UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

MESTRADO PROFISSIONAL EM HEMOTERAPIA E BIOTECNOLOGIA

Comparação de técnicas para determinação do grau de hemólise em concentrado de hemácias durante o armazenamento

Gabriela Coelho de Rezende Cunha

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Hemoterapia

Orientador: Prof. Dr. Edson Zangiacomi Martinez

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Ribeirão Preto

2017

Ficha Catalográfica

C972c

Cunha, Gabriela Coelho de Rezende

Comparação de técnicas para determinação do grau de hemólise em concentrado de hemácias durante o armazenamento / Gabriela Coelho de Rezende Cunha – Ribeirão Preto, 2017.

127p.; il. 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Hemoterapia

Orientador: Edson Zangiacomi Martinez

1. Hemólise2. Hemoglobina plasmática 3. Drabkin

CDU 612.118

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Gabriela Coelho de Rezende Cunha

Título: Comparação de técnicas para determinação do grau de hemólise em concentrado de hemácias durante o armazenamento

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre.
Área de concentração: Hemoterapia

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof .Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Prof .Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Prof .Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus, por abrir todas as portas para a realização desse curso. Por me capacitar, fortalecer e direcionar em todos os caminhos.

À minha família, pelo apoio, incentivo e paciência nos momentos de ausência. Em especial, a meu marido Paulo e a minha mãe Sandra. À minha pequena Sophia, que ainda em meu ventre participou dessa jornada.

Ao professor Edson Zangiacomi Martinez pela orientação do trabalho e apoio.

À Maria Angela Ottoboni pela co-orientação e disponibilidade.

À Flávia Naves Givisiez, pelo incentivo, proposição de ideias e sugestões e pela confiança em meu trabalho na Fundação Hemominas.

À equipe da Gerência de Controle de Qualidade da Fundação Hemominas pelo apoio e compreensão e auxílio.

À Daniele Gomes Ribeiro, por ter realizado comigo todos os testes deste trabalho por um longo período.

À minha amiga Alessandra Nívia Silva pelo incentivo e encorajamento.

Ao Ministério da Saúde, Fundação Hemominas e Hemocentro de Ribeirão Preto pela capacitação e por fornecer todas as condições para realização do curso.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

À Fresenius pela doação de reagentes e kits para a realização de alguns testes deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente participaram deste trabalho.

RESUMO

Cunha GCR. Comparação de técnicas para determinação do grau de hemólise em concentrado de hemácias durante o armazenamento (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, 2017.

A determinação do grau de hemólise é um importante indicador utilizado para assegurar a qualidade de armazenamento dos concentrados de hemácias (CH), sendo um dos parâmetros avaliados nas análises de controle de qualidade de hemocomponentes. A hemólise em unidades de CH pode ser causada por diversos fatores, tais como: procedimentos inadequados durante a coleta eo processamento do sangue, condições impróprias de armazenamento, contaminação bacteriana, algumas drogas e outros fatores anormais no sangue do doador. Apesar da existência de diretrizes nacionais e internacionais que determinam o grau de hemólise aceitável nos CH, não há padronização em relação ao método ideal para quantificar o percentual de hemólise. Para determinação do grau de hemólise em CH são necessárias a análise da hemoglobina total, hemoglobina plasmática e hematócrito. Esses três testes podem ser mensurados por diversas técnicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a concordância entre três métodos para determinação da hemoglobina plasmática (Drabkin, Espectrofotométrico Ótico e Azida Metahemoglobina HemoCue® Plasma/Low Hb), dois métodos para dosagem do hematócrito (microhematócrito e analisador hematológico Cell-Dyn Ruby) e dois métodos para determinação da hemoglobina total (azida metahemoglobina HemoControl e analisador hematológico Cell-Dyn Ruby). Foram analisadas 59 bolsas de CH produzidas pelo Hemocentro de Belo Horizonte, Minas Gerais. As bolsas foram divididas em dois grupos amostrais, um composto de CH CPDA1 e outro CH CPD SAG manitol. Os testes foram realizados em todas as bolsas em três momentos do armazenamento. As análises foram feitas utilizando gráficos de Bland-Altman. Nas análises de hemoglobina plasmática foi observada uma boa concordância entre os métodos de Drabkin, Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low nas bolsas CPD/SAG manitol em todos os períodos do armazenamento, porém, nas bolsas CPDA1, ao final da validade, a mesma não foi verificada. Nessas bolsas a média da diferença entre os métodos Drabkin e Espectrofotométrico, assim como os limites de concordância foram muito elevados (média 0,42g/dL e limites entre -0,02 e -0,85 g/dL), indicando uma pior concordância entre os métodos nesse momento do armazenamento. Nas análises de hemoglobina total foi observada boa concordância entre o analisador hematológico Cell-Dyn Ruby e o hemoglobinômetro HemoControl EKF nos dois grupos de bolsas analisadas e em todos os períodos do armazenamento. Os métodos de microhematócrito e analisador hematológico Cell-Dyn Ruby foram concordantes para as análises do hematócrito, tanto em CH CPDA1 como em CH CPD/SAG manitol. A escolha do método de determinação de hemoglobina livre tem papel fundamental na determinação de resultados de hemólise, podendo gerar um percentual maior de não conformidades nas análises de controle de qualidade e aumento no número de descarte de bolsas por esse motivo, principalmente em CH CPDA1. Nesse trabalho, foi possível constatar que ao final do armazenamento, nas bolsas CPDA1, o método espectrofotométrico subestimou resultados de hemólise, principalmente nos hemocomponentes com altas concentrações de hemoglobina livre. Os métodos de Drabkin e HemoCue Plasma Low apresentaram uma melhor concordância na determinação da hemólise dessas bolsas ao final da validade.

Palavras chaves: Hemólise, Hemoglobina plasmática, Drabkin, Concentrado de hemácias

ABSTRACT

Cunha GCR. Comparison of techniques for measure hemolysis in red blood cell during storage (Master Degree) – Ribeirão Preto Medical School (FMRP), University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, 2017.

