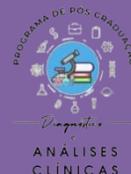




UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS



NOTA TÉCNICA

Recomendações para validação de intervalos de referência hematológicos e bioquímicos na veterinária

*Natália Rodrigues Marques
Valéria Smith Neves e Santos
Maria Vivina Barros Monteiro*

Belém, 2022



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/br/>

Produto Técnico Tecnológico produzido como parte de Dissertação de Mestrado orientada pela Profa. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro no Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas da Universidade Federal do Pará. Nota Técnica destinada a médicos veterinários que atuam na área de Medicina Laboratorial.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)**

M357n Marques, Natália Rodrigues.
NOTA TÉCNICA: Recomendações para validação de intervalos de referência hematológicos e bioquímicos na veterinária / Natália Rodrigues Marques, Valéria Smith Neves E Santos . — 2022.
15 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro

1. análises clínicas . 2. medicina veterinária . 3.
intervalos de referência . I. Título.

CDD 570

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Os exames hematológicos e bioquímicos auxiliam no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento de doenças veterinárias (Rahman, 2018). Na interpretação desses exames é indispensável que os intervalos de referência (IRs) estabelecidos para a espécie sejam comparados com os resultados do paciente (Russell e Roussel, 2007; George et al., 2010).

Os IRs são determinados a partir de animais saudáveis, utilizando metodologias padronizadas, cálculos estatísticos e representam uma estimativa dentro da qual 95% dos indivíduos clinicamente sadios devem ser encontrados (George et al., 2010). Os IRs podem variar, principalmente, por fatores genéticos, demográficos, nutricionais, analíticos e ambientais (Friedrichs et al., 2010; Odhiambo et al., 2015). Assim, é importante estabelecer intervalos que se aproximem da realidade nacional, regional ou, preferencialmente, da população atendida pelo laboratório (Chung et al., 2016).

Estipular IRs próprios é dispendioso para sua execução, além de ser mais trabalhoso e requerer a utilização de um elevado número de animais. A validação de intervalos já existentes é uma alternativa, necessitando para isso apenas de 20 amostras de animais saudáveis (Nielsen et al., 2010).

No Brasil os IRs hematológicos e bioquímicos utilizados rotineiramente na veterinária foram estabelecidos há bastante tempo, em outras regiões geográficas e, provavelmente, não retratam a realidade atual. Assim, fica demonstrada a importância da atualização ou validação dos IRs já existentes.

Nesse contexto, a presente nota técnica tem como objetivo descrever um procedimento que pode ser utilizado na validação de IRs para o hemograma e exames bioquímicos veterinários.

2. PROPOSTA METODOLÓGICA

A metodologia apresentada segue o protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI* e foi utilizada na validação de IRs para o hemograma e exames bioquímicos de cães domiciliados na Amazônia Oriental (Marques et al., 2021).

A seguir serão descritos as etapas importantes para realização da metodologia de validação, a saber: escolha dos Intervalos de referência e parâmetros a serem validados; seleção dos animais; coleta e processamento das amostras e procedimento de validação. A título de exemplificação são apresentados os resultados da validação realizada por Marques et al. (2021).

Etapa 1. Escolha dos Intervalos de referência e parâmetros a serem validados

Nessa etapa sugerimos que sejam escolhidos para validação os IRs utilizados no laboratório e liberados nos laudos dos exames. No trabalho de Marques et al. (2021) foram utilizados os IRs estabelecidos por Jain (1993) e Kaneko (1997) para o hemograma e os exames bioquímicos, respectivamente. Esses intervalos são utilizados por muitos laboratórios veterinários e expressos nos resultados dos exames.

A seleção dos parâmetros que serão submetidos ao processo de validação pode ser realizada de acordo com as necessidades de cada laboratório. Recomendamos que todos os parâmetros descritos no hemograma sejam utilizados na validação. Para os exames bioquímicos podem ser validados os analitos mais frequentemente utilizados na rotina, como exemplo: enzimas, glicose, proteínas totais e frações, bilirrubina, ureia, creatinina, colesterol e triglicerídeos. No quadro 1 estão descritos os parâmetros submetidos ao processo de validação realizado por Marques et al. (2021).

