

# Efeitos dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio na contagem de plaquetas e leucócitos de gatos domésticos, em diferentes intervalos de tempo

*Effects of the anticoagulants EDTA and sodium citrate on platelet and leukocyte count in domestic cats, in different time intervals*

**Eliane Miranda Thomaselli Fuck** - Médica Veterinária, Mestre em Ciência Animal pela Universidade Paranaense – UNIPAR, responsável pelo laboratório clínico do Hospital Veterinário SOS Animal Ltda. E-mail: elianefuck@sosanimal.com.br

**Adalson Gobbi** - Aluno do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Paranaense – UNIPAR, Bolsista do Programa PIBIC/UNIPAR. E-mail: adalson\_vet@hotmail.com

**Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt** - Médica Veterinária, Mestre, Doutora. Professora Assistente do Departamento de Clínica Veterinária da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu. E-mail: bethschmidt@fmvz.unesp.br

**Luiz Romulo Alberton** - Médico Veterinário, Mestre, Doutor. Professor Titular do Programa de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Paranaense – UNIPAR. Umuarama, PR, Brasil. E-mail: romulo@unipar.br (Co-Orientador)

**José Ricardo Pachaly** - Médico Veterinário, Mestre, Doutor. Professor Titular do Programa de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Paranaense – UNIPAR. Diretor Científico do Instituto Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária – ESPECIALVET. E-mail: pachaly@uol.com.br (Orientador)

Fuck EMT, Gobbi A, Schmidt EMS, Alberton LR, Pachaly JR. Medvop - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação; 2012; 10(33); 1-637.

## Resumo

Agregados plaquetários são artefatos comuns em hemogramas de gatos e além de afetar a acurácia da contagem de plaquetas, podem alterar a contagem de hemácias e leucócitos, com importantes consequências para os cuidados da saúde do animal. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio, e do tempo de execução da contagem celular em equipamento automatizado, sobre a quantificação de plaquetas e leucócitos em sangue de gatos. Amostras de sangue de 54 gatos foram colhidas e acondicionadas em tubos contendo EDTA e citrato de sódio a 3,2%, permanecendo em homogeneização até o momento da avaliação laboratorial. As contagens de plaquetas e leucócitos foram realizadas em contador por impedância (BC-2800 Vet-Mindray®) em três momentos: imediatamente após (TZ) e uma (T1) e duas (T2) horas após a colheita. Também foram avaliados os histogramas, e realizada a contagem manual de leucócitos de 32 amostras. A contagem de plaquetas foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) em sangue com EDTA e diminuiu significativamente uma e duas horas após a colheita. No entanto, com citrato de sódio a contagem de plaquetas se manteve estável ao longo do tempo. A contagem de leucócitos de amostras colhidas com EDTA apresentou aumento significativo gradativo ao longo do tempo, sendo observados, logo após a colheita, valores significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) quando comparados com os demais tempos. As amostras colhidas com citrato de sódio apresentaram contagens de leucócitos inferiores às obtidas com EDTA ( $p < 0,05$ ) e não sofreram alteração ao longo do tempo. O citrato de sódio pode ser recomendado como anticoagulante de escolha para colheita de sangue de gatos, oferecendo vantagens sobre o EDTA por diminuir a ocorrência de pseudotrombocitopenia e pseudoleucocitose, principalmente quando não há disponibilidade imediata para realização dos exames hematológicos.

**Palavras-chave:** antiagregantes, felinos, pseudoleucocitose, pseudotrombocitopenia, células brancas.

## Abstract

Platelet aggregates are common artifacts in blood smears of cats, and also can affect the accuracy of platelet count, and alter erythrocyte and leukocyte count, with important consequences for the health care of the animal. The objective of this study was to evaluate the effect of the anticoagulants EDTA and

sodium citrate, and the cell counting time in automated equipment, over quantification of platelets and leukocytes in blood of cats. Blood samples of 54 cats were collected and placed in tubes containing EDTA and 3.2% sodium citrate, remaining under homogenization until laboratory evaluation. The leukocyte and platelet counts were carried out by impedance counter (BC-2800 Vet-Mindray®) in three times: immediately after blood collection (TZ) and one (T1) and two (T2) hours after collection. Histograms were also evaluated and manual counting of leukocytes was performed in 32 samples. The platelet count was significantly lower in blood with EDTA and decreased significantly one and two hours after collection, but with sodium citrate the platelet counts remained stable over time. The leukocyte counts of samples collected with EDTA had a significant increase incrementally overtime, and soon after collection values were significantly lower than other times ( $p < 0.05$ ). Samples collected with citrate had scores lower than those obtained with EDTA ( $p < 0.05$ ) and did not showed changes over time. Sodium citrate may be recommended as the choice anticoagulant for blood collection in cats, offering advantages over EDTA by decreasing the occurrence of pseudothrombocytopenia and pseudoleukocytosis, especially when is not possible to perform laboratorial examination soon after blood collection.

