

Coleta e Manejo de Amostras Sangüíneas em Bovinos¹

Gerardo F. Quiroz-Rocha
Jan Bouda
Félix H. D. González

A confiabilidade no uso do laboratório como apoio diagnóstico depende em grande medida de que o material utilizado na análise tenha sido coletado e conservado adequadamente. Adicionalmente, para o aproveitamento ótimo das análises de patologia clínica deve existir uma relação estreita entre o médico veterinário clínico e o laboratório de diagnóstico. O 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. Frequentemente é argumentado que, na prática bovina, é complicado recorrer ao uso dos laboratórios para apoiar o diagnóstico, uma vez que geralmente estão localizados a grandes distâncias. No entanto, quando se domina o adequado uso das amostras, esta limitante não é significativa.

Considerações gerais

Cada vez que amostras são enviadas a qualquer laboratório de diagnóstico, é muito importante fazer uma adequada identificação, utilizando material que resista ao manejo, isto é, tintas permanentes resistentes a água, fitas com cola ou etiquetas com adesivo apropriado. É necessário acompanhar às amostras um protocolo que inclua:

1. Identificação do proprietário, médico veterinário ou pessoa responsável, telefone e endereço.
2. Dados de identificação do animal ou animais amostrado(s).
3. Anamnese completa do paciente e/ou do rebanho, sem omitir dados relevantes da história clínica, nutrição, reprodução, produção, etc.
4. Indicar se existe suspeita de doenças infecciosas, especialmente nos casos de zoonoses.

Devido às mudanças físico-químicas que ocorrem na amostra com o tempo, deve ser mencionada data e hora da coleta da amostra, bem como o tipo de conservante utilizado.

Coleta de amostras

Existem diferentes métodos para obter uma amostra de sangue:

- a) agulha direta: útil e rápido para obter grandes volumes, sua contra-indicação mais importante é que causa contaminação da amostra e, especialmente, do meio-ambiente;

¹ Quiroz-Rocha, G.; Bouda, J.; González, F. H. D. (2000) Coleta e manejo de amostras sangüíneas em bovinos. In: González, F. H. D.; Borges, J. B.; Cecim, M. (Eds.). *Uso de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos*. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- b) seringa: não deve ser feito vácuo violento; quando forem usadas seringas com anticoagulante, recomenda-se que esteja na forma líquida; quando o sangue vai ser transferido a outro recipiente, deve ser retirada a agulha da seringa para evitar hemólise na amostra;
- c) sistema de tubos com vácuo (*vacutainer*): siga as instruções do fabricante; é necessária certa prática para um manejo eficiente; é importante que, se utilizado algum tipo de anticoagulante, o tubo deve ser cheio até terminar o vácuo para manter as proporções sangue/anticoagulante.
- d) sistema de vácuo com tubos de plástico: são de recente introdução no mercado; sua principal vantagem é que o vácuo é regulável; sua utilização está mais orientada para determinações sorológicas, tais como detecção de anticorpos para diferentes patologias.

O principal fator de alteração de resultados é a hemólise, cujas causas mais comuns são as seguintes:

- provocar vácuo violento na coleta da amostra com agulha de calibre de muito fino;
- causar impacto do jato de sangue no fundo do recipiente;
- utilizar material úmido com água ou álcool;
- usar material sujo ou contaminado;
- usar material de má qualidade, com bordas ou paredes rugosas.
- agitar a amostra ao incorporá-la com o anticoagulante;
- provocar choques térmicos tanto por calor quanto por frio;
- permitir temperaturas extremas;
- manipular bruscamente as amostras para obter o soro antes que o coágulo tenha sido formado.

Tabela 1. Calibres de agulhas recomendados para coleta de amostras sangüíneas.

Calibre	Cor	Manejo
20,21	amarelo, verde	em sistema comercial de tubos de vácuo (<i>vacutainer</i>)
16,18	branco, rosa	mais difundidos ao utilizar seringa
14,16	azul, branco	para uso direto

Determinações de bioquímica clínica

Para este fim é utilizado soro ou plasma. O soro é obtido a partir de uma amostra de sangue extraída sem anticoagulante, esperando o tempo necessário para a formação de coágulo. O tempo que dura a sua formação é muito variável, entre 30 a 180 minutos. Por esta razão, é mais prático enviar ao laboratório amostras de plasma utilizando heparina de sódio como anticoagulante (tubos de tampa verde). O EDTA não deve ser utilizado para determinações bioquímicas. Em recipientes de plástico, o tempo de formação do coágulo é aproximadamente o dobro daquele do vidro.