The determination of the level of hemolysis is an important indicator that is used to ensure the quality of the storage of red blood cell (RBC). It is one of the parameters evaluated in the analyses of the quality control of blood components. The hemolysis in the units of red blood cell (RBC) can be caused by several factors, for example: inappropriate procedures during the blood processing, inappropriate conditions of storage, bacterial contamination, some drugs and another abnormal factors in the blood donor. Despite the existence of national and international guidelines that determinate the acceptable level of hemolysis in the red blood cells concentrate, there is no standardization in relation to the ideal method to quantify the percentage of the hemolysis. To determine the acceptable level of hemolysis in the red blood cells concentrate, the analysis of total hemoglobin, free hemoglobin and hematocrit is necessary. These three tests can be measured by several techniques. The aim of the presented study was to evaluate the concordance between the three methods to determinate free hemoglobin (Drabkin, Optical spectrophotometric e Azide Metehemoglobin HemoCue® Plasma/Low Hb), two method to hematocrit dosage, (microhematocrit e hematology analyser Cell Dyn Ruby) and two method to determination of hemoglobin (azide metehemoglobin HemoControl e hematology analyser Cell Dyn Ruby). For this purpose Bland-Altman graphics were used. 59 bags of red blood cell that was produced by Blood Center of Belo Horizonte (Hemominas), Minas Gerais were analyzed. The bags were divided in two sample groups, one compound of RBC CPDA1 and other RBC CPD SAG mannitol. The tests were accomplished in all bags in three moments of the storage. In the analysis of free hemoglobin a good agreement between Drabkin methods, spectrophotometric and HemoCue Plasma Low in bags CPD/SAG mannitol was observed in all periods of storage. Although, in the bags of CPDA1, in the end of validity, the same was not verified. In these bags the average of the difference between the methods of Drabkin and spectrophotometric, as well as the limits of agreement were very high (average 0,42g/dL and limits between -0,02 e -0,85 g/dL), that indicates worse agreement between the methods in this moment of the storage. In the analysis of the total hemoglobin a good agreement between the hematology analyzer Cell Dyn Ruby and the hemoglobinometer HemoControl EKF was observed in both groups of analysed bags and in all periods of the storage. The method of microhematocrit and hematology analyzer Cell Dyn Ruby were consistent for the analyses of the hematocrit, as in RBC CPDA1 as in RBC CPD/SAG mannitol. The choice of the determination of method of the free hemoglobin has a fundamental role in the detemination of secure and reliable hemolysis results, that may genarete a bigger percentage of non-compliance in the analysis of quality control and an increase in the number of discard bags, for this reason, mainly in RBC CPDA1. In this study, it was possible to observe that in the end of the storage, in CPDA1 bags, the spectrophotometric method underestimated the results of the hemolysis, mainly in hemocomponents with high concentration of the free hemoglobin. The methods of Drabkin e HemoCue Plasma Low presented a better agreement for the measure hemolysis of the bags in the end of vality.

Key words: Hemolisys, Free hemoglobin, Drabkin, Red blood cell

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AS-1	adenina, dextrose, manitol, cloreto de sódio
AS-5	adenina, dextrose, manitol, cloreto de sódio
BTHC	butyryl-n-trihexyl-citrate
CH	concentrado de hemácias
CPD	ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato, dextrose
CPDA-1	citrato, fosfato, dextrose, adenina
CV	coeficiente de variação
DEHP	di-(2-ethylhexyl) phthalate
dp	desvio padrão
G6PD	glicose 6 fosfato desidrogenase
Hb	hemoglobina
HbCO	carboxihemoglobina
Hi	metahemoglobina
HiCN	cianometahemoglobina
ICSH	International Council for Standardization in Haematology
Ht	hematócrito
MS	Ministério da Saúde
nm	nanômetro
pH	potencial hidrogeniônico
PVC	polyvinyl chloride
rpm	rotações por minuto
SAG	soro fisiológico, adenina, glicose
SAGM	soro fisiológico, adenina, glicose, manitol
VCM	volume corpuscular médio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de hemoglobina obtidas a partir de diferentes diluições de uma mesma amostra 28
Tabela 2. Resultados fictícios de hemoglobina total (g/dL) obtidos pelos métodos 1 e 2..39
Tabela 4.Valores da absorbância em 540 (nm), segundo diluição. 45
Tabela 5.Linearidade da hemoglobina plasmática obtida pelo método Drabkin. 47
Tabela 6.Linearidade da hemoglobina plasmática obtida pelo método Azida metahemoglobina do HemoCue® Plasma/LowHb. 48
Tabela 7.Linearidade da hemoglobina plasmática obtida pelo método espectrofotométrico.....49
Tabela 8.Linearidade da hemoglobina total obtida pelo Hemoglobinômetro EKF. 50
Tabela 9.Linearidade da hemoglobina total obtida pelo analisador hematológico Cell Dyn. 51
Tabela 10.Linearidade do hematócrito obtido pelo método de microhematócrito. 52
Tabela 11. Linearidade do hematócrito obtido pelo analisador hematológico Cell Dyn Ruby. 53
Tabela 12.Média e desvio padrão de hemoglobina (Hb) total, hematócrito e Hb plasmática obtidos a partir de diferentes métodos no grupo de bolsas CH CPDA1 em momentos distintos do armazenamento.....58
Tabela 13. Média e desvio padrão de hemoglobina (Hb) total, hematócrito e Hb plasmática obtidos a partir de diferentes métodos no grupo de bolsas CH CPD/SAG manitol em momentos distintos do armazenamento. 60
Tabela 16. Percentual médio de hemólise em CH CPD/SAG manitol em diferentes dias de armazenamento utilizando o Cell-Dyn para determinação da hemoglobina total e hematócrito.....62
Tabela 17.Percentual médio de hemólise em CH CPD/SAG manitol em diferentes dias de armazenamento utilizando o hemoglobinômetro EKF para dosagem da hemoglobina total e microhematócrito para determinação do hematócrito. 62
Tabela 18. Percentual de conformidade do grau de hemólise em bolsas CPDA1 no vencimento.....63
Tabela 19.Coeficiente de variação(CV) inter-ensaio para os métodos de determinação da hemoglobina livre.....63
Tabela 20.Coeficiente de variação(CV) inter-ensaio para os métodos de determinação da hemoglobina total e hematócrito. 64
Tabela 21. Coeficiente de variação (CV) intra-ensaio para os métodos de determinação da hemoglobina livre 64
Tabela 22. Coeficiente de variação (CV) intra-ensaio para os métodos de determinação da hemoglobina total e hematócrito. 65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de dispersão, dados fictícios (Tabela 2). 36
Figura 2. Gráficos de dispersão, considerando quatro diferentes conjuntos de dados fictícios.....37
Figura 3. Gráfico de Bland-Altman, dados fictícios (Tabela 2). 38
Figura 4. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman, dados da Tabela 3. 43
Figura 5.Curva de calibração de hemoglobina 46
Figura 6.Linearidade hemoglobina plasmática (g/dL) pelo método de Drabkin.....47
Figura 7. Linearidade hemoglobina plasmática (g/dL) pelo (a) métodoHemoCue Plasma Low e pelo (b) método Espectrofotométrico.....48
Figura 8.Linearidade hemoglobina total (g/dL) no Hemogloninômetro EKF, considerando as amostras 1, 2 e 3 (gráficos (a), (b) e (c), respectivamente).....54
Figura 9.Linearidade hemoglobina total (g/dL) no analisador hematológico, considerando as amostras 1, 2 e 3 (gráficos (a), (b) e (c), respectivamente).....55
Figura 10.Linearidade hematócrito (%) no método de microhematócrito, considerando as amostras 1, 2 e 3 (gráficos (a), (b) e (c), respectivamente).....56
Figura 11.Linearidade hematócrito (%) no analisador hematológico Cell Dyn, considerando as amostras 1, 2 e 3 (gráficos (a), (b) e (c), respectivamente).....57
Figura 12.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hemoglobina total obtida no Cell Dyn e no hemoglobinômetro, Amostra 1, dias 1, 19 e 35.....67
Figura 13.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hemoglobina total obtida no Cell Dyn e no hemoglobinômetro, Amostra 2, dias 1, 19 e 42.....68
Figura 14.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hematócrito obtido no Cell Dyn e no microhematócrito, Amostra 1, dias 1, 19 e 35. 70
Figura 15.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hematócrito obtido no Cell Dyn e no microhematócrito, Amostra 2, dias 1, 19 e 42. 71
Figura 16.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da Hb livre obtidas nos métodos de Drabkin e Espectrofotométrico, Amostra 1, dias 1, 19 e 35. 72
Figura 17.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da Hb livre obtidas nos métodos de Drabkin e Espectrofotométrico,Amostra 2, dias 1, 19 e 42. 73
Figura 18.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hemoglobina livre obtidas nos métodos de Drabkin e HemoCue Plasma Low, Amostra 1, dias 1, 19 e 35. 75
Figura 19.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hemoglobina livre obtidas nos métodos de Drabkin e HemoCue Plasma Low, Amostra 2, dias 1, 19 e 42. 76
Figura 20.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da Hb livre obtidas nos métodos Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low, Amostra 1, dias 1, 19 e 35. 77
Figura 21.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da Hb livre obtidas nos métodos Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low, Amostra 2, dias 1, 19 e 42. 78
Figura 22.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos de Drabkin e Espectrofotométrico (Hb total e Ht Cell Dyn), Amostra 1, dias 1, 19 e 35.....80
Figura 24. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos Drabkin e Espectrofotométrico (Hb total hemoglobinômetro e Ht mi-

