

## VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE GLICOSE EM AMOSTRAS DE CÃES ARMAZENADAS A 4°C

[Variation in concentration glucose serum in dogs stored samples a 4°C]

Gustavo Gomes Oliveira<sup>1</sup>, Kelly Cristina Silva Godoy<sup>2\*</sup>, Tamires Ramborger Antunes<sup>3</sup>, Simone Caramalac<sup>1</sup>, Silvana Caramalac<sup>1</sup>, Nathalia Guedes Oliveira<sup>4</sup>, Alda Izabel de Souza<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Residente do Programa de Residência em Saúde em Medicina Veterinária– Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS, Campo Grande- MS, Brasil

<sup>2</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS, Campo Grande- MS, Brasil.

<sup>3</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS, Campo Grande- MS, Brasil.

<sup>4</sup>Graduanda do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul- FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>5</sup>Docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul- FAMEZ/ UFMS, Campo Grande-MS, Brasil

**RESUMO** – Para mensuração da concentração sérica de glicose, recomenda-se o uso de tubos sem aditivos com separação do soro em menos de 30 minutos, uma vez que poderá ocorrer glicólise *in vitro* alterando seus valores. Entretanto, é importante considerar que, na medicina veterinária, algumas particularidades inviabilizam o cumprimento dessa conduta. Diante disso o objetivo deste trabalho foi determinar o percentual de variação na concentração de glicose sérica de cães, em amostras de sangue total, sem aditivos, na temperatura de 4°C, centrifugados em diferentes intervalos de tempo e verificar a importância dessas variações no diagnóstico. Amostras de sangue de 27 cães foram coletadas e separadas em oito alíquotas. Uma alíquota processada logo após a coleta e as demais armazenadas por 1, 2, 4, 6, 10, 24 e 48 horas a 4°C. O valor médio inicial (107, 24 mg/dl ± 7,8) estava dentro do intervalo de normalidade para a espécie e aumento gradual da porcentagem de variação nas mensurações foi observado à medida que as amostras permaneceram em contato com o coágulo em temperatura de refrigeração. Essa instabilidade se mostrou crescente em todos os tempos subsequentes, atingindo variações de aproximadamente 17% após 48 horas. A aplicação da máxima porcentagem de variação à média dos valores iniciais de amostras normoglicêmicas não causou erro de interpretação dos resultados e, do ponto de vista clínico, não comprometeria o diagnóstico de níveis séricos normais de glicose nesses animais.

**Palavras-Chave:** acondicionamento; estabilidade; glicemia.

**ABSTRACT** – For measurement of serum glucose without the use of additives to serum separation tubes is recommended in less than 30 minutes, since glycolysis may occur *in vitro* altering their values. However, it is important to consider that in veterinary medicine, some peculiarities make impossible the fulfillment of that conduct. Therefore the aim of this study was to determine the percentage change in the concentration of serum glucose dogs in whole blood samples without additives, at 4 ° C, centrifuged at different intervals of time and verify the importance of these variations in diagnosis . 27 dogs blood samples were collected and separated into eight aliquots. An aliquot processed immediately after collection and the other stored with 1, 2, 4, 6, 10, 24 and 48 hours at 4°C. The initial mean value (107, 24 mg / dl ± 7.8) was within the range of normal range for the species and gradually increasing the percentage of variation in the measurements was observed as the samples remained in contact with the clot in cooling temperature. This instability showed increased at all subsequent times, reaching variations of approximately 17% after 48 hours. The application of the maximum percentage change from baseline to the average of normoglycemic samples did not cause error in interpretation of the results and the clinical point of view, would not jeopardize the diagnosis of normal serum glucose levels in these animals.