Assim que se forma o coágulo, este deve ser separado das paredes do tubo ou seringa onde foi obtida a amostra utilizando-se de um palito longo de madeira ou de uma pipeta Pasteur. Posteriormente, deve ser centrifugado a 1.500 g (2.500 a 3.500 rpm) durante 10 minutos e transferir o soro para outro recipiente livre do coágulo. A amostra não deve ser centrifugada e nem colocada em refrigeração antes que o coágulo esteja bem formado, pois se prolonga o tempo de coagulação e existe predisposição à hemólise.

É necessário separar o soro do coágulo ou o plasma das células sangüíneas dentro de um período máximo de 2 horas depois de tirada a amostra. Se o tempo for maior, as frações dos parâmetros a serem medidos variam devido à troca de elementos entre as fases celular e líquida do sangue.

Assim que estiver separado o soro ou o plasma, é conveniente analisar de imediato (especialmente no caso da glicose). Se não for possível, é conveniente conservar a amostra sob refrigeração (0-4°C). Quando a obtenção dos resultados não for urgente, é possível enviar as amostras congeladas (-8 a -20°C) uma vez que a grande maioria dos parâmetros é estável pelo menos por uma semana nestas temperaturas.

Contudo, é recomendável consultar um bioquímico clínico antes de proceder às coletas, pois existem algumas determinações instáveis.

A melhor forma de obter o plasma é coletando as amostras de sangue com heparina como anticoagulante, na proporção de 3 gotas de heparina 1% (0,2 mg ou 200 UI) para cada 10 mL de sangue. É importante mesclar várias vezes de forma suave para incorporar totalmente o anticoagulante com o sangue para que este se conserve em bom estado. A amostra heparinizada deve centrifugar-se a 1.500 G durante 10 minutos, e depois deve ser transferido somente o plasma (livre de células) para um outro tubo, com uma pipeta Pasteur ou com uma seringa. Após, tampar e enviar para o laboratório clínico. Para as análises de bioquímica clínica completa (8-10 metabólitos) é suficiente extrair 3 a 5 mL de plasma, volume que se obtém a partir de 7 a 10 mL de sangue aproximadamente. Nos laboratórios que utilizam microtécnicas, 1,5 mL de plasma é suficiente.

Quando se trata de dosar microelementos, particularmente Zn, é recomendado colocar Parafilm[®] ao invés da rolha de borracha para fechar o tubo, pois o material das rolhas pode interferir com o resultado.

A amostra de plasma ou soro deve estar protegida da luz quando se trata de dosar pigmentos biliares (bilirrubina). Se existe o interesse de medir os valores do perfil lipidêmico (ácidos graxos não esterificados, colesterol, β -hidroxibutirato, triglicerídios, lipídios totais), sua determinação deve ser feita no soro, e não no plasma.

Para a determinação de glicose, é possível refrigerar imediatamente a amostra de sangue completa com heparina, para ser analisada nas 3 horas seguintes a coleta. Quando uma amostra está hemolisada os valores podem apresentar-se alterados, geralmente aumentados.

Determinações de hematologia

Hemograma

Para esta análise 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 medidos no hemograma. O anticoagulante para este estudo é o EDTA, pois é o que preserva melhor as células sangüíneas, além de não interferir com os corantes hematológicos. O EDTA deve ser utilizado na proporção de 10-20 mg ou 2 gotas de uma solução a 10% para cada 10 mL de sangue, lembrando que o excesso pode alterar os resultados. Se for utilizado o sistema vacutainer, é importante encher o tubo na capacidade que marca o fabricante, pois o anticoagulante está dosado para o volume máximo de cada tubo. Em nenhum caso pode ser dispensada uma mistura perfeita do sangue com o anticoagulante.

Assim que a amostra é coletada, pode ser conservada durante 4 horas a temperatura ambiente (15-25°C). Também é possível refrigerar a amostra para ser processada dentro das 24 horas posteriores a coleta, porém esperando pelo menos 15 minutos depois de feita a coleta em temperatura ambiente antes de ser refrigerada, para evitar que ocorra hemólise. Depois de 24 h de coletada, começam a ocorrer mudanças significativas na amostra.

