

vetscan

Número 03 Ano 2021

Boletim técnico

**Os resultados não coincidem
com a clínica: como os
principais efeitos pré-analíticos
podem interferir no diagnóstico
e interpretação dos exames**

Prof. Ms. Ricardo Duarte Lopes

zoetis

Principais efeitos pré-analíticos e interferentes nos exames laboratoriais



Os erros pré-analíticos que podem comprometer a interpretação dos exames laboratoriais são todos os fatores e situações que ocorrem desde o preparo do paciente, a requisição do veterinário solicitante, colheita, identificação da amostra, conservação e transporte do material para a área técnica onde será realizada a análise, até o princípio do processamento do exame, onde inicia-se a fase analítica.

No decorrer deste processo complexo quando ocorre alguma intercorrência, pode ser o suficiente para uma incorreta interpretação do exame e consequentemente um tratamento inadequado do paciente ou solicitação de exames adicionais sem a real necessidade. A literatura relata que a fase pré-analítica representa de 50% a 75% dos erros em exames laboratoriais, levando a danos potenciais de 3% a 12% dos casos (BRAUN et al., 2015).

Podemos dividir os fatores pré-analíticos em duas categorias para entender toda esta complexidade:

1 Fatores técnicos: onde estão incluídas a escolha do anticoagulante, técnica de colheita, conservação do material, estabilidade e transporte da amostra até o momento da análise, assim como a infusão de fármacos ou realização de procedimentos diagnósticos.

Normalmente são fatores de fácil rastreamento e controle, facilmente minimizados com processos bem descritos e treinamento técnico da equipe.

2 Fatores biológicos: que compreendem os efeitos biológicos. Nele estão incluídos a variação cronobiológica (diária, mensal, anual, sazonal ou outros), jejum, estresse, exercício físico, sedação, variações individuais como gênero, idade, raça, gestação ou lactação, condições ambientais, entre outros. São variações muito individuais e de difícil controle de dados. Documentação, pesquisas em artigos e a experiência do médico-veterinário podem diminuir o impacto na incorreta interpretação dos exames, dificultando muitas vezes no controle destes fatores (BRAUN et al., 2015).

Outro ponto importante a ser levantado na medicina veterinária, que não é descrito na literatura, mas acontece regularmente, é a necessidade de exames dos pacientes nas seguintes condições:

1 Exames de emergência: são aqueles que precisam ser realizados naquele exato momento para uma triagem do paciente. Nestas condições, normalmente, não são respeitados jejum, e nem mesmo certas condições necessárias para alguns testes. Na maioria das vezes são processados em equipamentos point of care, por profissionais não treinados, mas que são de suma importância para uma resposta rápida ao paciente.

2 Exames de check-up ou confirmação de uma suspeita clínica: são considerados aqueles muitas vezes solicitados para o acompanhamento da saúde do paciente, ou como triagem quando há uma suspeita clínica. Na maioria das vezes os exames são programados, respeitando jejum e preparo adequados do paciente para um melhor diagnóstico.

3 Exames de controle: são solicitados para o controle de uma doença em tratamento ou em cuidados paliativos. Muitas vezes são utilizados exames anteriores como parâmetro comparativo, buscando uma estabilidade, melhora ou evolução da doença. Nestas condições é importante que o paciente siga as recomendações e situações da colheita anterior, eliminando alterações nas condições fisiológicas individuais, já que normalmente são colheitas programadas. Situações como horário da colheita, jejum, rotina, método da análise entre outros fatores, devem ocorrer para um melhor acompanhamento do paciente, evitando assim uma incorreta interpretação do resultado.

Os principais problemas encontrados nos erros pré-analíticos são:

1. Formação de coágulos de sangue

A formação de coágulos é uma das principais causas de rejeição ou cancelamento de exames de hemograma dentro dos laboratórios clínicos. Podem ser formados desde microcoágulos até grandes coágulos de sangue. Podem ocorrer durante a punção venosa devido à dificuldade de uma colheita, por posicionamento errado da agulha, ou utilização de uma agulha e/ou seringa inadequada para aquele paciente e tamanho do vaso onde está realizando a colheita etc.