**Keywords:** glycemia; packaging; stability.

\* Autor para correspondência. E-mail: k.c.s.godoy@gmail.com

## INTRODUÇÃO

Testes laboratoriais são de grande importância para o diagnóstico, prognóstico e monitoração de diferentes enfermidades. Fatores pré-analíticos, analíticos e de variação biológica podem prejudicar a acurácia destas provas. A escolha do exame a ser realizado, as técnicas utilizadas para coleta de material e o transporte e preservação da amostra, até o momento da execução do exame, são fatores pré-analíticos capazes de afetar a estabilidade da alíquota e promover resultados errôneos (SBPC, 2014). Tais fatores refletem em inadequadas decisões de procedimentos terapêuticos ou conclusões em projetos de pesquisa (Humann-Ziehanck & Ganter, 2012).

A concentração de glicose da amostra para a dosagem bioquímica é altamente influenciada pelo preparo do paciente antes da coleta de sangue, o tipo de tubo utilizado, a temperatura de estocagem e o tempo de contato do soro com as células sanguíneas antes da separação do coágulo (Christopher & O'neil, 2000; Stockham & Scott, 2011; Oddoze et al., 2012). Em humanos, estudos para avaliar diferentes formas de armazenamento e conservação de amostras têm resultado em diretrizes para a redução de erros pré-analíticos. No entanto, na medicina veterinária esses dados são raros, especialmente em relação à glicose sérica de cães (Christopher & O'Neill, 2000; Clark et al., 2003; Reynolds et al., 2006; Oddoze & Portugal, 2012).

A contínua glicólise *in vitro*, provocada pelos eritrócitos, pode produzir falsa hipoglicemia quando o soro sanguíneo não é separado rapidamente (Ehsani et al., 2008), conforme demonstrado em estudos realizados com soro humano (Ono et al., 1981). Variações na concentração de leucócitos e eritrócitos também são descritas como causa de erros analíticos, ocasionando super ou subestimação (Barreau & Buttery, 1988; Tang et al., 2000). O armazenamento em tubos com inibidores de glicólise ou, no caso do uso de tubos sem aditivos, a separação do soro em menos de 30 minutos, são condutas padrões recomendadas (Christopher & O'Neill, 2000). Embora essa orientação não deva ser desprezada, é importante considerar que na medicina veterinária, existem particularidades que muitas vezes inviabilizam o cumprimento dessas recomendações. Frequentemente a coleta é realizada pelo clínico que encaminha o sangue, sem centrifugação, a um laboratório. Com isso, o tempo entre a coleta e separação do soro, quase sempre, excede o limite recomendado.

O conhecimento do comportamento da glicose sérica em caninos normoglicêmicos, tomando-se por base a inadequada separação, o tempo de processamento e as concentrações de eritrócitos e leucócitos da amostra, pode facilitar a identificação de valores falsamente alterados desse analito.

Em vista disso o objetivo deste estudo foi determinar o percentual de variação da concentração de glicose sérica em amostras de sangue total, armazenado sem aditivos, na temperatura de 4°C e em diferentes intervalos de tempo e verificar a importância dessas variações para a aplicação do resultado no diagnóstico em cães.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 27 cães, com idade entre um a cinco anos e peso corporal superior a 5 kg, independente de sexo e raça, sem jejum prévio. Amostras de sangue (4 ml) foram colhidas por venopunção jugular ou cefálica e distribuídas imediatamente em oito tubos sem aditivos. Mantiveram-se todas as alíquotas em temperatura ambiente por 20 min para a retração do coágulo, antes do início das dosagens. Soros lipêmicos, ictericos ou com hemólise visível após este período foram descartados.

Imediatamente após a retração do coágulo, uma das alíquotas (T0) foi centrifugada a 3000g por 5 min e o soro resultante analisado pelo método enzimático com *kit* comercial (Glicose Liquiform Vet Labtest®) e analisador bioquímico semiautomático. Os valores do analito obtido na mensuração das amostras processadas no T0 foram considerados referência para o indivíduo testado. As alíquotas remanescentes foram armazenadas a 4°C e processadas, conforme descrito anteriormente, após 1h (T1), 2h (T2), 4h (T4), 6h (T6), 10h (T10), 24h (T24) e 48h (T48).

