

FASE PRÉ-ANALÍTICA EM HEMATOLOGIA LABORATORIAL

1



O processamento das amostras para exames laboratoriais é composto por três fases denominadas de pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase pré-analítica engloba todas as atividades que precedem o ensaio laboratorial, ou seja, compreende as atividades realizadas antes da determinação analítica. A fase analítica inicia-se com a validação do sistema analítico, passando pelo controle de qualidade interno e se encerra quando a determinação analítica gera um resultado. Já a fase pós-analítica inicia-se após a geração do resultado analítico, quantitativo e/ou qualitativo, sendo finalizada após a entrega do laudo e interpretação do resultado.¹

Conforme o **Quadro 1.1**, cada etapa possui fontes de erros que afetam a qualidade e confiabilidade dos resultados reportados. Com o uso de equipamentos automatizados no laboratório de hematologia, o processo analítico e seu controle se tornaram mais confiáveis. Contudo, erros ainda ocorrem e são, na maioria dos casos, observados durante as fases pré e pós-analítica, as quais são conjuntamente chamadas de fase extra-analítica. Portanto, conhecer os fatores que influenciam a qualidade dos resultados, desde o preparo do paciente para a coleta da amostra, passando pela análise propriamente dita, até a emissão dos resultados, é de fundamental importância para que sejam estabelecidas estratégias e ferramentas de monitoramento dos processos envolvidos, de modo que funcionem como planejado e especificado.

A fase pré-analítica envolve todos os fatores que devem ser levados em conta antes da realização do exame propriamente dito e que exerçam influência direta na interpretação dos resultados. Ela necessita de procedimentos que indiquem e controlem suas possíveis falhas, de modo a permitir que as inferências dos estudos de precisão e exatidão dos sistemas analíticos realmente contribuam para melhorias das fases analítica e pós-analítica. As fontes de variação pré-analítica podem ser divididas em variáveis fisiológicas, variáveis de coleta e manipulação da amostra e variáveis endógenas, que são mostradas, de modo didático, no **Quadro 1.2**. Cabe lembrar que tudo começa com a solicitação dos exames mais apropriados, no momento certo, os quais serão interpretados corretamente, o que traz benefícios aos pacientes, aos médicos e aos laboratórios.

VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS

Determinados fatores fisiológicos, intrínsecos ao paciente, podem afetar os resultados dos exames laboratoriais. Estes fatores incluem situação clínica do paciente, idade, sexo e raça, jejum, postura, efeitos do exercício físico, ritmo circadiano, altitude em que foram coletados os exames, gravidez e estilo de vida do indivíduo.

■ SITUAÇÃO CLÍNICA

A situação clínica do paciente se refere ao porquê ele está realizando o exame solicitado. Isso pode parecer uma situação irrelevante, mas na hematologia pode

QUADRO 1.1 Fontes e frequências de erro que afetam a qualidade e confiabilidade dos resultados		
FASE PRÉ-ANALÍTICA 46-68%	FASE ANALÍTICA 7-13%	FASE PÓS-ANALÍTICA 19-47%
▪ Orientação inadequada ao paciente ▪ Tempo de jejum ▪ Legibilidade da requisição médica ▪ Requisição médica incorreta ▪ Interpretação incorreta da requisição médica ▪ Perda da requisição médica ▪ Coleta inadequada ▪ Estase venosa prolongada ▪ Utilização de tubo de coleta inadequado ▪ Incorreta proporção entre sangue e anticoagulante ▪ Identificação incorreta do paciente ▪ Transporte e armazenamento da amostra inadequados ▪ Centrifugação inadequada	▪ Falha no equipamento ▪ Perda da amostra ▪ Troca da amostra ▪ Contaminação entre amostras ▪ Sistema analítico não validado previamente à análise ▪ Falhas não detectadas no controle interno de qualidade: erro sistemático e erro randômico	▪ Perda do resultado ▪ Interpretação equivocada do resultado e ação subsequente ▪ Erro na transcrição dos resultados ▪ Tempo de liberação dos resultados acima do especificado ▪ Problemas com o sistema de informação laboratorial ▪ Valores de referência e limites de decisão inapropriados

Fonte: Adaptada de Lima-Oliveira e colaboradores² e Plebani.³

QUADRO 1.2 Fontes de variação pré-analítica		
VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS	VARIÁVEIS DE COLETA E MANIPULAÇÃO DA AMOSTRA	VARIÁVEIS ENDÓGENAS
▪ Situação clínica ▪ Idade ▪ Sexo ▪ Raça ▪ Jejum ▪ Postura ▪ Efeitos do exercício físico ▪ Ritmo circadiano ▪ Altitude ▪ Gravidez ▪ Estilo de vida	▪ Identificação da amostra ▪ Efeitos da infusão ▪ Coleta sanguínea ▪ Tempo de garroteamento ▪ Material do tubo de coleta ▪ Ordem de coleta dos tubos ▪ Homogeneização da amostra com o anticoagulante ▪ Anticoagulante ▪ Confecção da extensão sanguínea sem anticoagulante logo após a coleta ▪ Transporte e armazenamento inadequados ▪ Centrifugação	▪ Presença de anticorpos circulantes contra leucócitos e plaquetas (EDTA dependentes) ▪ Analitos que provocam interferência ▪ Efeito de medicamentos e seus metabólitos

EDTA, ácido etilenodiaminotetracético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*).

Fonte: Adaptada de Jury, Nagia e Tatsumi,⁴ Mullins,⁵ e Narayanan.⁶

ser uma informação bastante útil, pois direciona a análise e fornece segurança no momento de relatar as alterações hematológicas observadas na microscopia. Uma doença hereditária se manifesta, muitas vezes, desde o nascimento. O fato de o paciente informar que estava bem e que passou a ter algum sintoma há pouco tempo, afasta a hipótese de uma doença hereditária ou pode sugerir, por exemplo, o início de uma crise de hemólise.⁷

■ ■ IDADE, SEXO, RAÇA, JEJUM E POSTURA

A idade, o sexo e até mesmo a raça são fundamentais para a interpretação dos exames hematológicos, pois os valores de referência foram definidos para diferentes populações e agrupados conforme

gênero e faixa etária. Ocorre um aumento substancial na contagem de glóbulos vermelhos nos recém-nascidos em comparação com a dos adultos em decorrência da glicose ser metabolizada muito rapidamente em neonatos. O aumento do oxigênio arterial logo após o nascimento ocasiona um aumento dos níveis de hemoglobina. Nos recém-nascidos, a contagem de neutrófilos é elevada e atinge um valor máximo entre 1 e 2 dias após o nascimento, enquanto a contagem de monócitos permanece aumentada até duas semanas após o nascimento e a contagem de eosinófilos por até uma semana. A contagem de linfócitos está aumentada significativamente no momento do nascimento e permanece elevada em crianças de até 4 anos de

idade. Já a contagem de basófilos permanece elevada, mas apenas temporariamente, até um dia após o nascimento. Saber se o paciente está em jejum ou não é importante, pois o pós-prandial altera, principalmente, a linhagem leucocitária. Não considerando situações de urgência e emergência, nas quais os exames são solicitados a qualquer momento e sem necessidade de jejum prévio, o período de jejum – habitualmente solicitado para a coleta de hemograma e testes de coagulação – é de 8 horas, podendo ser reduzido para 4 horas sem que haja grandes prejuízos e para 1 ou 2 horas em situações especiais que envolvam crianças de baixa idade e de baixo peso. Mudanças na postura, principalmente quando o paciente passa da posição deitada para a posição em pé ou sentada, provocam deslocamento da água corporal do interior dos vasos para o espaço intersticial, que resulta em hemoconcentração e causa flutuações entre 8 e 10% na hemoglobina, volume globular e contagem de leucócitos em relação à concentração inicial. O correto é padronizar a postura do paciente durante coletas subsequentes; contudo, sempre que possível, recomenda-se fazer a coleta com o paciente sentado.⁶⁻⁸

■ EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E RITMO CIRCADIANO

Perguntar ao paciente o que ele estava fazendo antes da coleta de sangue é importante porque exercícios físicos, deslocamento até o laboratório de bicicleta ou em caminhadas apressadas alteram os exames hematológicos, aumentando a contagem de leucócitos, por fazer um deslocamento dos leucócitos do *pool* marginal para o circulante, assim como a contagem de plaquetas. Exercícios físicos podem influenciar a hemostasia, ativando a coagulação, a fibrinólise e as plaquetas. O horário da coleta se correlaciona com o ritmo circadiano de flutuações que ocorrem com certos hormônios, substâncias e células presentes na corrente sanguínea. Os níveis de ferro e as contagens de eosinófilos aumentam no período da tarde. Deve-se realizar a coleta dos pacientes em condições basais que sejam reprodutíveis e padronizáveis.^{4,5,7,8}