**Keywords:** antiaggregants, feline, pseudoleukocytosis, pseudothrombocytopenia, white blood cells.

## Introdução e Revisão de Literatura

A realização do hemograma envolve três passos fundamentais: colheita e processamento da amostra, avaliação e interpretação dos resultados (1,2). A colheita do sangue para a realização do hemograma é feita por punção de uma veia periférica, de forma asséptica, transferindo-se a amostra para um tubo contendo anticoagulante. Em seguida deve ser homogeneizado com movimentos cuidadosos, e analisado o mais rapidamente possível, ou ser refrigerado, pois com o passar do tempo ocorrem alterações celulares. Imediatamente após a colheita deve ser confeccionado o esfregaço sanguíneo em lâmina de vidro, para posterior análise (3,1).

Os gatos são bastante suscetíveis ao estresse relacionado a procedimentos veterinários, tanto no exame físico quanto na colheita de material para análise laboratorial (4). O resultado do hemograma pode sofrer influências dos efeitos da adrenalina, que tendem a ser mais pronunciados no gato do que no cão. Particularmente no gato, estão associados ao medo e reação à contenção durante a colheita da amostra sanguínea (5,8).

Durante a imobilização para colheita de sangue pode ocorrer liberação de adrenalina em resposta à excitação, causando aumento no fluxo de sangue, desviando neutrófilos e linfócitos do pool marginal para o *pool* circulante (4), causando neutrofilia e leucocitose (3,7) num processo comumente denominado leucocitose fisiológica (8).

Essa alteração se deve, além do aumento do fluxo sanguíneo, a redução de adesão desses neutrófilos e linfócitos ao endotélio vascular (9), sendo que o valor de referência para contagem de leucócitos em gatos domésticos

varia de 5.500 a 19.500 células/ $\mu$ L(8).

Agregação de plaquetas é frequentemente observada em gatos, podendo ser causa de pseudotrombocitopenia, e também pode resultar na formação de grumos de tamanho similar ao dos leucócitos. Os contadores automáticos de células são incapazes de distinguir tais grumos, reconhecendo-os como leucócitos e fornecendo contagem falsamente elevada (pseudoleucocitose), promovendo a diagnósticos incorretos e tratamentos inapropriados (10,11).

Além disso, agregados de plaquetas em grandes grumos podem ser contados como uma célula grande pelos aparelhos que contam células por impedância, subestimando a contagem de plaquetas e elevando falsamente a contagem de outros tipos de células (12). A falsa diminuição na contagem de plaquetas também ocorre com os aparelhos que contam células por meio de raio laser, pois o agregado plaquetário apresenta dispersão de luz diferente, em comparação à plaqueta normal, e assim não é contado como plaqueta (13). A agregação de plaquetas também interfere na contagem manual, apesar de que quando esses grumos são observados no esfregaço sanguíneo, usualmente sugere-se que a amostra está associada a um número adequado de plaquetas (14).

Nos gatos, cada plaqueta observada no esfregaço sanguíneo corresponde a aproximadamente 20.000 plaquetas/ $\mu$ L. Esfregaços de sangue de gatos com agregados plaquetários usualmente estão associados com número adequado de plaquetas. O valor de referência para gatos é de 200.000 a 800.000 plaquetas/ $\mu$ L (15).

A trombocitopenia não é comum em gatos, com prevalência de 1,2% num estudo que avaliou 3.300 animais (16). Em outro estudo realizado com 359 amostras de san-

## Efeitos dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio na contagem de plaquetas e leucócitos de gatos domésticos, em diferentes intervalos de tempo

gue de gatos que apresentavam trombocitopenia, as plaquetas foram contadas por contador por impedância e o resultado foi comparado com a estimativa de plaquetas no esfregaço sanguíneo das mesmas amostras. Em 71% dos casos, a contagem automatizada indicou trombocitopenia (<200.000 plaquetas/ $\mu$ L) e em 12% a contagem foi muito baixa (<50.000 plaquetas/ $\mu$ L). Entretanto, quando a contagem foi baseada no esfregaço sanguíneo, somente 3,1% das amostras apresentavam contagem de plaquetas inferior que 200.000 plaquetas/ $\mu$ L (12).

A ativação plaquetária eleva-se progressivamente ao longo do tempo pós-colheita com EDTA também em sangue humano, e a agregação plaquetária induzida por anticoagulantes ou por atraso na contagem celular pode conduzir a pseudotrombocitopenia, e concomitante pseudoleucocitose (17). Isso pode ser reconhecido pela avaliação convencional do esfregaço sanguíneo, bem como por histogramas feitos por contadores de células sanguíneas (18).

O EDTA é o anticoagulante de escolha para testes hematológicos porque conserva a morfologia das células (3), atua quelando o cálcio e o plasma pode ser usado para alguns exames bioquímicos. O citrato de sódio atua quelando o cálcio, previne a agregação plaquetária e é indicado para colheita de sangue de pacientes com suspeita de pseudotrombocitopenia, promovendo contagem mais acurada (19).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio, e do tempo de execução da contagem celular, em equipamento automatizado, sobre a quantificação de plaquetas e leucócitos de sangue de gatos domésticos.

O projeto referente a este estudo foi registrado no Instituto de Pesquisa, Estudos e Ambiência Científica da Universidade Paranaense - IPEAC/UNIPAR, e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da Universidade Paranaense - CEP-EA/UNIPAR, sob número de registro geral 20046.

## Material e Métodos

Foram empregados 54 gatos atendidos no Hospital Veterinário SOS Animal Ltda. (Maringá, PR), com idade variando de seis meses a 19 anos, sendo 36 machos e 18 fêmeas, no período de agosto de 2010 a maio de 2011.

