

**AÉCIO CARLOS DE OLIVEIRA**

**INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO EDTA, TEMPO E TEMPERATURA DE  
ARMAZENAGEM SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE CÃES NO  
HEMOGRAMA AUTOMATIZADO E MANUAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009**

AÉCIO CARLOS DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO EDTA, TEMPO E TEMPERATURA  
DE ARMAZENAGEM SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE CÃES  
NO HEMOGRAMA AUTOMATIZADO E MANUAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 03 de dezembro de 2009.

---

Prof. José Otávio do A. Corrêa Torres  
(Coorientador)

---

Prof. José Domingos Guimarães  
(Coorientador)

---

Prof. Cláudio Lísia M. de Siqueira

---

Prof. Lissandro Gonçalves Conceição

---

Prof. José Dantas Ribeiro Filho  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo de bom que tem me proporcionado.

A Elisângela por ter sido pai e mãe nas minhas ausências, minha eterna gratidão.

Aos meus dois príncipes João Pedro e Davi que fazem tudo valer à pena.

Aos meus pais (Marlei e Maria das Graças) por me darem a chance de obter o maior patrimônio que alguém pode possuir; o conhecimento.

Aos meus irmãos (Vanda, Cláudio e Eduardo) por estarem sempre dispostos a ajudar.

A Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF, onde aprendi muito, fiz grandes amigos e tenho enorme saudade.

Ao Dantas por acreditar na minha capacidade e investir em minhas idéias.

Ao DVT por me adotar como membro da família.

Aos colegas de laboratório Lucinda e Luis Márcio pela ajuda e compreensão.

Aos colegas que me ajudaram na coleta e processamento das amostras: Laila, Sheila, Cybeli, André, Rodrigo, Samuel, Paulão e Camilo pela disponibilidade e competência.

A Waleska pelo apoio imprescindível.

Ao J D pela paciência e grande ajuda.

A Rosi pela enorme competência em resolver problemas burocráticos.

Aos amigos Fábio, Emily, Tatinha, Evandro, José de Oliveira e Taciana por estarem sempre solícitos.

A todos os professores e funcionários que de alguma forma contribuíram nesta empreitada.

Aos colegas de pós-graduação pelo compartilhamento de conhecimentos e experiências pessoais.

Ao Nelson pela oportunidade da vivência em laboratório.

A minha esposa Elisângela e meus filhos João Pedro e Davi

## **BIOGRAFIA**

AÉCIO CARLOS DE OLIVEIRA, filho de Manoel Marlei de Oliveira e Maria das Graças de Oliveira, nasceu em 04 de janeiro de 1975, em Ervália – Estado de Minas Gerais. Em outubro de 1998, graduou-se em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora – MG. Em março de 2008, ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Mestrado), do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa de dissertação em dezembro de 2009.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>03</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>06</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>06</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>06</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>07</b>
<b>4.1. Animais.....</b>	<b>07</b>
<b>4.2. Coleta e Preparo das Amostras.....</b>	<b>07</b>
<b>4.3. Grupos Experimentais.....</b>	<b>07</b>
<b>4.4. Relação Sangue/Anticoagulante.....</b>	<b>08</b>
<b>4.5. Tempos de Avaliação.....</b>	<b>08</b>
<b>4.6. Distribuição das amostras de sangue por concentração de EDTA, tempo e temperatura de armazenagem (por animal).....</b>	<b>09</b>
<b>4.7. Análises Laboratoriais.....</b>	<b>09</b>
<b>4.8. Análises Estatísticas.....</b>	<b>10</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>5.1. Influência da concentração de EDTA, tempo e temperatura de armazenamento sobre parâmetros hematológicos de amostras sanguíneas de cães.</b>	<b>11</b>
<b>5.1.1. Eritrograma.....</b>	<b>11</b>
<b>5.1.2. Contagem global de leucócitos.....</b>	<b>17</b>
<b>5.1.3. Plaquetas.....</b>	<b>18</b>
<b>5.2. Efeitos do EDTA, do tempo e da temperatura de armazenamento sobre contagem global de leucócitos, hematócrito e hemoglobina com técnica manual e automatizada; contagem diferencial de leucócitos por microscopia e mensuração da proteína plasmática por refratometria.....</b>	<b>21</b>

<b>5.2.1. Leucócitos, hematócrito e hemoglobina, na técnica manual e automática.....</b>	<b>21</b>
<b>5.2.1.1. Leucócitos.....</b>	<b>21</b>
<b>5.2.1.2. Hematócrito.....</b>	<b>22</b>
<b>5.2.1.3. Hemoglobina.....</b>	<b>24</b>
<b>5.2.2. Contagem diferencial de leucócitos.....</b>	<b>27</b>
<b>5.2.3. Proteína plasmática.....</b>	<b>29</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>30</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>31</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<b>Médias de volume corpuscular médio (MCV), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) e hemoglobina corpuscular média (MCH), de sangue total canino, de acordo com a temperatura de conservação medidas nos tempos 0h, 12h, 24h e 48h, em amostras com diferentes concentrações de EDTA.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Médias do Hematócrito, obtidas em sangue total canino de acordo com a concentração de EDTA determinadas pelo método automatizado e manual.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Médias do Hematócrito, em sangue total canino de acordo com os tempos de armazenagem determinadas pelo método automatizado e manual.....</b>	<b>24</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 - Médias e desvios-padrão dos eritrócitos de sangue total canino conservado em diferentes temperaturas.....</b>	<b>11</b>
<b>Tabela 2 - Médias do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de sangue total canino, conservado em diferentes concentrações de EDTA.....</b>	<b>12</b>
<b>Tabela 3 - Médias de volume corpuscular médio (MCV), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) e hemoglobina corpuscular média (MCH), de sangue total canino, de acordo com a temperatura de conservação e medidas nos tempos 0h, 12h, 24h e 48h.....</b>	<b>13</b>
<b>Tabela 4 - Médias* e desvios padrão de hematócrito, hemoglobina e do RDW de amostras coletados em diferentes concentrações de EDTA, armazenadas em duas temperaturas e analisadas em quatro intervalos de tempo.....</b>	<b>16</b>
<b>Tabela 5 - Médias de leucócitos de sangue total canino, de acordo com a temperatura de conservação, em amostras com diferentes concentrações de EDTA.....</b>	<b>18</b>
<b>Tabela 6 - Médias* e desvios padrão das características hematológicas de amostras coletadas em diferentes concentrações de EDTA, armazenadas em duas temperaturas (2°C a 8°C e ambiente) e analisadas em quatro tempos (0, 12, 24 e 48h) após a coleta.....</b>	<b>19</b>
<b>Tabela 7 - Médias do volume plaquetário médio (MPV) e PDW de sangue total canino, de acordo com os tempos 0h, 12h, 24h e 48h de armazenagem.....</b>	<b>20</b>

<b>Tabela 8 - Médias de leucócitos (<math>10^3/\mu\text{L}</math>) de sangue total canino, armazenado em diferentes temperaturas, determinadas pelo método automático e manual.....</b>	<b>22</b>
<b>Tabela 9 - Médias do HCT em sangue total canino de acordo com a concentração de EDTA, determinados pelo método automático e manual.....</b>	<b>22</b>
<b>Tabela10 - Médias dos resultados do hematócrito (%), em sangue total canino, de acordo com o tempo, determinadas pelo método automático e manual.....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela11 - Médias* e desvios padrão (g/dL) da hemoglobina de cães em amostras coletadas com diferentes concentrações de EDTA, armazenadas em duas temperaturas e analisadas em quatro tempos diferentes, determinados pelo contador automático e pelo espectrofotômetro.....</b>	<b>26</b>
<b>Tabela12 - Médias de monócitos no hemograma canino, de acordo com a concentração de EDTA em mg/mL na amostra sanguínea.....</b>	<b>27</b>
<b>Tabela13 - Médias de neutrófilos segmentados, monócitos e neutrófilos bastonetes de hemograma canino, de acordo com o tempo de armazenagem da amostra sanguínea.....</b>	<b>27</b>
<b>Tabela14 - Médias de neutrófilos bastonetes no hemograma canino, de acordo com a temperatura de armazenagem da amostra sanguínea.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabela15 - Médias da Proteína (g/dL) determinada no plasma de sangue canino, de acordo com a concentração de EDTA na amostra de sangue.....</b>	<b>29</b>

**Tabela16 - Médias da proteína (g/dL) determinadas no plasma de sangue canino, de acordo com o tempo de armazenagem da amostra sanguínea..... 29**

## RESUMO

OLIVEIRA, Aécio Carlos de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro, 2009. **Influência da concentração do EDTA, tempo e temperatura de armazenagem sobre parâmetros hematológicos de cães no hemograma automatizado e manual.** Orientador: José Dantas Ribeiro Filho. Co-orientadores: José Domingos Guimarães e José Otávio do Amaral Corrêa.

