pubvet
MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
ISSN 1982-1263
https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n03a1063.1-6

Influência do tempo de análise nos parâmetros hematológicos

Larissa Santiago Amorim[1*], Ednilse Lemes[2], Fernanda Donata Henriques Batista[3]

[1]Graduanda em Ciências Biologicas, Universidade Paulista (UNIP), São Paulo - SP, Brasil.
[2]Professora Mestre e Doutora do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Paulista (UNIP), São Paulo - SP, Brasil.
[3]Medica Veterinaria Patologista, LabPets Centro Diagnostico Veterinario, São Paulo, SP, Brasil.
**Autor para correspondencia, E-mail: laris.395@gmail.com*

Resumo. O hemograma é um dos exames fundamentais para analisar o estado clínico geral do cão. Pelas as análises hematológicas podem ser estabelecidos pro diagnósticos, diagnósticos e também acompanhar a saúde do animal, indicando possíveis infecções bacterianas, virais ou parasitológicas. Tendo em vista a importância da realização do hemograma, este trabalho tem como objetivo comprovar alterações causadas pelo tempo de armazenamento das amostras estocadas em temperatura ideal sugerida em literatura (2º a 6º graus) e refrigerada durante o tempo de 24, 48 e 72 horas, através da análise dos parâmetros hematológicos como, hematócrito, eritrócitos, contagens totais de leucócitos, diferenciação de leucócitos, hemoglobina, proteína, plaquetas, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a hemoglobina corpuscular média (HCM). Foram utilizados amostras sanguíneas de três cães de sexo, raça, peso e tamanhos distintos, que após terem realizado a anamnese dos mesmo, foram coletadas duas amostras sanguíneas de cada animal para análise hematológica. Todas as amostras foram armazenadas em tudo anticoagulante EDTA. As amostras analisadas no momento 0 e as analisadas no período de 24 horas mantiveram alguns parâmetros iguais. Os que mantiveram os valores foram hematócrito, hemoglobina, proteína e CHCM. Os demais parâmetros como, eritrócitos, leucócitos, plaquetas, VCM e a HCM, obteve alterações, porém resultados satisfatórios. Nas análises de 48 e 72 horas os parâmetros obtiveram alterações significativas.

Palavras chaves: Armazenamento, cães, parâmetros hematologicos, tempo

Influence of analysis time on hematological parameters

Abstract. The blood count is one of the fundamental tests to analyze the dog's general clinical status. Through hematological analysis can be established for diagnosis, diagnosis and also monitor the animal's health, indicating possible bacterial, viral or parasitological infections. Given the importance of performing the blood count, this work aims to prove changes caused by the storage time of samples stored at the ideal temperature suggested in the literature (from 2° to 6° C) and refrigerated for 24, 48 and 72 hours, through the analysis of hematological parameters such as hematocrit, erythrocytes, total leukocyte counts, leukocyte differentiation, hemoglobin, protein, platelets, mean corpuscular volume (VCM), mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM) and mean corpuscular hemoglobin (HCM) . Blood samples from three dogs of different sex, breed, weight and sizes were used, which after having carried out their anamnesis, two blood samples were collected from each animal for hematological analysis. With a sample of each dog, the exam was performed immediately (time 0) and the other samples were analyzed after 24, 48 and 72 hours. All samples were stored in all anticoagulant EDTA. The samples analyzed at time 0 and those analyzed within 24 hours kept some parameters the same. Those that maintained the values were hematocrit, hemoglobin, protein and CHCM. The other

parameters such as erythrocytes, leukocytes, platelets, MCV and HCM, obtained changes, but satisfactory results. In the 48- and 72-hours analyses, the parameters showed significant changes.

Keywords: Dogs, hematological parameters, storage, time

Introdução

O exame hematológico é um dos exames mais requisitados e considerado essencial para observar funções do organismo e indicar alterações patológicas que não são visíveis no exame clinico (Cardoso, 2008; Chhabra et al., 2013; Lasta, 2011). No geral, o hemograma faz análise do sangue no qual é fluido corporal que circula pelo organismo levando nutrientes e oxigênio. Composto por células sanguíneas diferenciadas em glóbulos brancos, que tem como função produzir resposta imunológica a qualquer ação externa fisiológica ou patológica (Cardoso, 2008; Lasta, 2011). Os glóbulos brancos são classificados por neutrófilos que atuam como primeiras células na resposta imunológica do organismo, eosinófilos como processos alérgicos e presença de parasitas, basófilos importante em processos alérgicos, monócitos combate no organismo contra corpos estranhos e os linfócitos são responsáveis pela defesa do sistema imunológico. Glóbulos vermelhos tem como função transportar oxigênio nos tecidos do organismo e responsável pela cor vermelha do sangue, indicando alterações importantes como anemia que consiste pelo baixo nível de glóbulos vermelhos do sangue, consequentemente dificultando o transporte de oxigênio pelo organismo, causando graves complicações, que no caso da espécie canina são a falta de apetite, perda de peso, quadros de indisposição, urina de cor escura. E as plaquetas, que são células produzidas pela medula óssea que correspondem a processos de coagulação sanguínea (Oliveira, 2009) quando ocorre hemorragia há maior produção de plaquetas.