Amostras de sangue venoso foram colhidas de cada animal para avaliação hematológica, como parte dos procedimentos diagnósticos da rotina clínica, puncionando-se a veia jugular com agulha hipodérmica 25x7 acoplada a seringa de 3,0mL.

Cada amostra foi fracionada em duas alíquotas, sen-

do uma alíquota acondicionada em frasco de 1,0 mL contendo como anticoagulante o ácido etileno-diamino-tetra-acético<sup>1</sup>, e outra em frasco contendo como anticoagulante o citrato de sódio<sup>2</sup> a 3,2%. Os tubos eram cuidadosamente preenchidos com 1,0 mL de sangue para o frasco com EDTA e 0,9 mL de sangue para o frasco com citrato, homogeneizando-se por agitação delicada imediatamente após a colheita. Cada amostra permanecia em equipamento de homogeneização<sup>3</sup> durante o tempo de espera para cada contagem.

As contagens de plaquetas e leucócitos foram feitas em analisador hematológico automatizado<sup>4</sup> com tecnologia de impedância, em três momentos: imediatamente após a colheita (Tempo Zero = TZ), uma hora após a colheita (Tempo 1 = T1) e duas horas após a colheita (Tempo 2 = T2), mantendo-se a homogeneização da amostra do sangue até a contagem final. Também foram avaliados os histogramas, obtidos a partir do aparelho automatizado, e realizada a contagem manual de leucócitos de 32 das amostras.

Para análise de dados foi utilizado o programa Bioestat<sup>®</sup>, empregando-se análise de variância (ANOVA), estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis e correlação de Spearman. Também foi usado o Teste de t de Student, e o método de Dunn para comparação entre as médias.

## Resultados

Os resultados referentes às contagens de plaquetas são apresentados no Quadro 1 e na Figura 1. A contagem de plaquetas apresentou correlação negativa, altamente significativa em função do tempo (RS = -0,416; p<0,01), quando utilizado EDTA.

Anticoagulante e tempo da colheita	Plaquetas/ $\mu$ L*	Leucócitos/ $\mu$ L**
EDTA - TZ	327.740,74 $\pm$ 19.862,82a	10.301,85 $\pm$ 779,65b
EDTA - T1	212.314,81 $\pm$ 20.360,63b	14.038,88 $\pm$ 1.155,70a
EDTA - T2	186.481,48 $\pm$ 17.807,07b	15.242,59 $\pm$ 1.129,84a
Citrato - TZ	334.296,29 $\pm$ 20.287,13a	8.546,29 $\pm$ 663,84b
Citrato - T1	308.259,25 $\pm$ 20.357,65a	8.301,85 $\pm$ 654,37b
Citrato - T2	292.277,78 $\pm$ 20.275,24a	8.375,92 $\pm$ 641,26b

Obs.: As letras diferentes na mesma coluna, mostram significância estatística

\*ANOVA / Teste T

\*\*ANOVA Kruskal-Wallis-Dunn.

Valor de referência para plaquetas de gatos domésticos: 200.000 a 800.000/ $\mu$ L (8,20) Valor de referência de leucócitos para gatos domésticos: 5.500 a 19.500/ $\mu$ L (20)

**Quadro 1** - Médias e respectivos erros-padrão obtidos para as contagens de plaquetas e leucócitos em amostras de sangue de gatos domésticos (n = 54) colhidas e armazenadas com os anticoagulantes EDTA e citrato nos tempos TZ (logo após a colheita), T1 (uma hora após a colheita) e T2 (duas horas após a colheita).

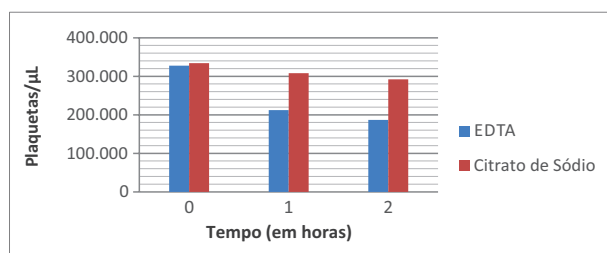
<sup>1</sup>EDTA K3 Minicollect - Vacuett<sup>®</sup>, Greier Bio-one GmbH Kremsmunster, Áustria.

<sup>2</sup>Citrato de sódio 3,2% Minicollect - Vacuett<sup>®</sup>, Greier Bio-one GmbH Kremsmunster, Áustria.

<sup>3</sup>Hemololab - BioEng<sup>®</sup>, BioEng, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>4</sup>BC-2800VET - Mindray<sup>®</sup>, Myndray, Nanshan, Shenzhen, China.

## Efeitos dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio na contagem de plaquetas e leucócitos de gatos domésticos, em diferentes intervalos de tempo



**Figura 1** - Média da contagem de plaquetas/ $\mu\text{L}$  de amostras de sangue de 54 gatos domésticos imediatamente após (TZ), uma hora após (T1) e duas horas após a colheita (T2), usando EDTA e citrato de sódio como anticoagulantes.