Quadro 1. Parâmetros hematológicos e bioquímicos submetidos ao procedimento de validação realizado por Marques et al. (2021).

Parâmetros hematológicos (unidades)	Parâmetros Bioquímicos (unidades)
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Albumina (g/L)
Hemoglobina (g/dL)	ALT (U/L)
Hematócrito (%)	AST (U/L)
VGM (fl)	Colesterol (mg/dl)
CHGM (%)	Creatinina (mg/dl)
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Fosfatase alcalina (U/L)
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	GGT (U/L)
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Glicose (mg/dl)
Neutrófilos Segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Globulinas (g/L)
Neutrófilos em bastão ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Proteínas totais (g/L)
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Triglicerídeos (mg/dl)
Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Ureia (mg/dl)

VGM- Volume Globular Médio; CHGM- Concentração de Hemoglobina Globular Média; ALT- Alanina Aminotransferase; AST- Aspartato Aminotransferase; GGT- Gamaglutamiltransferase.

Etapa 2. Seleção dos animais

No Procedimento de validação são utilizadas, no mínimo, amostras de 20 animais clinicamente saudáveis. Entretanto, pode ser necessária uma segunda amostragem para concluir ou não a validação de alguns parâmetros hematológicos ou bioquímicos. Assim, recomendamos que sejam utilizados o dobro ($n=40$) ou um número maior de animais.

Os animais devem passar por um rigoroso exame clínico e recomenda-se aplicação de um questionário ao tutor para avaliação do histórico dos animais. Devem ser excluídos animais gestantes ou em lactação, filhotes, idosos, com doença clínica em curso, com lesões aparentes, ou que estejam utilizando medicações como hormônios ou promotores de crescimento, indutores enzimáticos (corticosteroides ou antiepilépticos), entre outras drogas que podem interferir nos exames hematológicos e bioquímicos de acordo com o estabelecido por Friedrichs et al. (2012).

O protocolo experimental deve ser aprovado por um Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA). Lembrar que a utilização de vertebrados em pesquisa e ensino é regulamentada pela Lei Federal nº 11.794/08, assim a aprovação ética do protocolo deve ser previamente realizada.

No trabalho de Marques et al. (2021) foram utilizados 44 animais adultos (com mais de um ano de idade) de diferentes raças e sexos, que não apresentavam sinais de doença nas duas semanas anteriores ou seguintes à coleta de amostras. Os tutores responderam um questionário sobre o histórico clínico dos animais com perguntas sobre manejo alimentar, utilização de medicações, esquemas de vacinação, vermifugação etc (APENDICE A).

Etapa 3. Coleta e processamento das amostras

Para coleta os animais podem ser contidos fisicamente e, quando necessário, focinheiras devem ser utilizadas. O sangue pode ser obtido preferencialmente por punção da veia cefálica, utilizando seringas e agulhas descartáveis. Em animais de pequeno porte recomenda-se a utilização da veia jugular e microtubos de coleta.

