

Processamento da amostra

Centrifugação

É recomendável o uso de centrífuga refrigerada com *swing*, regulada em temperatura entre 18 a 20°C. No caso de obtenção de plasma pobre em plaquetas (PPP), se a centrífuga estiver devidamente calibrada, a rotação de 1700g por 10 minutos ou 1500g por 15 minutos é suficiente para a obtenção de um plasma contendo um número de plaquetas abaixo de 10.000/mm³. Para a pesquisa de anticoagulante lúpico e congelamento do plasma para posterior utilização, após a primeira centrifugação o plasma deve ser retirado e colocado em tubo plástico e centrifugado novamente nas mesmas condições para a retirada completa das plaquetas.

Transporte e estocagem

No quadro abaixo está descrito o tempo de transporte e estocagem das amostras para alguns exames do laboratório de hemostasia.

Determinações	Sangue total		Plasma		
	Temperatura ambiente	Refrigerado	Temperatura ambiente	Refrigerado	Congelado
TP	Até 24 h	Não	Até 24 h	Não	-20°C – 2 semanas
TTPA	Até 4 h	Até 4 h	Até 4 h	Até 4 h	-70°C – 12 meses
Fibrinogênio	Até 24 h	Até 24 h	Até 24 h	Até 24 h	Nitrogênio – 6 anos
Fatores (VIII e IX)	Até 4 h	Até 4 h	Até 4 h	Até 4 h	-20°C – 2 semanas* -70°C – 6 meses Nitrogênio – 6 anos
Quantificação de inibidores	Até 24 h	Até 24 h	Até 24 h	Até 72 h	-20°C – 6 meses -70°C – 12 meses Nitrogênio – 6 anos
Sg total Agregação plaquetária	1 h	Não	Não	Não	Não
Cofator Ristocetina (plasma técnica manual)	4 h	Não	4 h	4h	-20°C – 2 semanas -70°C – 6 meses Nitrogênio – 6 anos
Dosagem de vWAg	4 h	Não	4 h	4 h	

TP – Tempo de Protrombina; TTPA – Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada.

*Segundo CLSI H21-A5, a Federação Mundial de Hemofilia considera a temperatura de -20°C inadequada para estocagem de amostras para quantificação de fatores.

Algumas observações devem ser consideradas no transporte e estocagem das amostras:

- Evitar tempos prolongados de processamento para sangue total para não ocorrer hemólise.
- O descongelamento das amostras deve ser realizado rapidamente em banho-maria a 37°C por 4 a 5 minutos.
- Para amostras mantidas em temperatura ambiente por 24 horas é recomendável a não abertura do tubo para evitar contaminação bacteriana e alteração do pH.

- Evitar agitação e vibração no transporte, principalmente em sistema pneumático.
- Amostras congeladas devem ser pobres em plaquetas.
- Para o transporte de amostras para quantificação de inibidores de fatores, não há necessidade de congelar o plasma, somente manter refrigerado.
- Amostras para controle de heparina não fracionadas, devem ser centrifugadas em até 1 hora após a coleta devido à liberação do PF4 (presente nas plaquetas com função neutralizadora de heparina) e realizar o TTPA em até 4 horas.
- Para dosagem de fatores de coagulação as amostras devem ser transportadas em gelo seco ou congeladas em bloco de gelo (picolé) para que cheguem ao destino congeladas.
- Para o teste de função plaquetária, o sangue deve ser coletado próximo ao local onde é realizado o teste, devido a ativação das plaquetas durante o transporte.

Variáveis do paciente

Existem condições do paciente que podem interferir tecnicamente na realização dos testes de hemostasia bem como na interpretação dos resultados, dentre elas pode-se citar a dieta alimentar, atividade física, influência hormonal, variação circadiana, medicamentos e estresse mental. Portanto é recomendável:

- Abstenção de atividade física nas últimas 24 horas e descanso de 15 a 20 minutos antes da coleta.
- Exames que sofrem a interferência da gravidez, como fatores VII, X, VIII, PAI-1, Proteínas C e S e fator von Willebrand, é recomendável repetir as análises dois meses após o parto ou após a volta normal do ciclo menstrual.
- Para o diagnóstico da Doença de von Willebrand recomenda-se colher o sangue do 1º ao 4º dia do ciclo menstrual devido a queda hormonal.
- A coleta do sangue deve ser preferencialmente entre às 07:00 e 09:00 horas da manhã.
- Analisar cada medicamento em uso pelo paciente, dada a grande quantidade de medicamentos que interferem nos resultados. Nesses casos, quando possível, é indicada a substituição ou a suspensão do medicamento após consentimento do médico do paciente. Sempre anotar todos os medicamentos que o paciente está fazendo uso durante a investigação laboratorial.
- No dia da coleta do sangue o paciente tabagista não deve fumar.
- Por fim, considerando que a concentração de lipídeos pode interferir nos tempos de coagulação e no sistema de detecção do

coágulo quando se utiliza equipamentos de coagulação de leitura óptica, é recomendável o jejum mínimo de 4 horas para adultos e crianças e 2 horas para lactantes.

Objetivando a redução dos erros pré-analíticos, algumas atitudes pertencentes a gestão da fase pré-analítica devem ser tomadas, como:

- Educação continuada
- Registros de não conformidade
- Critérios para aceitação ou rejeição das amostras
- Sistema de orientação ao paciente

O conhecimento das fontes de erros e suas causas, bem como o acompanhamento do resultado desta gestão, podem ser realizados por levantamento mensal de indicadores de qualidade como o número de amostras rejeitadas por volume de sangue inadequado, hemólise, lipemia, presença de coágulos, testes incoaguláveis por contaminação, número insuficiente de tubos de sangue, erros na identificação e quantidade de re-coletas.

Referências

BlombaCk,M; Konkle, BA; Manco-johnson,MJ; Bremme,K; HellgreN, M; Kaaja, R. Preanalytical conditions that affect coagulation testing, including hormonal status and therapy. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 5: 855–858. 2007.

CLSI/NCCLS H21A5 Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays 2008

Favaloro, EJ; Funk, DM; Lippi, G. Pre-analytical Variables in Coagulation Testing Associated With Diagnostic Errors in Hemostasis. DOI: 10.1309/LM749BQETKYPYPVM. 2012.

Recomendações Da Sociedade Brasileira De Patologia Clínica/medicina Laboratorial Para Coleta De Sangue Venoso(2ª edição). Minha Editora.ISBN 978-85-98416-94-6. 2010.

Saraiva, ASL; Sternick, GMP; Santos, ME; Montalvão, SAL; Machado, TFGS; Rocha, TRF. Manual de diagnóstico laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias. Ministério da Saúde - Brasília-DF. 2009.

Salvagno GL, Lippi G, Bassi A, Poli G, Guidi GC. Prevalence and type of pre-analytical problems for in patients samples in coagulation laboratory. J Eval Clin Pract. 14(2):351-3. 2008

Veiga, MTA; Montalvão, SAL; Rezende,SM. Hemofilia Congênita e Inibidor:Manual de Diagnóstico e Tratamento de Eventos Hemorrágicos Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde - Brasília-DF. 2009.

World Federation of Hemophilia. Kitchen S; McCraw, A; Echenagucia, M. Diagnosis of Hemophilia and Other Bleeding Disorders. A LABORATORY MANUAL. Second Edition. 2010

Este material foi elaborado pela Comissão de Assessoramento Técnico em Hemostasia do Ministério da Saúde

Mais informações: coagulopatias.sangue@saude.gov.br | 61 3315-6155



Ministério da Saúde

Design gráfico e foto da capa: Fabiano Bastos



O teste de laboratório é um componente que faz parte da avaliação médica do paciente, uma vez que auxilia na determinação do seu diagnóstico e tratamento. Portanto, a capacidade de cuidados clínicos depende de resultados precisos e confiáveis de laboratório. Este folheto tem como finalidade, de uma maneira resumida, destacar as principais fontes de erros na fase pré-analítica e como evitá-las.

A fase pré-analítica envolve o preparo do paciente, coleta, transporte, preparo e armazenamento de amostras biológicas, são itens sujeitos a variáveis relacionadas ao paciente e ao laboratório que podem comprometer a integridade da amostra e consequentemente produzir um erro laboratorial. Vários trabalhos mostram que a maior frequência de erros laboratoriais encontra-se nesta fase, podendo chegar até 70% dos erros.