■ ALTITUDE E GRAVIDEZ

Alterações nas contagens sanguíneas podem ocorrer quando realizadas ao nível do mar ou em altitudes elevadas. Por exemplo, o volume globular e a concentração de hemoglobina podem

aumentar cerca de 8% em uma altitude de 1.400m em relação ao nível do mar. A concentração de transferrina diminui com o aumento da altitude. Na gravidez, ocorre um aumento do volume plasmático médio que leva à hemodiluição. A velocidade de hemossedimentação aumenta em até cinco vezes devido à presença de proteínas de fase aguda. Também ocorre aumento dos níveis de fator VII e diminuição dos níveis de ferro e ferritina.⁶

■ ESTILO DE VIDA

O estresse e a ansiedade podem provocar aumento temporário nas contagens de leucócitos. A ingestão regular de etanol pode provocar aumento do volume corpuscular médio (VCM). Em fumantes de longo prazo, também pode ocorrer aumento do VCM e das concentrações de carboxihemoglobina, hemoglobina e nas contagens de eritrócitos e leucócitos. O aumento dos leucócitos está correlacionado com o número de maços fumados.⁶

VARIÁVEIS DE COLETA E MANIPULAÇÃO DA AMOSTRA

Para minimizar o erro pré-analítico, algumas variáveis precisam ser padronizadas, como, por exemplo, conferência do nome do paciente, técnica de coleta, tempo de duração da aplicação de garrote (torniquete), locais de coleta, anticoagulantes utilizados para a coleta de sangue, relação sangue/anticoagulante e manuseio e processamento das amostras.

■ IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Erros de identificação, tanto da amostra como do paciente, levam a subsequentes erros de transcrição de resultados, podendo acarretar a graves erros médicos. O coletador deve se assegurar de que a amostra que será coletada realmente seja do paciente especificado na requisição médica. Esta situação constitui um problema crítico e não deve ser subestimada. Para assegurar uma correta identificação do paciente, deve-se solicitar pelo menos dois ou mais identificadores, tais como nome e data de nascimento, sendo que estas informações devem ser as mesmas que constam na requisição médica. No caso de pacientes hospitalizados, a identificação por meios eletrônicos ou pulseiras com código de barras reduz o risco de erros de identificação dos pacientes. O número do leito nunca deve ser utilizado como critério de identificação. Para recém-nascidos e pacientes

com dificuldades de comunicação, o coletador deve valer-se de informações fornecidas por acompanhante ou equipe de enfermagem. A identificação das amostras deve ser realizada logo após o término da coleta, na presença do paciente e antes de sair do local de coleta. A data e a hora da coleta devem ser registradas no tubo, assim como a identificação do coletador.^{8,9}

❑ EFEITOS DA INFUSÃO

Nos pacientes que estão recebendo infusão de algum medicamento ou soro fisiológico ou glicosado, as amostras de sangue não devem ser obtidas do local próximo à infusão e sim do braço oposto. Deve-se passar pelo menos 8 horas antes de se coletar sangue de um paciente que recebeu uma emulsão de lipídios. O período de espera para coleta de sangue de pessoas que receberam uma solução rica em carboidratos, ou aminoácidos e proteínas hidrolisadas, ou eletrólitos é de pelo menos 1 hora depois da cessação da infusão. Para indivíduos que receberam transfusões de sangue, a extensão da hemólise e, com isso, o aumento dos valores de potássio, lactato desidrogenase e hemoglobina livre estão diretamente relacionados com o tempo decorrido entre a produção do concentrado de hemácias e a transfusão propriamente dita.⁶

❑ COLETA SANGÜÍNEA

A coleta de sangue deve ser padronizada pelos laboratórios a fim de evitar contagens espúrias e artefatos gerados *in vitro*. A coleta sanguínea inclui a punção venosa, o uso do anticoagulante adequado, a correta homogeneização da amostra após ser transferida para o tubo e, conforme o laboratório, a confecção da extensão sanguínea sem anticoagulante. A punção sanguínea pode ser realizada pelo sistema a vácuo e por seringa e agulha. Na primeira situação, os tubos só devem ser retirados do suporte após o preenchimento total do tubo; isso vai garantir uma correta proporção de sangue e anticoagulante. Logo após o tubo ser retirado do suporte, ele deve ser homogeneizado gentilmente por inversão. Isso garante a completa solubilização do anticoagulante e a correta anticoagulação da amostra de sangue. Deve-se sempre verificar a data de validade dos tubos, uma vez que eles vão perdendo o vácuo ao longo do tempo, o que pode resultar em relações sangue/anticoagulante inadequadas.

Quando a punção é realizada com seringa e agulha, o sangue deve fluir para o interior da seringa sem que se tenha de fazer qualquer esforço para puxar o êmbolo. Quando isso não ocorre, o turbilhonamento ocasionado pelo esforço causa alterações celulares. A **Figura 1.1** mostra a correta

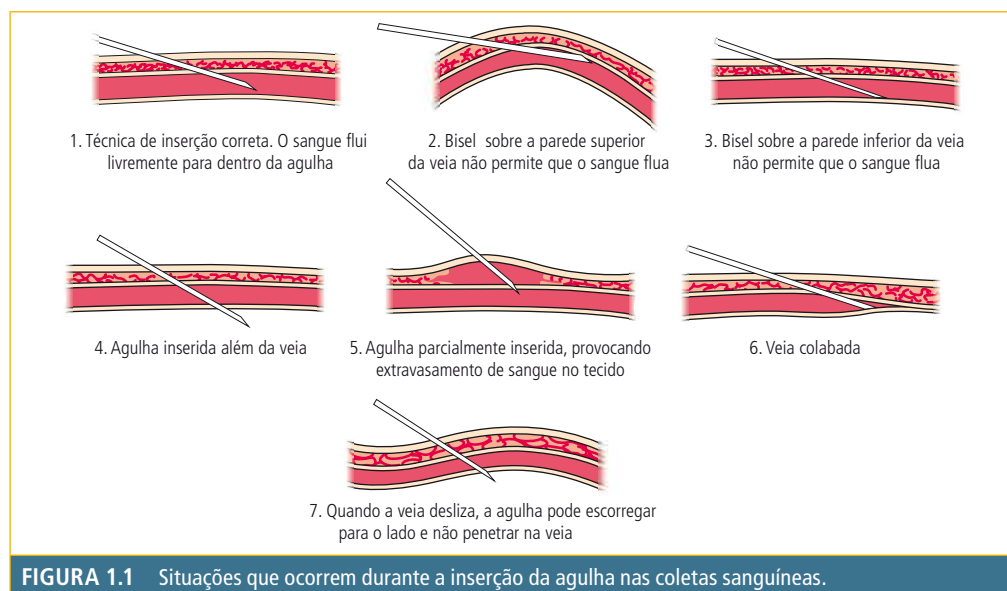


FIGURA 1.1 Situações que ocorrem durante a inserção da agulha nas coletas sanguíneas.

Fonte: Adaptada de McCall e Tankersley.¹⁰

técnica de inserção da agulha (1) e problemas que podem prejudicar a coleta, mas que devem ser contornados por um coletador experiente.

Terminada a punção, a agulha deve ser retirada da seringa e o sangue passado aos tubos, respeitando a proporção de sangue e anticoagulante.⁷ Para a coleta dos exames hematológicos, a preferência é pela coleta de sangue venoso e a partir da punção das veias do antebraço: mediana cubital, cefálica ou basílica. Sempre ambos os antebraços devem ser observados, e a punção, realizada na veia mais visível. Antes da punção, deve-se fazer assepsia com álcool a 70%. A **Figura 1.2** mostra a representação esquemática das veias do antebraço.

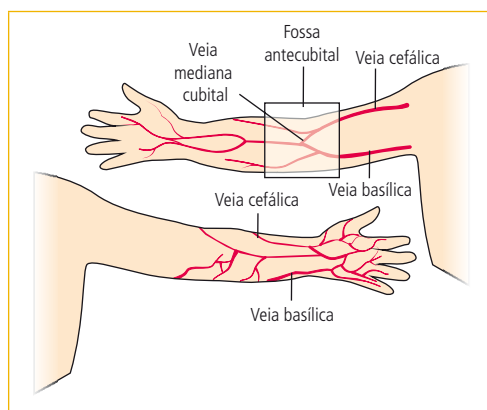


FIGURA 1.2 Representação esquemática das veias do antebraço.

