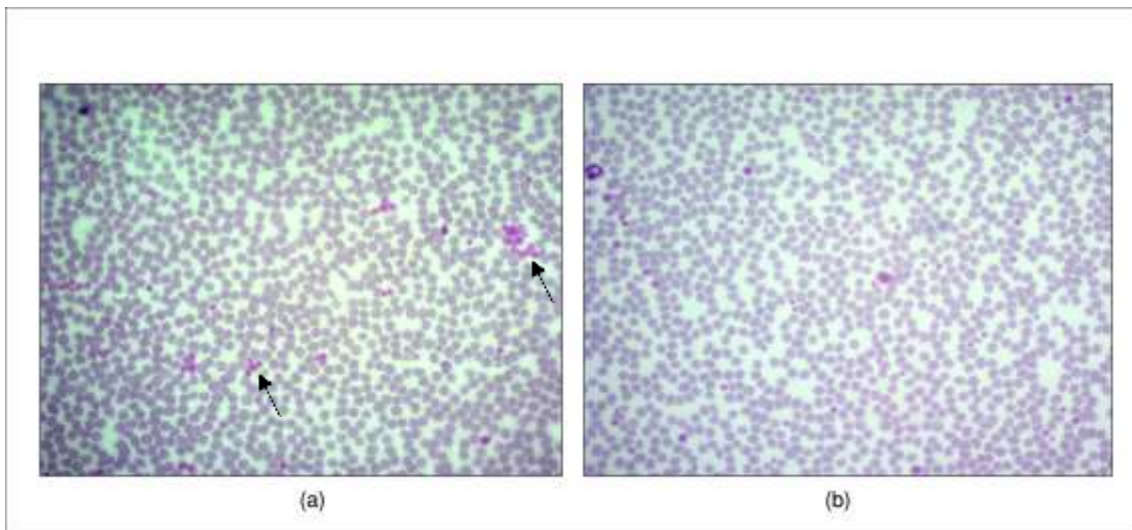
96 Statistical analysis

97 Data were statistically analysed using computer software (IBM SPSS
98 Statistics 23). Determination of data distribution was established using the
99 Kolmogorov-Smirnov test. The Student's *t*-test was used for comparison between
100 the groups with normally distributed data (RBCs, HGB, HCT, MCV, MPV and
101 PDW). The comparison between the groups for the MCHC, RDW, PLT, PCT and
102 WBCs parameters that showed a non-normal distribution was performed using
103 the Wilcoxon signed rank test. A *P* value of <0.05 was considered significant.

104

105 **Results**

106 Platelet aggregation was observed in the blood smear in 56% of the EDTA
107 group. In contrast, amikacin was able to prevent platelet aggregation in 95% of
108 EDTA-AMK group samples (Figure 1).



109

110 **Figure 1** Representative images of blood smears prepared with a blood sample
111 from the same animal. a) Blood smear from the EDTA anticoagulated aliquot
112 (EDTA sample). Note that the arrows showing the platelet clumps. b) Blood
113 smear from the EDTA plus Amikacin anticoagulated aliquot (EDTA-AMK sample).

114

115 The analysis of 56 samples with platelet aggregation revealed difference
116 ($P < 0.05$) between EDTA group and EDTA-AMK groups for all haematological
117 parameters evaluated, except for MPV and RDW. The amikacin addition
118 decreased the mean WBC count (-17.70%) and increased PCT (53.00%) and PLT
119 (47.73%). For the RBC, HGB, HCT, MCV, MCHC and PDW values, the relative
120 mean difference between groups was less significant (Table 1).

121 **Table 1** Hematological parameters values of feline blood samples with platelet
 122 aggregates in EDTA group (n = 56), and their counterparts from EDTA-AMK
 123 group (n = 56) measured by BC-VET 2800.

