

ANÁLISE COMPARATIVA DE HEMOGRAMAS CANINOS SUBMETIDOS AOS ANTICOAGULANTES EDTA E CITRATO DE SÓDIO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

MARCHI CARNEIRO, Vinícius Antônio¹
THARIN KRZYONOSKI HOLSBACH, Vanessa²
PRIMIERY, Cornelio³

RESUMO

As amostras sanguíneas podem conter alterações hematológicas ocasionadas pela ação de anticoagulantes, acarretando assim na omissão de resultados laboratoriais confiáveis e podendo levar a erros de diagnóstico. O presente estudo visou avaliar os resultados de hemogramas pertencentes a cães que foram obtidos através da utilização de dois diferentes anticoagulantes, sendo avaliados hemácias, leucócitos e plaquetas. Para isso fez-se a coleta de sangue por venopunção jugular dos animais e dividiu-se a amostra em um tubo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e outro com citrato de sódio 3,2%. As amostras foram analisadas em três diferentes tempos, sendo trinta amostras analisadas no tempo de 0h (T1), dez amostras analisadas no tempo de 0h (T1) e 3h (T2) e dez amostras analisadas no tempo de 0h (T1) e 5h (T3). As análises foram representadas através de gráficos, e os dados encontrados demonstraram uma diminuição na contagem de plaquetas em todas as amostras colhidas com citrato de sódio, mostrando uma redução na contagem de plaquetas em T1 e ao longo de T2 e T3. Na contagem de leucócitos o EDTA se manteve mais estável nas amostras analisadas em T2 e T3, já na contagem de hemácias ambos os anticoagulantes se mantiveram estáveis em T2 e T3, mostrando um número reduzido de hemácias em amostras colhidas com citrato de sódio. A partir dos dados obtidos, o EDTA deve ser o anticoagulante de escolha, pois apresentou maior estabilidade nos tempos analisados na maioria das amostras.

PALAVRAS-CHAVE: anticoagulante. citrato de sódio. EDTA. hemograma. canino.

1. INTRODUÇÃO

Um laboratório de patologia clínica tem como propósito fundamental realizar procedimentos analíticos de forma adequada, auxiliando no diagnóstico e tratamento do paciente. O exame laboratorial é um meio de diagnóstico complementar, com a finalidade de acompanhamento das condições de saúde do animal (MOHRI et al., 2007).

O hemograma é de grande importância e muito solicitado na clínica de animais de companhia, sendo importante no acompanhamento e no tratamento de diversos distúrbios hematológicos, portanto é necessário que os resultados do hemograma sejam confiáveis para uma correta interpretação, porém muitos fatores são determinantes para uma boa análise,

¹ Discente do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Assis Gurgacz. Email: vinipcta@gmail.com

² Médica Veterinária. Mestre em Ciência Animal (UEL). Docente do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Assis Gurgacz. vanessa.holsbach@hotmail.com.

³ Engenheiro Agrônomo. Mestre em energia na agricultura (UNIOESTE). Docente do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Assis Gurgacz. primieri@fag.edu.br.

incluindo fatores pré-analíticos como métodos de coleta, tipo do anticoagulante e tempo de armazenamento (BUTTARELLO, 2004).

Tem-se a necessidade de acurácia em exames complementares a fim de se realizar a avaliação do paciente e obter o diagnóstico definitivo. Porém, inúmeros fatores são responsáveis por ocasionar interferência no resultado das análises hematológicas, acarretando assim em erroneidade dos resultados e do diagnóstico. O presente estudo visa comparar a ação dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio em hemogramas realizados em diferentes intervalos de tempo, contribuindo assim para a acurácia do hemograma em cães.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Na clínica de animais de companhia o hemograma é o exame laboratorial mais solicitado devido ao baixo custo, praticidade e grande eficiência no acompanhamento do estado geral do paciente e no auxílio ao diagnóstico definitivo. Além disso, também é imprescindível o pedido de hemograma completo do animal antes do mesmo ser encaminhado para qualquer procedimento cirúrgico (LOPES et al., 2009).