Fonte: Adaptada de Mullins.⁵

Em crianças, quando o acesso venoso é difícil, a coleta na jugular externa pode ser uma boa opção, mas também pode ser realizada a punção capilar. A coleta do sangue capilar deve ser feita nas partes externas, medial e lateral do calcanhar, sendo que este deve estar aquecido. A punção deve ser feita com lanceta apropriada, após assepsia, e o sangue deve verter espontaneamente, sem que nenhuma compressão seja feita com a intenção de aumentar o fluxo sanguíneo. Existem diferenças nos resultados de alguns parâmetros hematológicos entre o sangue capilar e o venoso. Para alguns autores, o volume globular, a concentração da hemoglobina, contagem de eritrócitos, leucócitos, neutrófilos e monócitos são mais elevados no sangue capilar, e a contagem de plaquetas é mais elevada no sangue venoso, talvez por adesão das mesmas no local da punção capilar.⁴ Já outros autores relatam que a contagem de eritrócitos, volume

globular e a hemoglobina são menores no sangue capilar em relação ao venoso.¹¹ A concordância entre esses autores se dá na contagem de plaquetas. A **Figura 1.3** exemplifica os locais para a realização da punção capilar.

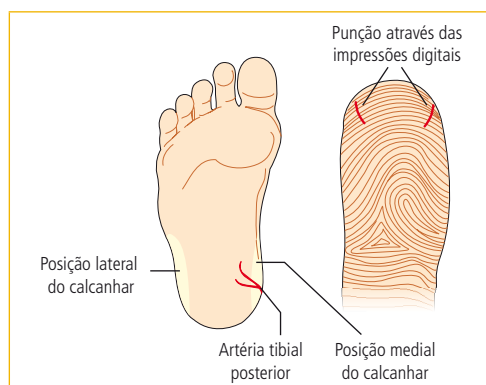


FIGURA 1.3 Locais para a realização da punção capilar.

Fonte: Adaptada de Mullins.⁵

Em idosos ou em pacientes com a pele flácida, após a escolha da veia a ser punccionada, a pele deve ser bem distendida com ajuda do polegar para evitar sangramentos subcutâneos. Em situações em que o paciente esteja com um cateter para a infusão de soros e medicamentos, a punção sanguínea pode ser feita pelo próprio cateter. Contudo, uma determinada quantidade de sangue, diluída pelo líquido de infusão, deve ser descartada para que se possa utilizar a amostra para a realização de exames hematológicos. Quando o volume descartado é menor que o recomendado, podem ocorrer alterações no volume globular e nos leucócitos espuriamente para menos. Recomenda-se que o volume descartado seja pelo menos 4 vezes maior que o volume do espaço morto do cateter, o qual depende do seu comprimento e do seu diâmetro. Os resultados do tempo de protrombina (TP) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) são inversamente proporcionais ao volume descartado em pacientes heparinizados. Isso significa que, se o volume descartado não for o ideal, ocorre aumento do TP e TTPa por interferência da heparina. Não se recomenda que exames para avaliação da hemostasia sejam coletados do cateter; caso seja necessário, um volume mínimo de 30 mL deve ser descartado, especialmente se o tempo de trombina (TT) for determinado.¹¹

Quando a coleta é realizada com sistema de escalpe, sendo o tubo com citrato o primeiro a ser coletado, deve-se utilizar um tubo de descarte. O uso do tubo de descarte tem por finalidade preencher o espaço morto do escalpe, de modo a garantir a proporção adequada do anticoagulante em relação ao sangue total. Para fins de descarte, pode-se utilizar os próprios tubos de citrato ou tubos sem qualquer aditivo.¹²

Amostras que chegam ao setor de hematologia com volume menor do que o volume nominal do tubo ou visivelmente hemolisadas não devem ser processadas. A primeira pode conter alterações celulares causadas pelo anticoagulante, e a última, ser reflexo de uma coleta traumática.⁶

A gasometria é muito solicitada em laboratórios que atendem a domicílio e a hospitais, incluindo leitos de enfermarias, apartamentos, berçário ou unidade de terapia intensiva, e esse exame exige coleta de sangue arterial, o qual, muitas vezes, é encaminhado ao laboratório na própria seringa, sem que haja divisão prévia da amostra para os demais exames solicitados. A divisão posterior para realização do hemograma não deve ser feita porque não se consegue a perfeita homogeneização do sangue no interior da seringa. Quando junto à solicitação de gasometria também se tem a do hemograma, a amostra sanguínea deve ser separada no momento da coleta. A lâmina deve ser confeccionada logo após o término da punção, não sendo recomendado que ela seja feita no laboratório, porque a gasometria é coletada com heparina e esta interfere na coloração das células. Outra situação em relação a pacientes internados (algumas vezes, pacientes ambulatoriais) é que a coleta pode ser difícil e a amostra inadequada para o exame, mas, por insistência médica ou por se querer cumprir a prescrição solicitada, ela é encaminhada para realização de exames hematólogicos. Esse tipo de amostra não é apropriado para a realização de exames hematológicos, porque a interpretação do exame pode ficar muito comprometida. Muitas vezes, esse resultado inadequado pode ser comparado com outro em que a coleta não estava difícil e não se tem uma explicação para a variação entre os resultados.

Em muitos hospitais com UTI (geral ou neonatal) ou com berçário, a coleta não é realizada pelo laboratório. Nessas situações, a responsabilidade sobre a coleta é do profissional que a executa e não do laboratório, que passa a ser um executor

do material que lhe foi enviado e que não tem responsabilidade sobre troca de amostras, sobre as condições de coleta (traumáticas) e sobre o uso do anticoagulante (foi usado o anticoagulante correto? A relação sangue/anticoagulante foi obedecida?). Essa responsabilidade deve estar documentada pelo laboratório junto ao(s) responsável(is) pela coleta e, no laudo, deve ser escrito “amostra enviada ao laboratório”.

Uma causa grave e potencialmente fatal de erro pré-analítico é a troca de amostra ou coleta de sangue de um paciente em um tubo identificado com o nome de outro, que gera um erro subsequente de transcrição do resultado. Esses erros podem ocorrer em qualquer fase e, apesar dos sistemas informatizados com código de barras para a identificação das amostras dos pacientes, é essencial ter um processo de verificação cruzada.

É interessante que o laboratório oriente e esclareça o paciente sobre os riscos de uma punção sanguínea, um processo invasivo que pode ter como consequência a formação de hematoma, o que judicialmente caracteriza lesão corporal. No dia da coleta, o paciente não deve realizar tarefas que exijam esforço físico com o braço que sofreu a punção. Essas orientações podem estar afixadas na sala de coleta (em local perfeitamente visível) ou ser entregues ao paciente antes da coleta. Alguns laboratórios, ao cadastrar o paciente, geram um documento que contém as informações sobre os riscos da coleta. O paciente, após a leitura, dá ciência no documento.

■ TEMPO DE GARROTEAMENTO

O tempo de garroteamento (aplicação do torniquete) não deve ultrapassar 1 minuto e, logo após a entrada do sangue no bisel da agulha, ele deve ser liberado. Um garroteamento além desse tempo ocasiona estase localizada, hemoconcentração, hemólise e infiltração de sangue nos tecidos, resultando em aumento do volume globular e alterações no TP, TTPa, fibrinogênio, D-dímeros e fatores da coagulação. A coleta de alguns testes especiais de coagulação, como o fragmento 1+2 da protrombina (PF1.2) e o complexo trombina-antitrombina (TAT), deve ser realizada sem o uso de garrote, pois pode provocar elevações espúrias desses marcadores, particularmente se o tempo de garroteamento ultrapassar 1 minuto. Caso, na procura de uma veia, o paciente fique garroteado por muito tempo, quando a veia for localizada, o garrote deve ser liberado e, após a

normalização da circulação, em torno de 2 minutos, garroteia-se novamente para proceder a punção. Todos os fatores relacionados com os procedimentos de coleta são de responsabilidade dos profissionais do laboratório. Esses profissionais devem entender plenamente a importância da coleta e dos fatores técnicos sobre o resultado dos exames hematológicos e devem ser reciclados periodicamente, no sentido de sempre melhorarem a qualidade dos serviços prestados.^{11,13,14}

ORDEM DOS TUBOS NA COLETA DE SANGUE

No momento da coleta, durante a troca de tubos, existe a possibilidade de contaminação de um tubo para outro com microrganismos, aditivos e líquido tecidual. Este último possui especial importância nos testes de coagulação, tanto que, na década de 1940, Armand Quick, o inventor do TP, afirmou que “suco de tecido” é o interferente externo mais importante que pode influenciar a coagulação e que qualquer traço desse suco deveria ser excluído das amostras a serem analisadas.¹⁵ O documento H3-A6 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹⁴ preconiza uma ordem de coleta para os tubos a vácuo cuja sequência é apresentada na **Tabela 1.1**.

