

Patologia clínica: colheita, conservação e remessa de amostras

Clinic pathology: collection, storage and samples delivering

SIMON, Caroline Ferreira – Med. Vet., Residente em Patologia Clínica do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Luterana do Brasil – RS

FISCHER, Cristine Bastos Dossin – Med. Vet., MSc. Professora do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Luterana do Brasil – RS

SILVEIRA, Fabiana – Aluna do Curso de Biomedicina da Universidade Luterana do Brasil – RS

ALLGAYER, Mariangela da Costa – Bióloga, Med. Vet., MSc. Professora do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Luterana do Brasil – RS

Data de recebimento: fevereiro 2007

Data de aprovação: maio 2007

Endereço para correspondência: Mariangela da Costa Allgayer. Av. Farroupilha, nº 8001, Bairro São Luiz. CEP 92450-900. Prédio 25. ULBRA, Canoas/RS. E-mail: bioclinica@ulbra.br

RESUMO

O resultado de um exame laboratorial confiável e de qualidade depende do preparo do animal, da colheita do material e do manuseio e armazenamento da amostra colhida. Fatores como hemólise, medo, excitação, lipemia, armazenamento inadequado, demora no processamento da amostra e a falta de informações sobre os sinais clínicos e medicamentos utilizados no paciente podem interferir no diagnóstico e tratamento de diversas patologias. Este trabalho tem o objetivo de fazer uma revisão bibliográfica sobre os cuidados que devem ser tomados ao colher e enviar amostras para realização de exames complementares no laboratório de Patologia Clínica.

Palavras-chave: colheita, hemólise, lipemia, patologia clínica.

ABSTRACT

The result of a reliable and of quality laboratory procedure depends on the preparation of the animal, collection of the material, handle and storage the sample collected. Factors such as hemolysis, fear, excitement, lipemia, inadequate stock, delay on the sample processing and the lack of information of the clinical signs and the drugs used in the patient may interfere in the diagnostic and treatment of several pathologies. This essay aims to make a bibliography review about the cares that must be taken when collecting and sending samples for complementary exams to the clinic pathology laboratory.

Key words: collection, hemolysis, lipemia, clinic pathology.

INTRODUÇÃO

A acurácia dos testes laboratoriais e a interpretação dos resultados dependem, primariamente, da qualidade da amostra recebida. Respeitar as técnicas de colheita prepará-las e realizá-las com cuidado, buscando artifícios para minimizar as alterações que possam ocorrer antes (ex. estresse), durante (ex. garroteamento prolongado a anti-sepsia inadequada), e após colheita (ex. contaminação) colabora para que haja uma correta interpretação dos exames. A confiabilidade no uso do laboratório como apoio diagnóstico depende da qualidade do material utilizado para análise, ou seja, colheita e conservação adequada da amostra. Adicionalmente, para o aproveitamento ótimo das análises em patologia clínica deve existir uma relação estreita entre o médico veterinário clínico e o laboratório de diagnóstico.

Os autores Gonzáles e Silva (2003); Kerr (2003) e Rebar et al. (2003) relatam que envio de amostras inadequadas implica em perda de tempo, de recursos e, em ocasiões, complicações na saúde do animal devido a uma interpretação incompleta ou incorreta de resultados.

ENVIO DE AMOSTRAS

Amostras enviadas a qualquer laboratório de diagnóstico, devem possuir uma identificação adequada, utilizando material que resista ao manejo, isto é, tintas permanentes resistentes à água, fitas com cola ou etiquetas com adesivo apropriado. Devem ser enviadas logo após a colheita e de preferência refrigeradas.

Gonzáles e Silva (2003), Kerr (2003) e Rebar et al. (2003) comentam que as amostras devem ser acompanhadas com um protocolo que inclua:

- Identificação do proprietário, médico veterinário ou pessoa responsável, telefone e endereço;
- Dados de identificação do animal ou animais amostrado(s);
- Anamnese completa do paciente e/ou do rebanho, sem omitir dados relevantes da história clínica, nutrição, reprodução, produção e manejo;
- A suspeita de doenças infecciosas, especialmente se elas forem zoonóticas;
- O uso de qualquer tratamento medicamentoso, dieta diferente, excitação/agitação durante a colheita da amostra, ou a utilização de um anestésico geral que possa ser relevante na interpretação subsequente dos resultados.