A estabilidade do analito foi determinada pelo cálculo da porcentagem de variação na concentração da glicose, em cada tempo, a partir dos valores obtidos no T0, para cada animal.

Para determinar a porcentagem de variação (V%) existente entre o valor de referência (T0) e os valores obtidos nos diferentes tempos utilizou-se a seguinte fórmula:  $V\%_N = \{(TX_N - T0_N) / T0_N\} \cdot 100$ . Para a melhor compreensão desta, tornou-se prudente explicitar o seguinte: V% = variação em porcentagem para cada animal. N = identificação do animal (sendo 1 o primeiro animal a participar do estudo). T0 = concentração de glicose obtida na hora 0 (valor de referência para cada animal). TX = valor obtido para a concentração de glicose em cada tempo, sendo X a identificação para cada hora.

## RESULTADOS

O teste estatístico de Friedman foi utilizado para comparar a variação nas concentrações séricas da glicose nos diferentes tempos da análise. O resultado foi considerado significativo se  $p < 0,05$ .

Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob o protocolo de número 620/2014.

As concentrações de glicose das alíquotas obtidas imediatamente após a retração do coágulo (T0), estavam dentro do intervalo de normalidade para a espécie canina, com valores médios de  $107, 24 \pm 7,8$  mg/dl. A média e desvio padrão da variação na concentração de glicose após armazenamento em temperatura de refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}$ ), nos diferentes tempos testados constaram na Tabela 1.

Tabela 1. Média e DP-Desvio padrão, em módulo, da variação da concentração de glicose, sérica, em amostras caninas, nos diferentes tempos de armazenamento a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Temperatura	Variação da Glicose						
	T0-T1	T0-T2	T0-T4	T0-T6	T0-T10	T0-T24	T0-T48
$4^{\circ}\text{C}$	7,43(5,02)	9,20(6,21)	9,22(7,06)	9,65(7,98)	12,09(8,94)	15,47(11,54)	16,45(15,49)

Tempo após retração de coágulo: T1= 1 h, T2= 2h, T4= 4h, T6= 6h, T10= 10h, T24= 24h, T48= 48h.

A figura 1 resumiu os dados de mudança nas concentrações de glicose sérica dos animais normoglicêmicos do estudo em cada tempo testado.

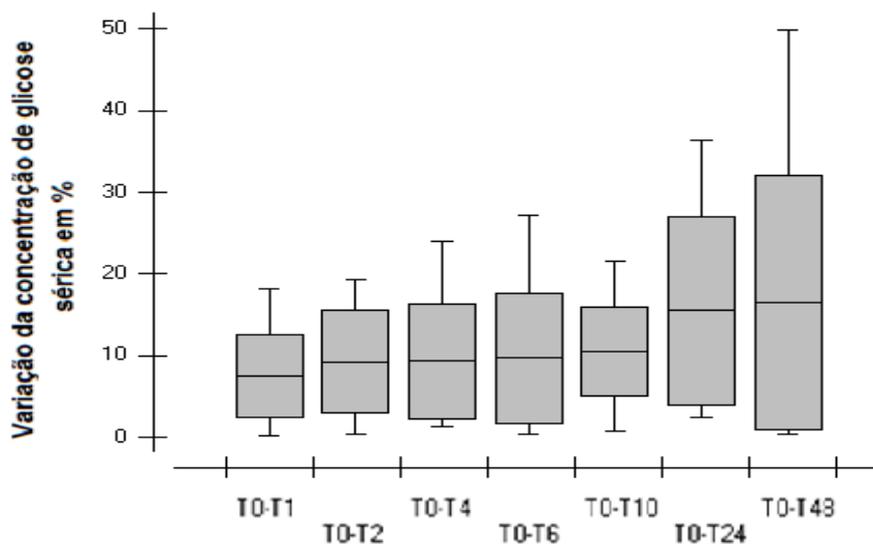


Figura 1. Média, desvio-padrão e valor máximo e mínimo de variação na concentração de glicose em amostras de sangue de cães armazenadas em tubos sem aditivos e estocadas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Na temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  a concentração de glicose sérica variou de forma crescente, partindo de 7,43% após uma hora de armazenamento até 16,45% após 48 horas de armazenamento. O efeito de estocagem a  $4^{\circ}\text{C}$  das amostras em tubo sem aditivos foi significativa ( $p = 0,0024$ ) para a concentração de glicose sérica entre o tempo inicial (T0) e T(24).