crohematócrito), Amostra 1, dias 1, 19 e 35.....82
Figura 25. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos Drabkin e Espectrofotométrico (Hb total hemoglobinômetro e Ht microhematócrito), Amostra 2, dias 1, 19 e 42.....83
Figura 26.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos de Drabkin e HemoCue Plasma Low (Hb total e Ht Cell -Dyn), Amostra 1, dias 1, 19 e 35.....84
Figura 27.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hemólise utilizando os métodos de Drabkin e HemoCue Plasma Low (Hb total e Ht Cell -Dyn), Amostra 2, dias 1, 19 e 42.....85
Figura 28. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hemólise utilizando os métodos deDrabkin e HemoCue Plasma Low(Hb total hemoglobinômetro e Ht microhematócrito), Amostra 1, dias 1, 19 e 35.....87
Figura 30.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low (Hb total e Ht Cell Dyn), Amostra 2, dias 1, 19 e 35.....90
Figura 31.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low (Hb total e Ht Cell Dyn), Amostra 2, dias 1, 19 e 42.....91
Figura 32.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos de Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low(Hb total hemoglobinômetro e Ht microhematócrito), Amostra 1, dias 1, 19 e 35. 92
Figura 33.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos de Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low(Hb total hemoglobinômetro e Ht microhematócrito), Amostra 2, dias 1, 19 e 42. 93
Figura 34.Fluxograma para escolha do método de hemoglobina livre (Hb livre) para determinação do percentual de hemólise em serviço de hemoterapia de pequeno porte. 103
Figura 35.Fluxograma para escolha do método de hemoglobina livre (Hb livre) para determinação do percentual de hemólise em serviço de hemoterapia de médio ou grande porte. 104
Figura36. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina total (amostra 1) no Hemoglobinômetro HemoControl EKF. 107
Figura37. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina total (amostra 2) no Hemoglobinômetro HemoControl EKF. 107
Figura38. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina total (amostra 3) no Hemoglobinômetro HemoControl EKF. 108
Figura39. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina total (amostra 1) no analisador hematológico Cell Dyn Ruby.....108
Figura40. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina total (amostra 2) no analisador hematológico Cell Dyn Ruby.....109
Figura41. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina total (amostra 3) no analisador hematológico Cell Dyn Ruby.....109
Figura42. Gráfico reprodutibilidade da hematócrito (amostra 1) no analisador hematológico Cell Dyn Ruby.....110
Figura43. Gráfico reprodutibilidade da hematócrito (amostra 2) no analisador hematológico Cell Dyn Ruby.....110

Figura44. Gráfico reprodutibilidade da hematócrito (amostra 3) no analisador hematológico Cell Dyn Ruby.....111
Figura45. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina livre (amostra 1) no método de Drabkin. 111
Figura46. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina livre (amostra 2) no método de Drabkin. 112
Figura47. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina livre (amostra 1) no método HemoCue Plama Low. 112
Figura48. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina livre (amostra 2) no método HemoCue Plama Low. 113
Figura49. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina livre (amostra 1) no método Espectrofotométrico.....113
Figura50. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina livre (amostra 2) no método Espectrofotométrico.....114
Figura51. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 1) no Hemoglobinômetro HemoControl EKF. 114
Figura52. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 2) no Hemoglobinômetro HemoControl EKF. 115
Figura53. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 3) no Hemoglobinômetro HemoControl EKF. 115
Figura54. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 4) no Hemoglobinômetro HemoControl EKF. 116
Figura55. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 1) no CellDyn. 116
Figura56. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 2) no CellDyn. 117
Figura57. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 3) no CellDyn. 117
Figura58. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 4) no CellDyn. 118
Figura59.Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 1) no CellDyn.....118
Figura60. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 2) no CellDyn.....119
Figura61. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 3) no CellDyn.....119
Figura62. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 4) no CellDyn. 120
Figura63. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 1) no método microhematócrito. 120
Figura64. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 2) no método microhematócrito. 121
Figura65. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 3) no método microhematócrito. 121
Figura66. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 4) no método microhematócrito. 122
Figura67. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 1) no método Espectrofotométrico.....122
Figura68. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 2) no método Espectrofotométrico.....123
Figura69. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 3) no método Espectrofotométrico.....123
Figura70. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 1) no método Drabkin. .. 124
Figura71. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 2) no método Drabkin. .. 124

Figura72. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 3) no método Drabkin. .. 125
Figura73. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 1) no método HemoCue Plasma Low. 125
Figura74. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 2) no método HemoCue Plasma Low. 126
Figura75. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 3) no método HemoCue Plasma Low. 126

SUMÁRIO

1. Introdução 15
2. Justificativa 23
3. Hipótese 25
4. Objetivos 26
4.1. Objetivo geral 26
4.2. Objetivos específicos 26
5. Métodos 27
5.1. Amostragem 27
5.2. Ensaios de linearidade 27
5.2.1. Linearidade, Hemoglobina Plasmática 28
5.2.2. Linearidade, Hemoglobina total e Hematócrito 29
5.3.Determinação da hemoglobina total 29
5.3.1. Método Azida metahemoglobina (HemoControl-EKF) 29
5.3.2. Analisador Hematológico automatizado 29
5.4.Determinação da hemoglobina plasmática (hemoglobina livre) 30
5.4.1. Espectrofotométrico ótico 30
5.4.2. Método Azida metahemoglobina do HemoCue® Plasma/Low Hb 31
5.4.3. Método de Drabkin 32
5.5. Métodos para determinação de hematócrito 32
5.6. Cálculo do percentual de hemólise 32
5.7. Testes microbiológicos 33
5.8.Variabilidade inter-ensaio (Reprodutibilidade) 33
5.8.1. Reprodutibilidade- Hemoglobina Livre 33
5.8.2. Reprodutibilidade- Hemoglobina e Hematócrito 33
5.9. Variabilidade intra-ensaio (Repetitividade) 34
5.9.1. Repetitividade-Hemoglobina Livre 34
5.9.2. Repetitividade – Hemoglobina total e hematócrito 34
5.10. Análise estatística 35
5.10.1. Comparações de hemoglobina total, hemoglobina plasmática, hematócrito e hemólise ao longo do armazenamento 35
5.10.2. Análise da concordância entre as determinações de hemoglobina plasmática, hemoglobina total, hematócrito e hemólise obtidas pelos diferentes métodos 35
6. Resultados 45
6.1. Curva de calibração de hemoglobina 45

