

AVALIAÇÃO DO GRAU DE HEMÓLISE E SUA INTERFERÊNCIA EM ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE AMOSTRAS OBTIDAS POR DIFERENTES TÉCNICAS DE COLETA DE SANGUE VENOSO

Marina de Souza Bastos¹; Alessandra Aparecida Berner²; Edivan Rodrigo de Paula Ramos³

RESUMO: Este trabalho realizou a dosagem sérica de LDH, TGO, potássio, glicemia e hemoglobina livre de amostras obtidas por método tradicional com seringa, método de coleta a vácuo e método de coleta onde a agulha é espetada na tampa do tubo destinado a coleta a vácuo, com o objetivo de verificar se este último procedimento causa hemólise significativa e altera o resultado dos exames realizados. As amostras foram obtidas de três voluntários, sendo que de cada voluntário foram realizadas duas punções. Cada analito foi determinado 10 vezes, em cada amostra, para obtenção da média e do desvio padrão, utilizados para o cálculo do coeficiente de variação analítico. Os resultados foram analisados pelo teste *One-way Anova* (não paramétrico) seguido de *Bonferroni*. As diferentes técnicas de coleta, nos três voluntários, produziram diferenças significativas na dosagem de hemoglobina livre e na atividade de LDH. Por outro lado, tais alterações não ocorreram para os exames de potássio sérico e de TGO. Apenas no voluntário C foi encontrada redução da glicemia nas amostras obtidas por coleta a vácuo e espetada. Estes resultados mostram que espetar a agulha no tubo a vácuo para transferência de sangue não produz hemólise maior em relação às outras técnicas de coleta.

PALAVRAS-CHAVE: Controle de qualidade; diagnóstico laboratorial; hemólise.

1 INTRODUÇÃO

A determinação de um diagnóstico preciso depende, muitas vezes, de exames laboratoriais. Por isso, é extremamente importante que esses resultados representem com exatidão a real situação clínica do paciente. A coleta de material biológico é o primeiro passo para todas as análises efetuadas em laboratório clínico. Dela dependem todas as etapas seguintes, de forma a ser impossível a obtenção de resultados exatos sem um procedimento correto de coleta. Ainda que existam revisões e discussões sobre a forma ideal para a realização da coleta de sangue venoso, observam-se, na prática, variações no procedimento de punção venosa entre diferentes laboratórios e diferentes profissionais. Este fato gera a dúvida se estas oscilações na obtenção de sangue venoso podem provocar diferenças significativas nos resultados dos exames laboratoriais.

Embora, a coleta de sangue venoso possa ser feita pelo método tradicional da seringa e agulha ou pela utilização do sistema a vácuo, verifica-se, na prática, uma mistura destes procedimentos. Neste caso, a coleta é feita pela forma tradicional, mas a

¹ Acadêmica egressa do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR, Maringá- PR. Programa de Iniciação Científica do Cesumar (PICC). marynabastos@yahoo.com.br

² Técnica do Laboratório de Análises Clínicas do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR. ale_berner@hotmail.com

³ Orientador, docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR. edivanramos@yahoo.com.br

agulha perfura a tampa de borracha do tubo a vácuo para transferência do sangue da seringa para o tubo de coleta. Entretanto, a *Federal Occupational Safety & Health Administration*² e a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial⁶ não recomendam a utilização da agulha no momento da transferência do sangue da seringa para o tubo devido à possibilidade de ocorrer hemólise que pode interferir nos resultados de alguns exames bioquímicos. Apesar disso, não foram encontrados na literatura estudos que demonstrem se este procedimento de coleta realmente possa interferir de forma significativa nos resultados destes exames. Diante disso, este trabalho foi proposto e teve por objetivo coletar amostras de sangue venoso pelo método tradicional e transferir o sangue para um tubo destinado à coleta a vácuo perfurando a tampa do tubo, visando observar se este procedimento pode causar hemólise e interferir nos resultados de alguns exames bioquímicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado com amostras de sangue colhidas de três voluntários (identificados como A, B e C), sendo que de cada voluntário foram realizadas duas punções, uma pela técnica a vácuo e a outra pela técnica tradicional (agulha e seringa). Contudo, no sistema tradicional, a transferência do sangue para o tubo de coleta a vácuo foi feita de duas formas distintas: 5 mL de sangue foram transferidos após a retirada da agulha da seringa e da tampa do tubo, (método tradicional recomendado), e os outros 5 mL foram transferidos perfurando com a agulha a tampa do tubo destinado à coleta a vácuo (método misto). Dessa forma, foram obtidas três amostras de sangue, de acordo com a técnica de coleta e transferência do sangue: amostra 1 (método tradicional), amostra 2 (método misto) e amostra 3 (método a vácuo). O estudo foi feito de maneira cega, onde o pesquisador não sabia o tipo de coleta pela qual a amostra foi obtida.

