

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Coleta de Sangue
- ✓ Plasma Pobre em Plaquetas (PPP)
- ✓ Substâncias Interferentes
- ✓ Armazenamento
- ✓ Descongelamento

Antes da coleta de sangue, alguns fatores devem ser considerados. Não é necessário jejum antes da coleta de sangue para a maioria dos exames de sangramento e trombose. No entanto, uma exceção é o teste de homocisteína, que requer jejum. Exercícios físicos (Venema et al, 2017) e estresse (Austin et al, 2012) podem causar aumentos temporários de FVIII e FVW. Exercícios também podem afetar o teste de dímero D (Huskens D et al, 2016). A inflamação pode afetar os fatores de coagulação e outros parâmetros hemostáticos (Hardy et al, 2024). A gravidez afeta uma variedade de parâmetros, incluindo FVIII (Castaman, 2013), FVW (Delbrück et al, 2019) e dímero D (Blombäck et al, 2007). Vários produtos farmacêuticos e anticoagulantes podem interferir nos testes de hemostasia, portanto, informações sobre os tratamentos dos pacientes são essenciais para o laboratório (Gosselin et al, 2019).

Coleta de Sangue: diversas diretrizes que descrevem as melhores práticas para coleta e processamento de amostras para testes hemostáticos estão disponíveis (CLSI, 2024; CLSI, 2017). A coleta de sangue deve utilizar um sistema de coleta a vácuo ou seringa plástica com agulha de calibre 19 a 21 (adultos) ou de calibre 22 a 23 (crianças) (Srivastava et al, 2021). Os tipos de tubo não são todos iguais, portanto, os centros devem usar um único tipo de tubo e gerar intervalos de referência com base nesses tubos (Bowen et al, 2016). Mesmo em um tipo de tubo de coleta, a constituição é importante; tubos de plástico e vidro não são intercambiáveis (Fiebig et al, 2005). Os tubos de coleta de sangue devem conter 0,105 a 0,109 M (3,2%) de citrato trissódico (CLSI, 2024). A sequência de coleta é importante para evitar contaminação cruzada por EDTA (Lima-Oliveira et al, 2015) ou heparina (Keppel et al, 2019); portanto, as melhores práticas na coleta de amostras devem ser seguidas (OMS, 2010; Simundic et al, 2018). As amostras requerem anticoagulação imediata após a punção venosa, com enchimento mínimo de 80% do volume alvo (Kitchen et al, 2021) para atingir a proporção sangue:anticoagulante de 9:1. A inversão suave (3 a 5 vezes) dos tubos de sangue após flebotomia permite a mistura adequada das amostras. Alterações hemostáticas indesejadas ocorrem em tubos subpreenchidos (Lippi et al, 2012). Amostras com níveis de hematócrito >55% requerem solução de citrato ajustada para compensar o alto volume globular e obter a proporção correta de 9:1. Alterações significativas no TP, TTPA e monitoramento de anticoagulantes (RNI) podem ser observadas se essa proporção não for mantida (Marlar et al, 2006). A fórmula recomendada para reajustar os níveis de citrato é apresentada abaixo (Kitchen et al, 2021). As amostras devem ser devidamente rotuladas imediatamente antes ou depois da flebotomia, de acordo com as políticas regulatórias ou institucionais locais.

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

C = volume de citrato em mililitros (mL) que deve ser adicionado a um volume de sangue (V)

HCT = hematócrito do paciente

V = volume de sangue adicionado em mL

E $1,85 \times 10^{-3}$ é constante

Um exemplo utilizando HCT de 70% e 4,5 mL de sangue coletado antes da adição do anticoagulante resulta no seguinte cálculo, ou seja, 0,25 mL de citrato são misturados com 4,5 mL de sangue.