Segundo os autores citados acima, conservantes físicos ou químicos devem ser utilizados com muita cautela, pois o uso inadequado pode fazer com que a amostra seja inviabilizada. A embalagem a ser usada deve ser segura para a amostra e principalmente aos que a manusearão. A padronização da colheita por parte do médico veterinário através de um manual contendo todos os procedimentos de colheita, é uma forma de garantir a qualidade do resultado final do exame.

Bush (2004) relata que se vários exames forem realizados, é desejável colher todas as amostras no mesmo momento, pois isso permite a correlação dos achados e evita a possibilidade de que, entre as colheitas, o quadro clínico tenha mudado, produzindo inconsistências nos resultados obtidos.

AMOSTRAS PARA HEMOGRAMA

Para o hemograma não importa o vaso sangüíneo selecionado para realizar a obtenção da amostra, uma vez que não existem diferenças significativas nas concentrações dos componentes sangüíneos que são mensurados (GONZALES e SILVA, 2003). Porém, a veia jugular é grande o suficiente, até mesmo em gatos para que sejam aspirados até 5 mL de sangue em poucos segundos. Isso minimiza a estase venosa e a hemólise e permite que a amostra seja transferida para um tubo com anticoagulante antes de começar a coagular. O período de contenção é muito mais curto e, muitos animais parecem rejeitar menos o posicionamento (KERR, 2003).

O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é o anticoagulante de escolha para a realização do hemograma nas espécies domésticas com exceção das ratitas (avestruz) onde é preconizado o uso da heparina, pois nesta espécie aviária, o contato dos eritrócitos com o EDTA causa hemólise intensa da amostra. A heparina não é capaz de impedir a agregação plaquetária e causa alterações morfológicas nos leucócitos, e por isso não deve ser utilizada para a colheita de sangue para fins de realização e interpretação

do hemograma nas espécies veterinárias. O citrato de sódio é recomendado para os estudos das plaquetas e testes de coagulação (REBAR et al., 2003; SINK e FELDMAN, 2006).

A amostra de sangue pode ser obtida diretamente de um tubo de colheita contendo anticoagulante (tubos a vácuo) ou com uma seringa e rapidamente transferido para um tubo de colheita com EDTA. O uso de tubos a vácuo não é preconizado em pequenos animais devido à ocorrência de hemólise na amostra, sendo preconizado a colheita em seringa. Após a colheita com seringa deve ser realizada a transferência do sangue para o tubo com EDTA, este tubo deve estar inclinado de forma que o sangue desça pela parede, minimizando a hemólise. Imediatamente o tubo deve ser fechado e homogeneizado por inversão delicadamente, propiciando que o anticoagulante entre em contato com toda a amostra.

É essencial que os tubos com EDTA sejam preenchidos com o volume especificado no rótulo. Se for colhida uma quantidade muito pequena de sangue, a concentração resultante de EDTA danificará as células, se ao contrário, o tubo for por preenchido em demasia, o sangue provavelmente coagulará (KERR, 2003).

Tempo de armazenamento

Segundo Gonzáles e Silva (2003) as hemácias apresentam aumento da suscetibilidade à lise após 24 horas em contato com EDTA. Este fato permite que uma amostra possa ser processada até 24 horas após a colheita, desde que a mesma permaneça sob refrigeração, esperando pelo menos 15 minutos depois da colheita em temperatura ambiente antes de ser refrigerada, para evitar que ocorra hemólise. Se o sangue colhido permanecer a temperatura ambiente, deve ser processado o mais rápido possível após a colheita, pois as mostras sangüíneas armazenadas no EDTA podem produzir alterações leucocitárias e artefatos morfológicos nas lâminas de esfregaço se o sangue for deixado em temperatura ambiente por mais de 3 horas (WEISS e TVEDTEN, 2004).

Efeito da hemólise no hemograma

Segundo Gonzáles e Silva (2003); Rebar et al. (2003); Sink e Feldman (2006), as principais causas de hemólise são:

- Aspirar sangue rapidamente para dentro da seringa, usando uma agulha com calibre pequeno;
- Tubos com fluoreto, que alteram o metabolismo das hemácias e a deterioração celular começa imediatamente.

- Seringas ou agulhas úmidas, ou água entrando nos tubos de colheita;
- Perder o vaso no meio da colheita e aplicar pressão negativa no sangue já presente na seringa, ao procurar pelo vaso “perdido”;
- Colocar o sangue no tubo de colheita sem tirar a agulha da seringa, a qual sempre deve ser removida;
- Homogeneização violenta, pois a inversão repetida é suficiente para homogeneizar adequadamente;
- Amostras lipêmicas;
- Tempo decorrido até o processamento, especialmente se a amostra não for refrigerada;
- Congelamento da amostra.