O soro obtido foi utilizado para determinação das seguintes dosagens bioquímicas: transaminase glutâmico-oxalacética (TGO/GOT/AST), lactato desidrogenase (LDH), potássio, glicose e hemoglobina. Com exceção do potássio sérico que foi determinado por meio de eletrodo íon seletivo (ISE) em Analisador de Eletrólitos 9180-AVL[®], os demais exames foram realizados utilizando-se métodos espectrofotométricos, cujas absorbâncias foram determinadas em fotômetro *Bioplus*[®] 2000. A verificação de hemólise foi feita por análise visual e por dosagem de hemoglobina livre no soro.

Cada analito, em cada amostra, foi determinado 10 vezes para obtenção da média e do desvio padrão, utilizados para o cálculo do coeficiente de variação analítico. Adotou-se como variação analítica aceitável os valores de coeficiente de variação inferiores a 5%. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *One-way Anova* (não paramétrico) seguido de *Bonferroni* para análise da variância entre os grupos. Atribuiu-se como nível de significância valores de $p < 0,05$. A realização da análise estatística foi feita com auxílio do programa *GraphPad Prism 3.0*.

Este trabalho foi executado mediante parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do CESUMAR (CEP-Cesumar) número CAE 0048.0.299.000-09.

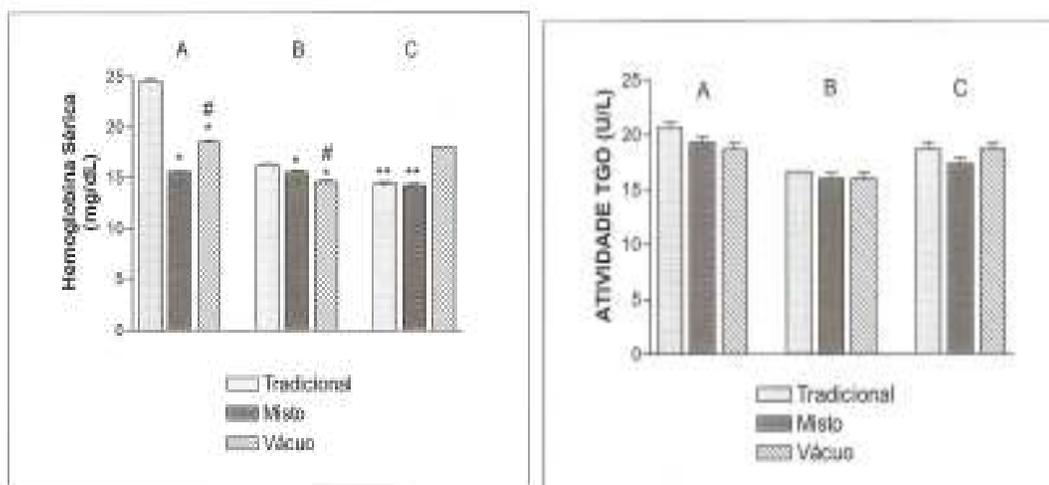
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A palavra hemólise é definida na literatura como um rompimento da membrana da hemácia, causando a liberação da hemoglobina e outros componentes internos no líquido circundante. Ela pode ser originada *in vivo* e/ou *in vitro*. Enquanto a hemólise *in vivo* sugere uma condição clínico-patológica, a *in vitro* demonstra erros no procedimento de coleta, processamento, transporte ou armazenamento da amostra, como por exemplo a

aplicação prolongada do torniquete, uso do sistema de coleta *vacutainer*[®] e transferir o sangue da seringa para o tubo sem remover a agulha^{2,6}.

A hemólise pode interferir na fase analítica por diferentes maneiras. Primeiro, a hemoglobina livre apresenta absorvibilidade alta em comprimentos de onda variando entre 415 e 570 nanômetros. Dessa forma, a hemoglobina provoca uma elevação aparente na concentração dos analitos medidos nestas escalas de comprimento de onda, por elevar a absorvância das amostras. Além da hemoglobina, as hemácias contêm várias proteínas estruturais, enzimas, lipídios e carboidratos, e muitos destes podem também interagir ou competir com os reagentes de ensaio ou elevar a quantidade do analito dosado no plasma ou soro⁷.