| | EDTA Group (n=56) | | | EDTA-AMK Group (n=56) | | | Mean Difference Between Groups | | P Value |
|------------------------------|-------------------|--------|--------|-----------------------|--------|--------|-----------------------------------|----------|---------|
| | Median | Mean | SD | Median | Mean | SD | Absolute | Relative | |
| RBC (10 ⁶ /μ) | 9.12 | 9.00 | 1.27 | 8.89 | 8.85 | 1.27 | -0.16 | -1.73% | <0.001 |
| HGB (g/dL) | 14.10 | 13.81 | 1.88 | 13.65 | 13.55 | 1.85 | -0.26 | -1.89% | <0.001 |
| HCT (%) | 42.05 | 41.08 | 5.94 | 39.95 | 39.48 | 5.62 | -1.60 | -3.82% | <0.001 |
| MCV (fL) | 45.80 | 45.82 | 3.89 | 45.23 | 44.85 | 3.86 | -0.97 | -2.12% | <0.001 |
| MCHC (%) | 33.53 | 33.65 | 1.14 | 34.25 | 34.32 | 0.98 | 0.67 | 2.02% | <0.001 |
| RDW (%) | 16.30 | 16.25 | 0.88 | 16.30 | 16.20 | 0.88 | -0.05 | -0.28% | 0.249 |
| MPV (fL) | 9.03 | 8.99 | 0.95 | 9.00 | 9.01 | 0.86 | 0.01 | 0.39% | 0.838 |
| PDW (%) | 16.00 | 15.92 | 0.45 | 15.78 | 15.77 | 0.42 | -0.14 | -0.88% | 0.001 |
| PCT (%) | 0.0925 | 0.1219 | 0.1011 | 0.1358 | 0.1615 | 0.1032 | 0.0396 | 53.00% | <0.001 |
| PLT (10 ³ /μL) | 97.50 | 131.99 | 105.02 | 149.75 | 175.90 | 109.30 | 43.90 | 47.73% | <0.001 |
| WBC (/μL) | 11,500 | 12,163 | 4,029 | 9,000 | 9,750 | 3,269 | -2,413 | -17.70% | <0.001 |

124 Statistically significant *P* values (<0.05);

125 RBC = red blood cells; Hb = hemoglobin; HCT = hematocrit; MCV = mean cell
 126 volume; MCHC = mean cell haemoglobin concentration; RDW = red blood cell
 127 distribution width; MPV = mean platelet volume; PDW= platelet distribution width;
 128 PCT = plateletcrit; PLT = platelets; WBC= white blood cells

129

130 In the 44 samples without platelet aggregation of the EDTA group, similar
 131 statistical results were obtained when compared to their corresponding EDTA-
 132 AMK group samples, except for PDW that did not differ between the groups.
 133 However, the mean differences in PCT, PLT and WBC were proportionally less
 134 representative in these samples (Table 2) in comparison with those 56 samples
 135 with platelet aggregates. In regard to blood cell morphology, the microscopic
 136 analysis of the blood smear demonstrated that the association of amikacin to
 137 EDTA tubes had no effect on WBC and RBC morphologic features.

138

139 **Table 2** Hematological parameters values of feline blood samples without platelet
 140 aggregates in EDTA group (n = 44), and their counterparts from EDTA-AMK
 141 group (n = 44) measured by BC-VET 2800.

| | EDTA Group (n=44) | | | EDTA-AMK Group (n=44) | | | Mean Difference Between Groups | | P Value |
|-----------------------------|-------------------|-------|------|-----------------------|-------|------|-----------------------------------|----------|---------|
| | Median | Mean | SD | Median | Mean | SD | Absolute | Relative | |
| RBC (10 ⁶ /μ) | 9.44 | 9.45 | 1.09 | 9.24 | 9.32 | 1.12 | -0.14 | -1.49% | <0.001 |
| HGB (g/dL) | 14.05 | 14.24 | 1.61 | 13.95 | 14.01 | 1.69 | -0.23 | -1.67% | <0.001 |
| HCT (%) | 41.00 | 41.70 | 4.97 | 39.85 | 40.56 | 5.14 | -1.15 | -2.81% | <0.001 |
| MCV (fL) | 44.30 | 44.34 | 4.09 | 43.84 | 43.73 | 4.08 | -0.61 | -1.38% | <0.001 |
| MCHC (%) | 34.00 | 34.14 | 1.37 | 34.25 | 34.54 | 1.32 | 0.40 | 1.18% | <0.001 |
| RDW (%) | 16.00 | 16.21 | 0.86 | 16.10 | 16.31 | 0.89 | 0.10 | 0.63% | 0.053 |

| <i>Table continuation</i> | | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| MPV (fL) | 8.80 | 8.85 | 0.90 | 8.75 | 8.76 | 0.77 | -0.09 | -0.77% | 0.158 |
| PDW (%) | 15.76 | 15.70 | 0.46 | 15.63 | 15.63 | 0.45 | -0.07 | -0.44% | 0.074 |
| PCT (%) | 0.1260 | 0.1336 | 0.0910 | 0.1318 | 0.1450 | 0.0860 | 0.0114 | 19.69% | 0.040 |
| PLT ($10^3/\mu\text{L}$) | 134.00 | 149.61 | 93.92 | 154.50 | 166.15 | 93.67 | 16.54 | 18.23% | 0.001 |
| WBC ($/\mu\text{L}$) | 9,500 | 10,811 | 4,822 | 8,400 | 9,684 | 4,540 | -1,127 | -9.34% | <0.001 |

142 Statistically significant *P* values (<0.05);

143 RBC = red blood cells; Hb = hemoglobin; HCT = hematocrit; MCV = mean cell
 144 volume; MCHC = mean cell haemoglobin concentration; RDW = red blood cell
 145 distribution width; MPV = mean platelet volume; PDW= platelet distribution width;
 146 PCT = plateletcrit; PLT = platelets; WBC= white blood cells

147

148 Discussion

149 This is the first report of the use of amikacin on platelet aggregation
 150 prevention in feline EDTA blood samples. Our results showed that platelet
 151 aggregation occurred in more than a half (56%) of samples without amikacin and
 152 in only 5% when amikacin was added in the EDTA-tube.