Vários fatores podem contribuir para um resultado incorreto das amostras hematológicas, tais como os métodos de coleta, tempo, forma de armazenamento e a proporção de sangue e anticoagulante (OLIVEIRA et., al 2011), devido a isso, a idoneidade dos laudos emitidos por laboratórios de análises clínicas é essencial, pois cerca de 70% dos diagnósticos são feitos com base nesses resultados (GUIMARÃES et al., 2011)

Levando-se em conta essas informações é fundamental dispor de estratégias para evitar a ocorrência de erros durante as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica do hemograma (COSTA, MORELI, 2012), pois segundo Guimarães (2011) a etapa pré-analítica compreende a anamnese, preparação do paciente, coleta, armazenamento das amostras e é a fase que alberga a maior parte dos erros devido aos procedimentos serem manuais.

Para manter a integridade das células, a amostra sanguínea deve ser colocada em um tubo contendo anticoagulante, um aditivo que interrompe a coagulação do sangue de forma que a concentração da substância a ser mensurada não sofre alterações por determinado período (MOHRI, 2007), para que o resultado do teste tenha confiabilidade é imprescindível à adequada escolha do anticoagulante (BRAUN, 2015).

O ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) é um anticoagulante encontrado na forma de sal de sódio ou potássio, por ser um agente quelante do cálcio ao reagir com o

mesmo impede sua ação no processo de coagulação (GARCIA-NAVARRO et al., 2005). Para Kerr (2003) o EDTA não preserva as células, mas é o anticoagulante de escolha para o hemograma na medicina veterinária por ser o que menos as danifica. Ele preserva melhor o volume celular e as características morfológicas das células no esfregaço sanguíneo, mas em muitos casos causa alteração na contagem de plaquetas, mostrando números muito abaixo dos parâmetros padrões, enquanto o sangue coletado com citrato de sódio ou heparina apresentam valores normais (THRALL, 2007).

O anticoagulante citrato de sódio reage com o cálcio e impede sua ação no processo de coagulação, mas tem a desvantagem de ocasionar alterações morfológicas nas células (NAVARRO & PACHALY, 1994). Seu uso acaba se restringindo a dosagem de glicose, testes bioquímicos, testes de coagulação sanguínea e devido a sua baixa toxicidade, também é indicado para transfusões (THRALL, 2007).

A proporção de sangue e anticoagulante também deve ser obedecida, pois o excesso de EDTA induz a modificações na membrana celular, podendo causar desidratação dos eritrócitos, diminuindo o volume corpuscular (SILVA, 2009). Amostras processadas em tempo superior ao indicado também sofrem grandes alterações comprometendo o resultado do hemograma. (OLIVEIRA et., al 2011). Silva (2016) relata que amostras que ficam armazenadas por um longo período de tempo, podem apresentar alterações morfológicas em neutrófilos, linfócitos e monócitos.

Tubos com anticoagulante podem causar alterações nos resultados plaquetários de amostras sanguíneas, como a pseudotrombocitopenia que se define pelo falso número de plaquetas abaixo do valor de referência. Um dos fatores que pode causar a pseudotrombocitopenia se da por uma modificação antigênica na superfície da plaqueta, originada pelo uso de anticoagulante. O anticoagulante citrato de sódio é de preferência quando há pseudotrombocitopenia induzida pelo EDTA. Contudo, alguns autores relatam que o citrato de sódio pode provocar aglutinação in vitro. (DUSSE et al., 2011).

O EDTA é o anticoagulante de eleição para coleta de sangue em testes que avaliam contagens celulares e exames que dependem da integridade celular. Este anticoagulante mostra em sua estrutura conjuntos amina e carboxilato, que se organizam com metais duros, estimulando a cascata de coagulação (ASSIS et al., 2011).

O EDTA é fundamental em várias de suas fases e age como um mediador, bem como na relação célula a célula durante as reações de coagulação (NAVARRO, 2005). O citrato de sódio é usado para determinação bioquímica de substâncias ou fatores que se relacionam aos mecanismos de coagulação (THRALL, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA). O presente trabalho foi realizado no Hospital Veterinário FAG, situado em Cascavel, município pertencente à região oeste do estado do Paraná. O experimento foi realizado com 15 cães que foram escolhidos de forma aleatória no momento do exame clínico, sendo de sexo, raça e portes distintos.

Após anti-sepsia realizou-se a coleta de sangue por venopunção jugular, com agulha 25x7 mm acoplada em seringas de 5ml, seguida da imediata distribuição para tubos de polipropileno de 1ml com 0,05ml de EDTA e 4ml com citrato de sódio a 3,2%, resultando em um total de 30 amostras.