Outro fato importante está na escolha do frasco e anticoagulante utilizado para a colheita de cães e gatos. O frasco com EDTA é o escolhido para a hematologia, lembrando que todo frasco possui uma proporção de sangue e aditivo preparado comercialmente e, quando não respeitada esta proporção, ultrapassando a quantidade estabelecida pelo fabricante, poderá ocorrer a formação de coágulos. Tubos de heparina frequentemente provocam agregação plaquetária e a formação de microcoágulos e devem ser evitados para a realização do hemograma, mas são constantemente utilizados para a mensuração dos bioquímicos, a importância de sua utilização será discutida mais adiante.

A homogeneização do frasco do sangue total, juntamente com o anticoagulante, é outro ponto que deve ter atenção, pois a falta de uma homogeneização adequada (10 a 15 vezes com inversão completa do frasco) predispõe a formação de coágulos na amostra.

Os felinos possuem maior predisposição a formação de coágulos, microcoágulos e agregados plaquetários que os caninos, portanto, deve-se ter uma atenção redobrada na colheita.

O principal problema encontrado pela formação de coágulos está relacionado à incorreta contagem das células sanguíneas, onde os números poderão estar subestimados e trazerem falsos resultados às contagens celulares.

Outro ponto importante é o risco de coágulos e microcoágulos causarem um entupimento no mecanismo interno dos equipamentos hematológicos, levando a um grande prejuízo financeiro ao laboratório clínico, com o conserto do equipamento e reagentes utilizados para desobstruir o sistema.



Fonte: Arquivo pessoal Ricardo Duarte Lopes.

FIGURA 1: Frasco de EDTA com sangue total, nota-se ao lado direito, próxima a tampa do frasco, uma estrutura vermelha escura, indicando a presença de coágulo na amostra.

2. Hemólise

A hemólise certamente é um dos fatores pré-analíticos mais presentes nas análises laboratoriais. Está relacionada a lise das hemácias na amostra, na qual a hemoglobina e outras substâncias ficam livres no plasma gerando uma coloração avermelhada.

Diversas condições podem provocar a hemólise na amostra, desde processos patológicos pré-existent, como, por exemplo, processos hemolíticos autoimunes, presença de hematozoários, tumores, doenças hepáticas tóxicas, entre outras. Assim como causas iatrogênicas, ou até mesmo em colheitas ou conservação inapropriada do material, homogeneização incorreta, transporte inadequado, não respeitar a proporção sangue/aditivo do tubo, não aguardar o tempo de formação do coágulo e realizar a centrifugação da amostra, entre outros.

Ao realizarmos a antissepsia do paciente com álcool 70°, deve ser respeitado o tempo para ação do antisséptico e sua evaporação (30 segundos), se este processo não for respeitado, e o álcool entrar em contato durante a punção com o sangue, pode causar hemólise.

Durante a homogeneização do frasco contendo anticoagulante, o mesmo deve ser realizado por inversão completa e de uma forma suave e não chacoalhando a amostra, podendo causar hemólise se for realizada de maneira mais acentuada.

Amostras com sangue total não devem ser conservadas em temperatura abaixo de 2°C, como também não podem estar em contato direto com o gelo no transporte, no freezer, em determinadas geladeiras que congelam a amostra, ou próximas à ventilação da geladeira, porque a baixa temperatura causa o rompimento das hemácias.

Assim como as baixas temperaturas, o calor excessivo também provoca o rompimento de hemácias in vitro, portanto é fundamental tomar cuidado com esse aspecto ao transportar as amostras para o laboratório de análise.

O tempo do processamento das amostras também pode ocasionar a hemólise, assim sendo, o indicado é que elas sejam processadas (centrifugadas, analisadas) o mais breve possível, para que essa hemólise seja evitada.

Dependendo do frasco utilizado existe a necessidade de uma espera para a formação do coágulo e posteriormente a centrifugação da amostra, não sendo respeitado este tempo, pode ocorrer a hemólise durante a centrifugação.

Problemas encontrados: Diminuição do hematócrito e contagem de eritrócitos e aumento da hemoglobina e CHCM nas análises hematológicas; interferências em exames bioquímicos, podendo causar aumento ou diminuição dependendo da metodologia e técnica utilizada; alteração de enzimas (ALT, AST), eletrólitos (Potássio), e proteínas (Hemoglobina) dependendo das espécies e raças, sendo provocada pela liberação destes constituintes dentro das hemácias para o plasma.