153 Other authors found in vitro platelet aggregation occurrence between 36%
 154 and 71% in feline blood samples, similar to our results.^{2,10,11} Several factors could
 155 explain the greater degree of aggregation in feline platelets, including increased

156 size, increased sensitivity to serotonin and to low concentrations of ADP.¹¹ Since
157 venipuncture may lead to stress in feline, adrenaline levels rise to a concentration
158 able to contribute in platelet activation.¹² For these reasons,
159 pseudothrombocytopenia is a common phenomenon in feline blood samples.

160 In automated haematology analysers, especially for impedance, platelet
161 aggregates are often interpreted as a larger cell and counted as a leukocyte.¹³
162 These instruments, widely used in the laboratory routine, are electronically
163 calibrated to count only cells with an appropriate size interval for different
164 species.^{14,15} This error results in pseudoleukocytosis and
165 pseudothrombocytopenia,^{5, 13,16,17} and may be relevant for the interpretation of
166 laboratory values, as observed in the present study (17.70% and 47.73%,
167 respectively).

168 Some small aggregates can also be interpreted as RBC, since platelets may
169 have 2 to 6 μm ^{18,19}, while the diameter of feline RBC is 5.5 to 6.3 μm ²⁰. Thus,
170 aggregates up to 5 μm may be counted as an erythrocyte by the automated
171 counter. In our study, the EDTA group samples had a higher erythrocyte count
172 than the EDTA-AMK samples. We believe that small platelet aggregates were

173 counted as RBC in EDTA group samples. Moreover, small platelet aggregates
174 present in the 44 samples without amikacin, may be counted as leukocytes,
175 explaining the increase of this parameter in these samples.

176 Platelet indexes, such as MPV and PDW, contribute to the differentiation
177 between pseudo and thrombocytopenia. The dissolution of platelet aggregates
178 decreased these two parameters.²² In our results, there was no decrease in mean
179 platelet volume probably due to EDTA-induced platelet swelling.²³ On the other
180 hand, amikacin induced a decrease in PDW. Thus, we believe that it prevented
181 platelet activation since its size did not change. The increase in PCT was expected
182 in amikacin samples.

183 There is no accurate method to estimate the platelet count.¹⁷ The
184 automated counting is able to detect significant more cells than in the manual
185 count, and for this reason, the error coefficient is reduced.¹⁷ Nevertheless,
186 haemocytometer counts are still accepted as the reference method for feline
187 platelet count.² In the presence of platelet aggregation, both methods become
188 more imprecise.¹⁵ Moreover, the impedance counters have high sensitivity and
189 low specificity for a feline platelet count. Therefore, a platelet count within the

190 reference values is reliable, but when decreased, this count should be checked in
191 a haemocytometer.²⁴

192 Thrombocytopenia, with a platelet count below 200,000 platelets/ μ L of
193 blood, is a rare haematological event in felines.^{1,25} In EDTA-AMK group samples
194 were the platelet counts was below the reference value, manual counts were also
195 performed. However, in EDTA group samples (56%), it was not possible to
196 perform the manual counting by the presence of platelet aggregates since the
197 precise determination of the platelet count is not possible in these cases.¹

198 The mechanism by which amikacin prevents platelet aggregation is not
199 fully understood.⁹ Authors suggest that amikacin neutralizes antiplatelet
200 antibodies, resulting in the prevention or dissociation of these aggregates.⁷ Thus,
201 the mechanism of amikacin on feline platelet aggregation may be related to the
202 lower platelet stimulation due to non-binding to GP IIb/IIIa, since this is the
203 common final pathway of platelet aggregation, independently of the agonist that
204 initiated this process.²⁶ Regardless the involved mechanism, we could observe a
205 more accurate platelet count when amikacin was added to the EDTA tube.

206

207 **Conclusions**

208

209 Since platelet aggregation frequently occurs in feline blood samples, and
210 the Amikacin association to EDTA-tubes has been effective in preventing this
211 event without impairing other haematological analysis, the use of amikacin is
212 recommended for EDTA-blood samples of feline species.