O estudo teve como objetivo identificar os efeitos do tempo, da temperatura de armazenamento e do excesso de anticoagulante sobre parâmetros hematológicos de cães. Foram utilizadas amostras do sangue de dez cães de raças variadas, clinicamente hígidos. As alíquotas foram colhidas com 1,8 mg, 3,6 mg, 7,2 mg e 14,4 mg de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) por mL de sangue, distribuídas em dois grupos: de 2°C a 8°C e temperatura ambiente. Após a coleta, foram avaliadas em quatro tempos: 0, 12, 24 e 48 h. Usando um contador automático de células, foram avaliados leucócitos, hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), índice de anisocitose eritrocitária (RDW), plaquetas, plaquetócrito (PCT), volume plaquetário médio (VPM) e índice de anisocitose plaquetária (PDW). Simultaneamente à análise realizada no contador automático, foi determinado o hematócrito, por meio da técnica do micro-hematócrito. Também se procedeu à dosagem da hemoglobina com espectrofotômetro, contagem global de leucócitos, em câmara de Neubauer, e contagem diferencial de leucócitos por microscopia de esfregaços corados, além da dosagem da proteína plasmática, por refratometria. Na análise com contador automático, o VCM diminuiu nas maiores concentrações de EDTA (7,2 mg/ml e 14,4 mg/ml) atingindo o máximo de 2,36%, na maior concentração. A temperatura e o tempo também influenciaram este parâmetro, que apresentou decréscimo no tempo de 12 horas, temperatura de 2°C a 8°C e aumento nos tempos 24 horas e 48 horas, na temperatura ambiente ( $p < 0,05$ ). HCM sofreu alterações com relação ao tempo e à temperatura e a CHCM, com relação ao tempo, à temperatura e a concentração de EDTA ( $p < 0,05$ ). O VPM e o PDW apresentaram discreto aumento, ao longo do tempo. A temperatura de conservação influenciou discretamente a contagem de leucócitos e eritrócitos, que apresentaram valores menores na temperatura ambiente. Hemoglobina, hematócrito, plaquetas e PCT não apresentaram alteração significativa. As alterações observadas, não

comprometeram os resultados obtidos no contador automático, mostrando que as amostras sanguíneas, conservadas por dois dias, se mantiveram em boas condições para processamento, principalmente quando armazenadas sob refrigeração. Nos dados obtidos sem automação, o hematócrito diminuiu de forma significativa com o aumento da concentração de EDTA atingindo na maior concentração um decréscimo médio de 25,35%. O tempo também influenciou o hematócrito, que apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) no tempo 48 horas. O fator tempo influenciou positivamente a proteína, que teve um aumento médio de 11%, no tempo 48 horas. A proteína também foi influenciada pela concentração de EDTA, apresentando aumento considerável em seu valor médio, na concentração 14,4 mg/mL de sangue. Na contagem diferencial à microscopia óptica foram detectadas alterações no número de neutrófilos e monócitos, com relação ao tempo e à concentração de EDTA ( $p < 0,05$ ). A contagem de bastonetes sofreu alterações mais significativas, relacionadas com o tempo e a temperatura ( $p < 0,05$ ). Leucócitos, hemoglobina, linfócitos, eosinófilos e basófilos não apresentaram alteração relevante ( $p < 0,05$ ). O decréscimo do hematócrito nas amostras com alta concentração de EDTA demonstrou a importância da relação sangue/EDTA para a qualidade do hemograma, com a utilização da técnica do micro-hematócrito.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Aécio Carlos de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, december, 2009 **Influence of the concentration of EDTA, time and temperature of storage on hematological parameters of dogs in count blood cells automated and manual.** Adviser: José Dantas Ribeiro Filho. Co-advisers: José Domingos Guimarães and José Otávio Amaral Correa.

The study aimed to identify the effects of time, temperature of storage and excess of anticoagulant on hematological parameters of dogs. Blood samples of ten, clinically healthy dogs, of different breeds were utilized. Aliquots were taken with 1.8 mg, 3.6 mg, 7.2 mg and 14.4 mg of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) per mL of blood, divided into two groups: 2°C to 8°C and room temperature. Right after collection, they were evaluated in four times: 0h, 12h, 24h and 48 h. White blood cells, red blood cells, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW) platelet, thrombocrit (PCT), mean platelet volume (MPV) and platelet distribution width (PDW) were evaluated in the automatic cell counter. Hematocrit was determined using the microhematocrit technique, simultaneously with the analysis carried out in the automatic blood cell counter. The hemoglobin determination in the spectrophotometer, the total leukocyte count in the Neubauer chamber, the leukocyte count by microscopy of stained smears and the plasma protein dosage by refractometry were also done. In automatic cell counter analysis, the MCV increased significantly in higher concentrations of EDTA (7.2 mg / ml and 14.4 mg / mL) peaking at 2.36%, in the highest concentration. Temperature and time also influenced the MCV, which showed a decrease in time 12 hours, in the temperature of 2 ° C to 8 ° C and an increase in time 24 hours and 48 hours at room temperature. MCH showed minor changes related to time and temperature and MCHC, related to time, temperature and EDTA. MPV and PDW showed a slight increase over time. Storage temperature influenced slightly in the leukocytes and erythrocytes counts, which showed lower values at room temperature. Hemoglobin, hematocrit, platelet and PCT did not change significantly. The changes observed did not compromise the results obtained automatic cell counter, showing that the blood samples stored for two days remained in good condition for processing, especially when stored under refrigeration. In the data obtained without automation, the hematocrit decreased significantly with the increasing concentration of EDTA: in the highest concentration (14.4 mg of EDTA

per mL of blood), it showed an average decrease of 25.35%. The time also affected the hematocrit, which increased ( $p < 0.05$ ) in 48 hours time. The time factor has positively influenced the protein, which had an average increase of 11% in 48 hours time. The protein was also influenced by the concentration of EDTA, with considerable increase in the average value, in the concentration of 14.4 mg/mL of blood. In the differential count, made by microscopy, small changes in the number of neutrophils and monocytes were detected, related to time and the concentration of EDTA. Rods counting suffered the most significant changes related to time and temperature. WBC, hemoglobin, lymphocytes, eosinophils and basophils did not present relevant changes. The hematocrit decrease in the samples with high concentration of EDTA demonstrated the importance of the blood / EDTA proportion to the quality of the blood count, using the microhematocrit technique.

## 1. INTRODUÇÃO

O hemograma (do grego: *haemo*, sangue e *grama*, escrito) é uma maneira fácil, prática e econômica de se obter informações valiosas sobre a saúde do paciente. Fornece dados importantes, para direcionar a utilização de exames mais específicos que, em conjunto com a clínica, são de suma importância para o diagnóstico preciso e confiável (GARCIA-NAVARRO, 2005).

O hemograma constitui um importante exame de auxílio diagnóstico e prognóstico, para doenças hematológicas e sistêmicas, em medicina humana e veterinária. Rotineiramente é indicado para avaliação de anemias, neoplasias hematológicas, reações infecciosas e inflamatórias, acompanhamento de terapias medicamentosas e avaliação de distúrbios plaquetários. Fornece dados para classificação de anemias, de acordo com alterações na forma, tamanho, cor e estrutura das hemácias e conseqüente direcionamento diagnóstico e terapêutico. Orientando na diferenciação entre infecções viróticas e bacterianas, parasitoses, inflamações, intoxicações e neoplasias, por meio de contagem global e diferencial de leucócitos e de sua avaliação morfológica. A avaliação quantitativa e morfológica das plaquetas sugere o diagnóstico de patologias congênitas e adquiridas (PARDINI, 2004/2005).

Pela sua enorme importância, o controle de qualidade das amostras na rotina laboratorial e na pesquisa deve ser rigoroso e contínuo, para que os resultados obtidos sejam confiáveis e representem fielmente o quadro hematológico do espécime em análise, no exato momento da coleta. No hemograma são avaliadas três populações celulares: os leucócitos (série branca ou leucograma), as hemácias (série vermelha ou eritrograma) e as plaquetas (série plaquetária). O leucograma compreende a contagem global e diferencial de leucócitos. As células normais do sangue periférico que constituem o leucograma são: neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. O eritrograma inclui a contagem de hemácias, a dosagem de hemoglobina, o hematócrito, o cálculo do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e do índice de anisocitose eritrocitária (RDW), que indica variação de tamanho e a avaliação morfológica das hemácias. A série plaquetária inclui a contagem e a avaliação morfológica das plaquetas (FAILACE, 2003). O VCM é considerado o índice hematimétrico mais importante para o diagnóstico correto das anemias (RAPAPORT, 1990). A técnica do micro-hematócrito se mostra bastante precisa, com um erro de 1% a 2%

enquanto a contagem de hemácias, na câmara de Neubauer, pode apresentar um erro de 8,8% (FERREIRA NETO, 1978).

No Laboratório Clínico do Departamento de Veterinária, da UFV, normalmente são realizados mais de três mil hemogramas por ano, atingindo no ano de 2008, 3.508. Sendo o exame mais solicitado, uma vez que, de todo animal atendido no Hospital Veterinário do DVT, é requerido o hemograma completo.

Diariamente, dentre as amostras de sangue total colhidas com EDTA e encaminhadas ao Laboratório Clínico do DVT/UFV, que por vezes apresentam volumes mínimos para a execução do hemograma, devido às dificuldades de coleta, dentre as quais se destacam: inexperiência do coletor, agressividade do animal e tamanho reduzido de algumas raças e filhotes. Como existe uma relação ideal sangue/anticoagulante e os tubos são padronizados com uma quantidade fixa de EDTA, percebe-se que boa parte dos hemogramas é executada com amostras preparadas de maneira inadequada, ou seja, com excesso de anticoagulante. Também se observa com frequência a chegada de amostras “velhas”, coletadas em finais de semana, em outras localidades ou a campo, durante aulas práticas, realizadas em locais e horários que não permitem o envio e o processamento das mesmas no mesmo dia. Estas amostras muitas vezes são conservadas sob temperatura ambiente, por grandes períodos de tempo, o que pode comprometer a qualidade do resultado dos hemogramas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

De uso corrente como anticoagulante de amostras sanguíneas, o excesso de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) pode ocasionar diminuição do hematócrito e do volume corpuscular médio, além de aumentar a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) sem interferir no resultado da concentração de hemoglobina (DOYLE, 1967; PENNY et al., 1970). Em amostras de sangue conservadas sob refrigeração por 24 horas, não há alteração nos valores do hematócrito, da hemoglobina e na contagem de células. O contato prolongado do sangue com o EDTA pode causar nos leucócitos: clareamento, manchas citoplasmáticas e até lise. (SCHALM et al., 1986). Segundo o manual de exames do Instituto Hermes Pardini, Divisão Veterinária, as amostras de sangue para hemograma permanecem viáveis por 72 horas, quando refrigeradas entre 2°C e 8°C. Segundo o fabricante de tubos Vacuette®, as amostras de sangue com EDTA, em temperatura ambiente, permanecem viáveis por 24 horas. O acondicionamento de um dia para outro, leva a um pequeno aumento do volume corpuscular médio (VCM), o que não é significativo, pois permanece similar ao VCM do sangue acondicionado em geladeira (LAWRENCE, et al., 1975). Amostras sanguíneas velhas podem provocar aumento do VCM e diminuição da MCHC (KERR, 2003). O aumento do teor de lipídeo, bilirrubina e hemoglobina pode resultar em valor de proteína plasmática falsamente elevada, quando obtido por refratometria (LASSEN, 2007).

