

Erros pré-analíticos e suas interferências nos exames de rotinas.



**Trabalho de Conclusão de Residência Médica
Multiprofissional – Patologia Clínica Veterinária**

Gabriela Duque Lima

14 de fevereiro de 2023

Brasília - DF

Resumo

Os laboratórios de patologia clínica fazem parte do processo de diagnóstico e auxiliam nas decisões médicas frente aos pacientes. Por essa razão os médicos veterinários clínicos necessitam ter confiança e segurança nos laudos fornecidos pelos laboratórios. Contudo, a fase que antecede a chegada da amostra no laboratório, conhecida como pré-analítica, vem sendo apontada por diferentes estudos, como a grande responsável pelos erros laboratoriais. A principal razão para a alta frequência de erros nesta fase do processo está na dificuldade de controlar as variáveis pré-analíticas e em realizar melhoria nos processos, pois diversas variáveis encontram-se onde o laboratório não tem controle, como por exemplo no preparo do paciente e no momento da colheita e identificação de amostras biológicas. Para alcançar as metas de redução dos erros e aumentar a segurança e confiabilidade dos processos pré-analíticos, se faz necessário implantar melhorias nas atividades envolvendo os processos de obtenção e manipulação de amostras biológicas.

Palavras-chave: laboratório, patologia, diagnóstico.

Abstract

Clinical pathology laboratories are part of the diagnostic process and help in medical decisions regarding patients. For this reason, clinical veterinarians need confidence and security in the reports provided by laboratories. However, the phase that precedes the arrival of the sample in the laboratory, known as pre-analytical, has been pointed out by different studies as being largely responsible for laboratory errors. The main reason for the high frequency of errors in this phase of the process is the difficulty of controlling the pre-analytical variables and improving the processes, since several variables are found where the laboratory has no control, as for example in the preparation of the patient. and at the time of collection and identification of biological samples. To achieve the goals of reducing errors and increasing the safety and reliability of pre-analytical processes, it is necessary to implement improvements in activities involving the processes of obtaining and handling biological samples.

Key-words: laboratory, pathology, diagnosis.

Introdução

A prestação de um atendimento de qualidade para seus pacientes é de extrema importância para os médicos veterinários e, para isso, dados clinicamente relevantes são imprescindíveis. Os exames laboratoriais são algumas de muitas ferramentas que fazem parte da rotina dos veterinários e os ajudam a chegar ao diagnóstico definitivo (MELO e SILVA, 2021). Grande parte dos exames laboratoriais clínicos são desenvolvidos para detectar ou quantificar substâncias ou células em amostras de sangue, assim a obtenção de resultado útil para a análise depende de amostras apropriadas (SCOTT e STOCKHAM, 2011).

Para a realização correta dos exames, suas etapas devem ser realizadas seguindo uma padronização, evitando que possíveis erros alterem o resultado final (MELO e SILVA, 2021). O processamento de uma amostra biológica obtida adequadamente é composto por três fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica. Cada etapa contempla a possibilidade de erros que afetam a qualidade e a confiabilidade do resultado (OLIVEIRA et al, 2009). A fase pré-analítica é a responsável por mais de dois terços de todos os erros atribuídos ao laboratório, estes podem representar mais de 90% do erro total, o que aponta para a necessidade de focar esta etapa no planejamento do sistema de gestão da qualidade (BRAZ e GARCIA, 2018). Erros pré-analíticos são rotineiramente comuns e geralmente originam-se de problemas na colheita e no processamento da amostra (SCOTT e STOCKHAM, 2011). Dentro dos possíveis erros pré-analíticos pode-se citar alguns, como tempo de jejum inadequado, estase venosa prolongada, flebotomia inadequada, preenchimento da requisição inadequada ou incompleta, perda da requisição ou amostra, transporte inadequado, identificação errada, dentre outros (OLIVEIRA et al, 2009).

Este trabalho tem como objetivo demonstrar os principais erros pré-analíticos ocorridos na medicina veterinária visando auxiliar os profissionais da área quanto à atenção nesta fase, primordial para o sucesso no resultado do exame solicitado.