As amostras foram divididas em alíquotas pares e encaminhadas para o laboratório de patologia clínica do Hospital Veterinário FAG, onde ocorreu a avaliação da amostra em três tempos distintos. O tempo um (T1) se deu logo após a coleta em 30 amostras, em seguida as amostras foram mantidas sob refrigeração a uma temperatura de 4°C até serem avaliadas novamente no tempo dois (T2), sendo avaliadas 10 amostras após três horas e no tempo 3 (T3), após cinco horas, outras 10 amostras foram analisadas.

Os resultados das amostras foram processadas no analisador hematológico automatizado Sysmex pocH-100iV Diff®, observando os padrões hematológicos de hemácias, leucócitos e plaquetas. Em uma planilha quantificou-se o resultado dos hemogramas, demonstrando as médias variâncias entre os diferentes anticoagulantes.

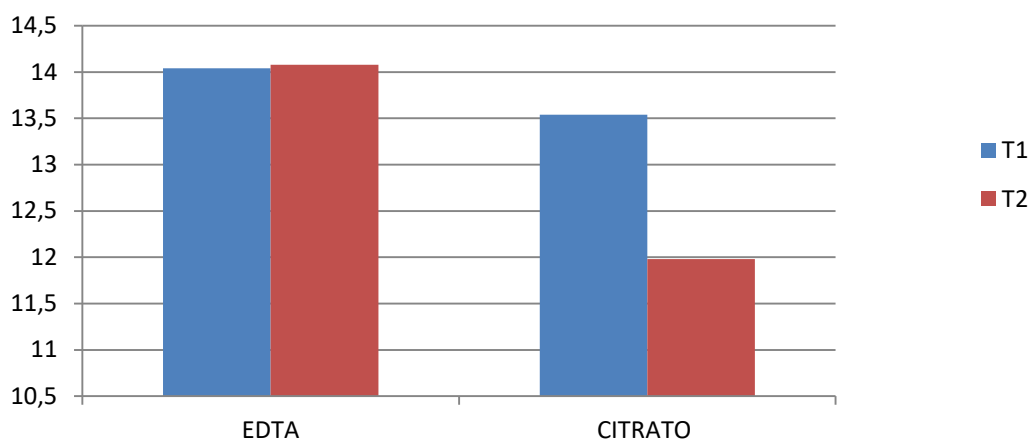
4. ANÁLISES E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Fez-se a comparação na contagem total de hemácias, leucócitos e plaquetas em um total de 30 amostras analisadas, sendo quinze amostras com EDTA e quinze amostras com citrato de sódio,

Resultados referentes à contagem de leucócitos, onde foram analisados cinco tubos contendo EDTA e cinco tubos contendo citrato de sódio em T1 (zero hora) e T2 (três horas) não apresentaram diferenças estatísticas significantes para tubos contendo EDTA com o passar do tempo, apresentou uma maior variação em tubos com citrato de sódio como mostra abaixo no Gráfico 1, demonstrando uma redução na contagem de leucócitos três horas após a coleta.

Gráfico 1 - Contagem total de leucócitos em T1 e T2.

CONTAGEM DE LEUCÓCITOS EM EDTA E CITRATO DE SÓDIO



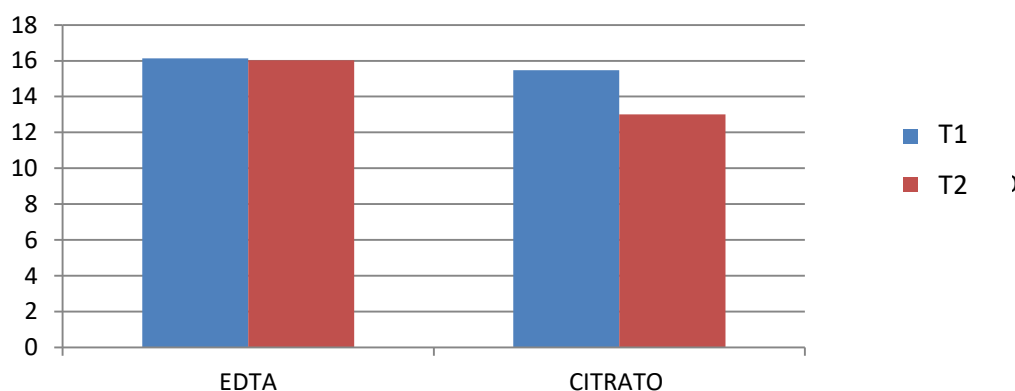
Fonte: Arquivo Pessoal, 2018.