Como causas de fontes de erros laboratoriais na fase pré-analítica podem ser citados o envolvimento de vários profissionais (médicos, flebotomistas, recepcionistas, técnicos de laboratório, bioquímicos, biomédicos...), coleta realizada por profissionais não capacitados e/ou devidamente treinados, maior preocupação com a fase analítica, falta de supervisão direta, falta de programas de controle de qualidade que contemplam esta fase e grandes distâncias entre o local de coleta e o laboratório.

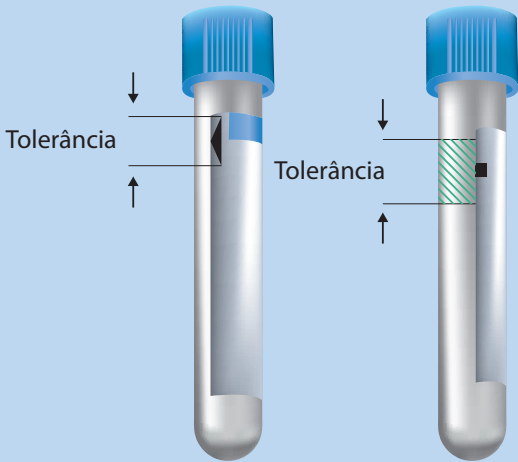
Principais fontes de erros

- Acesso venoso difícil
- Uso inadequado do material de coleta
- Preparo inadequado do paciente
- Erros de identificação da amostra
- Coleta do sangue em tubo inadequado
- Proporção sangue/anticoagulante não respeitada
- Amostra coagulada
- Amostra contaminada
- Amostra não enviada ou extraviada
- Lipemia
- Icterícia
- Hemólise
- Transporte, processamento e/ou armazenamento que comprometam a integridade da amostra.

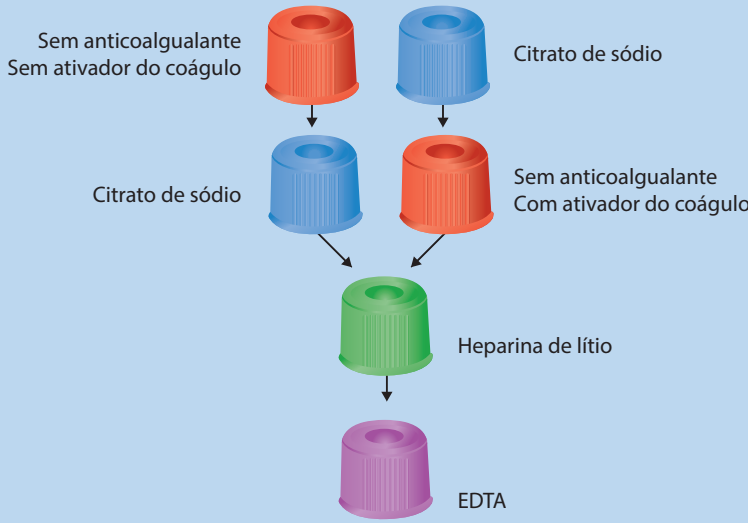
Vários cuidados devem ser tomados com o objetivo de reduzir as fontes de erros nesta fase, como:

Coleta da amostra

- **Escolha do anticoagulante** – O anticoagulante apropriado para a maioria dos testes de hemostasia é o citrato de sódio dihidratado 3,2% ou 0.109M na proporção de 1:9 (anticoagulante:sangue). Observar o volume correto de sangue nos tubos após a coleta, a maioria dos tubos tem marcas indicado o volume mínimo e máximo de sangue.



- **Escolha dos tubos de coleta** – Os tubos devem ser de polipropileno ou de vidro siliconizado. Atualmente a maioria dos laboratórios utilizam tubos de polipropileno contendo vácuo suficiente para o volume de sangue desejado, que segundo a literatura não promove nenhum malefício à amostra.
- **Homogeneização da amostra** – Logo após a coleta o sangue deve ser misturado com o anticoagulante delicadamente, por inversão do tubo de 8 a 10 vezes, evitando a formação de espuma e de microcoágulos.
- **Sequência de tubos durante a coleta** – Para evitar a contaminação indesejada entre os diferentes anticoagulantes o tubo contendo citrato de sódio deve ser o primeiro a ser coletado. Para os estudos de função plaquetária e veias de difícil acesso é recomendável o descarte do primeiro tubo e anotar no pedido de exame para futuras interpretações.