Revisão de literatura

A entrega de resultados de boa qualidade exige uma boa gestão em todas as etapas de procedimentos, incluindo medidas pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas (SHOAIB et al., 2020). A fase pré-analítica é a responsável por mais de dois terços de todos os erros atribuídos ao laboratório, estes podem representar mais de 90% do erro total (BRAZ e GARCIA, 2018). Esta é a fase da qual o laboratório detém menor controle, assim, erros pré-analíticos podem levar a resultados alterados, custos desnecessários, diagnósticos equivocados, e desfecho desfavorável para os pacientes. Erros pré-analíticos são geralmente decorridos de problemas na colheita e no processamento da amostra (SCOTT e STOCKHAM, 2011).

Colheita sanguínea

A colheita sanguínea inclui a punção venosa, o uso do anticoagulante adequado e a correta homogeneização da amostra após ser transferida para o tubo. A punção sanguínea pode ser realizada pelo sistema a vácuo ou por seringa e agulha (DA SILVA et al., 2016).

Quando a punção é realizada com seringa e agulha, o sangue deve fluir para o interior da seringa sem esforço para puxar o êmbolo, quando isso não ocorre, o turbilhonamento ocasionado por este esforço causa alterações celulares (ANDRIOLO et al., 2010). Ao fim da punção, o sangue é passado aos tubos respeitando a proporção de sangue e anticoagulante. Para realização de exames hematológicos, a preferência é pela colheita de sangue venoso fazendo assepsia do local com álcool a 70% (DA SILVA et al., 2016).

Hemodiluição

Uma das maneiras mais fáceis e mais acuradas de avaliar o volume globular sanguíneo (VG) é pelo emprego do micro-hematócrito por centrifugação, que consiste em centrifugação do sangue em alta velocidade separando as células sanguíneas em camadas com base na densidade de cada uma (SCOTT e STOCKHAM, 2011).

Resultados errôneos do micro-hematócrito podem ser produzidos por conta de homogeneização inadequada da amostra, centrifugação inadequada, leitura incorreta do volume globular e hemodiluição da

amostra. A proporção inadequada de sangue e EDTA pode levar a hemodiluição da amostra, assim o sal hipertônico encolhe os eritrócitos levando a um VG falsamente baixo (SCOTT e STOCKHAM, 2011).

Homogeneização

Logo após a coleta, os tubos contendo anticoagulante devem ser homogeneizados suavemente para que a amostra se misture adequadamente no anticoagulante. Não se deve homogeneizar vigorosamente os tubos de citrato, sob o risco de hemólise in vitro e promover a ativação das plaquetas e fatores de 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 (DA SILVA et al., 2016).

Identificação da amostra

Para evitar laudos incorretos por parte do laboratório, é imprescindível rotular adequadamente os tubos enviados e marcar claramente os testes solicitados. É recomendado também que inclua a data da coleta da amostra. Erros na identificação de amostras é uma causa grave e potencialmente fatal de erro pré-analítico, que gera um erro subsequente de transcrição do resultado, podendo esses erros serem cometidos em qualquer fase (GILOR et al., 2011).

Armazenamento

A escolha do tubo a ser utilizado é muito importante para a realização de cada exame, para isso é imprescindível que o médico veterinário saiba a função de cada um. O tubo contendo EDTA exerce seu efeito anticoagulante ligando-se ao cálcio e tornando-o indisponível para reações enzimáticas na cascata de coagulação. O EDTA é o anticoagulante de escolha para maioria das amostras hematológicas de rotina pois minimiza a agregação celular, preserva a morfologia celular e resulta em coloração de esfregaços sanguíneos de alta qualidade. O plasma de amostras de EDTA também pode ser usado para realizar alguns bioquímicos séricos, facilitando quando não é possível a colheita de grandes volumes sanguíneos (GILOR et al., 2011).

Tubos com heparina inibem a coagulação por aceleração a ação da antitrombina, que, por sua vez, neutraliza a trombina (fator II) e vários outros fatores de coagulação enzimática. Vários sais de heparina são usados comercialmente tubos de sangue disponíveis. A heparina de lítio é o tipo preferido de sal de heparina para a maioria dos usos porque não altera a concentração de eletrólitos avaliados rotineiramente. A heparina é comumente usada em amostras de sangue de espécies com eritrócitos nucleados, com base na observação de hemólise em amostras preservadas em EDTA em alguns répteis e aves (GILOR et al., 2011).