Como demonstram os dados, a contagem de leucócitos nas amostras colhidas com EDTA se manteve mais estável com o passar do tempo em comparação ao citrato de sódio, pois não houve diferença expressiva entre os tempos de contagem.

No Gráfico 2, estão representados os dados da contagem de leucócitos em T1 (zero hora) e T3 (cinco horas) de dez amostras. Podemos observar que as análises das amostras com EDTA não tiveram diferenças relevantes ao longo do tempo, já as amostras com citrato de sódio apresentaram novamente uma redução na contagem de leucócitos após cinco horas.

Gráfico 2 - Contagem de leucócitos em T1 e T3.

CONTAGEM DE LEUCÓCITOS EM EDTA E CITRATO DE



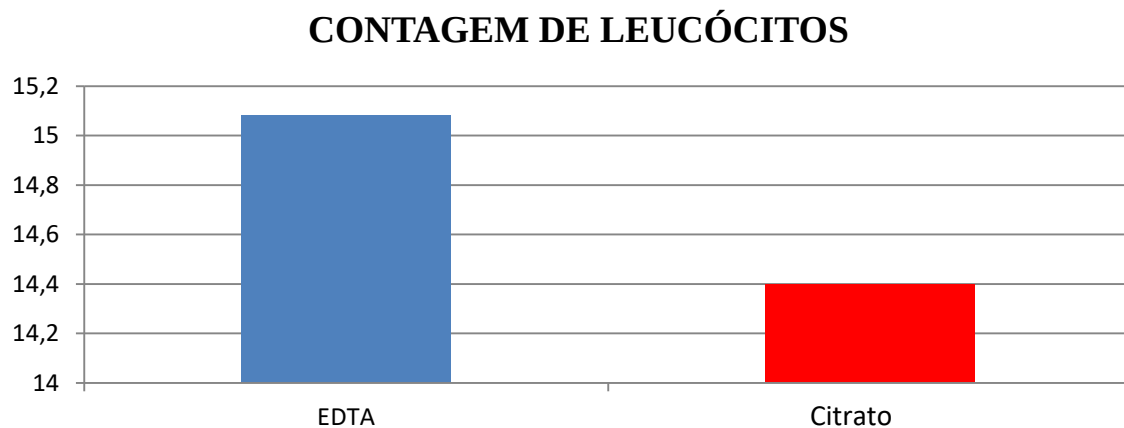
Fonte: Arquivo Pessoal, 2018.

No Gráfico 3 estão representados os resultados de 30 amostras analisadas no tempo zero, mostrando um valor inferior na contagem de leucócitos para citrato de sódio com média

de 14,4, não apresentando diferença significativa entre as médias das amostras analisadas quando comparadas com EDTA que apresentou uma média de 15,08.

Corroborando com estudos feitos por COHLE et al. (1981), não foram observadas alterações significativas nos leucócitos nas amostras de sangue humano armazenadas sob refrigeração ou temperatura ambiente por um período de até 48 horas.

Gráfico 3 - Contagem de leucócitos no T1.



Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

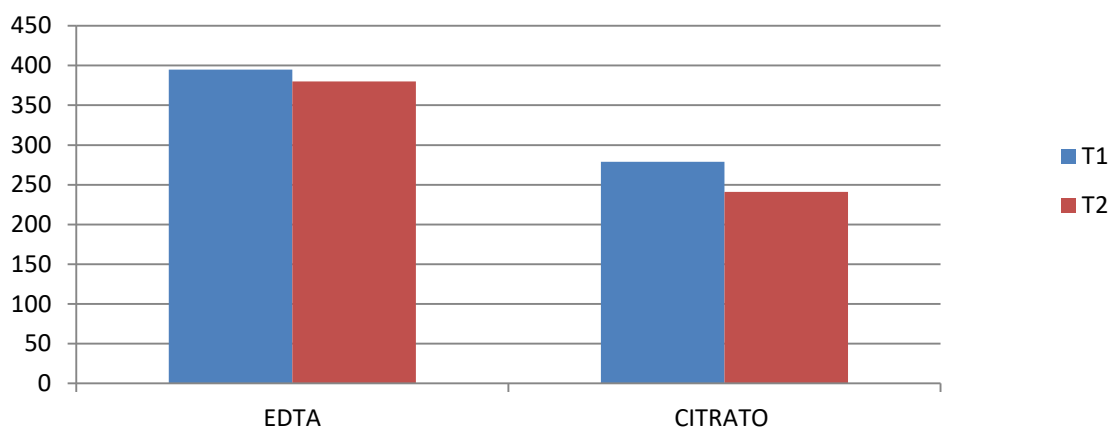
Os resultados na contagem de plaquetas de 10 amostras no T1 apresentaram média de 395 para amostras colhidas com EDTA, e média de 279 para amostras colhidas com citrato de sódio, demonstrando uma diferença significativa. A contagem de plaquetas no T2 apresentou uma média de 380 para amostras com EDTA, e média de 241 para amostras com citrato de sódio, exibindo uma redução maior no número de plaquetas em amostras contendo citrato de sódio ao longo de três horas, conforme mostra no Gráfico 4.