A técnica laboratorial do hemograma compreende na avaliação do hematócrito, contagem das hemácias e quantidade de hemoglobina presente no sangue, onde os valores obtidos resultam no volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a hemoglobina corpuscular média (HCM) (Oliveira, 2009). Para contagem de leucócitos é realizado o método manual com câmera de Newbauer e lâmina com esfregaço sanguíneo para avaliação diferencial das linhagens de glóbulos brancos. As plaquetas podem ser contadas também na câmera de Newbauer, mas neste método foi utilizado contagem e avaliação no esfregaço sanguíneo por campo de visualização (Lorenzi, 1992).

O método de coleta para realização do hemograma pode ser realizado por meio de punção venosa com agulha e seringa ou scalp e seringa (Feldman & Sink, 2006; Rengifo et al., 2010). Algumas técnicas utilizam cateter para coleta de pequenos vasos, a variação de material depende do paciente e do profissional de saúde que determina a melhor técnica para o momento.

Para armazenamento do sangue deve ser utilizado tubo anticoagulante EDTA que impede a coagulação sanguínea, possuindo o EDTA nas paredes do tubo preservando também a morfologia celular. Caso não seja avaliado no momento da coleta, o sangue deve ser armazenado em geladeira em temperatura de 2º a 6º C. O ideal é que o exame seja avaliado em até 2 a 4 horas após coleta, não podendo exceder o prazo de 24h para minimizar alterações *in vitro* (Feldman & Sink, 2006; Rengifo et al., 2010).

Contudo, existem alguns fatores que influenciam na qualidade de amostras sanguíneas que podem comprometer os resultados laboratoriais como a forma de coleta (estresse do animal em contenção inadequada), a coagulação do sangue o momento da coleta, podendo alterar no resultado das plaquetas, a proporção de sangue/EDTA (caso o tubo seja de 2 ml, o mesmo tem que ser preenchido no mínimo 1,5 ml de sangue, menos que isso ocorre alteração no hematócrito), a indução de fármacos pelo paciente, temperatura em armazenamento e o tempo de estocagem (Fernandes et al., 2001).

Tendo em vista que atualmente o cão é o principal animal doméstico de companhia humana, e a espécie mais atendida nas clínicas, consequentemente, a quantidade de amostras enviadas a laboratórios é maior da espécie canina. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo analisar as alterações hematológicas do hemograma causadas por diferentes tempos de análises, comprovando alterações *in vitro*.

Material e métodos

Foram utilizados três cães e duas amostras sanguíneas de cada animal, de raças, idades, sexo e peso distintos, foram atendidos no próprio laboratório de análise pela médica veterinária responsável pelo

setor de triagem e coleta. Os cães passarão por exames clínicos atestando saúde física, e então foram coletadas amostras de sangue para o uso do estudo hematológico. O método de coleta foi feito por meio de punção venosa com seringa de 3 ml e agulha 20 mm. O armazenamento das amostras no caso do hemograma, foi no tubo lilás (Vacuplast EDTA K3) com anticoagulante EDTA na proporção indicada para 2ml de sangue para preservar a morfologia das células sanguíneas (Lorenzi, 1992). Após as coletas realizadas, foram separadas duas amostras de cada animal, totalizando seis amostras. Com a primeira amostra a análise foi feita imediatamente e a segunda amostra armazenada para análise posterior. As amostras armazenadas foram usadas para repetir as análises após 24horas, 48horas e 72 horas. Sendo então três amostras feitas imediatamente o hemograma e três amostrar guardadas em temperatura de 4º a 6º C, as mesmas passou-se a serem usadas para repetir o processo.