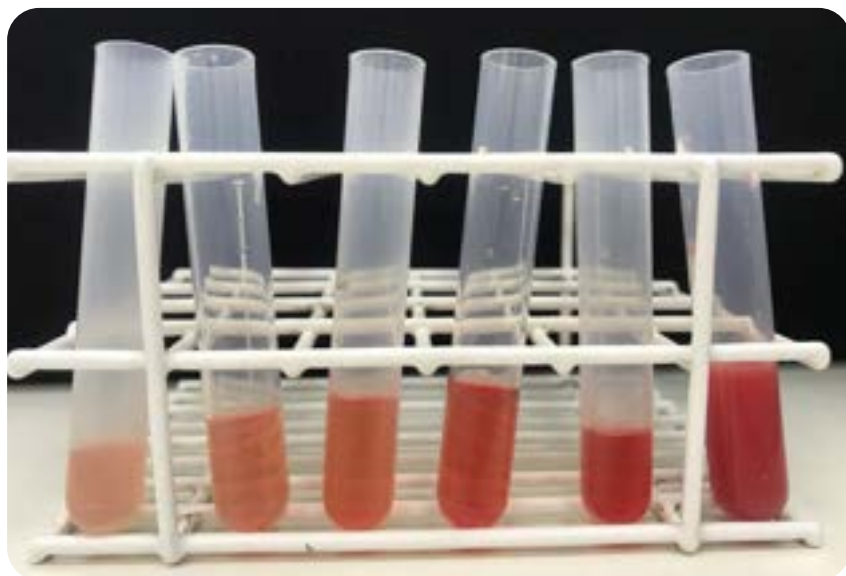


FIGURA 2: Diferentes graus de hemólise no soro sanguíneo, grau leve ou discreto (+) do lado esquerdo até um grau alto ou acentuado (+++) nos frascos da direita da figura, nota-se que o último frasco apresenta hemólise e lipemia na amostra.

3. Lipemia

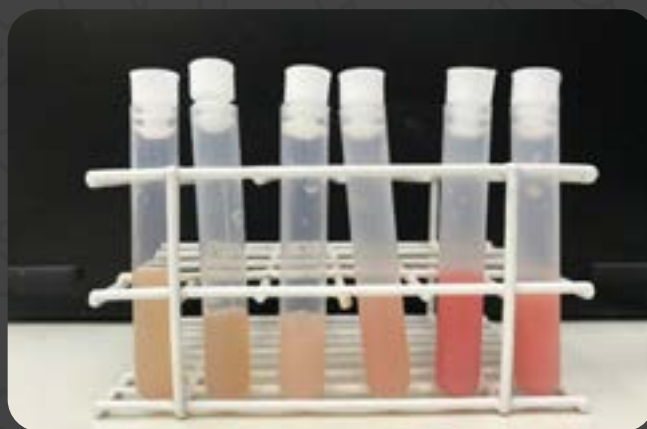
A lipemia na amostra confere ao soro ou plasma uma coloração opaca e leitosa, sendo relacionada à presença de lipídeos. Estes lipídeos presentes podem interferir nas mensurações hematológicas e bioquímicas, em algumas situações a lipemia e a hemólise estão associadas na amostra, ocorrendo esta situação principalmente em caninos.

A interferência da lipemia no soro ou plasma pode ser atenuada com a refrigeração, ultracentrifugação ou com a utilização de substâncias comerciais (validadas em apenas alguns analitos).

As principais causas da lipemia incluem a não realização do jejum ou um jejum muito prolongado, associado as doenças endócrinas ou hepáticas, causas genéticas, entre outras.

Problemas encontrados: No hemograma pode ser observado um aumento da hemoglobina, CHCM e plaquetas. Nas medições bioquímicas pode interferir em diversas mensurações ópticas ocasionando dispersão da luz nas análises, como

triglicérides, as mensurações de enzimas como ALT, AST, GGT entre outras, eletrólitos mensurados com a metodologia colorimétrica. É indispensável verificar com o equipamento e kit utilizado, até que níveis não ocorram interferências nos testes.



Fonte: Arquivo pessoal Ricardo Duarte Lopes.

FIGURA 3: Diferentes graus de lipemia no soro sanguíneo, grau leve ou discreto (+) do lado esquerdo até um grau alto ou acentuado (+++) nos frascos da direita da figura, nota-se que os dois últimos frascos apresentam além da lipemia a hemólise na amostra, estas alterações em conjunto são mais frequentes em caninos.