Analisando os resultados na contagem de plaquetas, notou-se que as amostras contendo EDTA se mantiveram mais estáveis, em contrapartida, o citrato de sódio apresentou valores menores em todas as amostras analisadas quando comparadas ao EDTA.

Estudos realizados com sangue canino demonstraram uma diminuição expressiva na contagem de plaquetas em amostras com citrato de sódio após determinado período de tempo, sugerindo que essa diminuição se dá devido à aglutinação ou satelitismo plaquetário (OLIVEIRA, 2010).

Gráfico 4 - Contagem de plaquetas em T1 e T2..

CONTAGEM DE PLAQUETAS EM EDTA E CITRATO DE SÓDIO

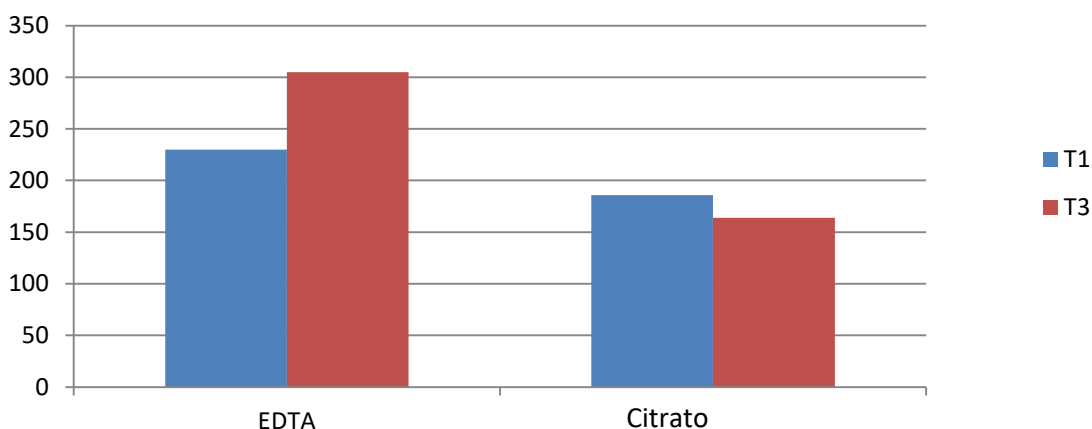


Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Em 10 amostras analisadas em T1 e T3, demonstraram que o EDTA apresentou um aumento significativo na contagem de plaquetas em ambos os tempos quando comparado ao citrato de sódio. Na contagem de plaquetas em tubos com EDTA a média foi de 229,8 em T1, tendo um aumento gradativo após cinco horas de repouso, expondo uma média de 305 em T3, tendo um aumento considerável no número de plaquetas. Em tubos contendo citrato de sódio, a média foi de 185,8 em T1, e houve uma discreta diminuição na contagem de plaquetas em T3, com média de 163,8, sem diferenças expressivas.

Gráfico 5 – Contagem de plaquetas em T1 e T3.