213

214 **Funding:** Part of this study was funded by the Higher Level Personnel
215 Coordination – Brazil (CAPES) – Finance Code 001.

216

217 **Conflict of interest statements:** The authors declared no potential conflicts of
218 interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

219

220 **References**

221 1 Norman EJ, Barron RCJ, Nash AS, et al. **Prevalence of low automated**
222 **platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia**
223 **based on blood smear examination.** *Vet Clin Pathol* 2001a; 3: 137–140.

- 224 2 Tvedten H and Korcal D 2001. **Vortex mixing of feline blood to disaggregate**
225 **platelet clumps.** *Vet Clin Pathol* 2001; 3: 104-106.
- 226 3 Williams TL and Archer J. **Effect of prewarming EDTA blood samples to**
227 **37°C on platelet count measured by Sysmex XT-2000iV in dogs, cats, and**
228 **horses.** *Vet Clin Pathol* 2016; 3: 1-6.
- 229 4 Tvedten H and Johansson P. **Feline platelet counting with prostaglandin E1**
230 **on the Sysmex XT-2000iv.** *Vet Clin Pathol* 2010; 2: 190-192.
- 231 5 Riond B, Waßmuth AK, Hartnack S, et al. **Effective prevention of**
232 **pseudothrombocytopenia in feline EDTA blood specimens with the**
233 **prostaglandin I2-analog Iloprost.** *BMC Vet Res* 2015; 183: 1-8.
- 234 6 Tvedten H, Bäcklund K and Lilliehöök IE. **Reducing error in feline platelet**
235 **enumeration by addition of iloprost to blood specimens: comparison to**
236 **prostaglandin E1 and EDTA.** *Vet Clin Pathol* 2015; 2: 179-187.
- 237 7 Sakurai S, Shiojima I, Tanigawa T, et al. **Aminoglycosides prevent and**
238 **dissociate the aggregation of platelets in patients with EDTA dependent**
239 **pseudothrombocytopenia.** *Br J Haematol* 1997; 4: 817-823.

- 240 8 Lin J, Luo Y, Yao S, et al. **Discovery and correction of spurious low platelet**
241 **counts due to EDTA-dependent pseudothrombocytopenia.** *J Clin Lab Anal*
242 2015; 5: 419-426.
- 243 9 Bokaei PB, Grabovsky D, Shehata N, et al. 2016. **Impact of amikacin on**
244 **pseudothrombocytopenia.** *Acta Haematol* 2016; 1: 27-29.
- 245 10 Zelmanovic D and Hetherington EJ. **Automated analysis of feline platelets**
246 **in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and**
247 **activation state.** *Vet Clin Pathol* 1998; 1: 2-9.
- 248 11 Russel KE. **Platelet kinetics and laboratory evaluation of**
249 **thrombocytopenia.** In: Weiss DJ and Wardrop KJ (eds). *Schalm's Veterinary*
250 *Hematology*. 6th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell, 2010, pp 576-585.
- 251 12 Tschopp TB. **Aggregation of cat platelets in vitro.** *Thromb Diath Haemorrh*
252 1969; 23: 601-620.
- 253 13 Knoll JS and Rowell SL. **Clinical haematology in-clinic analysis, quality**
254 **control, reference values, and system selection.** *Vet Clin North Am Small*
255 *Anim Pract* 1996; 5: 981-1002.

- 256 14 Moritz A and Becker M 2010. **Automated hematology systems**. In: Weiss DJ
257 and Wardrop KJ (eds). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Ames, IA:
258 Wiley-Blackwell, 2010, pp 1054–1056.
- 259 15 Weiss DJ and Tvedten H. **The complete blood count, bone marrow**
260 **examination and blood banking**. In: Willard MD and Tvedten H. (eds).
261 *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. 5th ed. St Louis,
262 Elsevier, 2012, pp 12-37.
- 263 16 Byrne RF, Andrews CM, Libretto SE, et al. **Canine and feline haematology**
264 **analysis: comparative performance of Technicon H*1 and AVL MS8 VET**
265 **analysers**. *Comp Haematol Int* 1994; 4: 212-217.
- 266 17 Norman EJ, Barron RCJ, Nash AS, et al. **Evaluation of a citrate-based**
267 **anticoagulant with platelet inhibitory activity for feline blood cell counts**.
268 *Vet Clin Pathol* 2001b; 3: 124-132.
- 269 18 Weiser MG and Kociba GJ. **Platelet concentration and platelet volume**
270 **distribution in healthy cats**. *Am J Vet Res* 1984; 3: 518-522.