4. Icterícia

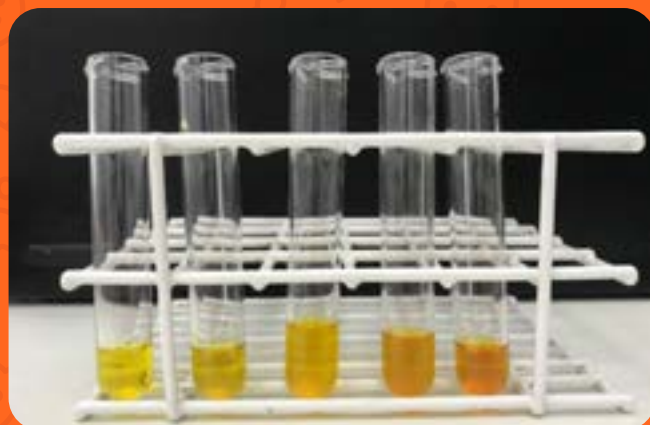
A icterícia é causada pelo aumento de bilirrubina no soro ou plasma, levando o mesmo a apresentar uma coloração amarelada, que pode variar de amarelo palha até um amarelo ouro.

Normalmente está presente em pacientes com problemas hepáticos, hemolíticos, relacionados a icterícias obstrutivas, entre outras.

Um detalhe importante em relação à mensuração das bilirrubinas, principalmente em pacientes ictericos, é processar rapidamente as amostras e protegê-las do contato com a luz, sendo necessária a utilização de frascos âmbar ou a proteção com algo que bloqueie a luminosidade.

Problemas relacionados à amostra icterica:

Assim como a lipemia, a amostra que possui icterícia pode dispersar a luz em algumas mensurações ópticas, sendo importante a verificação no equipamento e bula do reagente o quanto poderia influenciar no resultado do teste. Ensaios que utilizam o pico de absorvância próximos a 456 nm e reações catalisadas pela peroxidase são alguns exemplos (JACOBS; LUMSDEN; GRIFT, 1992; BRAUN et al., 2015).



Fonte: Arquivo pessoal Ricardo Duarte Lopes.

FIGURA 4: Diferentes graus de icterícia no soro sanguíneo, grau leve ou discreto (+) do lado esquerdo até um grau alto ou acentuado (+++) nos frascos da direita. Para a mensuração da bilirrubina nestas amostras o indicado é que sejam protegidas da luz através de um frasco âmbar ou com a proteção física de um papel que não permita a passagem da luz (papel alumínio ou pardo).

Nota: A presença de icterícia e algumas causas de lipemia e hemólise na amostra, infelizmente podem não estar relacionadas a problemas na colheita, sendo assim a solicitação de uma nova colheita não irá sanar o problema de interferência no resultado.

Alguns equipamentos mais modernos são capazes de inspecionar se há hemólise, lipemia e icterícia na amostra, informando sobre possíveis interferentes mesmo que não tenha sido visualizado pelo operador.

5. Jejum

A realização do jejum se torna necessária principalmente para minimizarmos as variações biológicas que podem ocorrer na mensuração de alguns analitos, além de diminuirmos a possibilidade de ocorrer a lipemia e/ou hemólise na amostra coletada. Para caninos e felinos é indicado um jejum alimentar de 12 horas, água pode ser oferecida à vontade para realização dos exames laboratoriais.

Existem poucos estudos na medicina veterinária que demonstrem as variações da alimentação em determinadas análises, assim como valores de referência específicos para alguns analitos em pacientes com ou sem jejum, como existem alguns padrões e trabalhos científicos bem estabelecidos na medicina humana, um exemplo são as mensurações de colesterol e frações, como triglicérides na medicina.

Um trabalho recente utilizando cães demonstrou que alguns analitos podem ser alterados quando o paciente não realiza o jejum, causado pela lipemia, demonstrando a importância da abstinência alimentar em enfermos que estão realizando o acompanhamento seriado de algum exame, assim como, colheitas programadas, para que não haja alteração nas interpretações de alguns analitos.

Problemas relacionados a amostras de pacientes sem jejum adequado: Alterações nos valores (elevação) de albumina, bilirrubinas, cálcio, colesterol, fósforo, glicose, proteínas totais, globulinas, triglicérides, uréia, AST, CK, creatinina (EVANS, 1987; SILVA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020).