6.2.Ensaios de Linearidade 46
6.2.1. Linearidade, Hemoglobina Plasmática 46
6.2.2. Testes de Linearidade, Hemoglobina total e Hematócrito 49
6.3. Análise do percentual de hemólise nos hemocomponentes durante o armazenamento.....60
6.4. Variabilidade Inter-ensaio (Reprodutibilidade).....63
6.5. Variabilidade Intra-ensaio (Repetitividade) 64
6.6. Análises de Concordância 65
6.6.1. Hemoglobina Total: Concordância entre Cell-Dyn e Hemoglobinômetro EKF.....66
6.6.2. Hematócrito: Concordância entre Cell-Dyn e Microhematócrito.....69
6.6.3. Hemoglobina livre: Concordância entre método de Drabkin e Espectrofotométrico.74
6.6.4. Hemoglobina livre: Concordância entre método de Drabkin e HemoCue® Plasma Low 74
6.6.5.Hb livre: Concordância entre método de Espectrofotométrico e HemoCue® Plasma Low 79
6.6.6. Hemólise: Concordância entre os métodos de Drabkin e Espectrofotométrico 79
6.6.7. Hemólise: Concordância entre os métodos de Drabkin e HemoCue Plasma Low.....86
6.6.8. Hemólise: Concordância entre método Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low 89
7. Discussão 94
8. Conclusão.....101
9. Recomendações 102
APÊNDICE.....107
ANEXO 127

1. Introdução

Os concentrados de hemácias (CH) são os eritrócitos que permanecem na bolsa depois que esta é centrifugada e o plasma é extraído para uma bolsa satélite. Os CH podem ser ressuspendidos no próprio plasma ou em soluções aditivas que fornecem nutrientes adicionais para células. O hematócrito esperado depende do tipo de solução preservativa adicionada à bolsa, variando de 50 a 70% para bolsas com solução aditiva e de 65 a 80 % para bolsas sem solução aditiva (Portaria MS 158/2016).

Dentre os parâmetros avaliados nas análises de controle de qualidade de hemocomponentes, o grau de hemólise é um importante indicador utilizado para assegurar a qualidade de armazenamento dos CH (SOWEMIMO-COKER, 2002). No Brasil, de acordo com a Portaria MS 158/2016, o grau de hemólise considerado aceitável em bolsas de CH deve ser menor que 0,8% na data de vencimento em 75% dos hemocomponentes avaliados pelo controle de qualidade. Da mesma forma o Conselho Europeu (2015) determina que o grau de hemólise deve estar abaixo de 0,8% na data do vencimento da bolsa. Já a Associação Americana de Bancos de Sangue (2011) considera que as bolsas de CH devem ter o grau de hemólise menor que 1%.

Para garantia da qualidade dos CH, a legislação brasileira determina que sejam realizados o controle de qualidade de pelo menos 1% da produção ou 10 unidades por mês (o que for maior). Além do grau de hemólise, são obrigatórias a análise do teor de hemoglobina da bolsa, a determinação do hematócrito e a realização do teste microbiológico. Para CH desleucocitados e CH com camada leucoplaquetária removida também deve ser avaliado a contagem de leucócitos (Portaria MS 158/2016).

Durante o período de armazenamento dos componentes eritrocitários, a membrana da hemácia sofre alterações bioquímicas e morfológicas. Essas mudanças são conhecidas como lesões de armazenamento e um dos indicadores dessas lesões é o percentual de hemólise (ADAMS et al., 2015).

A hemólise se dá pelo dano ou rompimento da integridade da membrana da hemácia com consequente liberação da hemoglobina (SOWEMIMO-COKER, 2002).A hemólise em unidades de CH pode ser causada por diversos fatores, tais como: procedimentos inadequados na coleta e no processamento do sangue, condições impróprias de armazenamento, contaminação bacteriana, algumas drogas ou substâncias como penincilina, vitamina C e outros fatores anormais no sangue do doador. Algumas padronizações de procedimentos de produção e estocagem são utilizadas para minimizar a hemólise em células vermelhas, porém é esperado que alguma hemólise ocorra nos hemocomponentes ao longo do armazenamento (HAN, SERRANO, DEVINE, 2010).

Segundo Sowemino-Coker (2002), os procedimentos de coleta e preparo de hemocomponentes nos bancos de sangue quando não padronizados podem levar a lise de hemácias e liberação da hemoglobina no plasma sobrenadante. Alguns exemplos incluem: tempo elevado entre coleta e centrifugação das bolsas de sangue total, alta velocidade durante homogeneização do sangue com a solução anticoagulante durante a coleta e procedimentos inadequados de centrifugação (altas velocidades de centrifugação utilizadas para máxima recuperação de plasma que resultam em valores de hematócrito acima de 80%).

Durante a estocagem dos CH, há progressivo aumento da hemólise com liberação da hemoglobina no sobrenadante (fenômeno análogo ao da hemólise intravascular).O teste de hemólise é realizado para certificação da qualidade deste hemocomponente durante sua produção e estocagem e para evitar os danos que a hemoglobina livre possa provocar nos receptores, como a insuficiência renal aguda. A determinação do percentual de hemólise é ainda importante para minimizar a transfusão de amostras contaminadas por microrganismos. Além disso, níveis elevados de potássio e de hemoglobina em si podem causar complicações significativas em alguns pacientes (JANATPOUR et al., 2004).

As implicações clínicas da hemólise em CH transfundidos em pacientes são muito graves e podem provocar lesões nos tecidos, endotélio e túbulos proximais renais. A interação da hemoglobina plasmática com o óxido nítrico causa disfunção endotelial, sendo um fator de risco para vasoconstrição, adesão leucocitária e trombose intravascular. Substancias pró-coagulantes e pró-inflamatórias provenientes da perda de microvesículas da superfície da membrana da hemácia lisada, afeta a microcirculação e consequentemente a hemodinâmica (ADAMS et al.,2015).

Certos plastificantes utilizados na fabricação de bolsas de coleta de sangue também estão associados ao aumento de hemólise em CH durante o armazenamento. Bolsas compostas por PVC (cloreto de polivinila) e o plastificante butyryl-n-trihexyl-citrate(BTHC) estão relacionadas com uma elevada concentração de hemoglobina livre, variando de 850 mg/dL a 1,470 mg/dL. Ao contrário, hemocomponentes produzidos em bolsas fabricadas com o di-(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP), apresentam um menor grau de hemólise durante o armazenamento (SOWEMIMO-COKER, 2002). O DEHP em contato com a membrana da hemácia é capaz de reduzir o grau de hemólise em até quatro vezes (HESS, 2014).

A temperatura do hemocomponente durante a processo de filtração e estocagem pode influenciar na determinação da hemólise. Temperaturas extremas acima de 40º C ou abaixo 0ºC afetam a membrana da hemácia promovendo a lise da célula (HAN, SERRANO, DEVINE, 2010). CH estocados em refrigeradores que não são monitorados adequadamente podem sofrer hemólise pelo congelamento acidental das bolsas. Da mesma maneira o calor excessivo promovido por seladores que são utilizados para separação de segmentos dos tubos coletores ou equipamentos de conexão estéril usados para retirada de amostras podem causar dano nas células (SOWEMIMO-COKER, 2002).