- **Correção do volume do sangue, ou do anticoagulante** – Para pacientes que possuem valores de hematócrito abaixo de 25% e acima de 55%. Nestes casos devemos aplicar a fórmula abaixo, corrigindo o volume do sangue ou do anticoagulante a ser colocado no tubo.

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

Onde C é volume do anticoagulante
e V é o volume de sangue

- **Coleta com seringa agulhada** – Deve-se retirar a agulha antes de adicionar o sangue pelas paredes do tubo aberto. Jamais perfurar a tampa do tubo com a agulha para passagem do sangue.

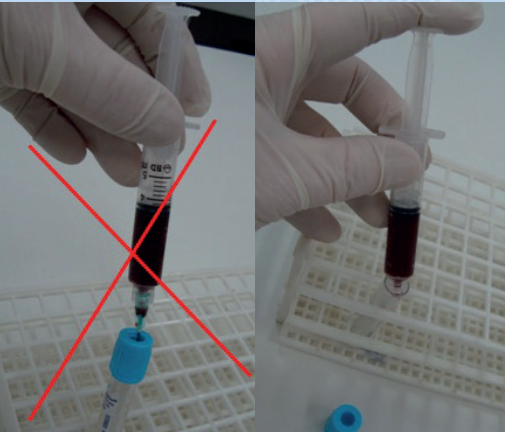


Foto: Arquivo do Ministério da Saúde

- **Garroteamento** – Evitar garroteamentos prolongados, ou seja, acima de 1 minuto. Um procedimento que contribui para reduzir o tempo de garroteamento é o preparo de todo o material a ser utilizado na coleta antes de realizar o garroteamento.
- **Coleta em cateter** – Evitar a coleta de sangue em acesso venoso periférico (cateter). Caso tenha que utilizar esse acesso a orientação é enxaguar a cânula com salina, descartar 5mL de sangue, ou 6 vezes o volume da cânula, e desprezar o primeiro tubo ou utilizar o tubo de soro (sem ativador do coágulo) antes do tubo com citrato de sódio.
- **Identificação da amostra** – Para evitar erros de identificação de amostras é recomendável que o flebotomista identifique o(s) tubo(s) antes da coleta do sangue.
- **Re-coleta de amostra** – Em casos de re-coleta do material, anotar no pedido de exame o horário do procedimento. Esta informação é importante no caso de haver alterações fisiológicas, fisiopatológicas ou a realização de procedimentos como a transfusão de hemocomponentes ou uso de medicamentos, entre a primeira e a nova coleta.
- **Amostra Hemolisada** – A presença de hemólise na amostra talvez seja uma das principais fontes de erros laboratoriais. A princípio, amostra com hemólise deve ser descartada, a menos quando for inerente ao paciente, por exemplo, em casos em que o paciente foi submetido à circulação extracorpórea uma nova coleta não irá eliminar a hemólise. A lise das hemácias leva a liberação de líquido intracelular para o meio extracelular causando a diluição dos fatores de coagulação, além de expor componentes intracelulares e de membrana que podem ativar a coagulação sanguínea. Como resultado a presença de hemólise pode tanto encurtar como prolongar os testes de coagulação. Devemos considerar ainda que, dependendo do grau da hemólise, pode ocorrer interferência na detecção do coágulo por sistema óptico. As causas de hemólise *in vitro* são diversas, mas podem-se destacar algumas:
 - Garroteamento prolongado e tapinhas no vaso durante a coleta;
 - Agitação do tubo;
 - Inserção da agulha da seringa na tampa do tubo, já comentado anteriormente;
 - Transporte inadequado, com agitação da amostra e/ou extremos de temperatura;
 - Contado direto do sangue com o gelo;
 - Coletas traumáticas;
 - Uso de agulhas de baixo calibre, vale lembrar que é recomendável o uso dos calibres: 25x8(21G1), 25x7(22G1) e 25x6 (23G1).