Segundo ALMEIDA (2008), as alterações mais frequentes após a coleta, causadas pela relação com anticoagulante e tempo de conservação são: aumento do VCM e da fragilidade osmótica dos glóbulos vermelhos, degeneração de neutrófilos e monócitos, evidenciada pela presença de vacúolos no citoplasma, e lobulação dos núcleos. Para evitar essas alterações, é necessário que o material seja examinado ou preparado para o exame o mais rápido possível. No caso do EDTA, o material deve ser analisado em até seis horas. Se houver necessidade de uma espera maior, é recomendado que o material seja acondicionado em geladeira a 4°C. O sangue deve ser homogeneizado suavemente para não produzir lise das células.

Um erro no hematócrito é aquele causado por excesso de EDTA. O valor do hematócrito se mostrará falsamente diminuído, devido à contração celular, mas a hemoglobina e as contagens celulares não estarão alteradas. A duração e a velocidade adequadas da centrifugação são essenciais para a obtenção de um hematócrito correto. Na centrifugação, uma pequena quantidade de plasma é retida entre as hemácias que contribuem com 1% a 3% no valor do hematócrito, em um sangue humano normal, sendo este valor

ligeiramente maior nas anemias macrocíticas, nas esferocitoses e nas anemias hipocrômicas. Outras causas de erro na mensuração do hematócrito são a homogeneização inadequada do sangue e a leitura incorreta do volume de células e de plasma, quando se inclui no volume eritrocitário a camada de leucócitos (MORRIS, 2008).

WEISER (2007) faz algumas considerações sobre procedimentos pré-analíticos e efeitos da temperatura de conservação e do excesso de EDTA sobre as amostras sanguíneas como: esfregaço sanguíneo seco, ao ar livre, preserva a morfologia celular para exame posterior; a refrigeração do tubo de sangue auxilia na preservação dos componentes celulares, mensurados por contadores de células automatizados; amostra de sangue armazenada sob temperatura ambiente ou acima dela, pode levar ao aumento artificial do VCM e do hematócrito pela tumefação celular; congelamento do sangue pode causar lise celular, por isto não deve ser usado como método de preservação e o preenchimento incompleto do tubo resulta em excesso de EDTA, provocando crenação osmótica de hemácias, o que sugere uma falsa diminuição do hematócrito e do VCM, quando se utiliza a técnica do micro-hematócrito (WEISER, 2007).

A natureza fisiopatológica da pseudotrombocitopenia, induzida por EDTA, não é bem conhecida. No entanto tem-se proposto que auto-anticorpos presentes no plasma reconhecem e se ligam a um epitopo da glicoproteína IIb (GPIIb), integrante do complexo GPIIb/IIIa da superfície plaquetária, promovendo aglutinação das plaquetas. Este epitopo somente é exposto na presença do EDTA. A fisiopatologia da produção de tais anticorpos é desconhecida e a presença deles no plasma é flutuante, podendo-se alternar períodos em que se detecta ou não a trombocitopenia. Já foram identificados vários anticorpos envolvidos na pseudotrombocitopenia induzida por EDTA. Dentre eles se destacam as imunoglobulinas das classes G (IgG), M (IgM) e A (IgA). Esses anticorpos reagem melhor em temperaturas inferiores à temperatura ambiente (DUSSE et al., 2004).

Em estudo experimental com cães saudáveis e com cães doentes, MEDAILLE et al. (2006) utilizaram 154 amostras de sangue total com EDTA, as quais foram analisadas em contador automático, logo após a coleta, e com 24 e 48 horas de conservação. Todas as variáveis analisadas apresentaram diferença significativa, mas poucos resultados chegaram a ser considerados inadequados, visto que as alterações foram pouco expressivas. Foram observadas variações na leucometria global e nas plaquetas e aumento constante no VCM com o passar do tempo. Os referidos autores reforçaram a necessidade de se conhecer as variações provocadas pela ação do tempo sobre as amostras, para que não ocorram equívocos

na interpretação dos resultados, principalmente daqueles que se encontram em condições limítrofes.

ROCHA et al. (2001), avaliando sangue humano em analisador automático de células, concluíram que não foram significativas as diferenças entre os resultados obtidos em diversos tempos de análise (0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12h), após a colheita, nos valores de: leucócitos, hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM, RDW, plaquetas, volume plaquetário médio, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e basófilos.

Em um ensaio experimental realizado por LIPPI et al. (2005), foram avaliados 21 parâmetros hematológicos, em 25 amostras de sangue de ciclistas, duas horas e 24 horas após a coleta, conservadas a 4°C. Foram detectados aumentos significativos nos seguintes parâmetros: hematócrito, VCM, porcentagem de macrócitos, plaquetas e volume plaquetário médio (VPM). Já a porcentagem e contagem de reticulócitos e o conteúdo médio de hemoglobina do reticulócito (Chr) diminuíram ( $p < 0,05$ ). As variações ocorridas foram modestas e ficaram, quase sempre, dentro da margem clinicamente aceitável.

Foi observada alteração significativa no VCM de amostras sanguíneas de cordão umbilical de recém nascidos, coletadas com EDTA, após armazenagem por mais de 24 horas em temperatura ambiente. As alterações acentuaram-se nos tempos 48 e 72 horas. Nas amostras conservadas a 4°C, mesmo após 72 horas, não foi constatado aumento nos valores do VCM (FREISE et al., 2008).

Estudo realizado com trinta cães da raça beagle determinou a influência do excesso de EDTA nos parâmetros hematológicos. Utilizaram-se para coleta do sangue total, tubos com vácuo, com dois volumes sanguíneos: nos tubos com 3mL, manteve-se a relação ideal de 1,8 mg de EDTA/mL de sangue, enquanto nos tubos com 1mL houve elevação desta relação para 5,4 mg de EDTA/mL de sangue. As amostras foram observadas em equipamento com software específico e, a seguir, os dados obtidos foram analisados. Os resultados mostraram diminuição do hematócrito e do VCM e aumento no CHCM. Não foram observadas alterações na contagem diferencial de leucócitos (NEMEC et al., 2005).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi verificar, sob condições variadas de coleta e processamento das amostras, a ocorrência de alterações causadas pelo excesso de anticoagulante, temperatura e tempo de conservação e a influência destas afetando o resultado do hemograma e comprometendo sua interpretação e uso como suporte à conduta clínica e terapêutica adotada.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Verificar as alterações causadas pela concentração de EDTA, tempo e temperatura de armazenamento, em cada parâmetro hematológico de forma isolada.
- Comparar as alterações nos processos automatizado e manual na contagem global de leucócitos na dosagem de hemoglobina e no resultado do hematócrito.
- Verificar as alterações ocorridas na contagem diferencial e na mensuração da proteína plasmática.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizados dez cães adultos hígidos (seis machos e quatro fêmeas) de peso, idade e raças variadas. Os animais foram selecionados, a partir da clientela de clínicas particulares da cidade de Viçosa, MG, e da rotina de atendimento do setor de Clínica e Cirurgia de Cães e Gatos do Hospital Veterinário do Departamento de Veterinária da UFV, de acordo com a disponibilidade e autorização do proprietário.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Viçosa e registrado na instituição sob o nº 505542577.

### 4.2. Coleta e Preparo das Amostras

A coleta e o processamento das amostras foram realizados entre os meses de março e maio de 2009.

Após antissepsia, as amostras foram colhidas por venipunção da jugular, onde foi introduzido um cateter, acoplado as seringas e aspirado o sangue. Para este procedimento foram usadas seringas com capacidades diferentes (10, 5, e 1mL) para o preenchimento dos 28 tubos plásticos<sup>1</sup> marcados com pincel indicando o volume correto a ser coletado. A coleta foi realizada com uma equipe de oito pessoas, que trabalharam sincronizadas para que o tempo entre a aspiração do sangue pela seringa e a homogeneização das amostras nos tubos fosse o menor possível, evitando assim a coagulação.

### 4.3. Grupos Experimentais

De cada animal, foram colhidas amostras sanguíneas, as quais foram separadas em dois grupos: **Grupo TA** (temperatura ambiente) e **Grupo 2°C a 8°C** (temperatura de 2°C a 8°C).

---

<sup>1</sup> Vacuette do Brasil LTDA, Campinas

#### **4.4. Relação Sangue/Anticoagulante**

Em ambos os grupos, as alíquotas de 0,25; 0,5; 1; e 2mL de sangue foram colhidas em tubos contendo 3,6mg de EDTA levando as seguintes concentrações de EDTA:

- A. 0,25mL → 14,4mg/mL de sangue
- B. 0,5mL → 7,2mg/mL de sangue
- C. 1mL → 3,6mg/mL de sangue
- D. 2mL → 1,8mg/mL de sangue

#### **4.5. Tempo das Avaliações Laboratoriais**

Em ambos os grupos, as amostras foram avaliadas em quatro tempos:

T0h: imediatamente após a coleta

T12h: 12 horas após a coleta

T24: 24 horas após a coleta

T48h: 48 horas após a coleta

Cada tubo foi aberto e manipulado uma única vez, no tempo da respectiva análise. A temperatura de 2°C a 8°C foi monitorada com termômetro de máxima e mínima, permanecendo na faixa citada, com a geladeira sendo aberta somente nos momentos de realização das análises, para retirada das amostras. A temperatura ambiente oscilou entre 22°C e 30°C.