- 271 19 Boudreaux MK and Ebbe S. **Comparison of platelet number, mean platelet**
272 **volume and platelet mass in five mammalian species.** *Comp Haematol Int*
273 1998; 1: 16-20.
- 274 20 Rizzi TE, Clinkenbeard KD and Meinkoth JH. **Normal hematology of the cat.**
275 In: Weiss DJ and Wardrop KJ (eds). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed.
276 Ames, IA: Wiley-Blackwell, 2010, pp 811-820.
- 277 21 Harvey JW. **Evaluation of erythrocytes.** In: Harvey JW (ed). *Veterinary*
278 *hematology. A diagnostic guide and color atlas*. St Louis, MO: Elsevier
279 Saunders, 2012, pp 1-10.
- 280 22 Tan GC, Stalling M, Dennis G, et al. **Pseudothrombocytopenia due to**
281 **platelet clumping: a case report and brief review of the literature.** *Case Rep*
282 *Hematol* 2016; 2016: 3036476.
- 283 23 Holme S, Murphy S. **Coulter counter and light transmission studies of**
284 **platelets exposed to low temperature, ADP, EDTA, and storage at 22°.** *J Lab*
285 *Clin Med* 1980; 96: 480-493.
- 286 24 Tasker S, Cripps PJ and Mackin AJ. **Evaluation of methods of platelet**
287 **counting in the cat.** *J Small Anim Pract* 2001; 7: 326-332.

- 288 25 Jordan HL, Grindem CB and Breitschwerdt EB. **Thrombocytopenia in cats:**
289 **a retrospective study of 41 cases.** *J Vet Intern Med* 1993; 5: 261-265.
- 290 26 Magee AN, Hogan DF, Sederquist KA et al. **In vitro effects of the**
291 **glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists abciximab and eptifibatide on**
292 **platelet aggregation in healthy cats.** *Am J Vet Res* 2014;3: 309-312.

3 CONCLUSÃO

Por meio deste estudo é possível concluir que a amicacina previne a formação de agregados plaquetários em amostras de sangue felino. Em adição, seu uso incrementa significativamente a contagem de plaquetas, bem como reduz o número de leucócitos totais, quando comparado ao EDTA isoladamente.

Em relação aos outros parâmetros hematológicos, bem como características morfológicas celulares, a amicacina não influencia os resultados e, dessa forma, pode ser adicionada sem qualquer prejuízo à amostra.

A partir destes resultados, pode-se sugerir a implementação deste fármaco na rotina laboratorial afim de se aumentar a precisão dos resultados das contagens plaquetária e leucocitária de amostras sanguíneas de felinos destinadas à realização do hemograma.

REFERÊNCIAS

- AHN, H. L. et al. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia confirmed by supplementation of kanamycin; a case report. **Korean J. Intern. Med.**, Seoul, v.17, n.1, Mar. 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4531650/>>. Acesso em: 8 ag. 2017. DOI: 10.3904/kjim.2002.17.1.65
- BAKER, D. C. Diagnóstico das Anormalidades de Hemostasia. In: THRALL, M. A. et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. São Paulo: ROCA, 2015. cap.16, p.399–439.
- BANFI, G.; SALVAGNO, G.L.; LIPPI, G. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. **Clin. Chem. Lab. Med.**, Berlin, v. 45, n. 5, May 2007. Disponível em:< <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.2007.45.issue-5/cclm.2007.110/cclm.2007.110.xml> >. Acesso em 18 jan. 2019. DOI: 10.1515/CCLM.2007.110
- BERKMAN, N. et al. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical study of 18 patients and a review of the literature. **Am. J. Hematol.**, New York, v.36, n.3, Mar. 1991. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.2830360307/pdf>>. Acesso em: 8 ag. 2017. DOI: 10.1002/ajh.2830360307.
- BYRNE, R.F. et al. Canine and Feline Haematology Analysis: Comparative Performance of Technicon H*I and AVL MS8 VET Analysers. **Comp. Haematol. Int.**, London, v. 4, n.4, Dec. 1994. Disponível em: < <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00185176.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2018.
- BOKAEI, P.B. et al. Impact of amikacin on pseudothrombocytopenia. **Acta Haematol.**, Basel, v.137, n.1, Nov. 2016. DOI: 10.1159/000452266.
- BOUDREAUX, M. K. Platelet Structure. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Ames: Blackwell, 2010. cap. 75, p. 561-568.
- BOUDREAUX, M. K. et al. Unique structure of the M loop region of β 1-tubulin may contribute to size variability of platelets in the family Felidae. **Vet. Clin. Pathol.**, Columbia, v.39, n.4, Dec. 2010. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2010.00256.x/epdf>>. Acesso em: 7 jul. 2017. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2010.00256.x.
- CASONATO, A., et al. EDTA dependent pseudothrombocytopenia caused by antibodies against the cytoadhesive receptor of platelet GP IIB-IIIa. **J. Clin. Pathol.** London, v. 47, n. 7, Jul 1994. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC502090/>>. Acesso em: 12 nov. 2017.
- CHEN, G.; FEI, X.; LING, J. The effects of aminoglycoside antibiotics on platelet aggregation and blood coagulation. **Clin. Appl. Thromb. Hemost.**, New York, v. 18, n.5, Feb. 2012. Disponível em: < <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1076029611430955>>. Acesso em: 5 mai. 2017. DOI: 10.1177/1076029611430955.