## DISCUSSÃO

Uma amostra é considerada estável quando consegue manter pequenas variações no valor inicial mensurado de um componente ao longo de

um período de tempo e sob condições específicas de armazenamento (ISO, 1992).

A instabilidade da amostra, causada por fatores pré-analíticos, pode levar a variações e inconsistências nos resultados (Humann-Ziehanck & Ganter, 2012). Contudo Stahl & Brandslund (2005) sugerem que essa inconsistência pode ser interpretada de maneira diferente se usada para uma população ou para um indivíduo.

As concentrações de glicose no momento T0 da pesquisa em questão foram similares ao intervalo de referência considerado por Kerr (2003) e

Stockham & Scott (2011) para cães sem jejum prévio (72 a 200 mg/dl). O tipo de tubo, o contato do soro com o coágulo e a temperatura de armazenamento já foram responsabilizados por oscilação na concentração de glicose sérica durante os diferentes períodos de armazenamento. Assim como no presente estudo, autores relataram mudanças nos valores mensurados da glicose após as primeiras horas de armazenamento em temperatura de refrigeração (Ono et al., 1981; Ehsani et al., 2008; Oddo et al., 2012).

Discordando essas observações, nos ensaios realizados por Marjani (2008) os valores de glicose só sofrem alteração após 48 horas de armazenamento a 4°C. Essa discrepância de resultados poderia estar relacionada à diferença na conservação das alíquotas. O autor acima citado armazenou a fração a ser usada, já centrifugada (soro), o que reduziu a glicólise, enquanto que no trabalho em evidência, o soro foi mantido em contato com o coágulo durante o armazenamento. Variações entre espécies e métodos de análise das amostras também podem ser considerados como causas dos resultados divergentes.

O aumento gradual das V% nas mensurações da glicose (Tabela 1) foi observado à medida que as amostras permaneceram mais tempo em contato com o coágulo e sob refrigeração. Esses dados reforçaram o conceito de que a concentração de glicose sérica decresce por hora de armazenamento devido à utilização da glicose pelos eritrócitos e leucócitos presentes na amostra (Stockham & Scott, 2011).

Contudo quando aplicado à máxima porcentagem de variação (T48) à média dos valores iniciais dos indivíduos normoglicêmicos, observou-se que essa alteração provavelmente é pouco relevante, mesmo após 48 horas de armazenamento a 4°C, já que não causaria erro de interpretação dos resultados, assemelhando-se as observações de Reynolds (2006).

A principal indicação para a dosagem sérica de glicose em cães é a suspeita clínica de diabetes mellitus. Nessa doença, a inadequada atividade da insulina causa persistente hiperglicemia. A elevação nos valores séricos da glicose, depois de descartadas causas não endócrinas, permite a confirmação da endocrinopatia. Estudos epidemiológicos indicam que em cães diabéticos a concentração sérica de glicose atinge, em média, aproximadamente 400 mg/dl (Pöpl & González, 2005, Humann-Ziehank & Ganter, 2012). Segundo Stockham & Scott (2011), em cães o quadro de diabetes mellitus pode ser considerado sempre que a glicose sérica casual (sem jejum) exceder 200 mg/dl. Em vista disso considerando-se os dados

apresentados pela literatura consultada e aplicando-se a V% nas observadas nos diferentes tempos do presente trabalho, foi possível suspeitar que, mesmo em amostras hiperglicêmicas, não haveria prejuízo na conclusão diagnóstica.