6. Escolha do tubo

A escolha do tubo para a colheita se torna uma importante aliada na qualidade dos resultados dos exames laboratoriais, portanto, o conhecimento sobre as particularidades de cada anticoagulante ou material que será utilizado para a realização do exame pode influenciar na interpretação do resultado.



6.1 Tubos de EDTA (tampa lilás ou roxa)

É o tubo de escolha para a realização do hemograma em mamíferos, entre eles caninos e felinos, embora a literatura cite que em algumas espécies, especialmente o felino, pode causar agregados plaquetários ou microcoágulos, e nestes casos a indicação para a contagem plaquetária seria o uso de outros anticoagulantes com aditivos de citrato, prostaglandinas, adenosinas entre outros; para algumas espécies de aves e répteis.

Alguns bioquímicos e sorologias podem ser realizados com o plasma de EDTA, mas é interessante consultar o laboratório clínico e/ou a bula do teste que está utilizando para identificar se foi validado e/ou recomendado para este tipo de material. Alguns testes não são possíveis devido a ação do anticoagulante (quelante de cálcio), como cálcio total e iônico, potássio (EDTA potássico), sódio (EDTA sódico), entre outros.

Em alguns testes em que é necessário o rápido processamento da amostra, é indicada a colheita no frasco de EDTA e a rápida separação do plasma (até 20 minutos após a colheita). Entre eles podemos citar os exames de Amônia e o ACTH.



6.2 Citrato (tampa azul)

Normalmente utilizado para mensuração de exames relacionados à coagulação sanguínea, também é uma alternativa para a contagem de plaquetas em alguns casos.

Um cuidado importante nos frascos de citrato está no fato de respeitar rigorosamente a proporção sangue aditivo que contém no tubo, podendo ocorrer diluição da amostra caso a proporção não seja respeitada, ocasionando erro nos resultados.

Para a mensuração das provas de coagulação, é necessária a centrifugação e separação do plasma em até 20 minutos após a colheita, caso o processamento da amostra não seja realizado nas próximas horas, é indicado o congelamento deste plasma.



6.3 Heparina

(tampa verde)

A heparina é muito utilizada para a mensuração bioquímica, especialmente a heparina de lítio, que possui diversas padronizações e validações em kits e equipamentos.

A vantagem está na não necessidade de aguardar a formação do coágulo e separação do soro nos tubos que tem esta finalidade e, atualmente, com os equipamentos que centrifugam a amostra durante o processo ou equipamentos que fazem a análise do sangue total, auxiliando no rápido resultado do exame, sendo de suma importância para pacientes críticos que necessitam de resultados rápidos.

Pode ser uma alternativa para a realização de hemograma, mas não é muito confiável na mensuração das plaquetas e leucócitos

algumas vezes, principalmente por causar agregados plaquetários e microcoágulos nas amostras.

Alguns analitos foram evidenciados no caso da utilização do soro e do plasma de heparina podendo sofrer alterações estatísticas nos resultados, demonstrando a importância da validação e novamente a consulta da bula do kit utilizado, onde pode ocorrer esta diferença, sendo relacionado há uma interferência química ou algo físico relacionado a diferença do tipo de material a ser analisado, sendo importante existirem referências específicas para cada tipo de material (soro ou plasma). Entre eles podemos citar alguns exemplos como o potássio, proteína total, CK, GGT, LDH (THORESEN et al., 1992).



6.4 Fluoreto

(tampa cinza)

O fluoreto normalmente é utilizado para análises de moléculas que são mais instáveis, como no caso da glicose, lactato e das cetonas. Caso o processamento da amostra seja rápido, não há necessidade da utilização deste aditivo, portanto, somente é indicado quando for realizar a análise em um laboratório de apoio ou em situações que o processamento da amostra seja mais demorado.



6.5 Frascos para obtenção do soro

(tampa vermelha ou amarela)

São utilizados para a obtenção do soro sanguíneo, normalmente para as mensurações bioquímicas,

sorologias e hormônios. Podem ou não conter ativadores de coágulo e/ou gel separador.

Um detalhe importante a ser seguido é o tempo de separação do sangue total/ soro da amostra, quando utilizados os frascos com ativadores de coágulo, é necessário aguardar 30 minutos e com aqueles sem aditivos deve-se aguardar 60 minutos para a centrifugação da amostra. A hemólise pode ocorrer se não respeitar este tempo de espera, e por esta razão é indicada a colheita

em heparina de lítio para a realização de exames emergenciais, em que não há necessidade de aguardar este tempo para a centrifugação da amostra.