Tubos com citrato de sódio são amplamente usados para testes de coagulação de rotina pois a ligação do citrato ao Ca^{2+} é facilmente revertida pela adição de Ca^{2+} . Os tubos de citrato são usados para alguns dos mais comuns testes de coagulação, incluindo tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativado tempo de trombina e determinação quantitativa de fibrinogênio. O preenchimento adequado dos tubos de citrato com 1 parte de citrato para 9 partes de sangue é extremamente importante. O preenchimento insuficiente ou excessivo desses tubos poderá resultar em resultados errôneos como prolongamento ou diminuição de PT e aPTT (GILOR et al., 2011).

Tubos com fluoreto de sódio (NaF) são utilizados como conservante para glicemia, mas também atua como um anticoagulante fraco, pois contém, além de NaF, oxalato de potássio, um quelante de Ca^{2+} . O flúor é um potente inibidor das enzimas envolvidas na glicólise e interrompe o metabolismo da glicose pelas células da amostra de sangue. Amostras de sangue coletadas em tubos de NaF são usados para a medição de glicose no sangue sem a necessidade de separar soro ou plasma das células (GILOR et al., 2011).

Para retirada de soro da amostra existem dois tubos de coleta disponíveis: tubos contendo gel separador de soro e tubos sem. Estes tubos são usados para acelerar o processo de coagulação pois contêm um material de gel inerte, sílica ou partículas de vidro responsáveis por acelerar a coagulação. O soro é a amostra padrão enviada para perfis bioquímicos e também é usado para títulos sorológicos, alguns testes endócrinos, entre outros (GILOR et al., 2011).

Quando a amostra é coletada em EDTA 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 (ANDRIOLO et al., 2010).

Os resultados de hemogramas de amostras coletadas em EDTA devem permanecer dentro de $\pm 5\%$ dos valores iniciais quando armazenados a 4 °C durante 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 (VAN e SIMMONS, 1995). 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. 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 (OLIVEIRA et al, 2009).

Longos períodos de armazenamento das amostras coletadas em EDTA provocam mudanças significativas na morfologia das células sanguíneas. Os neutrófilos podem apresentar mudanças no núcleo, podendo ser observadas 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. 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. Assim se tornando imprescindível a confecção de esfregaços sanguíneos o mais breve possível após a coleta da amostra (DA SILVA et al., 2016).

Hemólise

A hemólise constitui o rompimento da hemácia e pode acontecer in vivo ou in vitro, causando a liberação dos seus componentes internos no

líquido circulante, principalmente proteínas (hemoglobina), fósforo, potássio e várias enzimas. A hemólise in vivo sugere uma condição clínico-patológica do paciente, em que ocorrem anomalias na membrana da hemácia, no metabolismo celular ou na estrutura da hemoglobina (THRALL et al., 2015). A hemólise in vitro é consequência de erros no procedimento de coleta, processamento, transporte ou armazenamento da amostra. Como principais causas da hemólise in vitro estão: aplicação prolongada do torniquete, uso incorreto do sistema de coleta, transferência do sangue da seringa para o tubo sem remover a agulha, aspiração do sangue muito rapidamente para dentro da seringa, uso de agulha de pequeno calibre, contaminação com álcool durante a coleta, perda da veia durante a coleta, homogeneização vigorosa das amostras de sangue, congelamento da amostra ou alta temperatura de armazenamento (RIVELLO e LOURENÇO, 2013).