As alterações no hemograma e proteína plasmática total decorrentes de amostras hemolisadas encontram-se listadas na Tabela 1. Cabe salientar que o grau de alterações está relacionado com a hemólise evidenciada na amostra.

Tabela 1 – Efeitos da hemólise nos parâmetros eritrocitários do hemograma e na proteína plasmática total (PPT).

EXAME	EFEITO DA HEMÓLISE
<i>Eritrograma</i>	
Contagem de eritrócitos	Diminuição
Hematócrito	Diminuição
Hemoglobina	Aumento
CHCM*	Aumento
VCM**	Diminuição
<i>PPT</i>	Aumento

* Concentração de hemoglobina corpuscular média; **volume corpuscular médio

Fonte: Meyer et al. (1995).

Efeito da lipemia no hemograma

A lipemia ocorre com frequência em amostras colhidas exatamente após alimentação de um paciente (animais monogástricos), não sendo um problema da amostra ou do manuseio desta, e sim uma característica do paciente, podendo ser evitada pelo jejum no mínimo de 6 a 12 horas (MEYER et al., 1995; KERR, 2003).

No eritrograma a concentração de hemoglobina falsamente elevada, também pode ser causada pela lipemia, devido ao efeito do aumento de turbidez na membrana fotométrica. Isto resultará em um valor falsamente elevado de CHCM (KERR, 2003).

Efeito do medo e excitação no hemograma

Esses efeitos são principalmente os da adrenalina, e tendem a ser mais pronunciados no gato que no cão, além de serem transitórios. Particularmente no gato, estes efeitos podem estar associados com o medo e a contenção na colheita e também são evidentes em amostras sanguíneas colhidas sob anestesia geral, se tiver ocorrido excitação durante a indução (BUSH, 2004).

Para Gonzáles e Silva (2003), Rebar et al. (2003), Bush (2004) e Sink e Feldman (2006) os principais efeitos do medo e excitação no hemograma são descritos como:

- Aumento transitório no hematócrito, CHCM e contagem de eritrócitos, resultante da contração do baço, liberando mais eritrócitos para a circulação;
- Aumento na contagem de neutrófilos segmentados que migram do compartimento marginal e são temporariamente redistribuídos para o compartimento circulante, causando um discreto aumento no seu número, um efeito que dura cerca de 30 minutos. Isto não é muito comum em cães, mas ocorre freqüentemente em gatos, especialmente naqueles mais jovens e saudáveis (é menos freqüente em animais doentes), sendo que neste caso não haverá desvio à esquerda;
- Aumento temporário do número de linfócitos na circulação (geralmente maior que o aumento de neutrófilos) ocorre em gatos, mas não em cães;
- Alteração na contagem de eosinófilos, primeiramente ocorre uma discreta eosinofilia (pico após 1 hora), seguida de uma eosinopenia moderada com menores valores após, aproximadamente, 4 horas;
- Aumento no número de plaquetas, pois elas são mobilizadas do baço após a excitação, sendo que no gato pode ser de apenas 3 minutos.

AMOSTRAS PARA PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS

A maior parte das análises bioquímicas requer sangue total, plasma ou soro. As instruções acompanham os analisadores bioquímicos e devem ser consultadas para o tipo de amostra exigido (HENDRIX, 2006).

A principal fonte de deterioração, no que se refere aos exames bioquímicos, são as hemácias, as quais devem ser separadas o mais rápido possível. A melhor maneira de tratar uma amostra para bioquímica é fazer a separação do plasma ou soro imediatamente depois da colheita. Se houver atraso na separação das hemácias da amostra, isso fará toda a diferença

entre uma amostra útil e uma massa hemolisada que não deverá ser analisada (KERR, 2003).

Efeito da hemólise sobre a bioquímica sanguínea

As alterações nos exames bioquímicos decorrentes da análise de uma amostra hemolisada estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Efeito da hemólise sobre os resultados dos exames bioquímicos.

EXAME	EFEITO DA HEMÓLISE
Aspartato aminotransferase – AST	Aumento
Alanina aminotransferase – ALT	Aumento
Lactato desidrogenase – LDH	Aumento
Creatina quinase – CK	Aumento
Amilase	Diminuição
Lipase	Aumento
Fosfatase Alcalina	Aumento ou diminuição (dependendo do método utilizado)
Proteína total	Aumento
Albumina	Aumento
Cálcio	Aumento
Fósforo	Aumento
Creatinina	Diminuição (dependendo do método utilizado)
Potássio	Aumento (equino, bovino, cão da raça Akita)
Bilirrubina	Leve aumento

Fonte: Meyer et al. (1995).