#### 4.6. Distribuição das amostras de sangue por concentração de EDTA, tempo e temperatura de armazenagem (por animal).

Tempos de armazenagem em horas	0				12				24				48				Total
	14,4	7,2	3,6	1,8	14,4	7,2	3,6	1,8	14,4	7,2	3,6	1,8	14,4	7,2	3,6	1,8	
Concentração de EDTA em mg/mL de sangue																	
Temperatura: 2°C a 8°C	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
Temperatura: Ambiente	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	16
Número de amostras	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	28
Volume de sangue em mL	0,25	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	4,0	0,5	1,0	2,0	4,0	0,50	1,0	2,0	4,0	26,25

#### 4.7. Análises Laboratoriais

As amostras sanguíneas após homogeneização manual, por inversão suave do tubo por um período de um minuto, foram analisadas com contador hematológico automático<sup>2</sup>, para a mensuração dos seguintes parâmetros: leucócitos/ $\mu\text{L}$ , hemácias/ $\mu\text{L}$ , hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), volume corpuscular médio (fL), hemoglobina corpuscular média (pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (%), índice de anisocitose eritrocitária (RDW), plaquetas/ $\mu\text{L}$ , plaquetócrito (%), volume plaquetário médio (fL) e índice de anisocitose plaquetária (PDW). Para contagem diferencial os esfregaços sanguíneos foram confeccionados manualmente e corados com métodos para coloração rápida em hematologia, tipo panótico<sup>3</sup> conforme orientação do fabricante. A dosagem de hemoglobina realizada com espectrofotômetro modelo Celm E-225D<sup>4</sup> de acordo com as instruções do fabricante do Kit. Os leucócitos foram contados em câmara de Neubauer, sendo o hematócrito determinado pela

<sup>2</sup> Human do Brasil, Itabira - MG

<sup>3</sup> Newprov produtos para laboratório, Pinhais - PR

<sup>4</sup> Celm E-225D, CELM - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos Barueri - SP

técnica do micro-hematócrito, segundo SCHALM et al. (1986), e a mensuração das proteínas plasmáticas por meio de refratometria com o uso do equipamento modelo *Clinical refratometers n° 140*<sup>5</sup>. Os esfregaços foram analisados por microscopia de luz, para contagem diferencial de leucócitos.

#### **4.8. Análise Estatística**

Os dados foram arranjados em um esquema fatorial, em razão de duas temperaturas de estocagem (ambiente e 2°C a 8°C), quatro concentrações de EDTA e quatro tempos de avaliação (0h, 12h, 24h e 48h após coleta). Para proceder à análise dos dados, foram realizadas a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com probabilidade de 5% de erro. Foram verificadas as interações entre tempo de estocagem e tempo de avaliação, Onde não houve interação, os dados foram descritos separadamente. Antes das análises, os dados foram submetidos aos testes de Lilliefors e Cochran e Bartlett, para verificar a normalidade dos dados, e à homocedasticidade das variâncias entre tratamentos. Quando não foram atendidas as premissas da ANOVA, os dados foram submetidos à análise não paramétrica e a média testada pelo teste de Kruskal-Wallis ou Wilcoxon. A estatística descritiva foi efetuada para todos os parâmetros estudados (média e desvio padrão).

---

<sup>5</sup> Fuji Optical Electronics Co. LTD, Tokyo, Japão

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Influência da concentração de EDTA, tempo e temperatura de armazenamento sobre parâmetros hematológicos de amostras sanguíneas de cães.

#### 5.1.1. Eritrograma

Houve alteração nos valores de: eritrócitos, VCM, HCM e CHCM ( $p < 0,05$ ). A concentração de EDTA e o tempo de armazenagem não influenciaram a contagem de eritrócitos, nem houve interação deles com a temperatura. A temperatura de conservação influenciou o resultado da contagem de eritrócitos que foi menor nas amostras conservadas em temperatura ambiente como demonstrado na tabela 1.

**Tabela 1** - Médias e desvios-padrão dos eritrócitos de sangue total canino, conservado em diferentes temperaturas.

Parâmetro	Temperaturas	
	2°C a 8°C	Temp. ambiente
Eritrócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ )	$6,76 \pm 1,13^A$	$6,44 \pm 1,14^B$

Nota: Médias e desvios, seguidos por letras iguais na mesma linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ), pelo teste F.

Esse decréscimo se deveu a lise das hemácias durante o período de conservação, considerando-se o aumento da temperatura das amostras como provável fator determinante da fragilidade eritrocitária. Entretanto outros autores em condições semelhantes, (COHLE et al., 1981; HIRASE et al., 1992; FREISE et al., 2008), analisando sangue humano, não evidenciaram diferença significativa no número de eritrócitos em amostras mantidas sob refrigeração e temperatura ambiente por 48 horas.

Como expresso na tabela 2, o VCM apresentou um decréscimo nas duas maiores concentrações utilizadas de EDTA (7,2mg/mL e 14,4mg/mL).

**Tabela 2** – Médias do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de sangue total canino, conservado em diferentes concentrações de EDTA.

Parâmetro	EDTA (mg/ml)			
	1,8	3,6	7,2	14,4
VCM (fL)	69,15 <sup>A</sup>	68,24 <sup>AB</sup>	67,60 <sup>B</sup>	67,52 <sup>B</sup>
CHCM (%)	34,14 <sup>B</sup>	34,72 <sup>AB</sup>	35,12 <sup>A</sup>	34,56 <sup>AB</sup>

Médias seguidas por letras iguais e na mesma linha não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

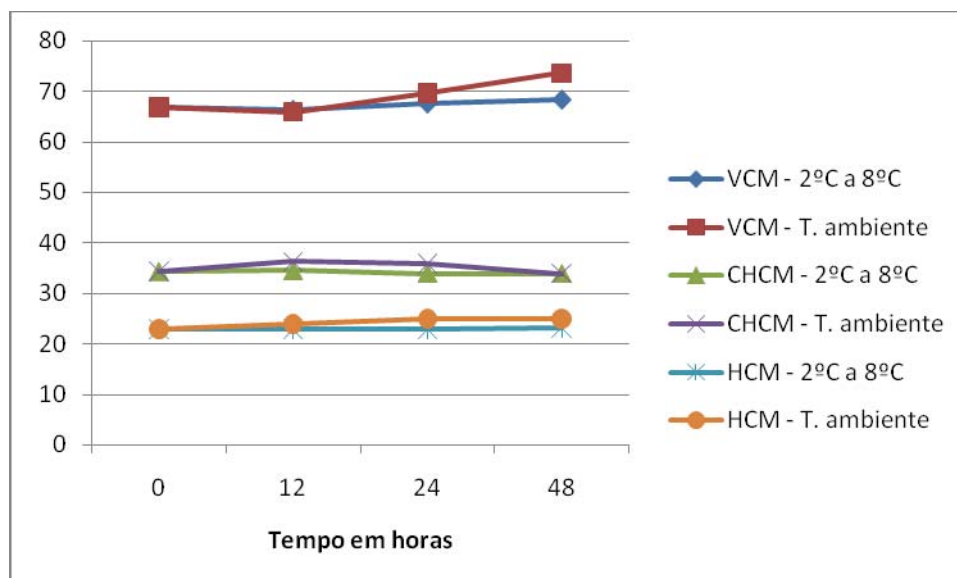
Entretanto, não foi observada interação entre a concentração de EDTA e o tempo ou a temperatura de conservação das amostras de modo que a diminuição do VCM foi ocasionada pela crenação osmótica das hemácias decorrente do excesso de EDTA. NEMEC et al. (2005) também evidenciaram diminuição do VCM em amostras com alta concentração de EDTA (5,4mg/mL de sangue). No estudo dos referidos autores, os valores do VCM reduziram de 74,4±1,1fL para 65,4±3,0fL, diferença de 11,9% sendo superior aos 2,36% de redução no presente estudo, quando se utilizou 14,4mg de EDTA por mL de sangue..

No presente estudo, o tempo e a temperatura de armazenamento também influenciaram o VCM, ocorrendo interação entre os dois (tabela 3 e Figura 1).

**Tabela 3** – Médias de volume corpuscular médio (MCV), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) e hemoglobina corpuscular média (MCH), de sangue total canino, de acordo com a temperatura de conservação e medidas nos tempos 0h, 12h, 24h e 48h.

		Tempo em horas			
Temperatura		0	12	24	48
VCM (fL)	2°C a 8°C	66,8 <sup>ABa</sup>	66,36 <sup>Ba</sup>	67,57 <sup>ABb</sup>	68,32 <sup>ABb</sup>
	Ambiente	66,8 <sup>CBa</sup>	65,93 <sup>CBa</sup>	69,62 <sup>Ba</sup>	73,60 <sup>ABa</sup>
HCM (pg)	2°C a 8°C	22,90 <sup>Aa</sup>	22,88 <sup>Ab</sup>	22,95 <sup>Ab</sup>	23,16 <sup>Ab</sup>
	Ambiente	22,90 <sup>Ca</sup>	23,90 <sup>Ba</sup>	24,95 <sup>Aa</sup>	24,91 <sup>Aa</sup>
CHCM (%)	2°C a 8°C	34,33 <sup>Aa</sup>	34,49 <sup>Ab</sup>	33,99 <sup>Ab</sup>	33,94 <sup>Aa</sup>
	Ambiente	34,33 <sup>Ba</sup>	36,26 <sup>Aa</sup>	35,88 <sup>Aa</sup>	33,94 <sup>Ba</sup>

Nota: Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ( $p>0,05$ ), pelo teste de Tukey. Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna e parâmetro, não diferem entre si ( $p>0,05$ ), pelo teste F.



**Figura 1** - Médias de volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) e hemoglobina corpuscular média (HCM), de sangue total canino, de acordo com a temperatura de conservação medidas nos tempos 0h, 12h, 24h e 48h, em amostras com diferentes concentrações de EDTA. VCM=volume corpuscular médio em Fentolitros, HCM=hemoglobina corpuscular média em Picogramas e CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média em %.