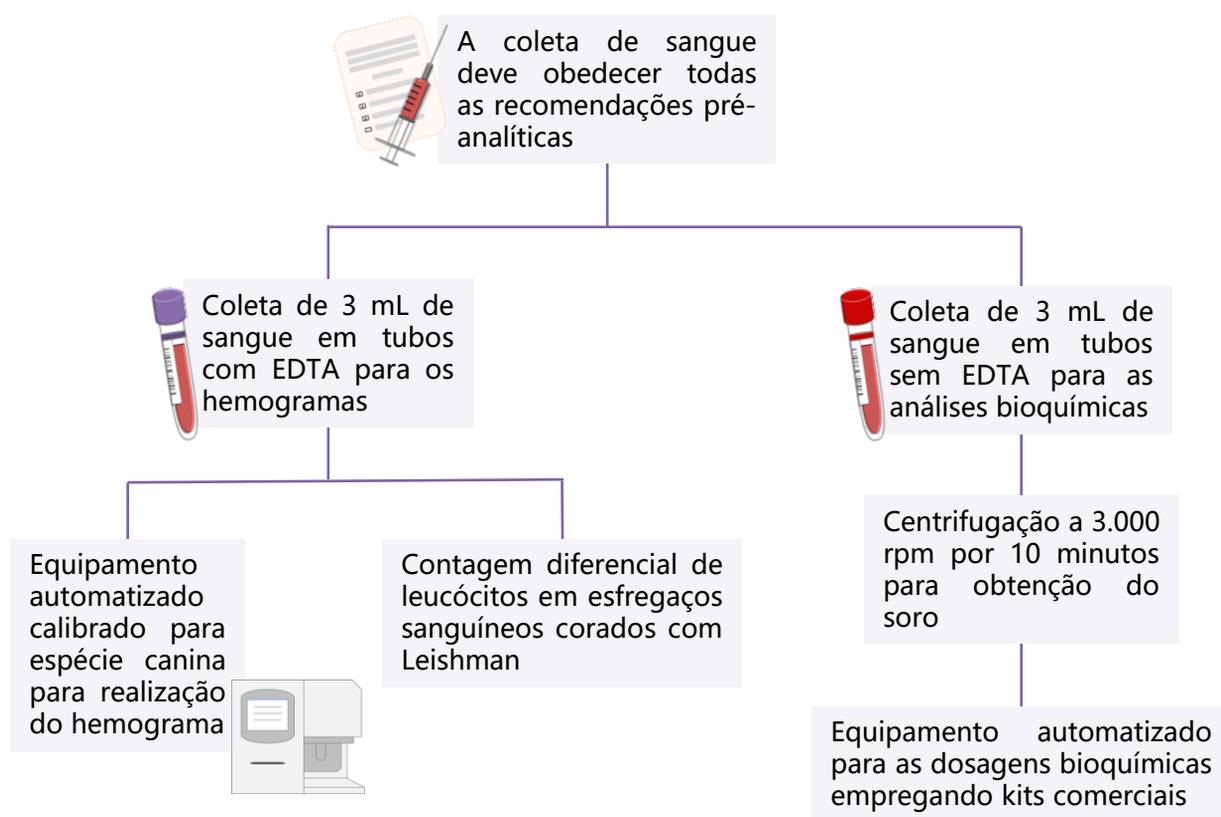
O procedimento de coleta deve ser realizado obedecendo todas as recomendações pré-analíticas de cuidados com o paciente e amostra. Os animais devem estar em jejum de oito horas, tranquilos e descansados. A coleta deve ser rápida, minimizando o estresse e com garroteamento não ultrapassando um minuto.

Os cuidados com a amostra incluem: utilizar o tubo adequado para o exame; identificar corretamente o tubo e as fichas de cada animal; respeitar a correta relação anticoagulante/sangue; refrigerar as amostras e remeter o mais rápido possível ao laboratório. As amostras para o hemograma devem ser processadas em até 6 horas após a coleta. O soro ou plasma para os exames bioquímicos devem ser congelados e processados em

até 15 dias.

O procedimento analítico das amostras pode ser realizado usando a metodologia (manual ou automatizada) e equipamentos da rotina do laboratório. Recomenda-se que a calibração, a manutenção preventiva e os procedimentos de controle de qualidade estejam atualizados. No fluxograma estão descritos os procedimentos de coleta e processamento das amostras realizado no trabalho de Marques et al. (2021).

Figura 1. Fluxograma de coleta e processamento de amostras.