Efeito da lipemia na bioquímica sanguínea

A lipemia altera a análise da amostra devido ao fato de que a opacidade interfere com análise fotométrica e, nos casos graves, fica impossível obter os valores bioquímicos (MEYER et al., 1995). Bush (2004) relata como principais efeitos da lipemia na bioquímica sanguínea, as seguintes alterações:

- Atividade da amilase falsamente elevada, sendo uma consideração importante no diagnóstico de pancreatite aguda porque a presença de lipemia é bastante provável;
- Níveis de sódio e potássio falsamente diminuídos. Os níveis de sódio e potássio aparecem menores porque os eletrólitos estão presentes apenas na fração aquosa do plasma/soro. Quando houver um grande aumento na fração lipídica (não aquosa), há o efeito de “diluição” de sódio e potássio presentes no volume da amostra em questão;

- A hemólise também é uma consequência, pois a lipemia aumenta a tendência à hemólise após colheita e manipulação.

Kerr (2003) descreve como efeitos da lipemia o aumento dos valores de PPT, obtidos com um refratômetro. Estes valores podem estar falsamente elevados pela turbidez e, dependendo da acurácia ou da determinação de albumina, produzem uma relação albumina/globulina imprecisa.

Efeito do medo e da excitação na bioquímica sanguínea

Para Hendrix (2006) o medo e a excitação podem causar uma elevação nos valores de glicose, porém nos cães a concentração de glicose raramente excede 150 mg/dL pela excitação e, portanto, é pouco comum haver glicosúria. Já nos gatos, a concentração de glicose no sangue pode atingir 300 a 400 mg/dL ou até mais, com a excitação e medo podendo ocorrer glicosúria.

AMOSTRA PARA URINÁLISE

A primeira etapa na realização de uma urinálise é a colheita apropriada de uma amostra urinária, que deve ser obtida cuidadosamente para garantir resultados significativos. Há quatro métodos básicos para colheita de uma amostra urinária: cistocentese, cateterização, compressão vesical e micção espontânea (KERR, 2003). Os métodos preferidos são cistocentese e cateterização, pois proporcionam amostras ideais para todos os aspectos da urinálise ao manter a amostra livre da contaminação a partir do trato genital distal e das áreas externas (HENDRIX, 2006).

Idealmente devem-se analisar amostras dentro de 30 minutos após a colheita para evitar artefatos pós-colheita e alterações degenerativas. Se uma análise imediata não for possível, a refrigeração preserva a maior parte dos constituintes urinários por 6 a 12 horas adicionais. Em amostras que são deixadas repousar por longos períodos em temperatura ambiente, pode ocorrer redução de concentrações de glicose e bilirrubina, aumento de pH resultante de degradação bacteriana da uréia em amônia, formação de cristais com aumento da turvação da amostra, desintegração de cilindros e eritrócitos (especialmente em urina diluída ou alcalina) e proliferação bacteriana. Podem se formar muitos cristais em amostras refrigeradas. As amostras devem ser aquecidas em temperatura ambiente antes da avaliação e, ocasionalmente, cristais que são formados durante o resfriamento podem não dissolver quando a amostra é aquecida. As células tendem a se deteriorar rapidamente na urina e, assim, caso se tenha de realizar uma avaliação citológica, deve-se centrifugar a urina logo após a colheita e acrescentar 1 a 3 gotas de soro do paciente ou

albumina bovina ao sedimento para preservar a morfologia celular (KERR, 2003; HENDRIX, 2006).

Efeito do medo e excitação na urinálise

Segundo Navarro (1996) e Bush (2004), as alterações causadas na urinálise pelo medo e a excitação são as seguintes:

- Glicosúria, a chamada glicosúria emocional, causada pela liberação súbita de adrenalina, que leva a um aumento da mobilização da glicose.
- pH aumentado que pode ser resultado de ansiedade, causando palpitação (hiperventilação) e perda de dióxido de carbono.

AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE EFUSÕES

A colheita dos líquidos cavitários se faz através da punção com seringa e agulha. Deve-se fazer sempre uma tricotomia no local de introdução da agulha e proceder a uma anti-sepsia rigorosa, não esquecendo nunca o risco de contaminação dos tecidos adjacentes que o procedimento oferece. Deve-se utilizar uma agulha fina, pois as agulhas mais grossas apresentam o inconveniente de produzir um orifício muito grande que pode levar ao extravazamento de líquido. Se a quantidade de líquido for pequena, deve-se transferi-lo imediatamente a um frasco contendo EDTA. Se a quantidade for maior, deve-se encher também um tubo de ensaio sem anticoagulante. O fluido acondicionado no tubo com EDTA serve para prevenir a coagulação uma vez que é comum a punção de pequenos vasos no momento da colheita. Este fluido deve ser utilizado para a determinação de contagem celular. O frasco sem anticoagulante, serve para avaliar parâmetros bioquímicos (COWELL e TYLER, 1993; SHELLY, 2003; NAVARRO, 2005).

A toracocentese é comumente realizada no sexto, sétimo ou oitavo espaço intercostal, imediatamente abaixo da articulação costochondral. Este procedimento pode ser realizado com uma agulha borboleta de pequeno calibre (nº 19 a 23). O ponto selecionado deve ser tricotomizado e, se necessário, deve ser realizado o bloqueio anestésico local. O local é preparado assepticamente e a agulha é introduzida no meio do espaço intercostal selecionado. A agulha deve ser introduzida no espaço pleural até que a pleura seja puncionada. O líquido deve ser aspirado delicadamente e as amostras devem ser colocadas em frascos com e sem EDTA (FOSSUM, 2004).

Na abdominocentese o paciente deve ter a bexiga e os intestinos vazios previamente, devido ao risco de perfurar esses órgãos durante a colheita.

O melhor local para punção é na linha média do abdome, 1 a 2 cm posteriormente ao umbigo, com o animal também em pé ou em decúbito lateral. Não há necessidade de anestesia ou tranquilização, mas o animal deve ser bem contido. Se o líquido aparecer posteriormente a uma cirurgia, deve-se tomar cuidado para não introduzir a agulha na ferida cirúrgica, pelo risco que isso traz de traumatizar vísceras que eventualmente estejam aderidas à sutura. Para colheita pode ser utilizado um cateter, o paciente deve ser colocado em decúbito lateral e, procedida de uma anti-sepsia local. Uma vez introduzido o cateter, fixa-se uma seringa à extremidade do mesmo e puxa-se delicadamente o êmbolo. Se o líquido não vier, pode-se introduzir uma pequena quantidade de solução salina estéril e morna, massageando delicadamente o abdome para espalhar o líquido. Este deve ser retirado por pressão negativa (NAVARRO, 2005).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os exames laboratoriais são úteis no direcionamento do diagnóstico e na evolução de diversas patologias sendo que a obtenção de resultados confiáveis depende principalmente da qualidade da amostra enviada. Portanto, o laboratório de Patologia Clínica poderá ser de grande auxílio na investigação e tratamento de afecções, desde que o clínico forneça uma amostra adequada para processamento e dados suficientes para uma melhor interpretação dos exames.

REFERÊNCIAS

- BUSH, B. M. *Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais*. São Paulo: Roca, 2004.
- COWELL, R.; TYLER, R. *Diagnostic cytology of the dog and cat*. California: American Veterinary Publications, 1993.
- FOSSUM, T. W. Doenças pleurais e extrapleurais. In: ETTINGER, S. J; FELDMAN, E. C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. v.2, 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004.
- GONZALES, F. D.; SILVA, S. C. *Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária*. Porto Alegre: UFRGS, 2003.XXXXX
- HENDRIX, C. H. *Procedimentos Laboratoriais para Técnicos Veterinários*. São Paulo: Roca, 2006.
- KERR, M.G. *Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca, 2003.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. *Medicina de Laboratório Veterinária*. São Paulo: Roca, 1995.

NAVARRO, C. E. K. G. *Manual de Urinálise de Medicina Veterinária*. 2.ed. São Paulo: Varela, 2005.

REBAR, A. H MACWILLIANS, P. S; FELDMAN, B. F; METZGER, F. L; POLLOCK, R. V. H; ROCHE, J. *Guia de Hematologia para cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2003.

SHELLY, S. M. Fluidos de Cavidades Corporais. In: RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. *Atlas de Citologia de cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2003.

SINK, C. A.; FELDMAN, B. F. *Urinálise e Hematologia Veterinária*. São Paulo: Roca, 2006.

WEISS, D.; TVEDTEN, H. Erythrocyte Disorders. In: WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H. *Small Animal Clinical Diagnosis*. 4.ed. St. Louis: Saunders, 2004.