CONTAGEM DE PLAQUETAS EM EDTA E CITRATO DE SÓDIO



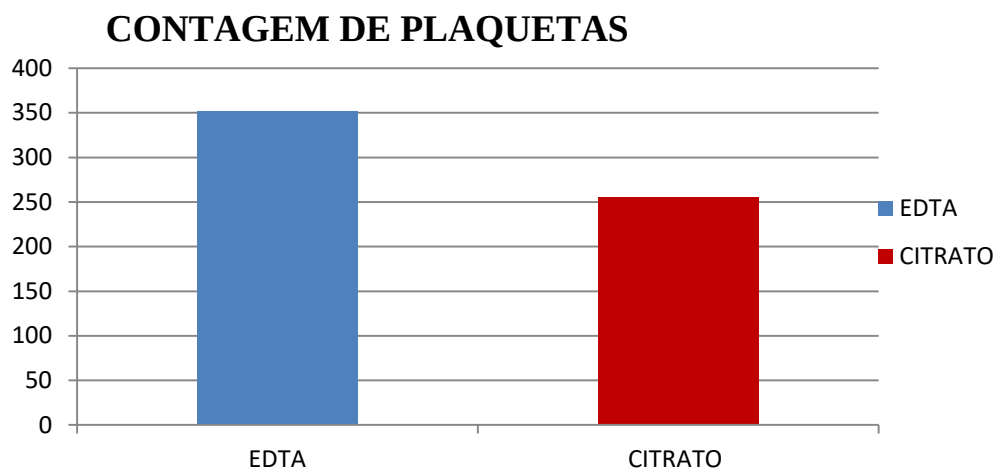
Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

As trinta amostras analisadas em T1 exibiram uma contagem de plaquetas superior nos tubos com EDTA em relação ao citrato de sódio. Os tubos contendo EDTA apresentaram uma média de 351,3, enquanto as amostras com citrato de sódio demonstraram média de 255,73, expondo um maior número de plaquetas em amostras com EDTA quando comparadas ao citrato de sódio, conforme mostra o Gráfico 6.

Em estudo comparativo entre o EDTA e o citrato de sódio em cães, mostrou que o EDTA é mais eficaz, inibindo a formação de agregados plaquetários. Pesquisadores compararam os efeitos do EDTA e citrato de sódio, e condições de armazenamento da amostra sobre a agregação plaquetária e tamanho das plaquetas em cães saudáveis. O estudo mostrou que a agregação plaquetária foi de 1,9 vezes mais prováveis com citrato de sódio, quando comparado com o EDTA. Esta análise do estudo corrobora com o presente trabalho onde se teve uma agregação plaquetária maior no anticoagulante citrato de sódio. (MYLONAKIS et al., 2008).

De acordo com Dusse et al., (2004), o citrato de sódio pode causar aglutinação das plaquetas in vitro, causando uma diminuição na contagem total de plaquetas. Para Stokol e Erb (2007) o citrato de sódio deve ser recomendado somente quando forem utilizados valores de referência exclusivos para esse anticoagulante.

Gráfico 6 – Contagem de plaquetas em T1.

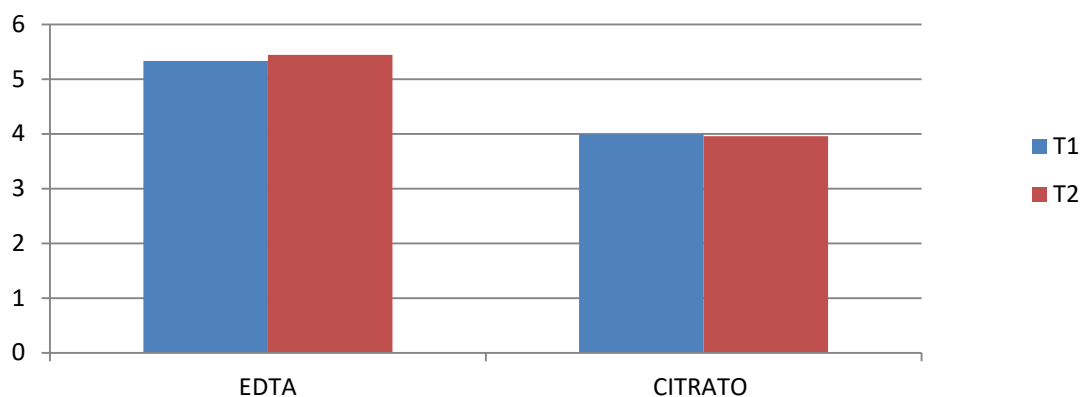


Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Na contagem de hemácias de 10 amostras, em tempos T1 e T2, as variações foram irrelevantes, percebe-se que o número de hemácias nos tubos contendo citrato de sódio foi menor em relação aos tubos com EDTA.

Gráfico 7 – Contagem de hemácias em EDTA e citrato de sódio em T1 e T2.