DAVIS, B. et al. Mutation in b1-tubulin correlates with macrothrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels. **J. Vet. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 22, n. 3, Mai-Jun. 2008. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/resolve/doi?DOI=10.1111/j.1939-1676.2008.0085.x> >. Acesso em 8 ag. 2017. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2008.0085.x.

DUSSE, L. M. S'A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M.G. Pseudothrombocytopenia. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 40, n.5, Out. 2004. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442004000500007 >. Acesso em: 15 mai. 2017. DOI: 10.1590/S1676-24442004000500007.

ESCOLAR, G.; WHITE, J.G. Changes in glycoprotein expression after platelet activation: differences between in vitro and in vivo studies. **Thromb Haemost**, Stuttgart, v.83, n.3, Mar. 2000.

FIORIN, F., et al. IgG platelet antibodies in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia bind to platelet membrane glycoprotein IIb. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v.110, n.2, Aug. 1998.

FUCK, E. M. T., et al. Efeitos dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio na contagem de plaquetas e leucócitos de gatos domésticos, em diferentes intervalos de tempo. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 33, 2012.

GREENBERG, E.M.; KALED, E.S. Thrombocytopenia. **Crit. Care Nurs. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 25, n. 4, Dec. 2013. Disponível em:< <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899588513000701?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 nov. 2017. DOI: 10.1016/j.ccell.2013.08.003

GOWLAND, E. et al. Agglutination of platelets by a serum factor in the presence of EDTA. **J. Clin. Pathol.** London, v. 22, n. 4, Jul. 1969. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC474212/pdf/jclinpath00381-0078.pdf>>. Acesso em: 8 ag. 2017.

HINCHCLIFF K.W.; KOCIBA, G.J.; MITTEN, L.A. Diagnosis of EDTA-pseudothrombocytopenia in a horse. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 203, n. 12, p.1715 – 1716, 15 dec. 1993.

HOLINSTAT, M. Normal platelet function. **Cancer Metastasis Rev.**, Boston, v. 36, n. 2, Jun. 2017. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10555-017-9677-x>>. Acesso em 8 ag. 2017. DOI: 10.1007/s10555-017-9677-x.

JACKSON, S. P. Arterial thrombosis insidious, unpredictable and deadly. **Nat. Med.**, New York, v.17, n.11, Nov. 2011. Disponível em: < <https://www.nature.com/nm/journal/v17/n11/full/nm.2515.html>>. Acesso em: 2 set.2017. DOI: 10. 1038/nm.2515.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JEON, I.; YANG, S.W. Prevention and dissociation of the platelet aggregation in a patient with EDTA-dependent pseudothrombocytopenia by supplementation of kanamycin: A case report. **Korean J. Pediatr.**, Söul, v.48, n.6, Mar. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4531650/>>. Acesso em: 19 mai.2017. DOI: 10.3904/kjim.2002.17.1.65.

JORDAN, H.L.; GRINDEM C.B.; BREITSCHWERDT, E.B. Thrombocytopenia in cats: a retrospective study of 41 cases. **J. Vet. Intern. Med.**, Philadelphia, v.7, n.5, Set.1993. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.19391676.1993.tb01017.x/epdf>>. Acesso em: 15 mai. 2017. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1993.tb01017.x.

KNOLL, J.S.; ROWELL, S.L. Clinical haematology in-clinic analysis, quality control,reference values, and system selection. **Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.**, Philadelphia, v.26, n.5, Set. 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561696500513>>. Acesso em: 8 ag. 2017. DOI: 10.1016/S0195-5616(96)50051-3.

KROLL, M. H; KHARGHAN, V. A. Platelets in pulmonary vascular physiology and pathology. **Pulm. Circ.**, Mumbai, v. 2, n. 3, Jul-Set. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc3487299/>>. Acesso em: 7 jul. 2017. DOI: 10.4103/2045-8932.101398.

KUNISHIMA, S. et al. Mutation of the beta1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. **Blood**, Washington, v.113, n.2, Jan. 2009. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/113/2/458?ck=nck&variant=full-text>>. Acesso em: 8 ag. 2017. DOI: 10.1182/blood-2008-06-162610.