A liberação de peróxido de hidrogênio e proteases pelos leucócitos em CH não desleucocitados pode causar a lise das hemácias durante o período de armazenamento (ADAMS et al., 2015). A leucorredução, realizada adequadamente, provavelmente melhora o armazenamento das células vermelhas do sangue a partir de dois mecanismos. Primeiro prevenindo a alta ação metabólica dos leucócitos removendo-os antes destas células terem a chance de consumir glicose e criar resíduos através do rompimento. Segundo, a remoção dos leucócitos enquanto ainda estão intactos previne a liberação de enzimas provenientes da ruptura destas células e que poderiam causar dano às hemácias durante a o período de armazenamento (HESS e GREENWALT, 2002).

A irradiação de componentes sanguíneos afeta a integridade da hemácia, através do aumento da fragilidade osmótica, lise de células e liberação de potássio. Unidades de CH que sofrem irradiação estão mais propensas a sofrer hemólise durante a leucofiltração. Alguns fatores são determinantes para a hemólise associados à filtração, como: a força exercida na bolsa de concentrado de hemácias para promover o escoamento do hemocomponente pelo filtro, ordenha de segmentos das bolsas para coleta de amostras para análise, ar preso no filtro

ou gerado durante a homogeneização do hemocomponente e temperaturas extremas durante a filtração (SOWEMIMO-COKER, 2002).

De acordo com o um estudo realizado por Hesset al. (2009), com mais de 10.000 amostras de CH, foi possível confirmar através de análises estatísticas que leucorredução, a duração da estocagem, a quantidade de manitol presente em soluções preservantes e o hematócrito são fatores determinantes para a hemólise ao final da estocagem.De acordo com Sowemino-Coker (2002), alguns fatores individuais nos doadores, como a diminuição da deformabilidade e defeitos na membrana da hemácia exercem grande influência na hemólise espontânea ou decorrente do armazenamento. CH provenientes de doadores com deficiência da glicose-6 fosfato desidrogenase (G6PD) e traço falciforme, por exemplo, podem ocasionar hemólise na bolsa. Componentes de doadores urêmicos possuem baixa deformabilidade da membrana da hemácia podendo ser responsáveis por hemólise mecânica.

As soluções anticoagulantes utilizadas durante a coleta do sangue total foram desenvolvidas para prevenir a coagulação e permitir o armazenamento das células vermelhas. Originalmente formuladas para estocagem do sangue total, elas têm sido utilizadas nos componentes sanguíneos que são preparados. Todas as soluções contêm citrato, ácido cítrico e glicose, algumas delas podem conter ainda adenina, guanosina e fosfato. O citrato se liga ao cálcio para prevenir a coagulação.A glicose é utilizada pelas células vermelhas durante a estocagem. O acido cítrico é adicionado a solução para se obter uma concentração de íons hidrogênio que é suficientemente elevada no inicio do armazenamento a 4ºC. Sem a adição do acido cítrico o sangue ficaria muito alcalino na temperatura de armazenamento. Durante o preparo dos CH parte considerável da glicose e adenina são removidas com o plasma. Dessa forma, para melhorar a qualidade do CH é necessário fornecer outros nutrientes através da ressuspenssão das células em soluções aditivas (COUNCIL OF EUROPE, 2015).

O desenvolvimento e melhoria das soluções anticoagulantes e aditivas para concentrado de hemácias permitiram o aumento do tempo de armazenamento, melhor recuperação 24 horas in vivo ao final da estocagem e redução da hemólise. Consequentemente esses avanços possibilitaram o aumento da segurança e eficiência dos produtos sanguíneos. As primeiras soluções anticoagulantes permitiam o armazenamento do sangue por três semanas, como o ACD e CPD. Posteriormente, soluções contendo citrato, fosfato, dextrose e adenina (CPDA1) ou soluções com CPD/SAG aumentaram o tempo de armazenamento do

CH por cinco semanas. A primeira solução aditiva foi o SAG (salina, adenina e glicose) que permitiu o armazenamento por 5 semanas. Porém, foi observado que o percentual de hemólise era em média de 0,58%. A hemólise dos CH armazenados variava muito de doador para doador, sendo um fator limitante para o uso dessa solução. Foi então, que a adição do manitol à solução SAG (SAG Manitol), reduziu a hemólise em 50% e permitiu o armazenamento das bolsas por 06 semanas (HEES, 2006).

Estabilizadores de membrana como o manitol são capazes de aumentar o tempo de estocagem dos CH por 06 semanas com o SAG manitol e seus variantes AS-1 e AS-5(HESS e GREENWALT, 2002).

Conforme estudo feito por Hess et al. (2009), altas concentrações de manitol, contidas na solução AS-1 (42 mmol/L) permitem melhor proteção contra hemólise do que soluções como o SAG-M que contém menores concentrações (30 mmol/L).

As soluções aditivas permitem a manutenção e viabilidade das células vermelhas, mesmo quando 90% do plasma é removido. O uso da glicose e adenina é necessário para manter a viabilidade das células vermelhas após a transfusão. O manitol pode prevenir a hemólise in vitro (COUNCIL OF EUROPE, 2015).

Apesar da existência de diretrizes nacionais e internacionais que determinam o grau de hemólise aceitável nos CH, não há padronização em relação ao método ideal para mensurar o percentual de hemólise. Existem diversos métodos para avaliar os parâmetros relacionados no cálculo do grau de hemólise e a escolha do método analítico pode influenciar de forma crítica os resultados (ACKER, CROTEAU, YI, 2012).

Em um estudo feito por Hees et al. (2005) com 14 laboratórios dos Estados Unidos e Uninão Européia para determinar a variabilidade de resultados de níveis de hemólise de CH, demonstrou um coeficiente de variação de 54% para este parâmetro. Esse dado indica que apesar dos métodos utilizados pelos laboratórios para análise da qualidade do armazenamento dos CH demonstrarem boa precisão, diferenças nos resultados entre os laboratórios podem prejudicar análises comparativas.

O teste de hemólise foi primeiramente utilizado por Rous e Turner em 1916, quando foi descrito a solução de estocagem do CH. Este método constitui um excelente parâmetro

para determinação da qualidade do hemocomponente, sendo de fácil execução, seguro e barato, sendo diretamente relacionado com a função da hemácia e a toxicidade da hemoglobina livre (HEES et al., 2009).

O grau de hemólise é definido como percentual de hemoglobina livre em relação à hemoglobina total. É calculado utilizando os valores de hemoglobina total, hemoglobina plasmática e hematócrito de acordo com a seguinte expressão(SOWEMIMO-COKER,2002):

$$\text{Percentual de hemólise}(\%) = (100 - \text{Hematócrito}) \times \frac{\text{hemoglobina livre no plasma}}{\text{hemoglobina total}}$$

Os métodos manuais utilizados para determinação da concentração de hemoglobina de uma amostra podem ser realizados através de: medida da cor, medida da capacidade de combinação do oxigênio ou monóxido de carbono, dosagem do ferro. Os métodos para determinação da hemoglobina por comparação de cor ou intensidade luminosa medem qualquer pigmento inerte que possa estar presente como metahemoglobina ou sulfohemoglobina. Os mais utilizados são o método da cianometahemoglobina (HiCN) e oxihemoglobina. A exatidão de ambos é a mesma, porém o método da cianometahemoglobina possui como vantagem a fácil obtenção de um padrão de referência estável(LEWIS, BRAIN, BATES, 2006).