Imediatamente após a colheita, não houve diferença significativa para a contagem de plaquetas em relação ao uso dos diferentes anticoagulantes. Uma e duas horas após a colheita de sangue, as contagens totais de plaquetas, ao se utilizar sangue com EDTA, foram significativamente ( $p < 0,05$ ) inferiores quando comparadas com amostras obtidas com citrato de sódio. Ao se avaliar esses resultados em relação aos valores de referência de plaquetas para gatos, de 200.000 a 800.000/ $\mu\text{L}$  (8, 20), nove amostras (16,6%) colhidas com EDTA apresentaram contagens entre 100.000 e 200.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$  quando o sangue foi analisado em TZ, e esse número aumentou para 13 (24,07%) e 22 (40,75%) amostras nas análises realizadas em T1 e T2, respectivamente (Quadro 2).

Contagem de plaquetas/ $\mu\text{L}$	EDTA - TZ	EDTA - T1	EDTA - T2	Citrato de sódio - TZ	Citrato de sódio - T1	Citrato de sódio - T2
Acima de 200.000	44 (81,48%)	24 (44,45%)	16 (29,67%)	45 (83,40%)	41 (75,92%)	41 (75,92%)
Entre 100.000 e 200.000	9 (16,66%)	13 (24,07%)	22 (40,75%)	8 (14,81%)	11 (20,38%)	9 (16,60%)
Abaixo de 100.000	1 (1,86%)	17 (31,48%)	16 (29,30%)	1 (1,86%)	2 (3,70%)	4 (7,40%)

**Quadro 2** - Número de amostras de sangue de gatos domésticos ( $n = 54$ ) colhidas e armazenadas com os anticoagulantes EDTA e citrato nos tempos TZ (logo após a colheita), T1 (uma hora após a colheita) e T2 (duas horas após a colheita), com contagem de plaquetas acima de 200.000/ $\mu\text{L}$ , entre 100.000 a 200.000/ $\mu\text{L}$  e abaixo de 100.000/ $\mu\text{L}$ .

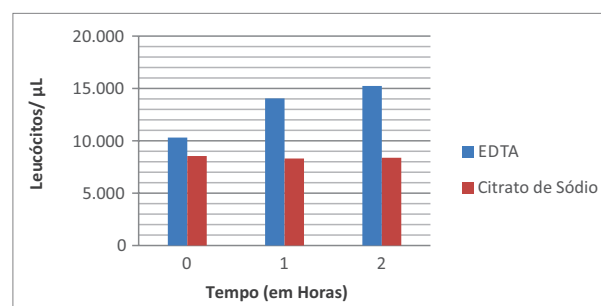
O número de plaquetas das amostras colhidas com citrato de sódio foi estável ao longo do tempo, sem diferenças estatísticas (Quadro 1). Dessas amostras, oito (14,81%), 11 (20,38%) e nove (16,6%) apresentaram contagem de plaquetas abaixo de 200.000/ $\mu\text{L}$  em TZ, T1 e T2, respectivamente (Quadro 2).

Em apenas uma (1,86%) amostra colhida com EDTA e uma (1,86%) colhida com citrato de sódio a contagem ficou abaixo de 100.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$  em TZ, imediatamente após a colheita. Uma hora após a colheita, 17 (31,48%) amostras colhidas com EDTA e duas (3,70%) colhidas com citrato de sódio apresentaram valores

abaixo dessa contagem. Finalmente, duas horas após a colheita, 16 (29,3%) amostras colhidas com EDTA e quatro (7,40%) amostras colhidas com citrato de sódio apresentaram valores abaixo de 100.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$  (Quadro 2).

As amostras colhidas e armazenadas com EDTA apresentaram contagens de plaquetas significativamente inferiores ( $p < 0,01$ ) que aquelas armazenadas com citrato de sódio, em T1 e T2.

Os resultados referentes às contagens totais de leucócitos estão demonstrados no Quadro 1 e na Figura 2. As contagens de leucócitos de amostras colhidas e armazenadas com EDTA apresentaram seus valores aumentados gradativamente do TZ até o T2, sendo que as contagens das amostras em TZ foram significativamente inferiores às demais ( $p < 0,05$ ). Observou-se correlação positiva significativa ( $RS = 0,2752$ ;  $p < 0,01$ ) entre a contagem de leucócitos e o tempo em amostras colhidas e armazenadas com EDTA, ou seja, com o avançar do tempo o número de leucócitos aumentou.



**Figura 2** - Média da contagem de leucócitos/ $\mu\text{L}$  de amostras de sangue de 54 gatos domésticos imediatamente após (TZ), uma hora após (T1) e duas horas após a colheita (T2), usando EDTA e citrato de sódio como anticoagulantes.

As contagens de leucócitos das amostras colhidas com citrato de sódio foram inferiores em T1 e T2 às obtidas com EDTA ( $p < 0,05$ ) e não sofreram alteração ao longo do tempo. Não houve correlação entre o tempo e a contagem de leucócitos usando o citrato de sódio como anticoagulante.

Das amostras colhidas com EDTA, 12 gatos (22,2%) apresentaram contagem de leucócitos significativamente superiores ao valor máximo de referência para a espécie (19.500/ $\mu\text{L}$ ), uma hora após a colheita (Quadro 3) e 13 (24%) duas horas após a colheita (Quadro 4). As contagens de leucócitos totais nas amostras colhidas com citrato em TZ, T1 e T2 não apresentaram alterações significativamente superiores, de acordo com valor de referência para a espécie.