A hemólise in vivo ou intravascular pode ocorrer em várias condições clínicas como na anemia hemolítica, infecção por hemoparasitas e reações transfusionais, estando associado a aumento dos níveis de bilirrubina indireta (livre) (SCOTT e STOCKHAM, 2011). A hemólise causa coloração avermelhada no plasma quando o nível de hemoglobina livre excede 300 mg/L visível após centrifugação. Hemoglobinemia ocorre quando uma quantidade de hemoglobina liberada no plasma excede a capacidade de sua ligação com haptoglobina, sua proteína de ligação no plasma (SCOTT e STOCKHAM, 2011). A hemoglobina livre apresenta maior absorvidade em comprimentos de onda entre 540 e 580 nm. Desta forma, a hemoglobina provoca uma elevação aparente na concentração dos analitos medidos nestas escalas de comprimento de onda, por elevar a absorbância das amostras. A hemólise interfere causando elevações dos níveis de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, lactato desidrogenase, lipase, creatinina, ferro, magnésio, fósforo, potássio e ureia e diminuição dos valores de albumina, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, glicose e sódio (Tabela 1) (DA SILVA et al., 2016).

Lipemia

A lipemia é caracterizada por turbidez da amostra causada pelo acúmulo de partículas de lipoproteínas podendo ser encontrada em animais aparentemente saudáveis. Como as lipoproteínas variam em tamanhos, nem todas as classes contribuem igualmente para a turbidez.

As partículas maiores, os quilomícrons, têm maior potencial de turbidez da amostra. A lipemia altera a análise da amostra pois a turbidez interfere na análise fotométrica e, em casos severos, impossibilita a determinação bioquímica de vários metabólitos. Em animais carnívoros, amostras levemente lipêmicas são normais poucas horas após a refeição, devido à absorção de gordura no intestino delgado, sendo assim recomendado o jejum do paciente para a coleta de amostras de sangue. Em geral, o jejum alimentar preconizado para cães e gatos varia entre 8 e 12 horas. O soro de amostras lipêmicas deve ser separado rapidamente em razão da lipemia promover fragilidade eritrocitária aumentando as chances de hemólise dessas amostras (ANDRIOLO et al., 2010).

As partículas de lipoproteínas na amostra podem absorver luz, de forma inversamente proporcional ao comprimento de onda no espectro visível (300 a 700 nm) sem picos de absorção específicos no meio. Assim, os métodos que usam comprimentos de onda mais baixos são mais afetados pela lipemia. Alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e glicose são fortemente afetados pela lipemia (Tabela 1) (ANDRIOLO et al., 2010).

Tabela 1. Testes bioquímicos e suas respectivas interferências por amostra lipêmicas e hemolisadas.

Testes	Lipemia	Hemólise
Alanina aminotransferase (ALT)	↑	↑
Aspartato aminotransferase (AST)	↓	↑
Glicose	↑	↓
Lactato	↑	↑
Lipase	↑	↑
Creatinina	↑	↑
Ferro	↑	↑
Magnésio	↑	↑
Fósforo	↑	↑
Ureia	↑	↑
Albumina	↓	↓
Fosfatase alcalina (FA)	↑	↓
Gamaglutamil transferase (GGT)	↓	↓
Sódio	↓	↓

Formação de coágulo/fibrina

No organismo, a coagulação sanguínea consiste na conversão do fibrinogênio, uma proteína solúvel do plasma, em fibrina, um polímero insolúvel, por ação de uma enzima denominada trombina. Inicialmente as plaquetas são ativadas por exposição ao colágeno por conta de qualquer dano no endotélio, como por exemplo punção ou estase venosa (THRALL et al., 2015). Após sua ativação, elas aderem ao subentotélio lesado, ali se acumulam e se ligam entre si formando um trombo que é posteriormente estabilizado. O evento culminante da ativação do fator de coagulação é a conversão de fibrinogênio em fibrina e a formação de um coágulo de fibrina estável, juntamente com plaquetas para ocluir o fluxo sanguíneo de um vaso lesionado, a fibrina forma uma rede de fibras elásticas que consolida o tampão plaquetário e o transforma em tampão hemostático que fornecerá a superfície adequada ao processo de coagulação do sangue, por este motivo amostras com fibrina resultam, erroneamente, na diminuição da concentração de plaquetas e, além disso, pode contribuir para a obstrução fluídica em aparelhos hematológicos (THRALL et al., 2015).