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

$$(1,85 \times 0,001)(100 - 70)(4,5 \text{ mL}) = 0,25 \text{ mL de citrato}$$

Plasma Pobre em Plaquetas (PPP): a maioria dos testes de coagulação pode ser realizada com PPP após centrifugação a >1700 g por 10 minutos (CLSI, 2024; Kitchen et al, 2021). Centrifugas refrigeradas devem ser evitadas, visto que a ativação a frio do fator plaquetário 4 pode afetar o monitoramento da heparina, os testes de função plaquetária, os testes de FVIII e os testes de FVII (Favaloro, 2004). Alguns testes, como de heparina não fracionada (HNF) e anticoagulante lúpico, requerem plasma livre de plaquetas centrifugado duas vezes (<10 x 10⁹) se o teste for realizado em amostras previamente congeladas. Nesse caso, o plasma é removido do tubo de sangue centrifugado para um recipiente secundário adequado e centrifugado novamente com subalíquotas removidas para congelamento. O teste de função plaquetária requer plasma rico em plaquetas (PRP), preparado após centrifugação a 170 g por 15 minutos ou 250 g por 10 minutos (Gomes et al, 2021).

Substâncias Interferentes: amostras hemolisadas não devem ser testadas, pois podem ser observadas alterações significativas, particularmente no TTPA (Woolley et al, 2016; Lippi et al, 2013), exceto quando a hemólise for intravascular (Arachchillage et al, 2014). Ensaios de rotina geralmente não são afetados por icterícia (Woolley et al, 2016) e a lipemia pode ser eliminada por ultracentrifugação (Lippi et al, 2013, Dimeski e Jones, 2011).

Armazenamento: o teste de amostras é sensível ao tempo. O processamento e o teste das amostras devem ser realizados dentro da janela de estabilidade do ensaio após a punção venosa, e as amostras devem ser armazenadas em temperatura ambiente durante esse período. As diretrizes recomendam o teste em até 4 horas (CLSI, 2024) para todas as amostras, a menos que dados locais confirmem estabilidade prolongada para uma combinação específica de tubo/ensaio (Kitchen et al, 2021; Linskens et al, 2018). O armazenamento em temperaturas mais altas pode levar à perda de fatores de coagulação, como o FVIII (Omidkhoda et al, 2011). A liberação de fator plaquetário 4 pode causar neutralização da heparina não fracionada nas amostras, por isso esses tubos devem ser centrifugados em até 1 hora e analisados em até 4 horas (Baker et al, 2020). Se o plasma for armazenado para testes posteriores, as condições de armazenamento podem afetar alguns ensaios. O plasma pode ser armazenado de forma aceitável a -24°C por 3 meses. Contudo, no armazenamento de longo prazo (aproximadamente 6 meses), as amostras devem ser armazenadas a -70°C (Woodhams et al, 2001; Fenclova et al, 2023).

Descongelamento: amostras congeladas para teste devem ser descongeladas em banho-maria a 37°C por 3 a 5 minutos e invertidas várias vezes antes do teste para homogeneizar a amostra (Jo et al, 2020). Deve-se evitar o recongelamento do plasma descongelado para testes posteriores.