## Efeitos dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio na contagem de plaquetas e leucócitos de gatos domésticos, em diferentes intervalos de tempo

Amostra	Leucócitos/ $\mu$ L - EDTA TZ	Leucócitos/ $\mu$ L - EDTA T1
1	9.300	21.200
2	14.300	21.200
3	19.500	28.500
8	27.000	41.300
13	8.900	23.100
16	7.100	19.900
23	11.900	22.400
25	6.000	33.600
28	12.600	19.200
30	18.800	26.600
31	5.700	25.300
33	15.700	27.800

**Quadro 3** - Amostras de sangue de gatos domésticos ( $n= 12$ ) que apresentaram aumento na contagem de leucócitos totais significativo clinicamente (número de leucócitos acima do valor de referência: 5500 a 19500 leucócitos/ $\mu$ L) colhidas e armazenadas com o anticoagulante EDTA nos tempos TZ (logo após a colheita) e T1 (uma hora após a colheita).

Amostra	Leucócitos/ $\mu$ L - EDTA TZ	Leucócitos/ $\mu$ L - EDTA T1
1	9.300	23.800
3	19.500	27.300
8	27.000	40.000
13	8.900	21.400
17	11.500	27.100
19	9.900	22.500
23	11.900	21.600
24	7.200	24.900
25	6.000	34.600
30	18.800	27.600
31	5.700	20.200
33	15.700	25.400
34	11.000	23.700

**Quadro 4** - Amostras de sangue de gatos domésticos ( $n= 13$ ) que apresentaram aumento de leucócitos significativo clinicamente (número de leucócitos maior que o número de referência: 5500 a 19500 leucócitos/ $\mu$ L) colhidas e armazenadas com o anticoagulante EDTA nos tempos TZ (logo após a colheita) e T2 (duas horas após a colheita).

Não houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre a contagem manual e automatizada de leucócitos totais nas amostras colhidas com EDTA em TZ (logo após a colheita), mas o tempo de duas horas influenciou significativamente ( $p< 0,05$ ) a contagem total de leucócitos (Quadro 5). Não houve diferença significativa ( $p< 0,05$ ) para as amostras de sangue colhidas com citrato de sódio tanto no método manual quanto no automático em TZ e T2 (Quadro 6).

Os dados apresentados mostram que as contagens totais de leucócitos em amostras colhidas com citrato de sódio foram mais estáveis, quando comparadas com a do uso do EDTA, pois não houve diferença significativa entre os tempos de contagem para os métodos, manual e automatizado.

A análise dos histogramas obtidos pelo aparelho automatizado mostrou semelhança no pico da contagem de leucócitos e plaquetas logo após a colheita, e se observou diferença evidente quando comparadas as amostras colhidas com EDTA em TZ e T2. A análise de T1 seguiu o mesmo padrão de pico.

Parâmetro	Leucócitos/ $\mu$ L (média $\pm$ erro padrão)
EDTA/Automático - TZ	9.925,00 $\pm$ 1.007,86b
DTA/Manual - TZ	9.726,56 $\pm$ 960,68b
EDTA/Automático - T2	14.181,25 $\pm$ 15.03,5 <sup>a</sup>

Kruskal-Wallis - letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

**Quadro 5** - Média e erro-padrão da contagem total de leucócitos pelos métodos, manual e automatizado logo após a colheita (TZ), e pelo método automático duas horas após a colheita (T2), em 32 amostras de sangue de gatos domésticos, colhidas e armazenadas com o anticoagulante EDTA.

Parâmetro	Leucócitos/ $\mu$ L (média $\pm$ erro padrão)
Citrato/Automático- TZ	7.771,87 $\pm$ 761,66
Citrato/Manual- TZ	8.700,00 $\pm$ 914,31
Citrato/Automático- T2	7.756,25 $\pm$ 775,40

Kruskal-Wallis não significativo.

**Quadro 6** - Média e erro-padrão da contagem de leucócitos pelos métodos manual, e automatizado logo após a colheita (TZ), e pelo método automático duas horas após colheita (T2), em 32 amostras de sangue de gatos domésticos, colhidas e armazenadas com o anticoagulante citrato de sódio.

## Discussão

Os resultados deste estudo indicaram que a contagem de plaquetas foi significativamente inferior em amostras de sangue de gatos domésticos colhidas com EDTA, quando comparada com amostras colhidas com citrato de sódio uma e duas horas após a colheita. Esses dados são compatíveis com os de um trabalho que comparou um anticoagulante à base de citrato (CTAD) com citrato de sódio e EDTA (21). Naquele estudo, dez das doze amostras (83%) colhidas com citrato de sódio tiveram valores mais elevados do que com EDTA, sendo que a concordância na contagem automatizada de plaquetas entre amostras colhidas com CTDA e citrato em gatos foi de 92%. Em sangue humano, o uso do CTDA, que contém citrato, teofilina, adenosina e dipiridamole, resulta em menor ativação de plaquetas, em comparação ao citrato de sódio (22).