Transporte

Durante o transporte as células no tubo de EDTA podem sofrer apoptose (morte celular programada) ou lise e podem tornar-se picnóticas ou fragmentadas. Isso afeta a qualidade do esfregaço de sangue e pode interferir na identificação de células, por isso, o tempo decorrido entre a coleta e o processamento da amostra deve ser minimizado (MEINKOTH e ALLISON, 2007).

Se as condições de transporte não forem otimizadas, poderá ocorrer erros clínicos significativos. Idealmente, todas as amostras devem ser analisadas dentro de 6 horas após a coleta, especialmente por conta da preservação da morfologia das células sanguíneas (SHOAIB et al., 2020).

Conclusão

Diferentes fatores estão envolvidos nos erros de laboratório clínico, principalmente na fase pré-analítica. Esta é a fase mais suscetível aos erros de processos, sobretudo aqueles processos que estão fora do laboratório e envolvem preparo do paciente e coleta da amostra. A falta de capacitação e de treinamentos dos profissionais envolvidos nos processos pré-analíticos ainda é a grande responsável por altas frequências de erros dentro do laboratório. Para alcançar as metas de redução dos erros e aumentar a segurança nos processos pré-analíticos, faz-se necessário estratégias de controle de qualidade, adotadas por todos os envolvidos desde a coleta da amostra até a chegada ao laboratório.

Bibliografia

- SCOTT, Michael A., STOCKHAM, Steven L., Fundamentos da patologia clínica veterinária. Tradução de Cid Figueiredo. Segunda edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- BRAZ, Paulo H., Garcia, Eduarda R., Frequência de erros pré-analíticos ocorridos na Medicina Veterinária. PUBVET v.12, n.2, a39, p1-4, 2018.
- OLIVEIRA, Gabriel S. L., et al., Controle de qualidade na coleta do espécime diagnóstico sanguíneo: iluminando uma fase escura de erros. J Bras Patol Med Lab v.45 n.6 p.441-447, 2009.
- MELO, Pedro H., M., SILVA, Pedro H., S., S., A prevalência de erros pré-analíticos em exames hematológicos de felinos. Centro Universitário de Brasília, 2021.
- SOUSA, Rener Leite et al. Preanalytical errors in clinical analysis laboratories: a review. Brazilian Journal of Health Review, v. 4, n. 2, p. 9132-9142, 2021.
- GUIMARÃES, Alexandre Costa et al. O laboratório clínico e os erros pré-analíticos. Revista HCPA. Vol. 31, n. 1 (2011), p. 66-72, 2011.
- SOUSA, Kátia Regina Ferreira et al. Survey of sample rejection causes in the clinical pathology laboratory of a veterinary hospital in Teresina, Piauí. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 12, p. 117014-117022, 2021.
- RIVELLO, Vivian Visconti; LOURENÇO, Patrick Menezes. A prevalência de erro na fase pré-analítica nos laboratórios de análises clínicas. Revista Saúde, v. 4, n. 1/2, p. 13-16, 2013.
- DA SILVA, Paulo Henrique et al. Laboratory hematology: theory and procedures. Artmed Editora, 2016.
- 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.
- CAGNOLATI, Daniel. et al. HEMOSTASIA E DISTÚRBIOS DA COAGULAÇÃO. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -USP- Ribeirão Preto-SP. 2017.
- THRALL, Mary A. et al., Hematologia e Bioquímica clínica Veterinária. Tradução de Leandro Zuccolotto Crivellenti. Segunda edição. São Paulo: Roca. 2015.
- ANDRIOLO A. et al. Gestão da fase pré-analítica: recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML); 2010
- GILOR et al., Common Laboratory Artifacts Caused by Inappropriate Sample Collection and Transport: How to Get the Most out of a Sample. Topical Review. 2011.
- SHOAIB Muhammad, et al. Pre-analytical Errors and Rejection Criteria for Blood Samples in Hematology Laboratory. 2020.

MEINKOTH J. H. e ALLISSON R. W. Sample Collection and Handling: Getting Accurate Results. Department of Veterinary Pathobiology, Center for Veterinary Health Sciences, Oklahoma State University, 250 McElroy Hall, Stillwater, OK 74078, USA. 2007.