Referências

- Arachchillage DJ, Platton S, Hickey K, Chu J, Pickering M, Sommerville P, MacCallum P, Breen K. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2024; 205(3): 855-880.
- Austin AW, Wirtz PH, Patterson SM, Stutz M, von Känel R. Stress-induced alterations in coagulation: Assessment of a new hemoconcentration correction technique. *Psychosom Med* 2012; 74(3): 288-295.
- Baker P, Platton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 347-362.
- Blombäck M, Konkle BA, Manco-Johnson MJ, Bremme K, Hellgren M, Kaaja R. Preanalytical conditions that affect coagulation testing, including hormonal status and therapy. *J Thromb Haemost* 2007; 5(4): 855-858.
- Bowen RA, Adcock DM. Blood collection tubes as medical devices: The potential to affect assays and proposed verification and validation processes for the clinical laboratory. *Clin Biochem* 2016; 49(18): 1321-1330.
- Castaman G. Changes of von Willebrand factor during pregnancy in women with and without von Willebrand disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013; 5(1): e2013052.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays, 6th edition. CLSI standard H21. 2024. https://clsi.org/media/bp2jr13r/h21ed6e_sample.pdf.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection of diagnostic venous blood specimens, 7th edition. CLSI standard GP41. 2017. https://clsi.org/media/1372/gp41ed7_sample.pdf.
- Delbrück C, Miesbach W. The course of von Willebrand factor and factor viii activity in patients with von Willebrand disease during pregnancy. *Acta Haematol* 2019; 142(2): 71-78.
- Dimeski G, Jones BW. Lipaemic samples: Effective process for lipid reduction using high speed centrifugation compared with ultracentrifugation. *Biochem Med (Zagreb)* 2011; 21(1): 86-92.
- Favaloro EJ, Soltani S, McDonald J. Potential laboratory misdiagnosis of hemophilia and von Willebrand disorder owing to cold activation of blood samples for testing. *Am J Clin Pathol* 2004; 122(5): 686-692.
- Fenclova T, Marecek F, Hrachovinova I. Effects of frozen storage conditions and freezing rate on the stability of coagulation proteins in human plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2023; 34(6): 377-384.
- Fiebig EW, Etzell JE, Ng VL. Clinically relevant differences in prothrombin time and INR values related to blood sample collection in plastic vs glass tubes. *Am J Clin Pathol* 2005; 124(6): 902-909.
- Gomez K, Anderson J, Baker P, Biss T, Jennings I, Lowe G, Platton S. Clinical and laboratory diagnosis of heritable platelet disorders in adults and children: A British Society for Haematology guideline. *Br J Haematol* 2021; 195(1): 46-72.
- Gosselin RC, Marlar RA. Preanalytical variables in coagulation testing: Setting the stage for accurate results. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45(5): 433-448.
- Hardy M, Catry E, Pouplard M, Lecompte T, Mullier F. Is lupus anticoagulant testing with dilute Russell's viper venom clotting times reliable in the presence of inflammation? *Res Pract Thromb Haemost* 2024; 8(6): 102536.
- Huskens D, Roest M, Remijn JA, Konings J, Kremers RM, Bloemen S, Schurgers E, Selmezi A, Kelchtermans H, van Meel R, Meex SJ, Kleinegris MC, de Groot PG, Urbanus RT, Ninivaggi M, de Laat B. Strenuous exercise induces a hyper-reactive rebalanced haemostatic state that is more pronounced in men. *Thromb Haemost* 2016 Jun 2;115(6):1109-19.
- Keppel MH, Auer S, Lippi G, von Meyer A, Cornes M, Felder TK, Oberkofler H, Mrazek C, Haschke-Becher E, Cadamuro J. Heparin and citrate additive carryover during blood collection. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(12): 1888-1896.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardisation in Haematology (ICHS) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardization in Haematology (ICHS) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.
- Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Danese E, Favaloro EJ, Guidi GC, Lippi G. Sodium citrate blood contamination by K2-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): Impact on routine coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2015; 37(3): 403-409.
- Linskens EA, Devreese KMJ. Pre-analytical stability of coagulation parameters in plasma stored at room temperature. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(3): 292-303.
- Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Interference in coagulation testing: Focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(3): 258-266.
- Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favaloro EJ. Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38(6): 565-575.
- Marlar RA, Potts RM, Marlar AA. Effect on routine and special coagulation testing values of citrate anticoagulant adjustment in patients with high hematocrit values. *Am J Clin Pathol* 2006; 126(3): 400-405.
- Omidkhoda A, Tabatabaei MR, Atarodi K, Karimi K, Froushani AR, Pourfathollah AA. A comparative study of the effects of temperature, time and factor VIII assay type on factor VIII activity in cryoprecipitate in Iran. *Blood Transfus* 2011; 9(4): 394-399.
- Simundic AM, Bölenius K, Cadamuro J, Church S, Cornes MP, van Dongen-Lases EC et al. Joint EFLM-COLABIOCLI recommendation for venous blood sampling. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(12): 2015-2038.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.

Venema CL, Schutgens REG, Fischer K. Pathophysiological mechanisms of endogenous FVIII release following strenuous exercise in non-severe haemophilia: A review. *Thromb Haemost* 2017; 117(12): 2237-2242.

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(4): 229-236.

Woolley A, Golmard JL, Kitchen S. Effects of haemolysis, icterus and lipaemia on coagulation tests as performed on Stago STA-Compact-Max analyser. *Int J Lab Hematol* 2016; 38(4): 375-388.

World Health Organisation. WHO guidelines on drawing blood: Best practices in phlebotomy. 2010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138650/>.