Em sangue humano colhido com EDTA a causa mais comum de pseudotrombocitopenia é o fenômeno de agregação plaquetária, sendo que em um estudo observou-se que a contagem de plaquetas foi incrementada em 90% das amostras, quando se usou citrato (23). Em outro estudo, agregados plaquetários foram vistos menos frequentemente em sangue de gatos tratado com citrato, do que em sangue tratado com EDTA e heparina (24).

Numa avaliação de 12 amostras de sangue a média da contagem de plaquetas em EDTA foi de 135.000 plaquetas/ $\mu$ L comparando com 213.000 plaquetas/ $\mu$ L em citrato de sódio, sem diferença significativa, mas a possibilidade de que o citrato está associado a menor ativação plaquetária não pode ser rejeitada, pois o número de animais utilizados foi baixo (21). Em contraste, outro estudo apre-

## Efeitos dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio na contagem de plaquetas e leucócitos de gatos domésticos, em diferentes intervalos de tempo

senta medianas significativamente menores na contagem de plaquetas em amostras colhidas com citrato de sódio em relação ao uso de EDTA em sangue de cães sob tratamento antineoplásico (25). Naquela pesquisa utilizou-se proporção de 1:10 de citrato para sangue, e o autor afirma que o citrato apresenta maior tendência a agregar plaquetas, em comparação com o EDTA.

A contagem de plaquetas das amostras colhidas com citrato de sódio se manteve estável ao longo do tempo, não apresentando diferença estatística, estando em concordância com estudos que afirmam que o citrato de sódio leva a menor possibilidade de formação de agregados plaquetários (19, 24, 26).

Agregados plaquetários foram visualizados mais frequentemente e de forma significativa em esfregaços de sangue canino preparados com citrato, em comparação ao uso de EDTA (25,27). Em uma avaliação de equipamento hematológico, de 140 amostras de sangue de gatos colhidas com EDTA, 23 (16,4%) apresentaram agregados plaquetários (26). Em outra pesquisa feita para determinar as relações entre resultados de contagem manual e automática de plaquetas, valores menores foram observados no método automático, com média de 139.000 plaquetas/ $\mu$ L, contra 177.521 plaquetas/ $\mu$ L na contagem manual (28).

Neste estudo, observou-se que a contagem de plaquetas demonstrou correlação negativa altamente significativa ( $RS = -0,416$ ); ( $p > 0,01$ ) em relação ao tempo, quando foi utilizado EDTA como anticoagulante. Essa diminuição ou pseudo-diminuição do número de plaquetas foi atribuída à agregação plaquetária, sendo que pequenos agregados podem ter sido contados como hemácias e/ou leucócitos, levando a um pseudo-aumento do número de leucócitos.

A contagem de plaquetas diminuiu lentamente com a conservação do sangue *in vitro*, e numa pesquisa realizada com 40 amostras de sangue humano conservado a 23°C, quando as contagens foram repetidas após seis horas observou-se diminuição em 36 (90%)(29). O autor observou que a média diminuiu de 254.000 para 247.000 plaquetas/ $\mu$ L (-2,8%), diferença significativa, mas clinicamente irrelevante.

Das amostras colhidas com EDTA e avaliadas duas horas após a colheita, 70,15% apresentaram trombocitopenia, o que ocorreu em somente 21% das amostras colhidas com citrato de sódio. Tais dados corroboram os resultados de um estudo em que a maioria (71%) das contagens de plaquetas realizadas por impedância ficou abaixo do valor de referência, enquanto que na avaliação do esfregaço sanguíneo com base na estimativa de plaquetas, apenas 3,1% das amostras apresentaram trombocitopenia (12).

É recomendável contar as células sanguíneas e especialmente as plaquetas nas duas primeiras horas após a colheita, sendo que a contagem de leucócitos pode diminuir se houver excesso de EDTA, por diluição da amostra.

As alterações degenerativas nos leucócitos afetam as contagens diferenciais automatizadas, mas a conservação a 4°C previne significativamente esse problema, ao menos até 24 horas (30).

Em amostras de sangue de cães colhidas com EDTA, observou-se que na avaliação realizada cinco minutos após a retirada das amostras da refrigeração a 4°C, a contagem de plaquetas diminuía após seis horas de estocagem (31), atribuindo-se também esta diminuição à agregação plaquetária. Em outro estudo realizado com sangue de cães houve diminuição significativa na contagem de plaquetas a partir de 24 horas, nas amostras estocadas a 25°C, e 96 horas em temperatura de 4°C. Adicionalmente, as contagens valores de plaquetas se apresentaram reduzidas na avaliação das amostras cinco minutos após a retirada da refrigeração, e aumentaram consideravelmente após as amostras retornarem à temperatura ambiente (32).

Numa pesquisa realizada em sangue humano a contagem de plaquetas apresentou diferença significativa tanto nas amostras avaliadas em temperatura ambiente quanto após refrigeração (33). Essa diferença também foi observada em outros estudos, que sugerem que a diminuição da contagem de plaquetas possa ser consequência de aglutinação ou satelitismo plaquetário em amostras colhidas com EDTA, por aglutinação EDTA-dependente por anticorpos IgM ou IgG, os quais possuem maior poder de aglutinação em baixas temperaturas(34).

Observou-se que a contagem de leucócitos das amostras de sangue de gatos colhidas com citrato de sódio foi inferior àquelas colhidas com EDTA, entendendo-se o fato como decorrente da menor agregação plaquetária proporcionada pelo citrato.