Nas etapas do hemograma, primeiro realizou-se o esfregaço sanguíneo, que utilizou lâmina, lâmina extensora e corantes panótico. Pingou uma gota de sangue através do capilar sanguíneo, sobre a lâmina (limpa e seca) e com a lâmina extensora encostada na gota de sangue deslizando a lamínula com ângulo de aproximadamente 45º C, deslizou-se em uma velocidade única até o final da lâmina para que o esfregaço fique uniforme, o melhor é distribuir bem a gota de sangue (Feldman & Sink, 2006). Após realizar o esfregaço, a lâmina foi corada com corantes panóptico rápido. A análise da lâmina realizou-se em microscópio com aumento e 40x onde ocorreu a diferenciação dos leucócitos (monócitos, linfócitos típicos e atípicos, basófilos, eosinófilos, neutrófilo segmentado e bastonetes) (Fernandes et al., 2001) utilizou o contador digital hematologico, até totalizar 100 células. Para o método do hematócrito, o sangue foi homogenizado (Raskin & Meyer, 2003) e ocorreu o preenchimento de aproximadamente 75% do sangue no capilar, no qual ocorreu a vedação de uma das pontas com um mini maçarico. O capilar foi colocado no micro centrífugo por 5 min, após isto houve a leitura do capilar através da régua própria para hematócrito, no qual mostra o valor do hematócrito. Logo foi realizado a quebra do capilar na parte do plasma, o mesmo deu-se colocado no refratômetro permitindo a visualização do valor da proteína.

A técnica manual de contagem dos glóbulos vermelhos, foi realizada pela da câmera de Newbauer, na qual foi limpa com álcool 70%, e sobre a mesma ocorreu a colocação da lamínula. A solução é feita por 5 ml do reagente de gower para 20 ul de sangue já homogeneizado, no qual a mistura foi inserida com a pipeta na câmara de Newbauer (Kantek & Navarro, 2005). Com o microscópio focado no aumento de 10x foi realizado contagem dos cinco quadrantes central, e o resultado multiplicado por 200x10x5. Para a contagem de leucócitos foi necessário o total de 380 ul da solução de turk para 20 ul de sangue. A solução preparada foi inserida na câmera Newbauer (limpa com álcool 70% e em sua superfície a lamínula) com a pipeta. A visualização foi realizada através do microscópio no aumento de 10x, ocorrendo a contagem dos quatro quadrantes laterais da câmara de Newbauer, utilizando contador digital no qual o total foi multiplicado por 50 (Madureira et al., 2013; Paes et al., 2009). A contagem plaquetária ocorreru através da lâmina de esfregaço sanguíneo, sendo utilizado óleo de imersão para microscopia com aumento de 100x. Ocorreu a contagem de 10 campos e o resultado foi somado e dividido, dando o valor final (Oliveira et al., 2010). Todo os resultados foram anotados em tabelas elaboradas no Excel.

Para obter os resultados foram realizados os siguintes calculos:

$$\text{Concentração de hemoglobina corpuscular média} - CHCM = HB \div HTO \times 10$$
$$\text{Volume corpuscular médio} - VCM = HTO \div HE \times 10$$
$$\text{Hemoglobina corpuscular média} - HCM = HB \div HE \times 100$$

Todas as etapas descritas acima foram feitas em quatro análises (análise imediata, análise após 24 horas, análise após 48 horas e análise após 72 horas) para comparação dos resultados obtidos.

Resultados

Baseado nos resultados da primeira análise até a última do hemograma, (momento 0 até 72 horas) ocorreu redução dos eritrócitos (hemácia). Os valores do hematócrito mantiveram-se estáveis do momento 0 até 24 horas, a partir de 48 horas de armazenamento em temperatura refrigerada (4,1º) houve aumento do mesmo. (Tabela 1). Na análise da hemoglobina, manteve o mesmo valor do momento de 0 a 24 horas, porém houve declínio no momento de 48 horas e 72 horas.

A partir dos dados apresentados do volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM), obtiveram aumentos relativos do momento 0 até 72 horas de análise em temperatura de 4,1º, (Tabela 1) já na análise da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), manteve-se o mesmo valor em relação ao momento 0 e 24 horas, a partir dos momentos de 48 e 72 horas ocorreu redução da média dos valores. Com relação aos resultados apresentados da proteína plasmática, ocorreu aumento significativo a partir de 48 horas de análise. Os resultados obtidos na contagem plaquetária apresentam decrescimento a partir de 48 horas e agregação plaquetária.