Nas punções capilares, recomenda-se que o primeiro tubo seja o de EDTA ou outro tubo com anticoagulante, caso não tenha sido solicitado o hemograma. Esse procedimento proporciona mais acurácia aos testes hematológicos.

MATERIAL DO TUBO DE COLETA (VIDRO OU PLÁSTICO)

Por muitos anos, os tubos de vidro foram o padrão para se obterem amostras de sangue em laboratórios clínicos. Contudo, devido ao interesse crescente pela segurança dos profissionais do laboratório, além da necessidade de facilitar a eliminação de resíduos biológicos, tubos de plástico foram desenvolvidos. Os tubos de plástico possuem algumas vantagens sobre os de vidro: maior resistência a choques mecânicos, maior tolerância a altas velocidades de centrifugação, menor formação de resíduos sólidos após incineração, além de serem mais flexíveis para uso em laboratórios automatizados e com manuseio de amostras por meio de sistemas robotizados.

Nos exames de coagulação, quando se utilizam tubos de vidro, a própria superfície interna do tubo pode atuar como ativador dos fatores de contato (cininogênio de alto peso molecular, pré-calicreína, fator XI e XII), além de haver elevado risco de os

TABELA 1.1 Ordem dos tubos de coleta e as razões para tal ordem			
ORDEM DE COLETA	TIPO DO TUBO	COR DA TAMPA	RAZÕES
1	Hemocultura	Geralmente amarela	Minimizar as chances de contaminação bacteriana
2	Tubos com citrato de sódio para coagulação	Azul	Deve ser o primeiro tubo com anticoagulante, pois todos os demais anticoagulantes e aditivos alteram os testes de coagulação
3	Tubos com citrato de sódio para VHS automatizado	Preta	Minimizar as chances de contaminação por outro anticoagulante senão o próprio citrato
4	Tubos de vidro para soro e sem aditivos	Vermelha	Prevenir a contaminação por aditivos de outros tubos
5	Tubos de plástico para soro, com ativador de coágulo, com ou sem gel separador	Amarela ou vermelha	Devem ser preenchidos após os tubos de coagulação, pois as partículas de sílica ativam a coagulação e alteram os seus testes
6	Tubos com heparina com ou sem gel separador de plasma	Verde	A heparina altera os testes de coagulação e interfere na obtenção de soro
7	Tubos com EDTA	Roxa	O EDTA é o maior responsável por problemas de arraste. Eleva os resultados de TP e o TTPa. Diminui os níveis de ferro
8	Tubos com oxalato/fluoreto de sódio	Cinza	Aumenta os níveis de sódio e de potássio e altera a morfologia dos eritrócitos

VHS, velocidade de hemossedimentação; EDTA, ácido etilenodiaminotetracético; TP, tempo de protrombina; TTPa, tempo de tromboplastina parcial ativada.
Fonte: Adaptada de McCall e Tankersley¹⁰ e Clinical and Laboratory Standards Institute.¹⁴

vidros se quebrarem e provocarem cortes e exposição a material infectante. Embora os tubos de coagulação possam ser de vidro ou plástico, os valores de referência podem variar se a amostra é coletada em tubo de vidro ou em tubo de plástico. Para evitar essa situação, os laboratórios devem padronizar o tipo do material do tubo utilizado.^{11,13} Em relação ao hemograma, não há diferenças evidentes e clinicamente significativas sobre o uso de tubos com EDTA compostos de vidro ou de plástico.¹⁶

■ HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS APÓS A COLETA DE SANGUE

Logo após a coleta, os tubos devem ser homogeneizados suavemente por inversão para que o anticoagulante se misture adequadamente na amostra. Não se deve homogeneizar vigorosamente os tubos de citrato, sob o risco de hemolisar *in vitro* e promover a ativação das plaquetas e fatores da coagulação, interferindo, dessa forma, nos testes de coagulação. A homogeneização inadequada da amostra promove a formação de microcoágulos pelo fato do anticoagulante não se dissolver adequadamente. O documento H3-A6 do CLSI¹⁴ preconiza que os tubos destinados ao hemograma precisam ser homogeneizados gentilmente por inversão durante 8 a 10 vezes, e os tubos destinados a testes de coagulação e VHS precisam, pelo menos, de 3 a 6 suaves inversões.

■ HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS PREVIAMENTE À FASE ANALÍTICA

Há um intervalo de tempo, entre a coleta e a realização do exame, em que o tubo fica parado e ocorre a sedimentação dos eritrócitos. Para que a amostra possa ser contada adequadamente, ela deve ser homogeneizada antes do exame, em homogeneizadores hematológicos por 5 minutos, sobretudo, se o analisador hematológico não possuir sistema de carregamento de amostras em *racks*. Caso possua, deve-se fazer uma validação do mecanismo homogeneizador do contador. Para isso, analisa-se uma *rack* com 10 amostras aleatórias, previamente homogeneizadas durante 5 minutos. Em seguida, deixa-se as amostras repousarem durante 4 horas para, após, serem analisadas diretamente e sem prévia homogeneização. A homogeneização será feita pelo mecanismo homogeneizador do analisador. Compara-se a contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A variação máxima permitida entre esses dois procedimentos

é: eritrócitos ($\pm 1,5\%$); leucócitos ($\pm 3\%$) e plaquetas ($\pm 5\%$). Amostras que vão ser recontadas e que estavam em repouso por algum tempo devem ser homogeneizadas por 15 minutos, principalmente quando se quer confirmar a contagem de plaquetas. Amostras refrigeradas, antes de serem homogeneizadas, devem adquirir a temperatura ambiente.

■ ANTICOAGULANTES

Os anticoagulantes mais comumente utilizados para exames hematológicos são o EDTA, a heparina e o citrato de sódio. O sangue coletado deve ser anticoagulado com uma concentração adequada do anticoagulante, sobretudo para evitar erros resultantes de uma relação sangue/anticoagulante inadequada. Idealmente, as amostras sanguíneas normais devem ser processadas em até 4 horas após a coleta e as anormais em até 1 hora depois. A dificuldade no laboratório é saber se a amostra é normal ou não; ele deve, então, estabelecer um protocolo que determine o tempo em que as amostras devem ser processadas e esse tempo deve ser o mais rápido possível. Na sequência, serão descritas as características dos principais anticoagulantes utilizados na hematologia, assim como possíveis problemas resultantes de uma relação sangue/anticoagulante inadequada ou de um tempo de estocagem prolongado.

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

Embora uma ampla variedade de anticoagulantes tenha sido utilizada no passado na realização do hemograma, incluindo vários tipos de soluções de oxalato e até mesmo a heparina, o quelante de cálcio, chamado ácido etilenodiaminotetracético (EDTA – $C_{10}H_{16}N_2O_8$), ou alguns dos seus sais, tornaram-se os principais anticoagulantes para a coleta de amostras destinadas à realização de hemogramas. Na molécula do EDTA, existem quatro hidrogênios simétricos que podem ser substituídos por potássio, sódio ou lítio, de modo a formar sais de EDTA que possuem elevada solubilidade no sangue. O EDTA exerce seu efeito por meio de uma forte ligação ao cálcio iônico presente no plasma, bloqueando efetivamente a coagulação e a agregação plaquetária. Apesar disso, o EDTA não pode ser utilizado para o estudo dos fatores da coagulação pelo fato de provocar mudanças na estrutura química do fator V, fibrinogênio e trombina. A quantidade de EDTA necessária para a completa quelação do cálcio é balanceada

com o desejo de minimizar os danos celulares, de modo que o International Council for Standardization in Haematology (ICSH) estabeleceu uma faixa de concentração ideal que pode variar de 1,5 a 2,2 mg do sal por mililitro de sangue. O EDTA-K₂ e o EDTA-Na₂ são disponibilizados na forma de um *spray* seco que reveste a parede dos tubos. O EDTA-K₂ é mais solúvel que o EDTA-Na₂ (1.650 g/L contra 108 g/L, respectivamente), sendo, por essa razão, o sal recomendado para uso rotineiro pelo ICSH. O EDTA-K₂ também elimina efeitos dilucionais nas amostras, especialmente as de pequeno volume. O EDTA-K₃ é comercializado na forma líquida e pode diluir levemente as amostras. Além disso, os eritrócitos podem ser contraídos devido a um efeito osmótico mais pronunciado que os demais sais do EDTA, resultando em uma diminuição do volume globular de cerca de 2 a 3% nas primeiras 4 horas.^{4,14,17-19}