Em comparação com o EDTA, a menor contagem de leucócitos foi observada também com o uso de CTDA, sendo que o valor de contagem de leucócitos foi semelhante na contagem manual e na contagem por impedância (21). Devido ao contador de células por impedância diferenciar os tipos celulares por tamanho, a contagem de leucócitos pode ser superestimada quando ocorre agregação plaquetária, pois o tamanho dos agregados de plaquetas pode se assemelhar ao tamanho de leucócitos. Diferenças na contagem de leucócitos foram clinicamente relevantes, e metade dos gatos apresentou contagem de leucócitos acima do intervalo de referência, quando a contagem foi feita em sistema automatizado e com uso de EDTA (21).

Nesta pesquisa observou-se que a contagem de leucócitos de amostras colhidas com EDTA aumentou gradativamente, e em muitos casos a diferença de contagem de T1 (22,2% das amostras) e T2 (24% das amostras) pode ser clinicamente relevante. Outro estudo também mostrou valores superestimados de leucócitos, da ordem de

## Efeitos dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio na contagem de plaquetas e leucócitos de gatos domésticos, em diferentes intervalos de tempo

16,4%, em sangue de gatos colhido com EDTA na contagem em aparelho automatizado, em relação a outro método de contagem, atribuindo esse aumento aos agregados plaquetários (26).

Em sangue canino colhido com EDTA, a contagem global de leucócitos aumentou significativamente após 24 horas, nas amostras estocadas sob temperatura ambiente, e diminuiu significativamente a partir de 72 horas nas amostras refrigeradas, mas as diferenças não foram clinicamente relevantes (31). Outro trabalho apresentou dados diversos, não se observando diferença significativa na contagem de leucócitos em material estocado a 4°C e 25°C, logo após a colheita e três, seis, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a colheita, também em sangue em sangue canino colhido com EDTA. Além disso, num estudo sobre os efeitos quantitativos da estocagem de sangue periférico humano em determinações automatizadas do hemograma, observou-se que em relação à contagem total de leucócitos, ocorre redução nos períodos de 48 a 72 horas, apesar de não haver diferença estatística significativa (33).

A ocorrência de pseudotrombocitopenia não está restrita ao uso de EDTA, e pode ocorrer em amostras colhidas com outros anticoagulantes, mas a pseudoleucocitose foi observada somente em sangue humano colhido com EDTA (10). Outra pesquisa com sangue humano atribuiu pseudotrombocitopenia e pseudoleucocitose à ativação plaquetária, que aumenta progressivamente ao longo do tempo, após a colheita do sangue com EDTA (17).

Nesta pesquisa não houve diferença significativa entre a contagem manual e automatizada dos leucócitos em amostras com EDTA em TZ, porém ocorreu diferença significativa em T2. Para amostras colhidas com citrato de sódio não houve diferença entre contagem manual e automática nos momentos avaliados.

Na análise dos histogramas, notou-se a distribuição de leucócitos semelhante em amostras colhidas com EDTA e citrato logo após a colheita, e com citrato duas horas depois. No entanto notou-se um aumento de leucócitos, na área onde são contadas células do tamanho de linfócitos nas amostras com EDTA duas horas após a colheita, sugerindo pseudolinfocitose. Esse aumento foi atribuído à contagem de agregados plaquetários como se fossem linfócitos.

## Conclusão

Neste estudo, a contagem de plaquetas em amostras de sangue de gatos domésticos colhidas com EDTA diminuiu significativamente com o tempo, desde a colheita até duas horas depois, enquanto a contagem de plaquetas em

amostras colhidas com citrato de sódio se manteve estável ao longo das duas horas seguintes à colheita.

Observou-se também que a contagem de leucócitos aumenta significativamente, em amostras de sangue de gatos domésticos colhidas com EDTA, desde a colheita até duas horas depois, de maneira que a contagem de plaquetas e leucócitos em amostras colhidas com esse anticoagulante deve ser realizada com precisão, antes de uma hora após a colheita. A contagem de leucócitos em amostras colhidas com citrato se mantém estável, desde a colheita até duas horas depois.

Assim sendo, o citrato de sódio pode ser recomendado como o anticoagulante mais adequado para contagem de plaquetas e leucócitos no sangue de gatos domésticos.