Na temperatura 2°C a 8°C, o VCM apresentou diminuição ( $p < 0,05$ ) no tempo 12h. Esta redução pode ser explicada pela crenação osmótica dos eritrócitos. Na temperatura ambiente, o VCM permaneceu sem alterações significativas durante as 12 primeiras horas, mas aumentou significativamente após a 24ª hora. Esse acréscimo possivelmente foi determinado pela tumefação celular, que ocorre em amostras mantidas sem refrigeração por longos períodos. Na comparação entre as duas temperaturas, os resultados do VCM permaneceram sem diferença estatística nos tempos 0 e 12h, mas apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) nos tempos 24 e 48h, com valores maiores na temperatura ambiente. Este aumento no VCM, com o passar do tempo, foi ocasionado também pela tumefação celular, corroborando os dados obtidos, em cães, por MEDAILLE et al. (2006) e em humanos por LAWRENCE et al. (1975), COHLE et al. (1981), MORAG (2003), LIPPI et al. (2005), WEISER (2007), ALMEIDA (2008) e FREISE et al. (2008). Por sua vez, ROCHA et al. (2001) não detectaram diferença no VCM, durante estudo realizado com sangue humano no contador automático de células Sismex NE 800, onde foram avaliadas várias características em 0h, 2h, 6h, 8h, 10h, 12h e 24h, após a coleta do sangue com EDTA. No entanto, apesar das diferenças, as alterações observadas nos índices do VCM, no presente estudo, mantiveram-se na faixa de referência (SCHALM et al., 1986).

A HCM sofreu influência da temperatura e do tempo de armazenamento das amostras sanguíneas com interação entre os dois ( $p < 0,05$ ), não sendo afetada pela concentração de EDTA. À temperatura ambiente, verificou-se aumento ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de análise como mostrado na Tabela 3 e na Figura 1. Como o índice da HCM é calculado pela fórmula hemoglobina/número de eritrócitos  $\times 10$ , o acréscimo verificado no valor da HCM possivelmente foi determinado pela diminuição do número de eritrócitos (Tabela 1), pois como expresso na Tabela 4, a concentração da hemoglobina permaneceu estável. COHLE et al. (1981) e FREISE et al. (2008) não evidenciaram alteração, mesmo 48 horas após a coleta, em amostras de sangue humano.

A CHCM foi afetada pela concentração de EDTA isoladamente e pelo tempo e temperatura de armazenamento das amostras, com interação entre os dois. Houve aumento ( $p < 0,05$ ) da CHCM na concentração 7,2mg de EDTA (Tabela 2). O aumento da concentração de EDTA por ml de sangue traduziu no acréscimo da osmolaridade da solução anticoagulante ocasionando a crenação dos eritrócitos e, conseqüentemente, originando decréscimo nos valores do hematócrito, que por sua vez gerou aumento da CHCM. Era de se esperar que a concentração 14,4 mg de EDTA ocasionasse um aumento mais acentuado no índice da CHCM, entretanto, o que não ocorreu. Nessa concentração de EDTA, apesar de não significativo, houve discreto aumento no valor do hematócrito (Tabela 4). Como a CHCM é a razão da hemoglobina pelo hematócrito, multiplicado por 100, esse acréscimo ocasionou a diminuição no índice da CHCM.

**Tabela 4** – Médias\* e desvios padrão de hematócrito, hemoglobina e do RDW de amostras coletados em diferentes concentrações de EDTA, armazenadas em duas temperaturas e analisadas em quatro intervalos de tempo.

	Tempo em horas	Concentração de EDTA por mL de sangue								
		1,8		3,6		7,2		14,4		
		Temperatura		Temperatura		Temperatura		Temperatura		
		2 a 8°C	Ambiente	2 a 8°C	Ambiente	2 a 8°C	ambiente	2 a 8°C	Ambiente	
Hemoglobina (g/dL)	0	15,34 ± 2,93	15,34 ± 2,93	15,32 ± 2,89	15,32 ± 2,89	15,26 ± 2,52	15,26 ± 2,52	15,96 ± 2,70	15,96 ± 2,70	
		15,35 ± 2,90	15,51 ± 3,03	15,45 ± 2,79	15,45 ± 2,81	15,37 ± 2,74	15,41 ± 2,83	15,74 ± 2,53	15,84 ± 2,99	
	24	15,29 ± 3,14	15,34 ± 2,83	15,39 ± 2,82	15,30 ± 2,58	15,29 ± 2,73	15,35 ± 2,80	15,67 ± 2,45	15,66 ± 2,74	
		15,65 ± 2,78	15,43 ± 2,89	15,50 ± 2,67	15,42 ± 2,74	15,49 ± 2,57	15,59 ± 2,64	15,86 ± 2,83	16,04 ± 2,45	
	Hematócrito (%)	0	44,42 ± 9,36	44,42 ± 9,36	44,60 ± 9,16	44,60 ± 9,16	44,22 ± 8,00	44,22 ± 8,00	47,65 ± 9,35	47,65 ± 9,35
			45,80 ± 9,68	44,21 ± 9,98	44,52 ± 8,85	42,65 ± 9,44	44,57 ± 8,76	42,42 ± 10,35	46,13 ± 9,95	43,61 ± 9,52
		24	44,98 ± 8,65	43,80 ± 8,74	45,40 ± 7,83	42,74 ± 6,98	45,27 ± 9,26	41,53 ± 7,75	46,18 ± 9,36	43,85 ± 7,65
			45,79 ± 8,87	48,75 ± 6,61	46,43 ± 9,73	44,83 ± 6,57	45,23 ± 8,06	44,74 ± 9,21	47,21 ± 8,14	46,94 ± 10,93
RDW		0	15,92 ± 0,65	15,92 ± 0,65	21,04 ± 16,51	21,04 ± 16,51	15,73 ± 0,66	15,73 ± 0,66	15,90 ± 0,61	15,90 ± 0,61
			16,07 ± 0,60	15,95 ± 0,62	15,93 ± 0,55	15,82 ± 0,72	15,75 ± 0,56	16,30 ± 0,71	15,71 ± 0,74	16,68 ± 0,90
		24	15,96 ± 0,72	15,59 ± 0,41	15,88 ± 0,59	15,83 ± 0,36	15,80 ± 0,49	16,22 ± 0,69	15,81 ± 0,60	16,75 ± 0,92
			15,66 ± 0,90	15,99 ± 0,62	15,97 ± 0,56	15,80 ± 0,59	15,70 ± 0,61	15,64 ± 0,56	15,76 ± 0,52	16,37 ± 1,00

\* p<0,05

NEMEC et al. (2005), em experimento similar, também evidenciou um aumento da MCHC em amostras com três vezes a quantidade recomendada de EDTA (5,4 mg/mL) na solução preservadora.

Diferença foi também detectada na CHCM nos valores da CHCM no tempo 12 horas e 24 horas na temperatura ambiente (Tabela 3). Nos referidos tempos houve aumento na CHCM, decorrente da diminuição do número de eritrócitos nas amostras conservadas em temperatura ambiente em temperatura ambiente (Tabela 1). A CHCM apresentou também diferença entre as duas temperaturas nos mesmos tempos, com maior valor na temperatura ambiente (Tabela 3 e Figura 1), evento este determinado pelo maior grau de hemólise. ROCHA et al. (2001), em estudo com sangue humano, não verificaram diferença ( $p > 0,05$ ) em sangue analisado durante 24 horas, em temperatura ambiente. Como no presente estudo, COHLE et al. (1981), avaliando sangue humano, não observaram aumento significativo da CHCM em amostras conservadas sob refrigeração, por 48 horas. Na temperatura ambiente, os mesmos autores não observaram aumento da CHCM, durante 24 horas, e observaram diminuição ( $p < 0,05$ ) da CHCM no intervalo de 48 horas.

Os valores de hemoglobina, hematócrito e o índice de anisocitose eritrocitária (RDWc) não apresentaram alterações alterações entre grupos e nos grupos ao longo do tempo (Tabela 4), corroborando os dados obtidos por HIRASE et al. (1992), FREISE et al. (2008) e IMERI et al. (2008). Por sua vez, COHLE et al. (1981), em contador automático de células, também detectou estabilidade da hemoglobina, durante 48 horas, em amostras de sangue humano, conservadas sob refrigeração e temperatura ambiente. Entretanto registraram aumento no hematócrito, a partir da 48<sup>a</sup> hora, em amostras conservadas em temperatura ambiente. Ausência de alteração na concentração de hemoglobina com alta concentração de EDTA (5,4 mg/mL) também foi constatada por NEMEC et al. (2005). Porém, os referidos autores registraram decréscimo no hematócrito, com aumento da concentração de EDTA, o que não foi observado no presente estudo.

#### 5.1.2. Contagem Global de Leucócitos

A concentração de EDTA e o tempo de armazenagem não influenciaram os resultados da contagem de leucócitos, nem houve interação entre eles ou deles com a temperatura de conservação. Observou-se que a contagem de leucócitos foi influenciada pela temperatura de conservação, sendo a média menor nas amostras conservadas sob temperatura ambiente

(Tabela 5). Este achado deve-se ao fato de que em temperaturas mais baixas, a lise de leucócitos é menor. Estudando a influência do tempo e da temperatura de armazenagem na conservação sanguínea em três equipamentos distintos, IMERI et al. (2008) detectaram diminuição no número de leucócitos na temperatura ambiente, no tempo 48 horas, em um dos três equipamentos utilizados, enquanto que nos resultados obtidos nos outros dois equipamentos, não foi observada diferença. COHLE et al. (1981); HIRASE et al. (1992) e FREISE et al. (2008), não observaram alteração nos valores dos leucócitos em amostras de sangue humano, armazenadas sob refrigeração ou temperatura ambiente, por 48 horas.

**Tabela 5** - Médias de leucócitos de sangue total canino, de acordo com a temperatura de conservação, em amostras com diferentes concentrações de EDTA.

Parâmetro	Temperatura	
	2°C a 8°C	Temp. ambiente
Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$12,97 \pm 5,33^A$	$11,90 \pm 3,59^B$

Nota: Médias e desvios seguidos por letras iguais e na mesma linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) pelo teste F.

### 5.1.3. Plaquetas

O número de plaquetas e o plaquetócrito (PCT) não apresentaram alteração (Tabela 6). Corroborando com os estudos feitos por HIRASE et al. (1992) e FREISE et al. (2008). Já IMERI et al. (2008) observando o número de plaquetas de sangue humano, conservado em temperatura ambiente e sob refrigeração em diferentes equipamentos, observaram variações desta estabilidade entre os equipamentos. Esses resultados demonstraram que amostras conservadas sob as mesmas condições de tempo e temperatura podem apresentar alterações importantes, dependendo do aparelho utilizado.