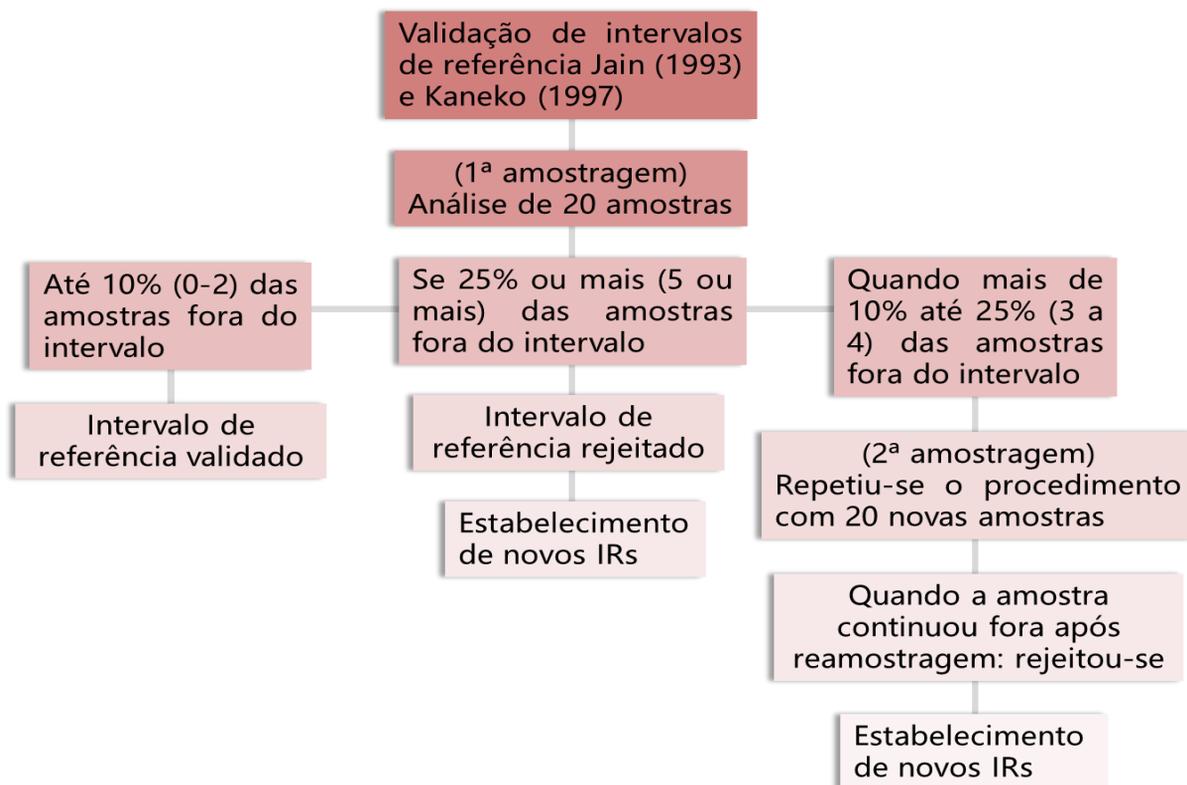


É importante excluir as amostras que apresentem coágulos, lipemia, hemólise ou outras alterações pré-analíticas que possam interferir nos resultados do hemograma e análises bioquímicas.

Etapa 4. Protocolo de validação

Da população de referência (animais clinicamente saudáveis), selecionar aleatoriamente 20 amostras e comparar o resultado de cada parâmetro hematológico ou bioquímico com o IRs que se deseja validar (1ª amostragem). O parâmetro é considerado validado quando apenas duas amostras estiverem fora do intervalo de referência estabelecido, ou seja, 10% do total. Quando cinco ou mais amostras ficarem fora do intervalo de referência este é imediatamente rejeitado. Caso o número de amostras divergentes seja de três a quatro, uma nova amostragem pode ser realizada (2ª amostragem), utilizando outros 20 animais saudáveis e deve-se proceder como na primeira amostragem. Quando, após a segunda amostragem, os resultados permanecerem rejeitados um novo IR deve ser calculado para esse parâmetro.

Figura 2. Procedimento de validação de intervalos de referência (Marques et al, 2022) adaptado de Nielsen et al. (2010).



3. RESULTADO DO PROCEDIMENTO DE VALIDAÇÃO (Marques et al., 2021)

Dos 44 cães utilizados por Marques et al. (2021), 24 eram fêmeas e 20 machos de raças variadas. A idade dos cães variou entre um a nove anos ($3,5 \pm 2,07$ anos).