A título de curiosidade, o EDTA também existe na forma de EDTA-Li₂ e EDTA-Na₃. O sal dilúcio (EDTA-Li₂) é efetivo em relação à ação anticoagulante, possuindo uma solubilidade de 160 g/L, além de poder ser utilizado para dosagens bioquímicas; contudo, é menos solúvel que o EDTA-K₂. Já o EDTA-Na₃, comercializado na forma líquida, não é recomendado por possuir pH elevado, que pode afetar adversamente proteínas do plasma e até mesmo tubos de coleta feitos de vidro.^{4,14,17-19}

Em muitos laboratórios clínicos, é comum o fato de amostras de sangue chegarem com atraso de 2 dias ou mais. Quando essas amostras chegam ao laboratório, é comum surgirem dúvidas sobre aceitá-las ou não, quais parâmetros analisar quando a amostra for aceita e quais comentários reportar no laudo, considerando a confiabilidade ou não dos resultados. Essas decisões requerem experiência e conhecimento dos profissionais do laboratório, sobretudo em relação às mudanças que ocorrem nas amostras de sangue durante o período de armazenamento.

Quando a amostra é coletada em EDTA di ou tripotássico e, em seguida, armazenada em repouso na temperatura ambiente (18 a 25 °C), a contagem de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e os índices hematimétricos são, em geral, estáveis por até 8 horas após a coleta da amostra. A partir desse período, mudanças começam a acontecer; contudo, em até 24 horas de armazenamento, os resultados ainda se encontram dentro do limite de erro permitido de Tonks.^{19,20}

Contagens hematológicas realizadas em amostras coletadas em EDTA e armazenadas a 4 °C não apresentam erros significativos durante as primeiras 24 horas. Assim, o sangue pode ser seguramente armazenado em refrigerador, ao longo de uma noite, para ser analisado no dia seguinte, desde que cuidados contra o congelamento sejam tomados. Tem sido sugerido que os resultados de hemogramas de amostras coletadas em EDTA devam permanecer dentro de $\pm 5\%$ dos valores iniciais quando armazenados a 4 °C durante 24 horas.^{4,19,21}

Tempo de armazenamento acima de 24 horas pode produzir resultados conflitantes e pouco reprodutíveis, independentemente do desempenho analítico e da metodologia empregada no analisador hematológico, haja vista ocorrer oscilação da estabilidade dos parâmetros hematológicos nesses tipos de amostra. Há parâmetros, como a contagem de leucócitos, que são estáveis por 24 horas em temperatura ambiente e por até 48 horas a 4 °C. Todavia, diferenças são encontradas, especialmente quando métodos de contagem baseados no princípio da impedância são utilizados.¹⁹

A contagem absoluta de linfócitos pode diminuir progressivamente ao longo do tempo, podendo chegar a até 50% da contagem inicial após 72 horas de armazenamento. Em situações especiais, como a utilização da contagem absoluta de linfócitos para quantificar CD₄+, a amostra deve ser processada dentro de poucas horas e nunca ser armazenada previamente.¹⁹

Depois de 8 horas de armazenamento em temperatura ambiente, o VCM aumenta em uma taxa progressiva de 3 a 4 fL a cada 24 horas. Tal efeito não é observado se a amostra for armazenada a 4 °C por até 24 horas. As contagens de reticulócitos geralmente são confiáveis por até 24 horas a 4 °C quando coletadas em EDTA; entretanto, em temperatura ambiente, a contagem começa a diminuir dentro de 6 horas. Os eritroblastos tendem a desaparecer da amostra dentro de 1 a 2 dias de armazenamento em temperatura ambiente. Dentro de 48 a 72 horas, e especialmente em temperatura ambiente alta, começa-se a observar hemólise nas amostras, fato este que resulta em diminuição da contagem de eritrócitos e do volume globular, com aumento da hemoglobina corpuscular média (HCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) calculado.^{4,19,21}

Percebe-se que alguns parâmetros são mais estáveis quando mantidos em temperatura ambiente

e outros quando refrigerados a 4 °C. Portanto, para que resultados equivocados não sejam gerados e liberados, deve-se evitar analisar amostras além de 24 horas de armazenamento, independentemente da temperatura.

Longos períodos de armazenamento das amostras coletadas em EDTA provocam mudanças significativas na morfologia das células sanguíneas. Os neutrófilos podem apresentar mudanças no núcleo, o qual se cora mais homogeneamente que em sangue fresco, tornando-se, às vezes, picnóticos e apresentando figuras de cariorréxis. Pode-se ainda observar margens celulares irregulares e menos definidas, e alguns vacúolos podem aparecer no citoplasma. Os monócitos e os linfócitos sofrem mudanças semelhantes, podendo apresentar pequenos vacúolos citoplasmáticos e lobulação irregular do núcleo.^{4,19}

Já os eritrócitos podem apresentar crenação e esferotização após longos períodos de armazenamento em contato com o EDTA. Todas as alterações morfológicas citadas anteriormente diminuem quando a amostra é mantida a 4 °C, mas não são eliminadas, tornando imprescindível a confecção de extensões sanguíneas o mais breve possível após a coleta da amostra. Trabalhos sugerem que um atraso de 3 horas na confecção da extensão é permitido sem maiores interferências.^{4,19}

O fato de laboratórios utilizarem diferentes formas de EDTA pode, em alguns casos, dificultar a comparabilidade de resultados. Esse erro é agravado pelo fato de que, algumas vezes, pouco cuidado é despendido para garantir a proporção correta de sangue/anticoagulante na amostra.

Heparina

A heparina é um mucopolissacarídeo com características ácidas e exerce ação anticoagulante por ser um inibidor da molécula de antitrombina. Consequentemente, acelera a inibição dos fatores Xa, IXa e trombina. A heparina está disponível na forma de sais de lítio, sódio e amônio. Ela preserva a forma e o volume dos eritrócitos e é usada em vários testes que avaliam a série vermelha, sendo o anticoagulante de escolha para a realização do teste de fragilidade osmótica, além de ser o mais adequado para a imunofenotipagem por manter os leucócitos viáveis de um dia para o outro. A heparina não é adequada para o hemograma devido ao fato de induzir aglutinação de leucócitos e plaquetas. Outra contraindicação é que as extensões

sanguíneas realizadas a partir de amostras coletadas com heparina apresentam uma coloração de fundo avermelhada, e as bordas celulares ficam realçadas na mesma cor. A heparina inibe a atividade enzimática e não deve ser utilizada na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com enzimas de restrição. Recomenda-se utilizar a heparina na concentração de 10 a 30 U/mL de sangue.^{4,11}

Citrato de sódio

O anticoagulante de escolha para o estudo dos fatores da coagulação é o citrato de sódio (tubo com tampa azul). A Organização Mundial de Saúde (OMS) e o documento H21-A5 do CLSI¹² recomendam o uso do citrato de sódio 3,2% (109 mmol/L), com o citrato na forma di-hidratada ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), em vez do citrato de sódio 3,8% (129 mmol/L), embora ambos sejam adequados para os testes de coagulação.^{12,22} Para reduzir a variabilidade nos testes de coagulação, os laboratórios devem padronizar a concentração do citrato e utilizar valores de referência apropriados para a concentração utilizada. O tempo para a formação do coágulo *in vitro* tende a ser maior na presença do citrato 3,8% do que na do 3,2% pelo fato de que quanto maior a concentração de citrato, mais cálcio adicionado no ensaio será quelado, o qual se torna menos disponível para possibilitar a formação do coágulo. Laboratórios de apoio que recebem amostras aliquotadas de plasma congelado devem ficar em alerta para a possibilidade dessas amostras terem sido coletadas com outros anticoagulantes, uma vez que o EDTA e a heparina alteram os testes de coagulação.