LEFRANÇAIS, E. et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. **Nature**, London, v. 544, Abr. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v544/n7648/full/nature21706.html>>. Acesso em: 20 jun. 2017. DOI: 10.1038/nature21706.

LIN J. et al. Discovery and correction of spurious low platelet counts due to EDTA-dependent pseudothrombocytopenia. **J. Clin. Lab. Anal.**, New York, v.29, n. 5, Set., 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.21818/full>>. Acesso em: 20 jun. 2017. DOI: 10.1002/jcla.21818.

McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 4. ed. Saint Louis: Ed. Elsevier Mosby, 2007. 1488 p.

MITCHEL, R. M. et al. **Fundamentos de Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1480p.

MORITZ, A.; HOFFMANN, C. Platelet count in the cat. **Tierarztl. Prax. Ausg. K. Kleintiere Heimtiere**, Stuttgart, v.25, n.6, Nov.1997.

MORITZ, A.; BECKER, M. Automated Hematology Systems. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. cap.135, p.1054–1056.

MYLONAKIS, M. E. et al. Effect of anticoagulant and storage conditions on platelet size and clumping in healthy dogs. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v. 20, n. 6, Nov. 2008.

Disponível em:

<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/104063870802000609?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed>. Acesso em: 8 ag. 2017. DOI: 10.1177/104063870802000609.

NORMAN, E.J. et al. Prevalence of low automated platelet counts in cats: Comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. **Vet. Clin. Pathol.**, Columbia, v.30, n.3, Set. 2001a. Disponível em: <

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2001.tb00422.x/abstract>>. Acesso em: 15 mai. 2017. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2001.tb00422.x.

NORMAN, E. J., et al. Evaluation of a citrate-based anticoagulant with platelet inhibitory activity for feline blood cell counts. **Vet. Clin. Pathol.**, Columbia, v. 30, n.3, Set. 2001b.

Disponível em: < [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2001.tb00420.x/epdf)

[165X.2001.tb00420.x/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2001.tb00420.x/epdf) >. Acesso em: 7 jul. 2017. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2001.tb00420.x.

OZCELIK, F., et al. A useful method for the detection of ethylenediaminetetraacetic acid- and cold agglutinindependent pseudothrombocytopenia. **Am. J. Med. Sci.**, New York, v. 344, n. 5, Nov. 2012. Disponível em:<

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0002962915308053?via%3Dihub>>.

Acesso em: 12 nov. 2017. DOI: 10.1097/MAJ.0b013e318242603d

PALOMINO, J.; PACHÓN, J. Aminoglucósidos. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, Barcelona, v.21, n.2, 2003.

RAGAN, H.A. Platelet agglutination induced by ethylenediaminetetraacetic acid in blood samples from a miniature pig. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v.33, n.12, p.2601-2603, Dec. 1972.

RIOND, B. et al. Effective prevention of pseudothrombocytopenia in feline EDTA blood specimens with the prostaglandin I₂-analog Iloprost.

BMC Vet. Res., London, v. 11, n.183, Mar.2015. Disponível em: <

<https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-015-0510-x>>. Acesso em: 7 jul. 2017. DOI: 10.1186/s12917-015-0510-x.

RIZZI, T. E.; CLINKENBEARD, K.D.; MEINKOTH, J.H. Normal hematology of the cat. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6.ed. Ames: Blackwell, 2010. cap.105, p. 811-820.

RUSSEL, K. E. Platelet Kinetics and Laboratory Evaluation of Thrombocytopenia. In:

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6.ed. Ames: Blackwell, 2010. cap. 77, p. 576-585.

SAKURAI, S., et al. Aminoglycosides prevent and dissociate the aggregation of platelets in patients with EDTA dependent pseudothrombocytopenia. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v. 99, n. 4, Dec. 1997. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2141.1997.4773280.x/epdf>>. Acesso em: 7 jul. 2017. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1997.4773280.x.

SCHREZENMEIER, H. et al. Anticoagulant-induced pseudothrombocytopenia and pseudoleucocytosis. **Thromb. Haemost.**, Stuttgart, v. 73, n.3, Mar. 1995.

SHREINER, D.P., BELL, W.R. Pseudothrombocytopenia: manifestation of a new type of platelet agglutinin. **Blood.**, Washington, v.42, n. 4, Oct. 1973. Disponível em: < <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/42/4/541.full.pdf> >. Acesso em: 10 ag. 2017.

SOUSA, J.C.F. **Manual de antibióticos antibacterianos**. 2. ed. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2006. 686p.

SOUZA, V.B., et al. Alterações renais por aminoglicosídeos. **Arq. Med.**, Porto, v. 22, n.4-5, 2008.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentos de patologia clínica veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 729p.