O interesse em avaliar se diferentes formas de coleta podem resultar em padrões de hemólise diferentes, tem sido objeto de estudo de alguns pesquisadores. Grant⁴, por exemplo, avaliou 454 amostras de sangue colhidas por punção venosa utilizando agulha ou cateter, e também avaliou o método de transferência do sangue da seringa para o tubo, se foi diretamente pela agulha ou após remoção da agulha. Os resultados por ele encontrados mostraram que 32% das amostras apresentaram algum padrão de hemólise e que o modo de transferência do sangue da seringa para o tubo não teve relação com a hemólise da amostra. Este último resultado nos chama atenção, pois de certa forma, foi semelhante ao encontrado neste trabalho. Aqui, embora nenhuma das amostras avaliadas tenha apresentado um padrão visual de hemólise, a dosagem de hemoglobina livre mostrou variações significativas entre as diferentes formas de coleta. Contudo, estas variações não foram semelhantes nos três voluntários (figura 1). Logo, sugere-se que o método de transferência do sangue da seringa para o tubo, não influencie na intensidade da hemólise, indicando que as diferenças na quantidade de hemoglobina sérica observadas estejam mais associadas ao procedimento de coleta do que propriamente à forma de transferência do sangue para o tubo e/ou sistema de coleta.

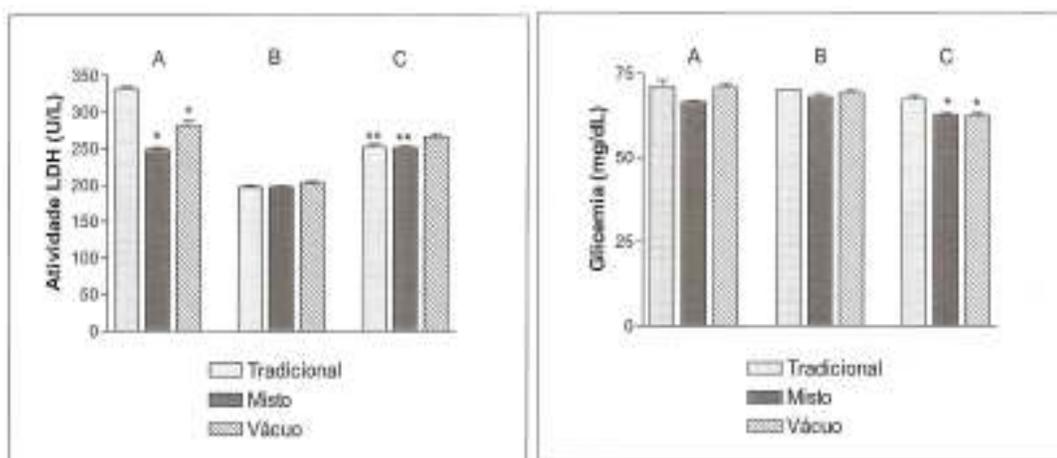


Figuras 1 (esquerda) e Figura 2 (direita). Níveis séricos de hemoglobina e TGO em amostras de soro obtidas por diferentes técnicas nos voluntários A, B e C. A altura das colunas representa a média \pm desvio padrão de 10 dosagens. * $p < 0,05$ em relação à coleta tradicional. # $p < 0,05$ em relação à coleta espetada. ** $p < 0,05$ em relação à coleta a vácuo. *One-way Anova* seguido de *Bonferroni*.

As hemácias apresentam elevada quantidade da enzima TGO. Portanto, a presença de hemólise na amostra pode elevar a atividade desta enzima no sangue e, dessa forma, proporcionar um falso resultado positivo. Contudo, não encontramos

alterações significativas na atividade de TGO nas amostras obtidas pelas diferentes técnicas (Figura 2). Apesar da quantidade de hemoglobina livre ter variado conforme a técnica de coleta é demonstrado que concentrações de hemoglobina até 45 mg/dL não produzem alterações significativas na dosagem de TGO¹. Como as coletas a vácuo, tradicional e mista não produziram hemólise com valores de hemoglobina livre superior a 45 mg/dL, é possível afirmar que estas técnicas de coleta, se bem executadas, não interferem no resultado final dos exames de TGO.

Outra enzima presente em elevada quantidade na hemácia é a LDH, logo qualquer intensidade de hemólise tem sido relacionada a um aumento considerável na atividade sérica da LDH⁵. De fato, observamos, tanto no voluntário A, quanto no voluntário C, que as amostras com maior valor de hemoglobina sérica tiveram, respectivamente, os maiores valores de atividade sérica de LDH (figura 3), sugerindo que o tipo de coleta e a forma de transferência do sangue da seringa para o tubo podem alterar a atividade sérica de LDH, mostrando a necessidade de um controle de qualidade mais rigoroso no procedimento de coleta de amostras para realização deste exame.