O Comitê Internacional para Padronização em Hematologia recomenda que as determinações de hemoglobina total sejam realizadas pelo método da cianometahemoglobina (HiCN). Esse método consiste na diluição do sangue em solução contendo cianeto e ferricianeto de potássio (Solução de Drabkin) (ZWART et al., 1996). A hemoglobina, a metahemoglobina (Hi) e a carboxihemoglobina (HbCO), exceto a sulfohemoglobina (SHb) são convertidas em cianometahemoglobina (HiCN). A absorbância da solução é medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm, ou em colorímetro fotoelétrico(LEWIS, BRAIN, BATES, 2006).

O padrão de cianometahemoglobina (HiCN) é utilizado para padronização e calibração de medidas de hemoglobina de sangue total na maioria do hemoglobinômetros e analisadores hematológicos automatizados. O ICSH (*International Council for Standardization in Haematology*) é responsável por fornecer a comunidade de laboratórios de hematologia padrão de referência para hemoglobina (DAVIS, JUNGERIUS, 2009).

Embora a solução de Drabkin contenha apenas 50 mg de cianeto de potássio por litro, e mais de 600 ml devam ser ingeridos para causar efeitos tóxicos graves, o uso do cianeto é visto como risco potencial. Dessa forma alguns reagentes alternativos têm sido propostos, tais como a azida de sódio e o lauril sulfato de sódio, que convertem a hemoglobina em hemiglobinazida e hemiglobinsulfato, respectivamente. Tais reagentes são usados em alguns sistemas automatizados e não possuem padrões estáveis disponíveis (LEWIS, BRAIN, BATES, 2006).

Os métodos automatizados utilizam analisadores hematológicos e a maioria realiza dosagem da hemoglobina por modificação do método manual de cianometahemoglobina. As modificações incluem a concentração dos reagentes, o pH das reações e a temperatura. Há a inclusão de um detergente não-iônico para que ocorra a hemólise rapidamente e a turvação causada pelas membranas celulares e pelos lipídeos plasmáticos possa ser reduzida. As medidas de absorbância são feitas em intervalos programados, a partir da mistura do sangue com os reagentes (LEWIS, BRAIN, BATES, 2006).

A determinação do hematócrito pode ser realizada por método manual (microhematócrito) utilizando centrifugação, método considerado como padrão ouro, ou por aparelhos semi-automatizados ou automatizados como os analisadores hematológicos (ACKER, CROTEAU, YI, 2012). O método manual utiliza centrifugação para que os eritrócitos fiquem completamente compactados. Mede-se então, com o auxilio de uma régua de leitura apropriada, a proporção entre as células compactadas e a coluna total (LEWIS, BRAIN, BATES, 2006).

No método automatizado, o hematócrito é calculado de forma indireta através da multiplicação do volume corpuscular médio (VCM) pela contagem de células vermelhas(ACKER, CROTEAU, YI, 2012).

Existem mais de vinte diferentes métodos desenvolvidos para determinação da hemoglobina plasmática para uso clínico em sangue humano (MALINAUSKAS, 1997). A maioria deles se baseia nas características do espectro de absorção da hemoglobina que incluem a espectrofotometria em comprimento de ondas discreto, espectrofotometria derivada e espectrofotometria de análise de varredura (SOWEMIMO-COKER, 2002).

As análises da hemoglobina plasmática podem ser classificadas em técnicas ópticas diretas em que a quantificação é baseada na absorbância da oxihemoglobina nos comprimentos de onda de 415, 541 ou 577 nm. Alguns exemplos desses métodos são: Cripps, Kahn, Porter, Shinowara, Primeira Derivada, Harboe e Fairbanks AII.Existem, também as técnicas químicas, tais como a tetrametilbenzidina ou cianometahemoglobina. (MALINAUSKAS, 1997).

Embora usado por poucas instituições, os métodos espectrofotométrico óptico diretosão seguros, fáceis e mais precisos e acurados que os métodos químicos (SOWEMIMO-COKER, 2002).

O método da cianometahemoglobina modificado (micromodificação do método de Drabkin) usado para análise da hemoglobina plasmática produz resultados lineares na faixa de 5 a 2000 mg/dL. Esse método se compara bem com o procedimento de tetrametilbenzidina e possui como vantagens a rapidez, simplicidade e estabilidade. O método consiste na diluição do plasma sobrenadante no reagente de Drabkin. A hemoglobina livre é convertida em cianometahemoglobina e a absorbância é medida no espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm (MOORE, LEDFORD, MERYDITH,1981).

2. Justificativa

Nos serviços de hemoterapia existem variados métodos para determinação do grau de hemólise em CH. Tem sido demostrado na literatura que a variabilidade de técnicas pode conduzir a valores que impedem a comparação dos resultados entre os laboratórios de controle de qualidade (HAN, SERRANO, DEVINE, 2010).

Para determinação do grau de hemólise em concentrado de hemácias são necessárias a análise da hemoglobina total, hemoglobina plasmática e hematócrito. Esses três testes podem ser mensurados por técnicas manuais ou automatizadas.

A automação permite a realização dos testes de forma mais rápida e quando os equipamentos estão corretamente calibrados é possível atingir o mesmo grau de acurácia das técnicas manuais.

O Laboratório de Controle de Qualidade da Fundação Hemominas, localizado em Belo Horizonte, Minas Gerais, realiza por mês, aproximadamente 440 testes de hemólise em hemocomponentes produzidos pelo Hemocentro de Belo Horizonte e algumas unidades da Fundação Hemominas. Utiliza-se o método espectrofotométrico para determinação da hemoglobina plasmática, e o método automatizado para determinação da hemoglobina total e hematócrito. Nas demais unidades da Hemominas, que possuem laboratório de controle de qualidade local, o método utilizado para quantificação da hemoglobina plasmática é o espectrofotométrico e nos laboratórios que não dispõem de analisador hematológico são utilizados os métodos manuais microhematócrito e cianometahemoglobina para análise do hematócrito e hemoglobina total, respectivamente.A determinação manual da hemoglobina plasmática é trabalhosa e assim como outras técnicas manuais, utilizadas para análise dos demais hemocomponentes no laboratório de controle de qualidade, consomem muitas horas de trabalho dos profissionais do laboratório. O método manual espectrofotométrico para dosagem de hemoglobina plasmática utilizada na Hemominas, assim como em diversos Hemocentros brasileiros, segue os procedimentos descritos no Manual para Controle de Qualidade de sangue total e Hemocomponentes da Redsang-Sibratec de 2011. Porém, durante a revisão de literatura, não foram encontrados artigos científicos com a descrição dessa técnica.

A determinação da hemoglobina plasmática através de um método automatizado, como o sistema HemoCue plasma/Low, associada a determinação de hemoglobina total e hematócrito através do uso de analisador hematológico automatizado permitirá ao laboratório de controle de qualidade a realização de um maior número de testes de hemólise de forma objetiva e rápida.

Portanto, torna-se relevante avaliar alguns métodos disponíveis para determinação do grau de hemólise e avaliar qual seria a técnica mais adequada para utilização em um serviço de hemoterapia, tendo em vista a linearidade, reprodutibilidade, objetividade e praticidade.