A relação sangue/anticoagulante é de 1:9, uma parte de anticoagulante para 9 partes de sangue. O citrato de sódio exerce sua atividade anticoagulante devido à sua habilidade em quelar o cálcio, o qual é um componente fundamental para formação do coágulo. Tubos preenchidos com sangue em níveis abaixo do volume adequado possuem proporção aumentada de citrato em relação ao sangue, o que permite aumentar a quelação de cálcio e pode levar a um aumento dos testes de coagulação. Tubos subpreenchidos com sangue em citrato 3,8% são mais propensos à prolongação do tempo dos testes de coagulação que aqueles com citrato 3,2%, pelo fato de que quanto maior for a concentração de citrato, mais cálcio adicionado ao ensaio será quelado. Tubos subpreenchidos mostram elevações significati-

vas dos resultados quando o volume for menor que 75 a 90% do recomendado.^{13,23}

Tubos preenchidos com sangue além do volume nominal do tubo podem limitar o procedimento de homogeneização da amostra, resultando em formação de microcoágulos *in vitro*. É proibido combinar 2 amostras de citrato do mesmo paciente, pois pode levar à duplicação da concentração e anticoagulante além da diluição da amostra, prolongando o tempo dos testes.

A relação sangue/anticoagulante de 9:1 é válida para valores de volume globular (VG) ou hematócrito (HT) de 45%, com uma variação permitida entre 25 e 55%. Valores de VG ou HT abaixo ou acima desta variação devem ter a quantidade de anticoagulante corrigida, pois o citrato se distribui apenas no plasma e não entra nas células. Amostras com VG > 55% mimetizam os efeitos de tubos subpreenchidos devido à menor quantidade de plasma disponível. Para exemplificar como deve ser feita a correção do anticoagulante, pode-se supor que o laboratório colete 4,5 mL de sangue para 0,5 mL de anticoagulante (relação 1:9).

Para um VG de 45%, tem-se 55 mL de plasma em 100 mL de sangue total. Então:

55 mL de plasma 100 mL de sangue total (VG 45%)
x mL de plasma 4,5 mL de sangue total
 $x = 2,475$ mL de plasma em 4,5 mL de sangue total
para um VG de 45%.

Caso o paciente tenha um VG de 70%, terá 30 mL de plasma. Então:

30 mL de plasma 100 mL de sangue total (VG 70%)
x mL de plasma 4,5 mL de sangue total
 $x = 1,35$ mL de plasma em 4,5 mL de sangue total
para um VG de 70%.

Deve ser utilizado 0,5 mL de anticoagulante para 2,475 mL de plasma (VG = 45%). O paciente em questão tem 1,35 mL de plasma; portanto, não pode ser utilizada a mesma quantidade de anticoagulante. A correção é feita pelo seguinte cálculo:

0,5 mL de anticoagulante 2,475 mL de plasma (VG 45%)
x mL de anticoagulante 1,35 mL de plasma (VG 70%)
 $x = 0,27$ mL de anticoagulante para um VG de 70%.

Conforme documento H21-A5 do CLSI,¹² amostras com VG acima de 55% também podem ter a quantidade de citrato corrigida pela seguinte fórmula:

$$C = (1,85 \times 10^{-3}) \times (100 - VG) \times (V)$$

C = volume de citrato que deve permanecer no tubo
VG = volume globular do paciente
V = volume de sangue que será coletado
 $1,85 \times 10^{-3}$ = constante da fórmula

Considerando o exemplo anterior:

$$C = (1,85 \times 10^{-3}) \times (100 - 70) \times (5)$$

C = 0,27 mL de anticoagulante para um VG de 70%.

No exemplo proposto, caso a quantidade de anticoagulante não seja corrigida, haverá um excesso de 0,23 mL de anticoagulante, e esse excesso presente no plasma coletado irá inibir o cálcio utilizado na realização do TP (tromboplastina cálcica) e do TTPa (adição de CaCl_2). A inibição do cálcio (combinado com o anticoagulante em excesso) fará com que aumente o resultado do TP e do TTP. Caso o VG do paciente esteja abaixo da variação permitida, haverá falta de anticoagulante, levando à formação de coágulos ou microcoágulos, ativando ou consumindo os fatores da coagulação, com resultados para mais ou para menos do valor real. Na prática, observa-se que VG abaixo da variação não tem o resultado tão alterado, mas valores acima da variação mostram resultados bastante alterados. Sempre que o valor do VG estiver fora da variação permitida, a quantidade de anticoagulante deve ser corrigida.

O correto seria que, antes de coletar sangue para TP ou TTPa, fosse feito o VG ou HT do paciente e, posteriormente, o sangue citratado fosse coletado na relação correta. Como esse procedimento é inviável na rotina laboratorial, deve ser padronizado que, após a centrifugação da amostra sanguínea, seja avaliada a relação dos eritrócitos sedimentados pelo plasma. É fácil evidenciar a quantidade de plasma com relação aos eritrócitos quando o VG está abaixo de 25 ou acima de 55%. Caso tenha sido solicitado hemograma do paciente, sabe-se qual o valor do VG e se a quantidade de anticoagulante deve ou não ser corrigida. Caso haja necessidade de corrigir a quantidade de anticoagulante, uma recoleta deve ser solicitada.

Uma maneira simples de superar os efeitos do citrato nas amostras com VG elevado, considerando que, na maioria das vezes, as amostras apresentaram VG entre 55 e 65%, é remover 20% do volume de citrato de sódio contido no tubo de coleta.

O tempo entre a coleta e a análise depende do exame a ser realizado e da temperatura de arma-

zenamento. A **Tabela 1.2** contém o tempo de armazenamento dos principais exames de acordo com a temperatura.

Os cuidados pré-analíticos são críticos para manter a integridade da amostra e a qualidade dos resultados em hemostasia. O **Quadro 1.3** resume informações sobre fontes de erro pré-analítico e condições que tornam a amostra ideal ou não.

❖❖ CONFEÇÃO DAS EXTENSÕES SANGÜÍNEAS LOGO APÓS A COLETA

As extensões sanguíneas confeccionadas com sangue sem anticoagulante e imediatamente após a coleta devem permanecer em temperatura ambiente até secarem completamente. Não se deve assoprar ou utilizar secadores ou ventiladores para secar as extensões, nem deixá-las em temperatura ambiente durante mais de 5 horas, pois tudo isso pode resultar em artefatos inaceitáveis, como equinócitos, esferócitos e leucócitos degenerados.

As amostras devem ser transportadas para o laboratório o mais rápido possível, mas caso não sejam, elas devem ser fixadas com metanol a fim de preservar as características intrínsecas de cada tipo celular.²⁵ No Capítulo 3, Fase analítica: Análise morfológica do sangue periférico e sua correlação com o hemograma, estão descritas as técnicas de confecção e coloração das lâminas.

❖❖ TRANSPORTE E PROCESSAMENTO

As amostras devem ser acondicionadas em maletas que ofereçam garantia de biossegurança no transporte, assim como resistência a choque e variações de temperatura e pressão. De um modo geral, as amostras devem ser transportadas para o laboratório em temperatura ambiente (15-22 °C) e no menor tempo possível. O ideal é que as amostras de TP e TTPa sejam processadas dentro de 4 horas após a coleta. Já as amostras de hemograma devem ser processadas em até 6 horas quando

TABELA 1.2 Tempo de armazenamento dos principais testes de coagulação conforme a temperatura			
EXAME	TEMPERATURA AMBIENTE	2 A 8 °C	-20 °C
TP	24 h, centrifugado ou não	Não armazenar	2 semanas
TTPa	4 h	4 h	2 semanas
TT	4 h	Não armazenar	2 semanas
Fibrinogênio	24 h, se centrifugado	Não armazenar, pois o fibrinogênio pode precipitar	2 semanas
Proteína C e S	4 h	Não armazenar	6 meses
Fatores	Nunca armazenar em temperatura ambiente	Não armazenar	2 semanas

Fonte: Adaptada de Adcock¹³ e Medeiros Jr e Munhoz.²⁴

QUADRO 1.3 Fontes de erro pré-analítico e condições da amostra em hemostasia		
FONTES DE ERROS PRÉ-ANALÍTICOS	CONDIÇÕES IDEAIS DA AMOSTRA	CAUSAS DE REJEIÇÃO DA AMOSTRA
Preenchimento incompleto do tubo	Coleta sem trauma e com uso mínimo do torniquete	Amostra coletada em outro anticoagulante que não seja o citrato
Uso de outro anticoagulante que não seja o citrato	Preencher o tubo adequadamente, conforme volume nominal	Amostras totalmente coaguladas ou com microcoágulos
Adicionar sangue de outro tubo para preencher um tubo de citrato subpreenchido	Homogeneizar a amostra suavemente por 5-8 inversões	Amostras preenchidas com < 75% do volume nominal do tubo
Homogeneização inadequada	Transportar a amostra rapidamente para o laboratório e em temperatura ambiente	Amostras preenchidas demasiadamente
Armazenar amostra não centrifugada em congelador	Centrifugar dentro de 1 h após a coleta	Amostras hemolisadas por provocarem flutuações nos resultados
Demora no transporte da amostra para o laboratório	Fazer os testes imediatamente após a centrifugação, a qual deve fornecer um plasma pobre em plaquetas (< 10.000/μL)	Amostras lipêmicas dependendo do princípio empregado no coagulômetro