**Tabela 6** – Médias\* e desvios padrão das características hematológicas de amostras coletadas em diferentes concentrações de EDTA, armazenadas em duas temperaturas (2°C a 8°C e ambiente) e analisadas em quatro tempos (0, 12, 24 e 48h) após a coleta.

	Tempo em horas	Concentração de EDTA por mL de sangue							
		1,8		3,6		7,2		14,4	
		Temperatura		Temperatura		Temperatura		Temperatura	
		2 a 8°C	Ambiente	2 a 8°C	Ambiente	2 a 8°C	ambiente	2 a 8°C	Ambiente
PLT (mil/ $\mu$ L)	0	295,10 $\pm$ 167,77	295,10 $\pm$ 167,77	298,60 $\pm$ 156,34	298,60 $\pm$ 156,34	278,30 $\pm$ 161,66	278,30 $\pm$ 161,66	234,00 $\pm$ 121,87	234,00 $\pm$ 121,87
	12	278,00 $\pm$ 189,05	296,00 $\pm$ 160,95	262,00 $\pm$ 196,09	280,50 $\pm$ 175,94	263,70 $\pm$ 180,76	289,10 $\pm$ 152,94	222,90 $\pm$ 149,84	241,60 $\pm$ 134,82
	24	254,50 $\pm$ 183,28	265,60 $\pm$ 148,34	247,90 $\pm$ 162,18	259,90 $\pm$ 154,78	246,20 $\pm$ 159,82	269,40 $\pm$ 153,52	214,50 $\pm$ 145,04	259,60 $\pm$ 163,99
	48	239,80 $\pm$ 161,74	263,50 $\pm$ 147,38	231,20 $\pm$ 167,53	242,80 $\pm$ 151,95	202,50 $\pm$ 128,23	240,20 $\pm$ 121,16	203,50 $\pm$ 143,63	235,00 $\pm$ 113,21
PCT (%)	0	0,26 $\pm$ 0,14	0,26 $\pm$ 0,14	0,26 $\pm$ 0,13	0,26 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,14	0,25 $\pm$ 0,14	0,20 $\pm$ 0,10	0,20 $\pm$ 0,10
	12	0,26 $\pm$ 0,17	0,27 $\pm$ 0,15	0,23 $\pm$ 0,18	0,25 $\pm$ 0,16	0,24 $\pm$ 0,16	0,27 $\pm$ 0,13	0,20 $\pm$ 0,14	0,22 $\pm$ 0,12
	24	0,24 $\pm$ 0,17	0,26 $\pm$ 0,14	0,23 $\pm$ 0,15	0,26 $\pm$ 0,16	0,23 $\pm$ 0,15	0,26 $\pm$ 0,15	0,21 $\pm$ 0,14	0,25 $\pm$ 0,15
	48	0,24 $\pm$ 0,16	0,26 $\pm$ 0,14	0,22 $\pm$ 0,16	0,24 $\pm$ 0,15	0,20 $\pm$ 0,12	0,23 $\pm$ 0,12	0,20 $\pm$ 0,15	0,23 $\pm$ 0,11

\*P>0,05. PLT=plaquetas; PCT=plaquetócrito.

O volume plaquetário médio (VPM) e o PDWC apresentaram aumento ( $p<0,05$ ) com relação ao tempo (tabela 7), mas não foram influenciados pela concentração de EDTA e pela temperatura de armazenagem ( $p>0,05$ ). Não houve interação entre os fatores analisados (temperatura, tempo e EDTA). O aumento do VPM, possivelmente, ocorreu pelo mesmo motivo do aumento do VCM, explicado anteriormente. Resultados semelhantes foram obtidos por LIPPI et al. (2005) em estudo com ciclistas na Itália, utilizando o contador hematológico.

Em experimento com sangue humano, conduzido por ROCHA et al. (2001), com o contador automático de células, não foi observada diferença ( $p>0,05$ ) no VPM, após 24 horas.

**Tabela 7** – Médias do volume plaquetário médio (VPM) e PDW de sangue total canino, de acordo com os tempos 0h, 12h, 24h e 48h de armazenagem.

Parâmetro	Tempo em horas			
	0	12	24	48
VPM (fl)	8,91 <sup>B</sup>	8,99 <sup>B</sup>	9,54 <sup>A</sup>	9,62 <sup>A</sup>
PDW	38,69 <sup>C</sup>	38,96 <sup>BC</sup>	39,79 <sup>AB</sup>	39,95 <sup>A</sup>

Médias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem si ( $P>0,05$ ) pelo teste de Tukey. fl=fentolitro

## **5.2. Efeitos do EDTA, do tempo e da temperatura de armazenamento sobre contagem global de leucócitos, hematócrito e hemoglobina com técnica manual e automatizada; contagem diferencial de leucócitos por microscopia e mensuração da proteína plasmática por refratometria**

O sangue conservado em temperatura ambiente apresentou uma tonalidade mais escura de vermelho, nos tempos 24 horas e 48 horas, sendo este fato mais evidente no último tempo. Na leitura do hematócrito, foi observada coloração avermelhada no plasma em quase todos os capilares dos tubos com concentração de EDTA em 14,4mg/mL de sangue, sinalizando que houve hemólise nessas amostras. Esse achado foi observado em todos os tempos de análise e nas duas temperaturas de armazenamento. No tempo 48 horas, a microscopia evidenciou degeneração intensa nos leucócitos, não permitindo uma diferenciação segura, razão pela qual a contagem diferencial não foi realizada nesse tempo.

### 5.2.1. Leucócitos, hematócrito e hemoglobina, na técnica manual e automática

Das três características hematológicas obtidas por meio das duas técnicas, os leucócitos apresentaram alterações significativas na contagem automática, o hematócrito, na técnica do micro-hematócrito e a hemoglobina permaneceram estáveis, independentemente do método de contagem.

#### 5.2.1.1. Leucócitos

A contagem de leucócitos no contador automático de células foi influenciada pela temperatura de armazenagem, não havendo influência da concentração de EDTA, do tempo de armazenagem e nem interação entre tempo, temperatura e EDTA. A média da contagem global nas amostras conservadas em temperatura ambiente foi menor ( $P < 0,05$ ) como descrito na Tabela 8. Esta diminuição se deveu provavelmente às lises ocorridas com maior intensidade nas amostras conservadas em temperatura ambiente. Após 48 horas de armazenamento, IMERI et al. (2008), trabalhando com três equipamentos diferentes, também observaram uma diminuição na contagem de leucócitos de sangue humano em temperatura ambiente, quando comparado com amostras conservadas sob refrigeração e analisadas em um dos contadores automático de células, não observando diferença ( $p < 0,05$ ) nas amostras avaliadas nos outros dois contadores. Em condições semelhantes, COHLE et al. (1981),

HIRASE et al. (1992) e FREISE et al. (2008) não evidenciaram diferença entre o número de leucócitos de amostras estocadas sob refrigeração ou temperatura ambiente, por 48 horas.

**Tabela 8** - Médias de leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ ) de sangue total canino, armazenado em diferentes temperaturas, determinadas pelo método automático e manual.

Métodos	Temperatura	
	2°C a 8°C	Temp. ambiente
Automático	12,97 ± 5,33 <sup>A</sup>	11,90 ± 3,59 <sup>B</sup>
Manual	11,28 ± 3,27 <sup>A</sup>	10,97 ± 3,28 <sup>A</sup>

Nota: Médias e desvios seguidos por letras iguais e na mesma linha não diferem entre si ( $p>0,05$ ) pelo teste F.

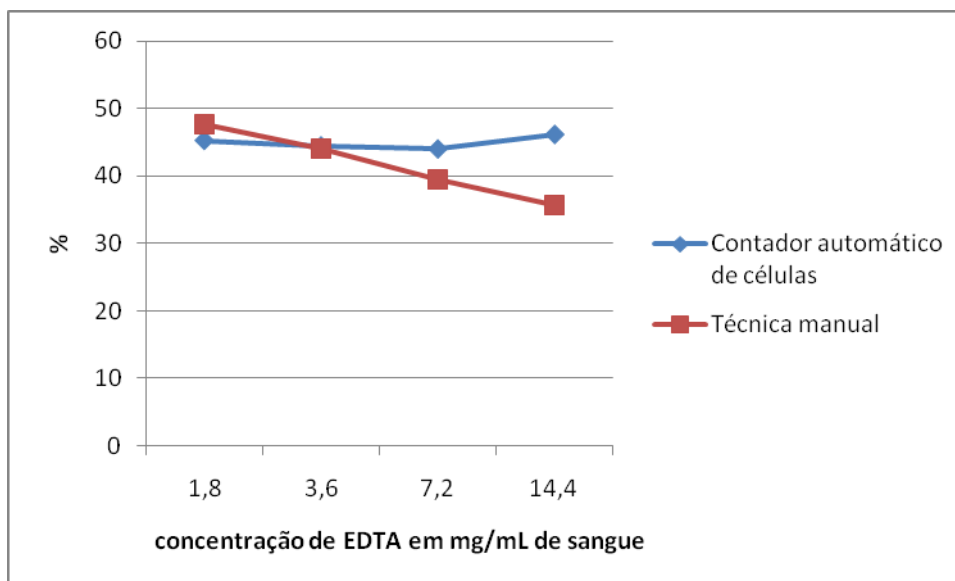
#### 5.2.1.2. Hematócrito

Utilizando-se a técnica do micro-hematócrito, observou-se uma diminuição progressiva do hematócrito com o aumento da concentração de EDTA ( $p<0,05$ ), enquanto no contador automático de células, não foi detectada alteração ( $p<0,05$ ), Tabela 9 e Figura 2.

**Tabela 9** – Médias do hematócrito em sangue total canino de acordo com a concentração de EDTA, determinados pelo método automático e manual.