Foram submetidos ao processo de validação um total de 25 parâmetros (13 hematológicos e 12 bioquímicos). Desse total, 76% (19/25) dos intervalos foram validados e 24% (6/25) foram rejeitados. Para os parâmetros hematológicos, o método validou 69,2% (9/13) dos parâmetros. Os resultados obtidos para eosinófilos e hemoglobina foram rejeitados na primeira amostragem, com sete amostras fora do intervalo de referência. Os resultados de linfócitos e CHGM tiveram que ser submetidos a uma segunda amostragem e permaneceram não validados (tabela 1). Os demais parâmetros hematológicos foram validados no primeiro procedimento de amostragem.

Tabela 1. Intervalos de Referência (IRs) hematológicos (Jain, 1993) e bioquímicos (Kaneko, 1997) para espécie canina e o resultado do procedimento de validação para os seis parâmetros não validados.

Parâmetros	1 ^a amostragem	2 ^a amostragem	IRs Jain (1993)	IRs Kaneko (1997)
Albumina (g/L)	9/20	-	-	26-33
GGT (U/L)	7/20	-	-	0-10
Hemoglobina (g/dL)	7/20	-	12-18	-
CHGM (%)	3/20	4/20	32-36	-
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3/20	6/20	1.0-4.8	-
Eosinófilos($\times 10^3/\mu\text{L}$)	7/20	-	0.1-1.25	-

GGT = Gama Glutamiltransferase; CHGM = Concentração de Hemoglobina Globular Média

Para bioquímica foram validados 83,3% (10/12) dos parâmetros testados. Apenas dois (albumina e GGT) foram rejeitados na primeira amostragem, pois mais de cinco amostras estavam fora do intervalo de referência proposto por Kaneko (1997). Os resultados de proteína total e ureia tiveram que passar por uma segunda amostragem, pois três amostras ficaram fora do intervalo, e foram validados. Os demais parâmetros foram validados.

Para os parâmetros não validados é importante que novos IRs sejam estabelecidos, pois serão mais representativos da população atendida pelo laboratório. Para esse propósito pode-se utilizar os resultados obtidos de toda população de referência selecionada para o processo de validação. O QRcode abaixo direciona para o artigo de Marques et al. (2021), onde pode ser encontrada a metodologia utilizada para estabelecimento de IRs utilizando pequenas amostras.



“Validação dos intervalos de referência hematológicos e bioquímicos estabelecidos para cães domiciliados na Amazônia Oriental, Pará, Brasil”

4. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A principal recomendação é que cada laboratório veterinário estabeleça seus próprios IRs, pois são mais representativos da população atendida. Na impossibilidade de estabelecer intervalos próprios, o procedimento de validação descrito na presente nota técnica pode ser utilizado para verificar se intervalos antigos ou estabelecidos em outras regiões geográficas são válidos para realidade local.

Os IRs estabelecidos para outros parâmetros bioquímicos (eletrólitos, minerais e outras enzimas) devem passar pelo procedimento de validação e, se necessário, novos intervalos devem ser estabelecidos para os que não forem validados.

A recomendação de validar ou estabelecer novos IRs pode e deve ser ampliada também para outras espécies domésticas (felinos, ovinos, caprinos, bovinos, suínos, equinos e bubalinos) e silvestres.

O trabalho de Marques et al. (2021) demonstrou que, para a maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, os IRs estabelecidos previamente na literatura ainda são válidos para utilização em cães criados na Amazônia Oriental.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHUNG, S.H.; CHANG, L.W.; CHENG, T.L.; LIN, C.J.; WENYING CHEN, W.Y.; CHOU, C.C. Establishing in-house reference intervals for dogs in veterinary clinics. *Taiwan Veterinary Journal*, v. 42, n. 2, p. 53–67, 2016.

FRIEDRICHS, K.R. Reference intervals: an essential, expanding, and occasionally equivocal standard. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 39, n. 2, p. 131–132, 2010.

FRIEDRICHS, K.R.; HARR, K.E.; FREEMAN, K.P.; SZLADOVITS, B.; WALTON, R.M.; BARNHART, K.F.; BLANCO-CHAVEZ, J. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 41, p. 441–453, 2012.

GEORGE, J. W.; SNIPES, J.; LANE, V. M. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 39, p. 138–148, 2010.

JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417 p.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; & BRUSS, M. L. 1997. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. San Diego: *Academic Press*, 1997, 932 p.

MARQUES, N. R.; RIBEIRO, R. C. M.; CAPELA, H. Y. B.; SILVA FILHO, E.; BRAGA, D. V.; MELLO, V. J.; RIBEIRO, W. L. C.; MONTEIRO, M. V. B. Validação dos intervalos de referência hematológicos e bioquímicos estabelecidos para cães domiciliados na Amazônia Oriental, Pará, Brasil, *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 28, n. 4, p. 211–217, 2021.

NIELSEN, L.; HANSEN, M.K.; JENSEN, A.L.; KRISTENSE, A.T. Breed-specific variation of hematologic and biochemical analytes in healthy adult Bernese Mountain dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 39, n. 1, p. 20–28, 2010.

ODHIAMBO, C.; OYARO, B.; ODIPO, R.; OTIENO, F.; ALEMNI, G.; WILLIAMSON, J.; ZEH, C. Evaluation of Locally Established Reference Intervals for Hematology and Biochemistry Parameters in Western Kenya. *PLOS ONE*, v. 10, n.4, 2015.

RUSSELL, K.A.; ROUSSEL, A.J. Evaluation of the ruminal serum chemistry profile. *Veterinary Clinics. Food Animal Practice*, v. 23, p. 403–426, 2007

RAHMAN, M.K.; ISLAM, S.; FERDOUS, J.; UDDIN, M.H.; HOSSAIN, M.B.; HASSAN. M.M.; ISLAM. A. Determination of hematological and serum

biochemical reference values for indigenous sheep (*Ovis aries*) in Dhaka and Chittagong Districts of Bangladesh. *Veterinary World*, v. 11, n. 8, p. 1089-1093, 2018.

APÊNDICE A

Questionário – Aspectos sanitários dos animais a serem selecionados para o procedimento de validação de IRs



Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas

Dados do Tutor

Nome:	Sexo:	Ocupação:
Endereço:	E-mail:	

Dados do animal

Nome:	Raça:	Sexo:	Idade:
-------	-------	-------	--------

1. Tipo de alimentação:

Industrial () Caseira () Mista () Petiscos ()

2. Manejo alimentar:

Uma vez ao dia () Até 3 vezes ao dia () à vontade ()

3. Você leva seu animal ao veterinário?

Nunca () Periodicamente () Só quando adoece ()

4. Vacinação em dia?

sim () Não ()

5. Quais vacinas?

6. Onde vacina?

Campanha () Casa agropecuária () Clínica veterinária ()

7. Fez exames laboratoriais (hemograma, bioquímica, urinálise, parasitológico etc) nos últimos 60 dias?

Sim () Não ()

8. Se sim, quais?

9. Caso tenha feito exames, o resultados estavam normais?

Sim () Não ()

10. Se não, quais as alterações observadas nos exames?

11. Vermifugação recente?

Sim () Não ()

12. Se sim, qual medicação usada? Há quanto tempo?

13. Histórico de doenças nos últimos 60 dias?

Sim () Não ()

14. Se sim, quais doenças diagnosticadas?

15. Uso de medicação recente?

Sim () Não()

16. Se sim, quais?

17. Uso de medicação de uso contínuo?

Sim () Não()

18. Se sim, quais?

19. Faz uso de hormônios, promotores de crescimento ou corticoides?

Sim () Não ()

20. Histórico de convulsões?

Sim () Não()

21. Micção normal?

Sim () Não()

22. Se não, descrever o problema:

23. Defecação normal?

Sim () Não()

24. Se não, descrever a alteração nas fezes:

25. Presença de ectoparasitas?

Sim () Não()

26. Se sim, quais?

27. O animal já passou por cirurgia recente?

Sim() Não ()

28. Se sim, quais e há quanto tempo?

29. Problemas de pele?

Sim () Não()

30. Se sim, quais e qual o tratamento?

31. O animal tem acesso a rua?

Sim () Não()

32. Tem contato com outros animais?

Sim () Não()