Desse modo, a análise resultante da pesquisa em discussão indicou que, embora com oscilações nos valores séricos de glicose em consequência do tempo de armazenamento da amostra em tubos sem aditivos e a 4°C, a instabilidade não comprometeu o diagnóstico clínico de normoglicemia em cães. Além disso, considerando-se as peculiaridades da medicina veterinária, principalmente no que diz respeito ao encaminhamento de amostras a laboratórios de referência, excepcionalmente, amostras armazenadas a 4°C, por até 48 horas podem ser utilizadas para uma triagem inicial de glicose para a espécie canina.

## CONCLUSÃO

Variações crescentes nas concentrações de glicose sérica são observadas durante o armazenamento a 4°C em amostras não centrifugadas e em tubo sem aditivo, no entanto essas variações não comprometem a conclusão diagnóstica para cães normoglicêmicos, quando utilizada até 48 horas após a coleta.

## REFERÊNCIAS

- Barreau, P.; Buttery, J. Effect of hematocrit concentration on blood glucose value determined on glucometer II. *Diabetes care*, v. 11, n. 2, p.116-118, 1988.
- Christopher, M. M.; O'Neill, S. Effect of Specimen Collection and Storage on Blood Glucose and Lactate Concentrations in Healthy, Hyperthyroid and Diabetic Cats. *Veterinary Clinical Pathology*, v.29, n.1, p.22-28, 2000.
- Clark, S.; Youngman, L.D.; Palmer, A.; Parish, S.; Peto, R.; Collins R. Stability of plasma analytes after delayed separation of whole blood: implications for epidemiological studies. *International Journal of Epidemiology*, v.32, n.1, p. 125-130, 2003.
- Ehsani, A.; Afshari, A.; Bahadori, H.; Mohri, M.; Seifi H.A. Serum constituents analyses in dairy cows: effects of duration and temperature of the storage of clotted blood. *Research in veterinary science*, v.85, n.3, p.473-475, 2008.
- International Organization for Standardization (ISO). *ISO Guide 30 Terms and definitions used in connection with reference materials Geneva*. (ISO 30). 8p.1992.
- Humann-Ziehank, E.; Ganter, M. Pre-analytical factors affecting the results of laboratory blood analyses in farm animal veterinary diagnostics. *Animal: an international journal of animal bioscience*. v.6, n. 7, p.1115-1123, 2012.
- Kerr, M. G. *Metabolismo de carboidratos*. In: *Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca. pp. 131-158, 2003.

Marjani, A. Effect of storage time and temperature in Serum Analytes. *American Journal of Applied Sciences*, v. 5, n.8, p. 1047-1051, 2008.

Oddoze, C.; Lombard, E. Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clinical biochemistry*, v. 45, n.6, p.464-469, 2012.

Ono, T.; Kitaguchi, K.; Takehara, M.; Shiiba, M.; Hayami K. Serum-constituents analyses: effect of duration and temperature of storage of clotted blood. *Clinical chemistry*, v.27, n.1, p. 35-38, 1981.

Pöppl, A.; González, F. H.D. Aspectos epidemiológicos e clínicos-laboratoriais da diabetes mellitus em cães. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, n.1, p. 33-40, 2005.

Reynolds, B.; Taillade, B.; Médaille, C.; Palenché, F.; Trumel, C.; Lefebvre, H. P. Effect of repeated freeze-thaw cycles on routine plasma biochemical constituents in canine plasma. *Veterinary clinical pathology*, v.35, n.3, p.339-340, 2006.

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). *Coleta e Preparo de Amostras Biológica*. Barueri .Malone. v. 1, p1-7, 2014.

Stahl, M.; Brandslund, I. Controlled storage conditions prolong stability of biochemical components in whole blood. *Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM/FESCC*, v. 43, n.2, p. 210-5, 2005.

Stockham, S. L.; Scott, M. A. Glicose, cetoaminas e hormônios reguladores relacionados. In: *Fundamentos de patologia clínica veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 589-612, 2011.

Tang, Z.; Lee, J.; Louie, R; Kost, G.J.et al. Effects of different hematocrit levels on glucose measurements with handheld meters for point-of-care testing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 124, n. 8, p. 1135-1140, 2000.