Figuras 3 (esquerda) e Figura 4 (direita). Níveis séricos de LDH e glicemia em amostras de soro obtidas por diferentes técnicas nos voluntários A, B e C. A altura das colunas representa a média \pm desvio padrão de 10 dosagens. * $p < 0,05$ em relação à coleta tradicional. # $p < 0,05$ em relação à coleta espetada. ** $p < 0,05$ em relação à coleta a vácuo. *One-way Anova* seguido de *Bonferroni*.

A determinação do potássio sérico também é reconhecida como um exame cuja hemólise causa forte interferência, uma vez que mais de 98% do potássio existente no organismo se encontra no interior das células. A influência do grau de hemólise nas dosagens de potássio foi avaliada por Frank *et al.*³ que, em seis *pools* de soro, adicionaram hemácias lisadas, produzindo amostras de soro com diferentes graus de hemólise. Através de fotometria de chama e técnicas de eletrodo íon seletivo, os autores verificaram que o potássio teve seus valores falsamente elevados e de forma proporcional ao grau de hemólise. Contudo, nossos resultados não demonstraram diferenças entre a concentração sérica de potássio nas amostras obtidas por diferentes técnicas. Se considerarmos que os resultados de Frank *et al.*³ evidenciaram uma elevação do potássio sérico dependente do grau de hemólise e que os níveis de hemólise observados nas amostras avaliadas aqui foram baixos, é possível inferir que alterações nos níveis de potássio sérico não sejam significativas em amostras com baixa taxa de hemólise.

Por apresentar coloração avermelhada, as amostras hemolisadas podem interferir na absorvância de métodos colorimétricos cuja coloração final seja vermelha. Neste

sentido, realizamos a dosagem de glicose pela metodologia de Trinder⁸, cujo produto final da reação é a quinoneimina, uma substância de coloração avermelhada. Logo, seria esperado que uma hemólise visual causasse um falso resultado elevado para a glicemia. O que observamos foi uma pequena redução, porém significativa, dos valores glicêmicos apenas no voluntário C, para as amostras obtidas por técnica de coleta mista e a vácuo (figura 4). A redução, ao invés de aumento, talvez possa ser explicada pelo fato de não ter sido observada hemólise visual e, dessa forma, não haver influência colorimétrica da hemoglobina na absorbância final da quinoneimina. Além disso, diferentes estudos vêm demonstrando que a hemólise, em pequeno grau, pode diluir a amostra de soro, fazendo com que o resultado da glicemia seja reduzido e não elevado.

4 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que os níveis de hemoglobina livre em amostras de soro variam significativamente com a técnica de coleta e transferência utilizadas. Contudo, esta variação parece estar mais relacionada ao procedimento de coleta, característica de cada flebotomista, do que propriamente ao tipo de técnica de coleta empregada e a forma de transferência da amostra para o tubo de ensaio. Além disso, o padrão de hemólise observado não alterou a dosagem sérica de potássio nem a atividade sérica de TGO, sugerindo que estes exames não têm seus resultados alterados quando há pequena taxa de hemólise. Por outro lado, observou-se uma alteração significativa da atividade sérica de LDH, que foi diretamente proporcional aos níveis de hemoglobina sérica, demonstrando que a determinação de LDH é altamente influenciada pela hemólise. Pequenas taxas de hemólise também podem causar diluição da amostra e reduzir os valores de alguns exames como a glicemia de jejum.

REFERÊNCIAS

BASQUES, J. C. - *Especificações de qualidade analítica*. Labtest Diagnóstica. 2005.

FEDERAL OCCUPATIONAL SAFETY & HEALTH ADMINISTRATION. *Disposal of contaminated needles and blood tube holders used for phlebotomy*. U.S. Department of Labor. Disponível em: <<http://www.osha.gov/dts/shib/shib101503.html>>. Acesso em: 22 set. 2009.

FRANK, J. J. *et al.* - *Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum*. Clin. Chem., 24 (11): 1966-1970, 1978.

GRANT, M. - *The effect of blood drawing techniques and equipment on the hemolysis of ED laboratory blood samples*. J. Emerg. Nurs., 29 (2): 116-121. 2003.

SCHEFFER, J. F.; GONZÁLEZ, F. H. D. - *Enzimologia clínica em medicina veterinária*. Porto Alegre, UFRGS, 2003. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/bioquimica>>. Acesso em: 15 set. 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA MEDICINA LABORATORIAL. *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso*. 2. ed. São Paulo, 2009. 109 p.

STANKOVIC, A. K. - *The laboratory is a key partner in assuring patient safety*. Clin. Lab. Med., 24: 1023–1035, 2004.

TRINDER, P. - *Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor*. Ann. Clin. Biochem., 6: 24-27, 1969.