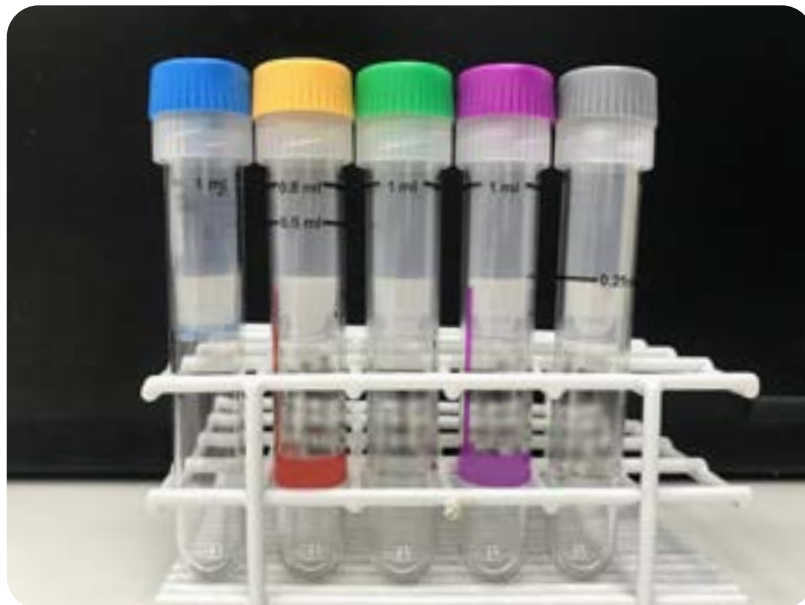
Algumas literaturas na medicina humana citam a interferência de alguns exames em contato com o gel separador por longos períodos, são poucos os trabalhos existentes e não temos trabalhos com a mesma relação na medicina veterinária, mas temos que ficar atentos a eventuais interferências, embora os fabricantes venham cada vez mais aprimorando a tecnologia para que isso não ocorra.

Nota:

A fim de não ocorrer uma contaminação da amostra de um frasco para outro, é indicada uma sequência de colheita de frascos, principalmente em colheitas fechadas, onde se utiliza o sistema a vácuo para a obtenção das amostras. A correta sequência dos frascos é: 1) Hemocultura > frascos sem aditivo > citrato > obtenção de soro > heparina > EDTA > fluoreto.

| Cor | Aditivo | Nº Inversões | Indicações |
|-------------------------|---------------------|---------------|------------------------------------|
| Azul ● | Citrato | 10 a 15 vezes | Coagulação |
| Amarela ● Vermelha ● | Ativador de coágulo | 10 a 15 vezes | Hormônios, bioquímicos, sorologias |
| Verde ● | Heparina | 10 a 15 vezes | Bioquímicos |
| Roxa ● Lilás ● | EDTA | 10 a 15 vezes | Hemograma, Biologia Molecular |
| Cinza ● | Fluoreto | 10 a 15 vezes | Bioquímicos (glicose) |

FIGURA 5: Exemplo de frascos de colheita de sangue, com indicação das cores e dos aditivos presentes. Da esquerda para a direita os aditivos presentes são citrato de sódio (azul), ativador de coágulo (amarelo), heparina (verde), EDTA (roxo ou lilás), fluoreto de sódio (cinza). Da esquerda para a direita é a sequência correta de colheita, evitando assim, problemas críticos nos resultados com a contaminação do sangue com os aditivos.



Fonte: Arquivo pessoal Ricardo Duarte Lopes.

7. Conservação do material

Não existe consenso sobre a conservação do material, pois diversos trabalhos demonstram diferentes situações e em diferentes analitos.

Se considerarmos uma regra geral, salvo algumas exceções, as amostras para hemograma e alguns bioquímicos se mantêm estáveis por até 2 horas em temperatura ambiente, lembrando que se refere a um ambiente controlado, com temperaturas próximas a 21°C.

Para a amostra de sangue total em refrigeração e a análise do hemograma, alguns trabalhos demonstraram que ocorre agregação plaquetária e controverso na análise de leucócitos em temperatura ambiente e refrigeração por até 48 horas após a colheita (BRAUN et al., 2015).