Fonte: Adaptada de Adcock¹³ e Comar e colaboradores.²³

mantidas em temperatura ambiente e em até 24 horas se armazenadas entre 2 e 8 °C.^{19,26} **O documento H18-A4 do CLSI²⁷ descreve detalhadamente os procedimentos para o manuseio e transporte de amostras de diagnóstico.** Na hematologia, **é fundamental** respeitar principalmente as temperaturas de transporte a fim de não alterar os fatores da coagulação e não degenerar as células sanguíneas.^{8,27}

▄ CENTRIFUGAÇÃO

Recomenda-se que o tempo entre a coleta e a centrifugação não ultrapasse uma hora. Como a maioria dos exames de coagulação é realizada em amostras de plasma pobre em plaquetas, com concentração de plaquetas no plasma inferior a 10.000/μL, torna-se necessário verificar periodicamente o funcionamento da centrífuga. Para essa verificação, deve-se selecionar algumas amostras da rotina e fazer a contagem de plaquetas antes e depois da centrifugação. Após a centrifugação, todas as amostras devem ter menos de 10.000 plaquetas/μL, mas caso apresentem resultados superiores, deve-se aumentar o tempo de centrifugação ou ajustar as configurações da centrífuga a fim de se obter plasmas pobres em plaquetas adequados para se realizar os testes de coagulação. O estudo deve ser repetido após ajuste ou redefinição do tempo de centrifugação para garantir a sua efetividade. A velocidade de centrifugação sugerida para gerar plasmas adequados é de 1500g durante 15 minutos ou mais.^{24,28}

VARIÁVEIS ENDÓGENAS

▄ MEDICAMENTOS E ANALITOS

Vários medicamentos como anti-inflamatórios, anticoagulantes orais, antirretrovirais, entre outros, interferem nos exames hematológicos, e, por isso, o paciente deve ser questionado quanto ao uso de medicamentos eventuais ou crônicos e a forma de administração. O laboratório deve estabelecer um protocolo de questionamentos a ser respondido pelo paciente. O preenchimento correto desse protocolo fica a cargo da recepção do laboratório, a qual deve estar capacitada para essa função. O aumento da concentração de uma substância química pode afetar algumas determinações hematológicas. Assim, níveis de glicose superiores a 600 mg/dL podem levar a um aumento transitório do VCM na medida em que a água entra nos eritrócitos. No

entanto, saídas de água dos eritrócitos junto com a glicose restauram o VCM original. Esse efeito hipoglicêmico transitório pode ser superado por uma microdiluição da amostra de sangue em solução salina e uma espera de 5 minutos até a amostra ser analisada novamente.

Hiperlipidemias, incluindo níveis de triglicerídeos superiores a 1.000 mg/dL podem provocar aumento espúrio da concentração de hemoglobina nos analisadores hematológicos pelo fato de ela ser determinada por espectrofotometria. Esse efeito pode ser superado por meio de centrifugação da amostra, retirada do plasma lipêmico e subsequente ressuspensão do concentrado ou papa de hemácias em igual volume de soro fisiológico ou diluente do equipamento antes da análise. Após essa análise, considera-se apenas o novo valor de hemoglobina e recalcula-se as constantes corpusculares (HCM e CHCM). Quanto aos demais parâmetros, como contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas e o volume globular, mantêm-se os valores da primeira análise, com a amostra ainda lipêmica, pelo fato de poderem ser alterados com a manipulação da amostra para a dosagem da hemoglobina corrigida. A seguinte fórmula também pode ser utilizada para a correção da hemoglobina em amostras lipêmicas; contudo, ela só funciona para amostras com VCM dentro dos valores de referência. Da mesma maneira, a hemoglobina corrigida substitui a antiga e recalcula-se as constantes corpusculares (HCM e CHCM):

$$\text{Hemoglobina corrigida} = \frac{\text{VCM (dentro dos valores de referência)} \times \text{RBC}}{2,98 \times 10}$$

VCM = volume corpuscular médio

RBC = eritrócitos (do inglês *red blood cells*)

A turbidez resultante da precipitação de proteínas monoclonais, vista em pacientes com mieloma ou macroglobulinemia, pode falsamente elevar a concentração de hemoglobina e a contagem de leucócitos e, em alguns casos, com precipitação intensa e com gelificação das amostras, impossibilita totalmente a análise automatizada.

Aglutininas eritrocitárias, hiperglicemia, fragmentação eritrocitária, contagens elevadas de linfócitos, presença acentuada de plaquetas gigantes, agregados plaquetários e microcitose intensa provocam alterações espúrias da amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW, do inglês *red blood cell distribution width*).²⁹⁻³²

■ ANTICORPOS CIRCULANTES

A presença de alguns anticorpos endógenos, que são produzidos pelos pacientes em determinadas épocas e por tempo indeterminado, podem alterar os resultados de testes hematológicos. A presença de anticorpos chamados de anticoagulante lúpico e anticardiolipina alteram o TTPa e outros testes dependentes de fosfolípidios.⁶ O EDTA, após quelar o cálcio, pode expor anticorpos endógenos direcionados contra o complexo de glicoproteínas IIb/IIIa das plaquetas, provocando sua aglutinação em um fenômeno *in vitro* chamado de pseudotrombocitopenia, induzido pelo EDTA, e que está presente em cerca de 0,1% da população. Essa reação antígeno anticorpo é acentuada em baixas temperaturas, incluindo a temperatura ambiente, e provoca diminuição espúria da contagem de plaquetas e aumento espúrio da contagem de leucócitos quando os agregados plaquetários são do mesmo tamanho que os leucócitos.³³ Anticorpos IgM dependentes de EDTA provocam leucoaglutinação em temperatura ambiente, a qual é percebida na observação da lâmina e pode provocar diminuição espúria da contagem automatizada de leucócitos.³⁴ O satelitismo plaquetário é um fenômeno que ocorre *in vitro*, em temperatura ambiente, quando plaquetas circundam os neutrófilos ou são fagocitadas pelos mesmos devido a autoanticorpos IgG dependentes de EDTA, que são direcionados para receptores nas membranas das plaquetas e dos neutrófilos, provocando diminuição espúria da contagem de plaquetas.³⁵

Essas situações podem ser minimizadas quando se reanalisa a amostra imediatamente após aquecê-la, por 30 minutos, a 37 °C. Caso não resolva, deve-se levar uma alíquota da amostra em um agitador de vórtex e agitá-la durante 3 minutos em alta velocidade, a fim de romper o complexo antígeno anticorpo. Uma lâmina pós-vórtex deve ser examinada para verificar a eficiência desse procedimento antes de reportar o resultado. Se a contagem de plaquetas ou leucócitos ainda estiver alterada, deve-se solicitar coleta em outro anticoagulante, normalmente o citrato de sódio. Quando se contam plaquetas em amostra coletada em citrato, deve-se corrigir a contagem em função da diluição da amostra, haja vista o citrato ser líquido numa relação 1:9. Para corrigir, basta multiplicar o valor da contagem automatizada de plaquetas por 1,1, que é o fator da diluição. Pode-se, ainda, analisar a amostra imediatamente após a

coleta. Entretanto, não se recomenda coletar amostras de sangue sem anticoagulantes e nem analisá-las imediatamente após a coleta, pois trazem risco de entupimento para o analisador hematológico, comprometendo o bom andamento da rotina.^{36,37}

As crioaglutininas são anticorpos completos do tipo IgM e podem aparecer em alguns pacientes com anemia hemolítica autoimune e com pneumonias atípicas, entre outras doenças. Esses anticorpos provocam aglutinação dos eritrócitos em temperaturas abaixo de 37 °C, prejudicando a contagem de eritrócitos e reticulócitos, a determinação do VG e das constantes corpusculares. Geralmente, a contagem de eritrócitos e o VG são falsamente diminuídos enquanto o VCM, HCM e o CHCM são falsamente aumentados. Para contornar essa situação, as amostras devem ser aquecidas, durante 30 minutos, a 37 °C antes das contagens serem realizadas.³⁸

Anticorpos EDTA dependentes também podem induzir o aparecimento da pseudo-síndrome das plaquetas cinzentas. Os anticorpos são distintos dos implicados na pseudotrombocitopenia EDTA dependente, os quais induzem a liberação do conteúdo dos grânulos alfa e delta das plaquetas, sem que haja agregação plaquetária. A pseudo-síndrome das plaquetas cinzentas só é induzida pelo EDTA; não ocorre com outros anticoagulantes e não é observada em lâminas confeccionadas com sangue sem anticoagulante. Portanto, cuidados devem ser tomados para não associar a presença de plaquetas cinzentas artefatuais com tendências reais de sangramento.³⁷

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os procedimentos realizados no laboratório de hematologia devem estar escritos na forma de procedimento operacional padrão e devem explicar claramente como identificar um paciente, coletar e identificar uma amostra, além de como transportá-la e prepará-la para a fase analítica. Os profissionais que executam os procedimentos pré-analíticos devem compreender não só o que os procedimentos são, mas por que eles são importantes para serem seguidos. Os profissionais precisam saber não só o que acontece se as medidas corretas não forem seguidas, mas também quais erros podem ocorrer e que efeito podem ter sobre a amostra e, principalmente, sobre o paciente. Deve-se prover formação contínua para esses pro-

fissionais do laboratório, e suas competências devem ser avaliadas periodicamente.