Para a análise do hemograma são suficientes 3 mL de sangue. Nos casos de realizar somente a técnica do hematócrito ou a medição de proteínas e fibrinogênio, se o processamento se realiza durante a primeira hora após a coleta, pode ser usada heparina como anticoagulante.

Quando existe interesse de observar hemoparasitas (*Babesia* spp., *Anaplasma* spp.) recomenda-se preparar o esfregaço em uma lâmina imediatamente depois de retirada a amostra. Se isto não for possível, é necessário preparar o esfregaço nas seguintes 6 horas após a obtenção da amostra como máximo, a fim de não ter resultados falsos negativos, pois nessa condição os parasitas não serão observados nas células. A amostra ideal, nesses casos, é obtida de vasos periféricos devido a que em ocasiões isto ajuda na diferenciação de espécies, como no caso de *Babesia bigemina* e *B. bovis*.

[®] Parafilm: American Can Company. Greenwich, CT. USA.

Provas de coagulação

Estas provas são realizadas em casos excepcionais e por isto recomenda-se consultar um laboratório especializado de patologia clínica veterinária.

Determinação do estado ácido-básico

Este tipo de análise requer um manejo muito preciso das amostras. Os passos para fazer uma adequada coleta são descritos a seguir:

1. carregar uma seringa limpa de 1-3 mL de capacidade com uma solução de heparina a 1% (1000 UI por mL), permitindo que as paredes fiquem umedecidas;
2. voltar a heparina, de forma suave, a seu recipiente. A quantidade de heparina aderida às paredes da seringa é suficiente para a conservação da amostra;
3. trocar a agulha usada nos passos anteriores por uma limpa e seca;
4. fazer pressão sobre a veia no máximo por 30 segundos, para não alterar os resultados;
5. obter o sangue sem fazer vácuo violento e evitando a formação de bolhas e/ou espuma na amostra; é suficiente 1 mL de sangue;
6. rapidamente proceder à eliminação das bolhas na seringa e observar que saia uma gota de sangue na ponta da agulha;
7. tampar a ponta da agulha com massa (não é suficiente dobrar a agulha);
8. depositar imediatamente a seringa em um recipiente de água com gelo (0-4°C), para bloquear o processo da glicólise;
9. enviar ao laboratório.

A determinação deve ser feita nas primeiras 3 horas posteriores a coleta da amostra. Em ocasiões, é possível analisar o sangue de bovinos durante as 24 horas seguintes, usando tabelas de correção, para o que é importante indicar a hora de coleta da amostra.

Quando o médico veterinário tenha dúvidas sobre o envio de amostras ao laboratório, deve entrar em contato direto com o patologista clínico veterinário responsável, o que permitirá a ambos terem um melhor intercâmbio de informações e, dessa forma, o clínico fará um uso mais eficiente do laboratório clínico como ferramenta de ajuda nos seus diagnósticos.

Referências bibliográficas

- Coles, E. H. Diagnóstico y Patología en Veterinaria. 4ª ed. Interamericana, México, D. F., 1989.
- Fraser, C. M., Bergeron, J. A., Mays, A. and Aiello, S. E. The Merck Veterinary Manual. Merck & Co., Inc. Rahway, New Jersey, 1991.
- Jain, N. C. Essential of Veterinary Hematology. Lea & Febiger. Philadelphia, 1993.
- Meyer, D. J., Coles, E. H. and Rich, L. J. Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and Diagnosis. W. B. Saunders Company. Philadelphia, 1992.
- Núñez, O. L. Colección, Manejo y Envío de Muestras para Hematología, Bioquímica, Urología y Citología. Revista AMMVEPE, 30: 220-223, (1994).
- Pratt, P. W. Laboratory Procedures for Veterinary Technicians. 2nd Ed. Mosby, St. Louis, USA, 1992.
- Quiroz, R. G. F., Bouda, J., Candanosa, de M. E. Cómo enviar muestras de bovinos para análisis clínicos. México Ganadero, 421: 37-40. 1997.
- Radostits, O. M., Blood, D. C.; Gay, C. C. Veterinary Medicine. 8th ed. Baillière Tindall. London. 1994.
- Rosenberger, G. Clinical Examination of Cattle. W. B. Saunders. Philadelphia, 1979.
- Smith, B. P. Large Animal Internal Medicine. 2nd Ed. Mosby, St. Louis. 1996.