CONTAGEM DE HEMÁCIAS EM EDTA E CITRATO DE SÓDIO

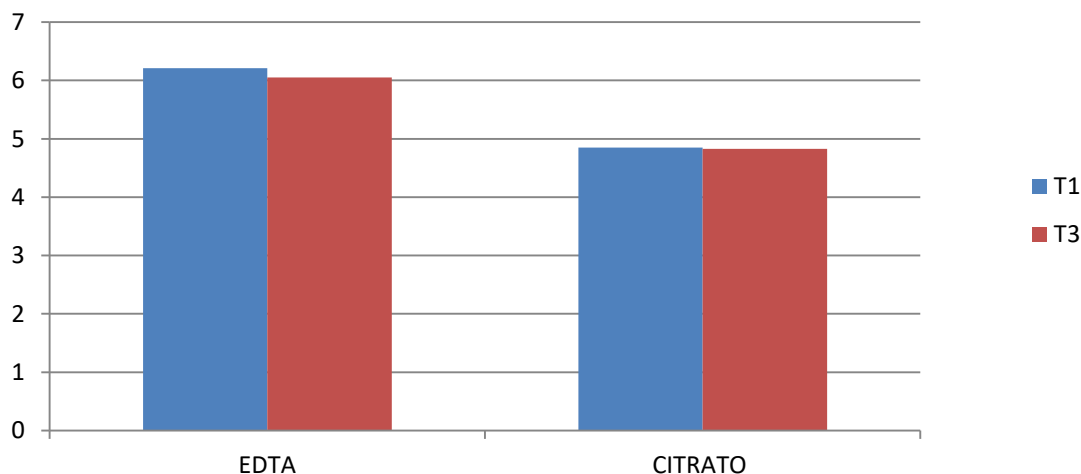


Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

A análise de 10 amostras em T1 e T3 se mantiveram estáveis, mantendo a diferença do Gráfico 7, onde os tubos contendo citrato de sódio apresentaram um número menor de hemácias quando comparados aos tubos com EDTA.

Gráfico 8 – Contagem de hemácias em EDTA e citrato de sódio em T1 e T3.

CONTAGEM DE HEMÁCIAS EM EDTA E CITRATO DE SÓDIO

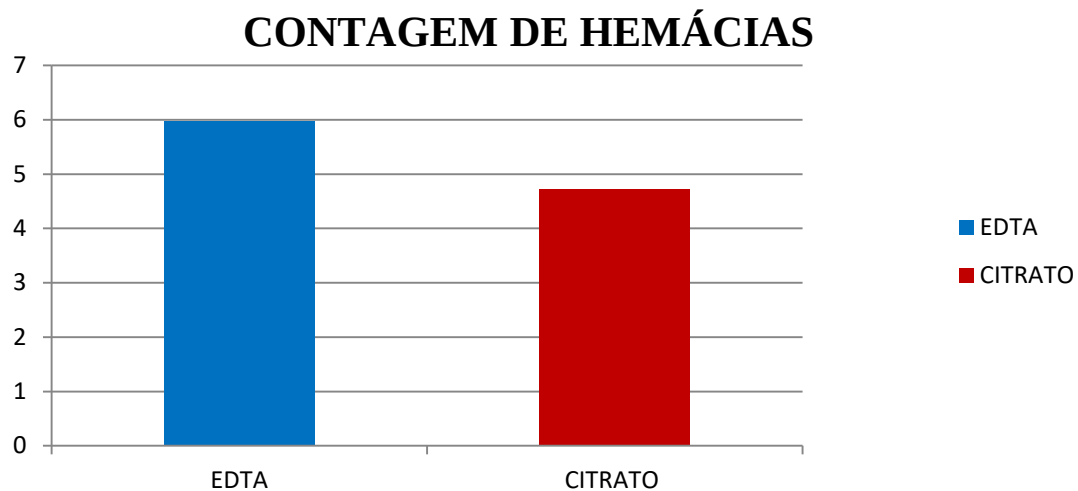


Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Em 30 amostras analisadas em T1 na contagem de hemácias, as amostras com citrato de sódio apresentaram uma média inferior em relação às amostras com EDTA. A média da contagem de hemácias com EDTA foi de 5,97, enquanto as amostras com citrato apresentaram média de 4,73.

Estudos realizados por Freise (2008) demonstraram que não houve alterações na contagem de hemácias de sangue humano mantido sob refrigeração, ficando de acordo com o presente estudo. O decréscimo na contagem de hemácias em tubos com citrato de sódio provavelmente ocorreu devido à lise das hemácias.

Gráfico 9 – Contagem de hemácias em EDTA e citrato de sódio em T1.



Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, a contagem de leucócitos se manteve mais estável em amostras colhidas com EDTA, desde a colheita até três e cinco horas depois, quando comparadas ao citrato de sódio onde se observou uma redução no número de leucócitos após T2 e T3.