## Referências

1. Rebar AH. Guia de hematologia para cães e gatos. São Paulo: Roca; 2003.
2. Willard MD, Tvedten H. Small animal clinical diagnosis by laboratory methods. 4. ed. St. Louis: Saunders; 2004
3. Thrall, MA. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: Roca; 2007.
4. Rizzi TE, Clinkenbeard KD, Meinkoth JH. Normal hematology of the cat. In: Weiss DJ, Wardrop KJ. Schalm's veterinary hematology. 6. Ed. Ames: Willey-Blackwell Publishing; 2010.p.811-820.
5. Meyer DJ, Coles EH, Rich LJ. Medicina de laboratório veterinária. São Paulo: Roca; 1995.
6. Bush BM. Interpretação de resultados laboratoriais para clínico de pequenos animais. 1. ed. São Paulo: Roca; 2004
7. Stockham ST, Keeton KS, Szladovits B. Hematology. Veterinary Clinics of North America: small animal practice 2003; 33(6), 1335-1357
8. Jain, CN. Essenciais of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993
9. Stockham SL, Scott MA. Fundamentos de patologia clínica veterinária. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda.; 2011.
10. Schrezenmeier H, Muller H, Günskius E, Heimpe H, Seifried E. Anticoagulant-induced pseudothrombopenia and pseudoleukocytosis. Journal of thrombosis and haemostasis. 1995; 73:506-513.
11. Meinkoth JH, Allison WR. Sample collection and handling: getting accurate results. Veterinary Clinics of North America: small animal practice 2007; 37(2): 203-219.
12. Norman E, Borrón RCJ, Nash A, Campitt RB. Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. Veterinary clinical pathology 2001a;30(3):137- 140
13. Zelmanov D, Hetherington EJ. Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume and activation state. Veterinary clinical pathology 1988; 27:2-9.
14. Tasker S, Cripps PJ, Mackin AJ. Estimation of platelet counts on feline blood smears. Veterinary clinical pathology 1999; 28(2): 42-45.
15. Latimer K, Mahaffey EA, Prasse KW. Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine: Clinical pathology. 4. ed. Ames: Blackwell; 2003.
16. Jordan HL, Grindem CB, Breitschwerdt EB. Thrombocytopenia in cats: a retrospective study of 41 cases. Journal of veterinary internal medicine 1993; 7:261-265.
17. Dusse LMSA, Vieira LM, Carvalho MG. Pseudotrombocitopenia. Jornal

## Efeitos dos anticoagulantes EDTA e citrato de sódio na contagem de plaquetas e leucócitos de gatos domésticos, em diferentes intervalos de tempo

- brasileiro de patologia e medicina laboratorial 2004; out.40(5): 321-324
18. Lombarts AJ, Kieviet W. Recognition and prevention of pseudothrombocytopenia and concomitant pseudoleukocytosis. *American journal of clinical pathology* 1988; 89(5):634-639.
  19. Harvey JW. *Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001.
  20. Weiss DJ, Waedrop KJ. *Schalm's veterinary hematology*. 6. ed. Ames: Wiley-Blackwell Publishing; 2010.
  21. Norman E, Borron RCJ, Nash A, Campitt RB. Evaluation of a citrate-based anticoagulant with platelet inhibitory activity for feline blood cell counts. *Veterinary clinical pathology* 2001b; 30(3): 124-132.
  22. Kuhne T, Horns A, Sample J et al. Flow cytometric evaluation of platelet activation in blood collected into EDTA vs. Diatube-H, a sodium citrate solution supplemented with the ophylline, adenosine and dipyridamole. *American journal hematology* 1995; 50:40-45.
  23. Joon B, Duck C, Kee SJ, Shin MG, Shin JH, Suh SP, Rya DW. Correction algorithm of pseudothrombocytopenia due to platelet clumping. *Korean Journal of laboratory medicine* 2005; 25:376-378.
  24. Moritz A, Hoffman C. Thrombozytenzählung bei der Katze. *Tierärztliche praxis* 1997; 25:695-700
  25. Stokol T, Erb HN. A comparison of platelet parameters in EDTA- and citrate anticoagulated blood in dogs. *Veterinary clinical pathology* 2007; 36(2):148-155
  26. Wassmuth AK, Riond B, Hofmann-Lehmann R, Lutz T. Evaluation of the Mythic 18 hematology analyzer for use with canine, feline and equine samples. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 2011; 23(3):436-453.
  27. Milonarkys ME, Leonides L, Farmaki R, Kostoulas P, Koutinas AF, Christopher M. Effect of anticoagulant and storage conditions on platelet size and clumping in healthy dogs. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 2008; 20:774-779.
  28. Linden T. Thrombozytopenie bei der Katze unter besonderer Berücksichtigung der immunvermittelten thrombozytopenie. [Tese de Mestrado]. Berlin: Freie Universität Berlin. Dissertationen on line / Mycore 2.0.2. D.188. ISBN 3-89820-950-4. 2006.
  29. Failace R. *Hemograma: manual de interpretação*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2003.
  30. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. *Hematologia prática de Dacie e Lewis*. 9. ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
  31. Pastor J, Cuenca R, Velarde R, Viñas L, Lavin S. Evaluation of hematology analyzer with canine and feline blood. *Veterinary clinical pathology* 1997; 26(3):138-147
  32. Coelho PS. Influência do tempo, temperatura e recipiente de estocagem nas características do hemograma de cães adultos hígidos. [Tese de Mestrado]. Jaboticabal: UNESP; 2006.
  33. Dalanhol M, Barros M, Mazuchelli JI, Dilva PH, Hashimoto Y, Largura A. Efeitos quantitativos da estocagem de sangue periférico nas determinações do hemograma automatizado. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia* 2010; 32(1):16-32.
  34. Oliveira AC, Ribeiro-Filho JDR, Guimarães JD, Silva AR, Dantas WMF, Bonfá LP, Farias SK. Concentração de anticoagulantes, tempo e temperatura de armazenagem sobre os parâmetros hematológicos no hemograma automatizado. *Ciência Rural* 2010; 40(12):2521-2526.

Recebido para publicação em: 02/02/2012.

Enviado para análise em: 02/02/2012.

Aceito para publicação em: 08/05/2012.