Em relação aos testes bioquímicos podemos encontrar bastante informação na literatura, na qual alguns testes são alterados por longos períodos em temperatura ambiente (exemplos: amilase, LDH, albumina, cálcio, creatinina, glicose, potássio, sódio e magnésio), sendo o mais indicado colocar a amostra em refrigeração se não for processada rapidamente, e se conservá-la por um longo período para análise, o mais indicado é congelar. Lembrando que sempre que for realizar o congelamento da amostra, a mesma deve ser separada das hemácias, embora em alguns analitos o congelamento não é possível.

8. Variações biológicas

Existem diversos fatores biológicos que podem fazer com que os exames laboratoriais variem no mesmo paciente ou de pessoa para pessoa, dificultando a análise frente aos valores de referência, como também a obtenção dos mesmos. Fatores como dieta, estresse, utilização de drogas, ritmos biológicos, exercícios, entre outros.

Sabemos que o estresse em felinos pode alterar os níveis de glicose, leucócitos, linfócitos e lactato. Em cães, pode elevar os níveis de cortisol, em coelhos, alterar os níveis de CK, entre vários outros exemplos.

Os ritmos biológicos ou ciclos endócrinos podem ocorrer e influenciar os resultados laboratoriais, algumas situações ambientais e quantidade e tipo de alimentos. Temos poucos estudos que corroborem com estas alterações, mas temos que levar em consideração de indivíduo para indivíduo.

Não temos muita informação nas alterações laboratoriais após a realização de exercícios físicos, apenas em caninos e equinos atletas, onde alterações como hematócrito, eritrócitos, leucócitos no hemograma, assim como alterações no lactato, CK e triglicérides, portanto, deve-se evitar ao máximo que o paciente realize algum tipo de exercício antes da colheita (BRAUN et al., 2015).

Referências bibliográficas

BRAUN, J. P. et al. The preanalytic phase in veterinary clinical pathology. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 44, n. 1, p. 8-25, 2015.

EVANS, G. O. Post-prandial changes in canine plasma creatinine. *Journal of Small Animal Practice*, 1987.

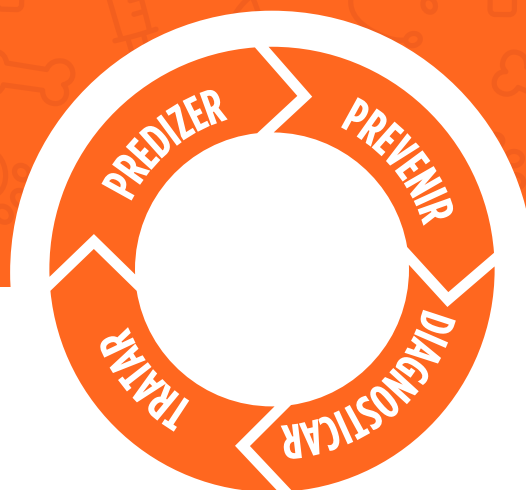
JACOBS, R. M.; LUMSDEN, J. H.; GRIFT, E. Effects of bilirubinemia, hemolysis, and lipemia on clinical chemistry analytes in bovine, canine, equine, and feline sera. *The Canadian veterinary journal*, v. 33, n. 9, p. 605-8, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17424077>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1481322>>.

OLIVEIRA, P. L. et al. Effect of post-prandial lipemia on canine biochemical parameters. *Comparative Clinical Pathology*, v. 29, n. 4, p. 763-775, 2020.

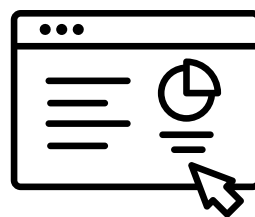
SILVA, N. L. T. et al. Post-prandial lipemia and glycemia in dogs fed with industrialized pet food. *Comparative Clinical Pathology*, v. 28, n. 1, p. 253-258, 2019.

THORESEN, S. I. et al. Effects of Storage Time on Chemistry Results from Canine Whole Blood, Heparinized Whole Blood, Serum and Heparinized Plasma. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 21, n. 3, p. 88-94, 1992.

vetscan



Escaneie o QR Code para acessar o site e fique bem informado com o conteúdo técnico do deZenvolve.



Visite o site da Vetscan



Accesse a plataforma DeZenvolve

zoetis

SAC: 0800 011 19 19 | adm-sac@zoetis.com | www.zoetis.com.br | @zoetisbr /zoetisbrasil

Copyright Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda. Todos os direitos reservados.