A contagem de plaquetas em sangue canino apresentou uma diferença significativa entre ambos os anticoagulantes, demonstrando números menores em todas as amostras analisadas em tubos contendo citrato de sódio e uma diminuição gradativa na contagem de plaquetas em T2 e T3.

O EDTA e citrato de sódio mantiveram-se estáveis na contagem de hemácias ao longo de T2 e T3. Amostras colhidas com EDTA apresentaram médias superiores em relação às amostras colhidas com citrato de sódio.

Os dados obtidos em trinta amostras analisadas permitem concluir que o EDTA se apresentou mais estável em todas as condições de tempo. Portanto, o EDTA deve ser o anticoagulante de escolha para avaliação de hemácias, plaquetas e leucócitos.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, T. S.; BRITO, A. S.; CARNEIRO, L. C. Comparação fisiológica dos anticoagulantes heparina e EDTA no exame de hematócrito relacionado de acordo com o sexo. **Laes & Haes**, v. 3, n. 191, p. 152-164, jun/jul. 2011.
- BONFÁ, L. P.; FARIAS, S. K. Concentração de anticoagulante, tempo e temperatura de armazenagem sobre os parâmetros hematológicos no hemograma automatizado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 12, p. 2521-2526, dez. 2010.
- BRAUN, J. P.; BOURGES-ABELLA, N.; GEFFRE, A.; CONCORDET, D.; TRUMEL, C. The preanalytic phase in veterinary clinical pathology. **Veterinary Clinical Pathology**, v.4, p.8-25, 2015.
- BUTTARELLO M. Quality specification in haematology: the automated blood cell count. **Clin Chim Acta**. 2004 Aug 2;346(1): 45-54.
- COHLE, E.D. et al. Effects of storage of blood on stability of hematologic parameters. **American Society of Clinical Pathologists**, v.76, n.1, p.67-70, 1981.
- COSTA, V. G.; MORELI, M. L. Principais parâmetros biológicos avaliados em erros na fase pré-analítica de laboratórios clínicos: revisão sistemática. **Brasil Patologia Medicina Laboratorial**, v.48, n.3, p.163-168, jun. 2012.
- DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Pseudotrombocitopenia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.40, n. 5, p. 321-324. 2004.
- GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; **Manual de Hematologia Veterinária**. 2. Ed. Ver. E ampl. São Paulo: Livraria Varela, 2005. p. 154
- GUIMARÃES, A. C.; WOLFART, M.; BRISOLARA, M. L. L.; DANI, C. O Laboratório Clínico e os Erros Pré-analíticos. **Revista HCPA**, v.31, n.1, p. 66-72, 2011.
- KERR, M. G.; **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2003. Cap 12, p. 207
- LOPES, S. T. A. et al. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007. Lopes & Cunha. Patologia Clínica Veterinária – UFSM – Santa Maria/RS – 2002
- MOHRI, M.; ALLAHIARI, L.; SARDARI, K. Effects of common anticoagulants on routine plasma biochemistry of horse and comparison with serum. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 7, p. 313–316, 2007.

MYLONAKIS, M. E. et al. Effect of anticoagulant and storage conditions on platelet size and clumping in healthy dogs. **J Vet Diagn Invest**, v. 20, n. 6, p. 774-779, 2008.

NAVARRO, C. E. K. G.; PACHALY, J. R. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Varela, 1994. 169 p.

OLIVEIRA, A. C.; RIBEIRO FILHO, J. D.; GUIMARÃES, J. D.; SILVA, A. R.; DANTAS, W. M. F.; BONFÁ, L. P.; FARIAS, S. K. Concentração de anticoagulante, tempo e temperatura de armazenagem sobre os parâmetros hematológicos no hemograma automatizado. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 40, n. 12, p. 2521-2526, dez. 2010.

SILVA PH HY, ALVES HB. **Hematologia Laboratorial**. Rio de Janeiro: Revinter. 2009.

SILVA PH AH, COMAR SR, HENNEBERG R, MERLIN JC, STINGHEN ST. **Hematologia Laboratorial**. Teoria e Procedimentos. Porto Alegre: Artmed 2016.

STOKOL, T.; ERB, N. A. Comparison of platelet parameters in EDTA – and citrate – anticoagulated blood in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 2, p. 148-154, 2007.

THRALL, M A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca; 2007.