SZALAI, G.; LARUE, A.C.; WATSON, D.K. Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v. 63, n.21, Nov. 2006. Disponível em: < https://www.researchgate.net/profile/Dennis_Watson/publication/6878738_Molecular_mechanisms_of_megakaryopoiesis/links/547f280a0cf2c1e3d2dc3f3d.pdf>. Acesso em: 10 ag. 2017. DOI: 10.1007/s00018-006-6190-8.

TOMAIUOLO, M.; BRASS, L. F.; STALKER, T. J. Regulation of platelet activation and coagulation and its role in vascular injury and cancer metastasis rev arterial thrombosis. **Interv. Cardiol. Clin.**, Amsterdam, v. 6, n.1, Jan. 2017. Disponível em: < [http://www.interventional.theclinics.com/article/s2211-7458\(16\)30084-0/fulltext](http://www.interventional.theclinics.com/article/s2211-7458(16)30084-0/fulltext)>. Acesso em: 8 ag. 2017. DOI: 10.1016/j.iccl.2016.08.001.

TOTH, M. et al. Crystal structure and kinetic mechanism of aminoglycoside phosphotransferase-200-IVa. **Protein Sci.**, New York, v.19, n.8, Jun. 2010. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pro.437/epdf>>. Acesso em: 8 ag. 2017. DOI: 10.1002/pro.437.

TVEDTEN, H.; KORCAL, D. Vortex mixing of feline blood to disaggregate platelet clumps. **Vet. Clin. Pathol.**, Columbia, v.30, n.3, sept. 2001. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165x.2001.tb00416.x/epdf>>. Acesso em: 15 mai. 2017. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2001.tb00416.x.

TVEDTEN, H.; BÄCKLUND, K.; LILLIEHÖÖK, I.E. Reducing error in feline platelet enumeration by addition of Iloprost to blood specimens: comparison to prostaglandin E1 and EDTA. **Vet. Clin. Pathol.**, Columbia, v.44, n.2, Jun. 2015. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vcp.12247/epdf>>. Acesso em: 15 mai. 2017. DOI: 10.1111/vcp.12247.

TVEDTEN, H.; JOHANSSON, P. Feline platelet counting with prostaglandin E1 on the Sysmex XT-2000iv. **Vet. Clin. Pathol.**, Columbia, v.39, n.2, Jun. 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165x.2009.00210.x/epdf>>. Acesso em: 15 mai. 2017. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2009.00210.x.

WATSON, S.P.; AUTHI, K.S. **Platelets: a practical approach**. 167.ed. Oxford: Oxford University Press, 1996, 370p.

WEISER, M.G.; KOCIBA, G.J. Platelet concentration and platelet volume distribution in healthy cats. **Am J Vet Res.**, Chicago, v.45, n. 3, Mar. 1984.

WEYRICH, A.S.; LINDEMANN, S.; ZIMMERMAN, G.A. The evolving role of platelets in inflammation. **J. Thromb. Haemost.**, Oxford, v.1, n.9, Sept. 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1538-7836.2003.00304.x/epdf>>. Acesso em: 8 ag. 2017. DOI: 10.1046/j.1538-7836.2003.00304.x.

WILLARD, M.D.; TVEDTEN, H. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. 5.ed. Saint Louis: Elsevier, 2012, 418p.

WILLIAMS, T. L.; ARCHER, J. Effect of prewarming EDTA blood samples to 37°C on platelet count measured by Sysmex XT-2000iV in dogs, cats, and horses. **Vet. Clin. Pathol.**, Columbia, v. 45, n.3, Jul. 2016. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vcp.12378/epdf>>. Acesso em: 7 jul. 2017. DOI: 10.1111/vcp.12378.

WILLS, T.B.; WARDROP, K.J. Pseudothrombocytopenia secondary to the effects of EDTA in a dog. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, South Bend, v.44, n.2, Mar. 2008. Disponível em: <http://jaaha.org/doi/10.5326/0440095?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed>. Acesso em: 15 out. 2017. DOI: 10.5326/0440095.

ZELMANOVIC, D.; HETHERINGTON, E. J. Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state. **Vet. Clin. Pathol.**, Columbia, v.27, n.1, Mar. 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165x.1998.tb01071.x/epdf>>. Acesso em: 7 jul. 2017. DOI: 10.1111/j.1939-165x.1998.tb01071.x.

ZHOU, X. et al. Amikacin can be added to blood to reduce the fall in platelet count. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v. 136, n. 4, Oct. 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1309/AJCPMON79QKQKRBT>>. Acesso em: 15 mai. 2017. DOI: 10.1309/AJCPMON79QKQKRBT.