Tabela 1. Valores dos parâmetros hematológicos da série vermelha, de três amostras distintas analisadas em quatro momentos

Série Vermelha	Tempo, horas	Amostras sanguíneas			Valores de referência
		M1	M2	M3	
Eritrócitos (mm^3)	0	5,9	4,6	4	5,5 – 8,5 (mm^3)
	24	4,6	3,9	3,6	
	48	3,7	3,3	3,2	
	72	3,1	3	2,8	
Hematócrito (%)	0	49	46	45	37 – 35 (%)
	24	49	46	45	
	48	51	49	47	
	72	52	51	48	
Hemoglobina (g/dl)	0	13,5	13,1	14,5	12 – 18 (g/dl)
	24	13,5	13,1	14,5	
	48	12,8	13	13,1	
	72	12,8	13	12,7	
V.C.M (fl)	0	83,05	100	112,5	60 – 77 (fl)
	24	106,52	117,9	125	
	48	137,83	148,48	146,87	
	72	167,74	170	171,42	
H.C.M (pg)	0	22,88	28,47	32,25	19,5 – 24,5 (pg)
	24	29,34	33,58	40,27	
	48	34,59	39,39	40,93	
	72	41,29	43,33	45,35	
C.H.C (g/dl)	0	27,55	28,48	32,22	30 – 36 (g/dl)
	24	27,55	28,48	32,22	
	48	25,09	26,53	27,87	
	72	24,61	25,49	26,45	
Proteína (g/dl)	0	6,8	7,8	7	5,5 – 8 (g/dl)
	24	6,8	7,8	7	
	48	7,2	8,2	7,2	
	72	7,8	8,4	7,6	
Plaquetas (mm^3)	0	300	480	340	200 – 500 (mm^3)
	24	300	480	340	
	48	280	480	320	
	72	240	440	280	

Os dados obtidos da contagem dos leucócitos totais, houve redução significativa a partir do momento de 24 horas até 72 horas (Tabela 2). Já diferenciação dos leucócitos, não houve diferença significativa em números, porém houve alterações na morfologia celular dos neutrófilos. Foi observado nos neutrófilos que a partir de 48 horas ocorreu a diminuição do citoplasma e condensação dos lóbulos. As demais células não tiveram mudanças observadas, tendo em vista que não foram observados basófilos e bastonetes.

Discussão

De acordo com os resultados de alguns parâmetros como, o hematócrito a partir de 48 horas em temperatura entre 4º e 6ºC, ocorreu o aumento, contrariando Linhares (2019) no qual observou o aumento do hematócrito em amostras armazenadas em temperatura ambiente (25º). Já em outros relatos, as amostras armazenadas em temperatura refrigerada mantiveram-se estáveis até 48 horas (Oliveira, 2009). Também o volume corpuscular médio e a hemoglobina corpuscular média obtiveram aumento; porém, considerados significativos. Discordando de alguns autores que relatam estabilidade dos valores em temperatura entre 4º a 25º C (Dorigam, 2011). A hemoglobina corpuscular média obteve redução a

partir de 48 (Dorigam, 2011) e 72 horas. Devido a hemólise no plasma ocorreu aumento da proteína plasmática (Oliveira, 2009).

Tabela 2. Valores dos parâmetros hematológicos da série branca, de três amostras distintas analisadas em quatro momentos

Série Branca	Tempo em Horas	Amostras Sanguíneas			Valores de Referência
		M1	M2	M3	
Leucócitos(mm^3)	0	9.200	12.500	8.400	6.000 - 17.00 (mm^3)
	24	8.500	12.400	7.500	
	48	8.400	9.700	7.000	
	72	8.000	9.600	6.600	
Segmentado (%)	0	64	64	72	60 – 77 (%)
	24	69	71	63	
	48	65	69	61	
	72	74	70	70	
Linfócito (%)	0	29	28	22	12 – 30 (%)
	24	23	22	29	
	48	30	24	31	
	72	23	26	22	
Monócitos (%)	0	4	5	4	3 – 10 (%)
	24	5	5	6	
	48	3	5	7	
	72	2	3	6	
Eosinófilos (%)	0	3	3	2	2 – 10 (%)
	24	3	2	2	
	48	2	2	1	
	72	2	1	2	

Em certos parâmetros da série vermelha houve decaimento, como o dos eritrócitos que se dá provavelmente devido a lise das hemácias. Os resultados da hemoglobina, obteve declínio em 48 e 72 horas, discordando com os relatos de Dorigam (2011) e Oliveira et al. (2010) nos quais os valores da hemoglobina se mantiveram estáveis.

A diminuição na contagem plaquetária é devido a agregação das mesmas. Essa agregação ocorre devido a ação do EDTA encontrado no tubo de armazenamento em baixas temperaturas (Dorigam, 2011; Falbo et al., 2005).