	Concentração de EDTA em mg/mL de sangue			
	1,8	3,6	7,2	14,4
Automático	45,27 <sup>A</sup>	44,47 <sup>A</sup>	44,02 <sup>A</sup>	46,15 <sup>A</sup>
Manual	47,74 <sup>A</sup>	44,09 <sup>B</sup>	39,52 <sup>C</sup>	35,64 <sup>D</sup>

Médias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem entre si ( $p>0,05$ ) pelo teste de Tukey.



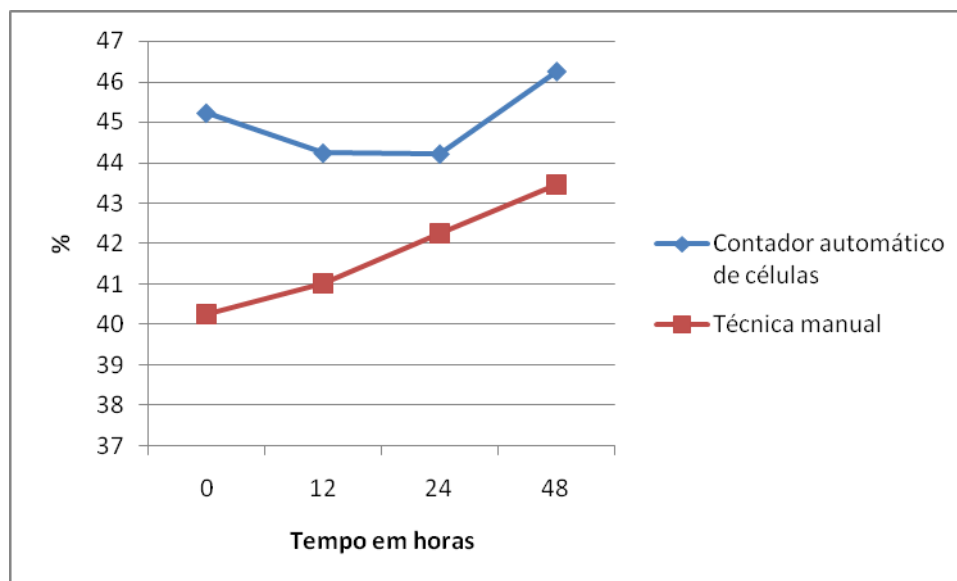
**Figura 2-** Médias do HCT (%), em sangue total canino de acordo com a concentração de EDTA determinado pelos métodos automático e manual.

Esta diminuição foi determinada principalmente pela crenação das hemácias, pois, com o uso da técnica do micro-hematócrito, os eritrócitos são submetidos à grande força centrífuga, para promover o empilhamento das hemácias, o que não ocorre quando se utilizou a técnica de automação. Associado a isso, o aumento da fragilidade osmótica e o efeito diluidor promovido pelo EDTA podem também ter contribuído para a diminuição do valor do hematócrito. O tempo também provocou alterações com o uso da técnica do micro-hematócrito ( $p < 0,05$ ), não afetando o obtido por automação ( $p > 0,05$ ), Tabela 10 e Figura 3.

**Tabela 10** – Médias dos resultados do hematócrito (%), em sangue total canino, de acordo com o tempo, determinadas pelo método automático e manual.

Métodos	Tempo em horas			
	0	12	24	48
Automático	45,22 <sup>A</sup>	44,24 <sup>A</sup>	44,22 <sup>A</sup>	46,24 <sup>A</sup>
Manual	40,26 <sup>B</sup>	41,02 <sup>AB</sup>	42,25 <sup>AB</sup>	43,45 <sup>A</sup>

Nota: médias seguidas por letras iguais e na mesma linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) pelo teste F.



**Figura 3-** Médias dos resultados do hematócrito (%), obtidos em sangue total canino, de acordo com os tempos de armazenagem no contador automático e na técnica manual.

Não houve interação entre o tempo, a temperatura e a concentração de EDTA ( $p < 0,05$ ). O hematócrito aumentou 7,9% entre os tempos 0 hora e 48 horas (Tabela 10 e Figura 3). A tumefação dos eritrócitos, ocorrida ao longo do tempo, explica esse aumento. A diminuição do hematócrito relacionada com o EDTA é relatada por vários autores (DOYLE, 1967; PENNY et al., 1970; NEMEC et al., 2005; WEISER, 2007; MORRIS, 2008). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os observados por WEISER (2007), no qual se verificou que os efeitos do excesso de EDTA sobre as hemácias levam a alterações mais importantes nos resultados obtidos na técnica do micro-hematócrito.

Pelo resultado do presente estudo, é desaconselhável a prática, comum em laboratórios de análises clínicas, de calibrar o contador automático de células com o resultado do hematócrito, obtido pela técnica manual (micro-hematócrito). Este procedimento deve ser evitado, principalmente, quando a amostra sanguínea estiver com excesso de EDTA e, ou, não tiver sido coletada recentemente.

### 5.2.1.3. Hemoglobina

A hemoglobina, como esperado, não apresentou alterações em nenhum dos métodos de contagem (Tabela 11). Nos estudos conduzidos em humanos, por COHLE et al. (1981), FREISE et al. (2008) e IMERI et al. (2008), a hemoglobina se mostrou estável para dosagem por 48 horas em amostras estocadas sob refrigeração ou temperatura ambiente. Nas mesmas

condições, a hemoglobina se mostrou estável por uma semana ou por 168 horas, no estudo conduzido por HIRASE et al. (1992). NEMEC et al. (2005) também comprovaram a estabilidade da hemoglobina com o aumento da concentração de EDTA, em estudo realizado com cães.

**Tabela 11** – Médias\* e desvios padrão (g/dL) da hemoglobina de cães em amostras coletadas com diferentes concentrações de EDTA, armazenadas em duas temperaturas e analisadas em quatro tempos diferentes, determinados pelo contador automático e pelo espectrofotômetro.

Métodos	T. em horas	Concentração de EDTA por mL de sangue							
		1,8		3,6		7,2		14,4	
		<u>Temperatura</u>		<u>Temperatura</u>		<u>Temperatura</u>		<u>Temperatura</u>	
	2 a 8°C	Ambiente	2 a 8°C	Ambiente	2 a 8°C	ambiente	2 a 8°C	ambiente	
Hemoglobina (g/dL) Contador automático	0	15,34 ± 2,93	15,34 ± 2,93	15,32 ± 2,89	15,32 ± 2,89	15,26 ± 2,52	15,26 ± 2,52	15,96 ± 2,70	15,96 ± 2,70
	12	15,51 ± 3,03	15,35 ± 2,90	15,45 ± 2,81	15,45 ± 2,79	15,41 ± 2,83	15,37 ± 2,74	15,84 ± 2,98	15,74 ± 2,53
	24	15,34 ± 2,83	15,29 ± 3,14	15,30 ± 2,58	15,39 ± 2,82	15,35 ± 2,80	15,29 ± 2,73	15,66 ± 2,74	15,67 ± 2,45
	48	15,43 ± 2,89	15,65 ± 2,78	15,42 ± 2,74	15,50 ± 2,67	15,59 ± 2,64	15,49 ± 2,57	15,04 ± 2,45	16,86 ± 2,83
Hemoglobina (g/dL) espectrofotômetro	0	15,10 ± 2,96	15,10 ± 2,96	15,15 ± 2,88	15,15 ± 2,88	14,92 ± 2,77	14,92 ± 2,77	15,17 ± 3,13	15,17 ± 3,13
	12	15,12 ± 2,64	14,97 ± 2,75	14,97 ± 2,64	14,99 ± 2,53	15,11 ± 2,59	14,97 ± 2,57	14,97 ± 2,64	15,09 ± 2,60
	24	14,99 ± 2,65	15,03 ± 2,75	15,04 ± 2,73	14,98 ± 2,60	14,85 ± 2,56	14,88 ± 2,62	14,77 ± 2,63	14,83 ± 2,64
	48	15,44 ± 3,08	15,39 ± 2,81	15,14 ± 2,77	15,14 ± 2,76	15,27 ± 2,53	15,13 ± 2,61	15,32 ± 2,76	15,03 ± 2,63

\*p>0,05.

### 5.2.2. Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos também sofreu alterações. Houve diferença na contagem dos neutrófilos segmentados, monócitos e neutrófilos bastonetes ( $p < 0,05$ ), enquanto o número de linfócitos, eosinófilos e basófilos não apresentaram alterações ( $p > 0,05$ ).

Na concentração de EDTA, 14,4mg/mL de sangue, o número de monócitos diminuiu ( $p < 0,05$ ), Tabela 12.

**Tabela 12** - Médias de monócitos no hemograma canino, de acordo com a concentração de EDTA em mg/mL na amostra sanguínea.

Parâmetro	EDTA			
	1,8	3,6	7,2	14,4
Monócitos (%)	5,08 <sup>A</sup>	4,62 <sup>B</sup>	4,38 <sup>AB</sup>	3,52 <sup>B</sup>

Médias seguidas por letras iguais e na mesma linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ), pelo teste de Tukey..

A contagem de monócitos também sofreu alteração com relação ao tempo, pois se observou o aumento ( $p < 0,05$ ) no tempo 12 (Tabela 13).

**Tabela 13** - Médias de neutrófilos segmentados, monócitos e neutrófilos bastonetes de hemograma canino, de acordo com o tempo de armazenagem da amostra sanguínea.

Parâmetros	Tempo em horas		
	0	12	24
Neut. segmentado (%)	63,92 <sup>A</sup>	60,91 <sup>B</sup>	61,59 <sup>AB</sup>
Monócito (%)	3,82 <sup>B</sup>	4,99 <sup>A</sup>	4,40 <sup>AB</sup>
Neut. bastonete (%)	1,52 <sup>B</sup>	2,76 <sup>A</sup>	2,64 <sup>A</sup>

Médias seguidas por letras iguais e na mesma linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ), pelo teste de Tukey, para neutrófilo segmentado e de kruskall-Wallis para monócito e neutrófilo bastonete.