3. Hipótese

O uso de métodos automatizados para realização de testes laboratoriais, apesar de possuírem um custo mais elevado, são mais reprodutíveis que os métodos manuais. A utilização do método azida metahemoglobina do HemoCuePlama/LowHb, para quantificação da hemoglobina plasmática e consequentemente determinação do grau de hemólise em CH, permite obter resultados equivalentes ao método espectrofotométrico ótico.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

- Avaliar a concordância entre métodos manuais de Drabkin (cianometahemoglobina), espectrofotométrico ótico e método automatizado azida metahemoglobina (HemoCue® Plasma/LowHb) para determinação do grau de hemólise em CH durante o armazenamento em relação a linearidade, reprodutibilidade, praticidade e viabilidade.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar a concordância entre os métodos da azida metahemoglobina (HemoCue® Plasma/Low Hb), Drabkin (cianometahemoglobina) e espectrofotométrico óptico para determinação de hemoglobina plasmática.
- Avaliar a concordância entre o método azida metahemoglobina (Hemo Control) e método automatizado por meio de analisador hematológico (Cell Dyn Ruby) para determinação da hemoglobina total.
- Avaliar a concordância entre o método manual de microhematócrito e método automatizado por meio de analisador hematológico (Cell Dyn Ruby) para determinação do hematócrito.
- Identificar a técnica mais adequada para utilização em um serviço de hemoterapia, tendo em vista a linearidade, reprodutibilidade, objetividade e praticidade.

5. Métodos

5.1. Amostragem

Os hemocomponentes analisados foram os CH produzidos pelo Hemocentro de Belo Horizonte e previamente separados para o Laboratório de Controle de Qualidade da Fundação Hemominas.

As amostras foram obtidas de 59 bolsas de concentrado de hemácias (CH), sendo 29 coletadas em bolsas triplas com anticoagulante CPDA-1 e 30 coletadas em bolsas triplas "*Top and Bottom*" com anticoagulante CPD e solução aditiva SAG-Manitol. As análises de hemoglobina total, hemoglobina plasmática e hematócrito foram realizadas em todas as unidades nos dias 1, 19 e 35 para CPDA-1 e 1, 19 e 42 para as bolsas com SAG-Manitol.

Do total de bolsas separadas para o Laboratório de Controle de Qualidade, semanalmente e de forma aleatória, cinco de cada tipo foram aproveitadas para realização dos testes propostos neste estudo.

O projeto de pesquisa foi avaliado pelo Comitê de Ética da Fundação Hemominas e aprovado em 07/01/2015 pelo parecer de número 930.061 (Anexo).

5.2. Ensaios de linearidade

Os ensaios de linearidade foram realizados nas diversas técnicas utilizando amostras de concentrado de hemácias CPDA-1. As amostras foram diluídas tentando-se obter alíquotas com variadas concentrações de hemoglobina total, hematócrito e hemoglobina plasmática para cobrir a faixa de linearidade de cada método analisado.

5.2.1. Linearidade, Hemoglobina Plasmática

Para determinação da linearidade da hemoglobina plasmática nos métodos de Drabkin, Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low, foi utilizada uma amostra de concentrado de hemácias CPDA1 com valor de hemoglobina de 22,7 g/dL. Foi escolhida uma bolsa CH CPDA1, devido a concentração de hemoglobina total ser mais elevada nesse tipo de hemocomponente. O valor de hemoglobina (22,7 g/dL) foi obtido no analisador hematológico Cell Dyn Ruby. A partir desta amostra foram realizadas várias diluições afim de se obter variadas amostras com diferentes concentrações de hemoglobina. Foram obtidas 13 amostras diferentes que foram utilizadas em cada método analisado. A Tabela 1 descreve as amostras obtidas após as diluições realizadas.

Tabela 1. Concentrações de hemoglobina obtidas a partir de diferentes diluições de uma mesma amostra

Identificação da amostra	Diluição 1/x	Amostras Valor esperado de Hb (g/dL)
1	1	22,700
2	2	11,350
3	4	5,675
4	7	3,243
5	8	2,838
6	9	2,522
7	20	1,135
8	200	0,114
9	400	0,057
10	800	0,028
11	2000	0,011
12	4000	0,006
13	10000	0,002

Hb: hemoglobina

5.2.2. Linearidade, Hemoglobina total e Hematócrito

Para verificação da linearidade do analisador hematológicoCell Dyn, do hemoglobinômetro e do método de microhematócrito, foram utilizadas três amostras de concentrado de hemácias CPDA1. Cada amostra possuia uma concentração diferente de hemoglobina e de hematócrito. As amostras foram diluídas e cada alíquota obtida foi testada para hemoglobina e/ou hematócrito no analisador hematológico, hemoglobinômetro EKF e técnica do microhematócrito.

5.3.Determinação da hemoglobina total

5.3.1. Método Azida metahemoglobina (HemoControl-EKF)

As amostras foram diluídas 1/2 na solução diluidora Readyn. As mesmas foram colocadas por capilaridade nas microcuvetas e inseridas no hemoglobinômetro. As absorbâncias das amostras foram medidas nos comprimentos de onda de 570 e 880 nm. O método de dosagem da hemoglobina utilizado pelo hemoglobinômetro portátil HemoControl EKF é a“azidametahemoglobina”. Os resultados foram obtidos em aproximadamente 25 segundos.

Em todos os testes foram utilizadas amostras controle em 3 níveis de concentração distintos.

5.3.2. Analisador Hematológico automatizado

As amostras foram diluídas 1/2, utilizando 300 µL do concentrado de hemácias em 300 µL do líquido diluidor do analisador hematológico. O valor de hemoglobina total foideterminado pelo contador hematológico Cell Dyn Ruby.

5.4.Determinação da hemoglobina plasmática (hemoglobina livre)

Os sobrenadantes de plasma de cada amostra foram obtidos após uma etapa de centrifugação. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos e separadas imediatamente, tomando-se o cuidado de não atingir a camada de hemácias sedimentadas.

5.4.1. Espectrofotométrico ótico

As amostras foram diluídas 1:10 utilizando-se 1800 µL de água destilada e 200 µL do plasma sobrenadante. A leitura da absorbância das amostras foi realizada nos comprimento de onda de 370 nm, 415 nm, 510 nm, 577 nm e 600 nm em espectrofotômetro. O cálculo para determinação da concentração de hemoglobina livre no plasma é usualmente efetuado de acordo com as seguintes expressões (REDSANG, 2011):

- Se a leitura em 415 for menor que 1,5, a Hb plasmática (g/dL) é dada por

$$\frac{Y}{113{,}22} 1{,}6125 \times \text{diluição},$$

sendo

$$X = leitura\ 510\ nm + \left(leitura\ 370\ nm - leitura\ 510\ nm\right) \times 0{,}68$$

e

$$Y = leitura\ 415\ nm - X\,.$$

- Se a leitura em 415 for maior que 1,5, a Hb plasmática (g/dL) é dada por

$$\frac{Y}{13{,}64} 1{,}6125 \times \text{diluição},$$

sendo

$$X = leitura\ 600\ nm + \left(leitura\ 510\ nm - leitura\ 600\ nm\right) \times 0{,}26$$

e

$$Y = leitura\ 577\ nm - X\,.$$

5.4.2. Método Azida metahemoglobina do HemoCue® Plasma/Low Hb

O sistema fotométrico para leitura de hemoglobina em baixas concentrações HemoCue® Plasma/Low Hb utiliza microcuvetas em que ocorrem a reação modificada da azidametahemoglobina. As amostras foram colocadas nas microcuvetas por capilaridade e estas inseridas no analisador. As absorbâncias das amostras foram medidas nos comprimentos de onda de 570 e 880 nm. A concentração de hemoglobina foi determinada pela absorbância em 570 nm e a absorbância em 880 nm foi utilizada para compensar o grau de turbidez. Os resultados foram obtidos após 60 segundos. Não foi necessária a diluição das amostras. Em todos os testes foram utilizadas amostras controle comerciais da marca Eurotrol em3 níveis de concentração distintos.