Os parâmetros hematológicos da série branca obtiveram redução significativa, esse resultado discorda de alguns autores, como de Linhares (2011), no qual observou no seu estudo que os leucócitos não apresentam alterações significativas quando estocados à temperatura de refrigeração por 24 e 48 horas. Outros autores descreveram elevação no número de leucócitos em amostras armazenadas em refrigeração (4,0º C) (Dorigam, 2011). Ocorrem alterações morfológicas nas células, possivelmente devido ao armazenamento prolongado (Oliveira, 2009).

Conclusão

As amostras analisadas imediatamente tem o melhor resultado. Nas análises de 48 e 72 horas as alterações dos parâmetros são mais significativas, em relação ao momento imediato e o momento de 24 horas. Portanto, para resultados adequados de todos os parâmetros, o ideal é que as amostras sanguíneas sejam analisadas no período de até seis horas após a coleta.

Referências bibliográficas

Cardoso, F. (2008). Indicadores hematológicos, bioquímicos e ruminais no diagnóstico do deslocamento de abomaso à esquerda em vacas leiteiras do Sul do Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, 43*, 141–147.

Chhabra, S., Uppal, S. K., & Singla, L. Das. (2013). Retrospective study of clinical and hematological aspects associated with dogs naturally infected by Hepatozoon canis in Ludhiana, Punjab, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *3*(6), 483–486. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60100-8.

Dorigam, J. P. (2011). *Influência do tempo e da temperatura de estocagem de amostras de sangue nas*

variáveis hematológicas de cães portadores de enfermidade renal crônica. Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Falbo, M. K., Reis, A. C. F., Balarin, M. R. S., Bracarense, A. P. F. R. L. A. P. F. R. L., Araújo Júnior, J. P., Okano, W., Sandini, I. E., Araújo, J. P., Okano, W., & Sandini, I. E. (2005). Alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias e histopatológicas na intoxicação natural em bovinos pela samambaia Pteridium aquilinum (L.) Kuhn. *Semina: Ciências Agrárias*, *26*(4), 547–558.

Feldman, B. F., & Sink, C. A. (2006). *Urinálise e hematologia-laboratorial para o clínico de pequenos animais*. Editora Roca.

Fernandes, S. T., Teixeira, M. N., & Santos, E. S. (2001). Influência da temperatura e do tempo de armazenamento nas dosagens bioquímicas de uréia e creatinina em soro ou plasma caninos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *53*(6), 648–651.

Kantek, C. E., & Navarro, K. G. (2005). Manual de Hematologia Veterinária. *São Paulo: Varela, 2. ed.*, 206 p.

Lasta, C. S. (2011). *Fatores de risco, parâmetros hematológicos, detecção molecular e sorológica de Ehrlichia canis e Anaplasma plantys em cães de porto Alegre/RS-Brasil*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Linhares P F. (2019). Influência de armazenamento do sangue bovino por 24 e 48 horas á temperatura ambiente e de refrigeração sobre os valores hematológicos. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia

Lorenzi, T. F. (1992). *Manual de hematologia: propedêutica e clínica* (Vol. 1). Guanabara - Koogan.

Madureira, K. M., Gomes, V., Barcelos, B., Zani, B. H., Shecaira, C. L., Baccili, C. C., & Benesi, F. J. (2013). Parâmetros hematológicos e bioquímicos de ovinos da raça Dorper. *Semina: Ciências Agrárias*, *34*(2), 811–816.

Oliveira, A. C. (2009). *Influência da concentração do EDTA, tempo e temperatura de armazenagem sobre parâmetros hematológicos de cães no hemograma automatizado e manual*. Universidade Federal de Viçosa.

Oliveira, A. C., Ribeiro Filho, J. D., Guimarães, J. D., Silva, A. R., Dantas, W. M. F., Bonfá, L. P., & Farias, S. K. (2010). Concentração de anticoagulante, tempo e temperatura de armazenagem sobre os parâmetros hematológicos no hemograma automatizado. *Ciência Rural*, *40*(12), 2521–2526.

Paes, P. R. O., Leme, F. O. P., & Carneiro, R. A. (2009). Hematologia dos animais domésticos. *FEPMVZ, Caderno Didático*.

Raskin, R. E., & Meyer, D. J. C. (2003). *Atlas de citologia de cães e gatos*. Roca.

Rengifo, S. A., Silva, R. A., Botteon, R., & Botteon, P. T. L. (2010). Hemograma e bioquímica sérica auxiliar em bezerros mestiços neonatos e ocorrência de enfermidades. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *62*(4), 993–997.

Histórico do artigo:

Recebido: 15 de novembro de 2021
Aprovado: 21 de dezembro de 2021
Disponível online: 27 de março de 2022

Licenciamento: Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.