Utilizando a concentração de EDTA 5,4mg/mL de sangue, NEMEC et al. (2005) não obtiveram diferença na contagem diferencial. No presente estudo as contagens de neutrófilo segmentado e neutrófilo bastonete também foram influenciadas pelo tempo, uma vez que houve aumento do número de bastonetes nos tempos 12 horas e 24 horas e diminuição do número de neutrófilos no tempo 12 horas (Tabela 13). A temperatura de conservação influenciou, de forma isolada, a contagem de neutrófilos bastonetes (Tabela 14): houve maior número na temperatura de 2°C a 8°C ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 14** - Médias de neutrófilos bastonetes no hemograma canino, de acordo com a temperatura de armazenagem da amostra sanguínea.

Parâmetro	Temperatura	
	2°C a 8°C	Temp. ambiente
Neut. bastonete (%)	3,07 <sup>A</sup>	1,60 <sup>B</sup>

Nota: Médias seguidas por letras iguais e na mesma linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ), pelo teste F.

Em nenhum dos casos acima houve interação entre tempo, temperatura e concentração de EDTA. Todas as alterações observadas na contagem diferencial de leucócitos foram decorrentes da dificuldade de se identificar as células alteradas pelo contato prolongado com o EDTA. Em temperatura de refrigeração ou ambiente, a qualidade visual da célula, exposta a mais de 12 horas a este contato, é bastante prejudicada. Como no presente estudo, ROCHA et al. (2001) observaram número maior de bastonetes em esfregaços confeccionados horas após a coleta. O número de bastonetes no tempo 24 horas foi até 19% maior que a porcentagem observada nas primeiras seis horas. Os referidos autores relataram dificuldade na identificação microscópica de células edemaciadas ou alteradas pelo EDTA, corroborando a recomendação para que se faça e se core o esfregaço sanguíneo no momento da coleta, preservando, assim, a morfologia das células. Na presente pesquisa, as alterações nas contagens de neutrófilos segmentados e monócitos foram discretas e não interferiram em uma eventual interpretação dos resultados. Já as alterações no número de bastonetes foram mais expressivas e em alguns resultados poderiam levar a uma interpretação equivocada.

### 5.2.3. Proteína plasmática

A concentração de EDTA e o tempo de armazenagem influenciaram a dosagem da proteína plasmática, não havendo interação entre os três fatores analisados (EDTA, tempo e temperatura)

Houve um aumento ( $p < 0,05$ ) da proteína plasmática na maior concentração de EDTA (Tabela 15).

**Tabela 15** – Médias da Proteína (g/dL) determinada no plasma de sangue canino, de acordo com a concentração de EDTA na amostra de sangue.

	EDTA em mg/ml de sangue			
Parâmetro	1,8	3,6	7,2	14,4
Proteína (g/dL)	7,73 <sup>B</sup>	7,55 <sup>B</sup>	7,54 <sup>B</sup>	8,36 <sup>A</sup>

**Nota:** médias seguidas por letras iguais e na mesma linha não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Este aumento foi determinado pela hemólise observada visualmente no plasma. A proteína também aumentou com o passar do tempo (Tabela 16).

**Tabela 16** – Médias da proteína (g/dL) determinadas no plasma de sangue canino, de acordo com o tempo de armazenagem da amostra sanguínea.

	Tempo em horas			
Parâmetro	0	12	24	48
Proteína (g/dL)	7,43 <sup>C</sup>	7,76 <sup>B</sup>	7,81 <sup>B</sup>	8,18 <sup>A</sup>

**Nota:** médias seguidas por letras iguais e na mesma linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Esse acréscimo provavelmente foi devido às trocas entre as células e o meio e também à lise, que ocorrem com o decorrer do tempo. Por esses motivos, a proporção correta EDTA/sangue (1,8mg/mL) e a mensuração antes de 12 horas, são essenciais para um resultado preciso e confiável da proteína plasmática. O efeito da hemólise, ou seja, o aumento da proteína foi citado por ALLEMAN (1990) e LASSEN (2007).

## 6. CONCLUSÕES

- Amostras sanguíneas coletadas com EDTA, para análise em contador automático de células sanguíneas podem ser usadas na realização de hemograma por até 48 horas se mantidas em temperatura ambiente ou sob refrigeração, onde claramente há maior preservação das características hematológicas.
- A contagem global de leucócitos, realizada em câmara de Neubauer, e a dosagem de hemoglobina, em espectrofotômetro ou em contador automático de células, podem ser realizadas com amostras conservadas em geladeira ou em temperatura ambiente, por até 48 horas.
- A concentração de EDTA não interferiu no resultado do hemograma, realizado no contador automático de células, nem na contagem global de leucócitos, realizada em câmara de Neubauer ou na dosagem de hemoglobina, no espectrofotômetro.
- O resultado do hematócrito obtido pela técnica do micro-hematócrito diminuiu significativamente, com o aumento da concentração de EDTA acima de 3,6 mg/mL de sangue, não sendo adequado o uso de EDTA acima desta concentração.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEMAN, A. R. The effects of hemolysis and lipemia on serum biochemical constituents, **Veterinary Medicine**, v.85, p.1272-1284, 1990.
- ALMEIDA, T. V. Hematologia; colheita de material. In: MOURA, R. A. **Técnicas de laboratório**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.335-342.
- COHLE, E. D. et al. Effects of storage of blood on stability of hematologic parameters. **American Society of Clinical Pathologists**, Chicago, v. 76, n.1, p.67-70, 1981.
- DOYLE, C. T. et al. The Effect of Blood Volume and Choice of Anticoagulant on the PCV, MCHC and Total White Cell Count. **Irish Journal of Medical Science**, Dublin, v.42, n.9, p.429-435, 1967.
- Disponível em <http://www.springerlink.com/content/c3m1230l68v19127/>>. Acesso: 27 jun. 2009. doi: 10.1007/BF02954088.
- DUSSE, L. M. S. et al. Pseudotrombocitopenia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.40, n.5, p.321-324, 2004.
- FAILACE, R. Hemograma. In:\_\_\_\_\_. **Hemograma, manual de interpretação**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003, Cap. 1, p.15-37.
- FERREIRA NETO, J. M. Hematologia clínica. In:\_\_\_\_\_. **Patologia clínica veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo e Brasil, 1978. Cap.3, p.78-130.
- FREISE, K. J. et al. The effect of anticoagulant, storage temperature and dilution on cord blood hematology parameters over time. **International Journal of Laboratory Hematology**, v.n.p., 2008. Disponível em: <>. Acesso em: 2008. doi: 10.1111/j. 1751-553X.2008.01066.x 2008.
- GARCIA-NAVARRO, C. E. K. Hemograma. In:\_\_\_\_\_. **Manual de Hematologia Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Varela, 1995, Cap. 5, p. 79-100.

HIRASE, Y. Stable blood cell after one-week storage at room temperature. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.49, n.4 p.504-508. 1992. doi: 10.1007/BF00196290

IMERI, F. et al. Stability of hematological analyses depends on the hematology analyzer used: A stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. **Clinica Chimica Acta**, v.397, n.1-2 p.68-71. 2008. doi: 10.1016/j.cca. 2008.07.018

KERR, M. G. Hematologia: glóbulos vermelhos. In:\_\_\_\_\_. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. 2ed. São Paulo: Roca, 2003, Cap.1, p.03-43.

LASSEN, E. D. Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sanguíneo. In: THRALL, M. A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap.26, p.376-387.

LAWRENCE. A. C. K. et al. Storage of blood and mean corpuscular volume. **Journal of Clinical Pathology**, v.28, n.5 p.345-349, 1975. Disponível em: <<http://jcp.bmj.com/content/vol28/issue5/>>. Acesso em: 26 jun. 2009. doi: 10.1136/jcp.28.5.345.

LIPPI, G. et al. Stability of blood cell counts, hematologic parameters and reticulocytes indexes on the Advia A 120 hematologic analyzer. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.146, n.6, p.333-340, 2005.

LORENZI, T. F. Hematopoiese. In:\_\_\_\_\_. **Atlas de hematologia: clínica hematológica ilustrada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap.1, p. 03-66.

MEDAILLE, C. et al. Stability of selected hematology variables in canine blood kept at room temperature in EDTA for 24 and 48 hours. **Veterinary Clinical Pathology**, v.35, n.1, p.18-23, 2006.

MORRIS, M. W. Exame básico do sangue. In: HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20. ed. Barueri: Manole, 2008. Cap.24, p. 559-604.

NEMEC, A. et al. The effect of high anticoagulant k3-edta concentration on complete blood count and white blood cell differential counts in healthy beagle dogs. **Slovenian Veterinary Research**, v.42, n.3/4, p.65-70, 2005.

PARDINI, H. Manual de exames. Belo Horizonte, 2004/2005, p. 124-125.

PENNY, R. H. C. et al. Some Observations on the Effect of the Concentration of Ethylenediamine Tetra acetic Acid (EDTA) on the Pached Cell Volume of Domesticated Animals. **British Veterinary Journal**, v.126, n.7, p.383-389, 1970.

RAPAPORT, S. I. Diagnóstico de anemia. In: \_\_\_\_\_. **Hematologia, introdução**. São Paulo: Roca, 1990. Cap.2, p.8-29.

ROCHA, H. H. G. et al. **Estudo da interferência do anticoagulante nos índices do hemograma, relacionados ao tempo pós coleta**. Rio de Janeiro: Setor de hematologia do Laboratório Diagnóstico das Américas, 2001. Acessado em 22 mar. 2009. Online. Disponível em: <<http://www.heloisa.med.br/EDTAEleuza.htm>>

SCHALM, O. W. et al. Hematologic techniques. In: \_\_\_\_\_. **Schalm`s Veterinary Hematology**. 4. ed. Lea & Febiger, 1986. Cap.2, p.20-86.

SCHALM, O. W. et al. The dog: Normal hematology with comments on response to disease. In: \_\_\_\_\_. **Schalm`s Veterinary Hematology**. 4. ed. Lea & Febiger, 1986. Cap.4, p.103-125.

WEISER, G. Coleta e processamento de amostras e análise das opções de serviços laboratoriais. In: THRALL, M. A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap.2, p.37-42.