Tecnologias modernas e sistemas de informação também podem ajudar a reduzir erros pré-analíticos. Já existe o preparo automatizado da bandeja de flebotomia, o qual fornece o conjunto completo dos tubos de sangue de uma determinada requisição, além das etiquetas de códigos de barras para rotulagem em uma bandeja para cada paciente. Coagulômetros automatizados já disponibilizaram aos laboratórios novos meios para a detecção automática dos índices do plasma, incluindo o índice de hemólise, icterícia e lipemia. Esses índices podem ser úteis para monitorar a qualidade do processo de coleta. Por fim, quando uma amostra não pode ser obtida ou analisada, é de responsabilidade do laboratório comunicar o problema para o médico ou paciente, de modo cortês, sucinto e amigável.³⁹

REFERÊNCIAS

1. Lima-Oliveira GS, Barcelos LF, Corrêa JA, Guimarães JC, Neufeld PM, Grinberg I. Gestão da qualidade na fase pré-analítica parte I: análise crítica do CLSI H3-A6. *Rev Bras Anal Clin*. 2011;43(2):85-8.
2. Lima-Oliveira GS, Picheth G, Sumita NM, Scartezini M. Controle de qualidade na coleta do espécime diagnóstico sanguíneo: iluminando uma fase escura de erros pré-analíticos. *J Bras Patol Med Lab*. 2009;45(6):441-7.
3. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(6):750-9.
4. Jury C, Nagia Y, Tatsumi N. Collection and handling of blood. In: Bain BJ, Bates I, Laffan MA, Lewis SM. *Dacie and Lewis practical haematology*. 11th ed. China: Churchill Livingstone Elsevier; 2012.
5. Mullins CA. Specimen collection. In: Rodak BF, Fritsma GA, Keohane EM. *Hematology: clinical principles and applications*. 4th ed. St. Louis Missouri: Elsevier Saunders; 2012.
6. Narayanan S. The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. *Am J Clin Pathol*. 2000;113(3):429-52.
7. Silva PH, Hashimoto Y, Alves HB. *Hematologia laboratorial*. Rio de Janeiro: Revinter; 2009.
8. Andriolo A, Martins AR, Ballarati CAF, Barbosa IV, Mendes MA, Melo MR, et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso. 2. ed. Barueri: Manole; 2010.
9. Lippi G, Salvagno G, Montagnana M, Franchini M, Guidi GC. Phlebotomy issues and quality improvement in results of laboratory testing. *Clin Lab*. 2006;52(5-6):217-30.
10. McCall RE, Tankersley CM. Phlebotomy and specimen considerations. In: Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical chemistry: techniques, principles, correlations*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
11. Olesinski RL. Specimen collection for hematology and hemostasis. In: Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA, editors. *Clinical hematology: principles, procedures, correlations*. 2nd ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 1998.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays. Approved guideline. 5th ed. Wayne: CLSI; 2008.
13. Adcock DM. Sample collection and processing in hemostasis. In: Marchant-Kottke K, Davis BH, editors. *Laboratory hematology practice*. Singapura: Blackwell; 2012.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Approved standard. 6th ed. Wayne: CLSI; 2007.
15. Quick AJ, Honorato R, Stefanini M. The value and limitations of the coagulation time in the study of hemorrhagic diseases. *Blood*. 1948;3(10):120-9.
16. Van Cott EM, Lewandrowski KB, Patel S, Grzybek DY, Patel HS, Fletcher SR, et al. Comparison of glass K3EDTA versus plastic K2EDTA blood-drawing tubes for complete blood counts, reticulocyte counts, and white blood cell differentials. *Lab Hematol*. 2003;9(1):10-4.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Tubes and additives for venous and capillary blood specimen collection. Approved standard. 6th ed. Wayne: CLSI; 2010.
18. Van Assendelft OW, Parvin RM. Specimen collection, handling and storage. In: Lewis SM, Verwilghen RL. *Quality assurance in haematology*. London: WHO; 1988.
19. Van Assendelft OW, Simmons A. Specimen collection, handling, storage and variability. In: Lewis SM, Koepke JA. *Hematology laboratory management and practice*. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1995.
20. Dalanhol M, Barros M, Mazuchelli J, Silva PH, Hashimoto Y, Largura A. Efeitos quantitativos da estocagem de sangue periférico nas determinações do hemograma automatizado. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(1):16-22.
21. Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, Schwarting R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126(3):336-42.
22. World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy. WHO Technical Reports Series. No 880. Geneva: WHO; 1999.
23. Comar SR, Locatelli GB, Odeli L, Bomfim LK. Avaliação do desempenho analítico do coagulômetro automatizado Sysmex CA-1500: experiência do Hospital de Clínicas da UFPR. *Rev Bras Anal Clin*. 2011;43(3):237-44.
24. Medeiros Jr N, Munhoz MAG. Controle de processo em coagulação. In: Oliveira CA, Mendes ME, organizadores. *Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática*. Rio de Janeiro: ControlLab; 2012. v. 3.
25. Maedel LB, Doig K. Examination of the peripheral blood film and correlation with the complete blood count. In: Rodak BF, Fritsma GA, Keohane EM. *Hematology: clinical principles and applications*. 4th ed. St. Louis Missouri: Elsevier Saunders; 2012.
26. Favaloro EJ, Adcock DM, Lippi G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis. *Lab Med*. 2012;43(2):1-10.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures for the handling and processing of blood specimens for

- common laboratory tests. Approved guideline. 4th ed. Wayne: CLSI; 2010.
28. Lawrence JB. Preanalytical variables in the coagulation laboratory. *Lab Med.* 2003;34(1):49-57.
 29. Bessman JD. Red cells. In: Bessman JD. Automated blood counts and differentials: a practical guide. Baltimore: The Johns Hopkins University; 1986.
 30. Cornbleet J. Spurious results from automated hematology cell counters. *Lab Med.* 1983;14:509-14.
 31. Park KI, Kim KY. Clinical evaluation of red cell volume distribution width (RDW). *Yonsei Med J.* 1987;28(4):282-90.
 32. Flynn MM, Reppun TS, Bhagavan NV. Limitations of red blood cell distribution width (RDW) in evaluation of microcytosis. *Am J Clin Pathol.* 1986;85(4):445-9.
 33. Lippi G, Plebani M. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(8):1281-5.
 34. Yang D, Guo X, Chen Y, Xu G. Leukocyte aggregation in vitro as a cause of pseudoleukopenia. *Lab Med.* 2008;39(2):89-91.
 35. Criswell KA, Breider MA, Bleavins MR. EDTA-Dependent platelet phagocytosis. A cytochemical, ultrastructural, and functional characterization. *Am J Clin Pathol.* 2001;115(3):376-84.
 36. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Pseudotrombocytopenia. *J Bras Patol Med Lab.* 2004;40(5):321-4.
 37. Mues G, Wians Jr FH, Kroft SH. EDTA-Induced pseudo-gray platelet syndrome. *Lab Med.* 2001;32(7):361-4.
 38. Stammering G, Beier L. Use of the XE-2100 in a patient with cold auto-immune hemolytic anemia. *Sysmex J Int.* 2000;10(1):3-12.
 39. Hammerling JA. A review of medical errors in laboratory diagnostics and where we are today. *Lab Med.* 2012;43(2):41-4.