5.4.3. Método de Drabkin

Após a etapa de centrifugação descrita no item 5.4, as amostras foram diluídas 1/5, utilizando 400µL do plasma sobrenadante em 1600 µL da solução Drabkin.

A amostra foi incubada durante cinco minutos em temperatura ambiente e a leitura da absorbância foi determinada em 540 nm em espectrofotômetro. O resultado final foi obtido aplicando a absorbância na curva de calibração.O reagente de Drabkin foi utilizado como branco para zerar o equipamento. A curva de calibração foi preparada em triplicata, diluindo alíquotas de padrão comercial de hemoglobina (11,2 g/dL) da marca Bioclin com a solução de Drabkin.

5.5. Métodos para determinação de hematócrito

O hematócrito automatizado foi determinado utilizando-se o analisador hematológico Cell Dyn Ruby. As amostras foram diluídas 1/2, utilizando 300µL do concentrado de hemácias em 300 µL em do líquido diluidor do analisador hematológico.

O hematócrito também foi determinado manualmente pela técnica do microhematócrito. As amostras concentradas foram colhidas em tubos capilares e processados na centrifuga de microhematócrito. As leituras dos resultados foram feitas utilizando régua para leitura própria para leitura de microhematócrito.

5.6. Cálculo do percentual de hemólise

O cálculo para determinação do grau de hemólise nas bolsas de CH foi realizado de acordo com a seguinte expressão:

$$\%\text{ de hemólise } = \left(100 - \text{Hematócrito}\right) \times \frac{\text{hemoglobina livre no plasma (g/dL)}}{\text{hemoglobina total (g/dL)}}\% .$$

Foram utilizadas várias combinações entre os métodos descritos nos itens anteriores para determinação do grau de hemólise.

5.7. Testes microbiológicos

Em todos os CH foi realizada análise microbiológica com um dia após a coleta e no dia do vencimento da bolsa. Os testes foram realizados sem abertura do sistema em frascos de hemocultura da marca BD- Bactec Standard. Os frascos foram incubados na incubadora BD Bactec e o resultado final foi obtido após cinco dias da data da inoculação.

5.8.Variabilidade inter-ensaio (Reprodutibilidade)

5.8.1. Reprodutibilidade- Hemoglobina Livre

Para verificação da reprodutibilidade da hemoglobina livre nos métodos de Drabkin, Espectrofotométrico e HemoCue® Plasma Low foram utilizadas duas amostras de CH CPDA1, colhidas em momentos distintos. Cada amostra foi centrifugada em 3000 RPM por 20 minutos e o sobrenadante foi retirado e aliquotado em dez tubos que foram mantidos congelados em freezer -30°C até o momento da realização dos testes. As alíquotas foram testadas em dez dias diferentes, sendo que para a realização do teste nos métodos de Drabkin e espectrofotométrico foi realizada a diluição do sobrenadante. No método de Drabkin foi realizada a diluição 1:5 e no espectrofotométrico 1:10. No método HemoCue® Plasma Low as amostras foram analisadas sem necessidade de diluição.

5.8.2. Reprodutibilidade- Hemoglobina e Hematócrito

A reprodutibilidade da hemoglobina no hemoglobinômetro EKF e no Cell Dyn e do hematócrito no método de microhematócrito e no Cell Dyn foi realizada utilizando três amostras de concentrado de hemácias (duas bolsas CPDA1 e uma CPD/SAG manitol) colhidas em três meses distintos. Para as análises no Cell Dyn e hemoglobinômetro, a partir de cada amostra concentrada foram realizadas dez diluições 1:2 e as alíquotas diluídas foram

mantidas em geladeira. Para o método de microhematócrito, cada amostra foi aliquotada em dez tubos, sem necessidade de diluição. Foram realizados dois testes em períodos distintos do dia, durante cinco dias consecutivos em cada método analisado.

5.9. Variabilidade intra-ensaio (Repetitividade)

5.9.1. Repetitividade-Hemoglobina Livre

Foram utilizadas três amostras de CH, sendo uma bolsa CPDA1 e duas bolsas CPD/ SAG manitol. Cada amostra foi colhida em meses diferentes e as mesmas foram centrifugadas em 3000 rpm por 20 minutos. Para análise da repetitividade da hemoglobina livre nos métodos de Drabkin e espectrofotométrico, o sobrenadante de cada amostra foi diluída 1:5 e 1:10, respectivamente. Foram obtidas dez alíquotas diluídas de cada amostra que foram testadas em um mesmo dia. A repetitividade da hemoglobina livre no HemoCue® Plasma Low foi realizada utilizando o sobrenadante de cada amostra que foi testado por dez vezes consecutivas em um mesmo dia.

5.9.2. Repetitividade – Hemoglobina total e hematócrito

As análises de repetitividade no Cell Dyn, hemoglobinômetro e microhematócrito foram realizadas utilizando quatro amostras de concentrado de hemácias, sendo duas amostras CPDA1 e duas CPD/SAG manitol. Para as análises no Cell Dyn e hemoglobinômetro foi obtida uma única alíquota de cada amostra com diluição 1:2. A alíquota diluída foi processada por dez vezes seguidas em cada equipamento em um mesmo momento. Os testes de hematócrito no método microhematócrito foram realizados com amostras concentradas, sem diluição. As análises no microhematócrito foram feitas a partir de cada amostra concentrada, utilizando-se dez capilares que foram centrifugados em um mesmo momento.

5.10. Análise estatística

5.10.1. Comparações de hemoglobina total, hemoglobina plasmática, hematócrito e hemólise ao longo do armazenamento

As médias de hemoglobina total, hemoglobina plasmática e hematócrito foram comparadas entre os períodos de armazenamento por modelos lineares de efeitos mistos (LITTELL et al., 2006). Estes modelos consideram um efeito aleatório, que identifica uma mesma bolsa de CH CPDA 1 ou CPD/SAG manitol ao longo do tempo. As médias de mínimos quadrados (*Least Squares Means*), estimadas por estes modelos, foram comparadas duas a duas, permitindo identificar diferenças entre momentos distintos de armazenamento.

Os modelos de efeitos mistos foram ajustados com o auxílio do programa estatístico SAS versão 9, sendo o nível de significância fixado em 5%.

5.10.2. Análise da concordância entre as determinações de hemoglobina plasmática, hemoglobina total, hematócrito e hemólise obtidas pelos diferentes métodos

Para avaliar a concordância entre as determinações de hemoglobina plasmática, hemoglobina total e hematócrito obtidos pelos diferentes métodos foram utilizados gráficos de dispersão e de Bland-Altman (BLAND, ALTMAN, 1986).

A Figura 1exemplifica um gráfico de dispersão construído para uma amostra de $n = 30$ pares de observações fictícias de hemoglobina total, obtidas independentemente por dois diferentes métodos (denotados arbitrariamente Métodos 1 e 2). Estas observações são exibidas na Tabela 2, juntamente com as diferenças entre as observações de cada par e as respectivas médias.

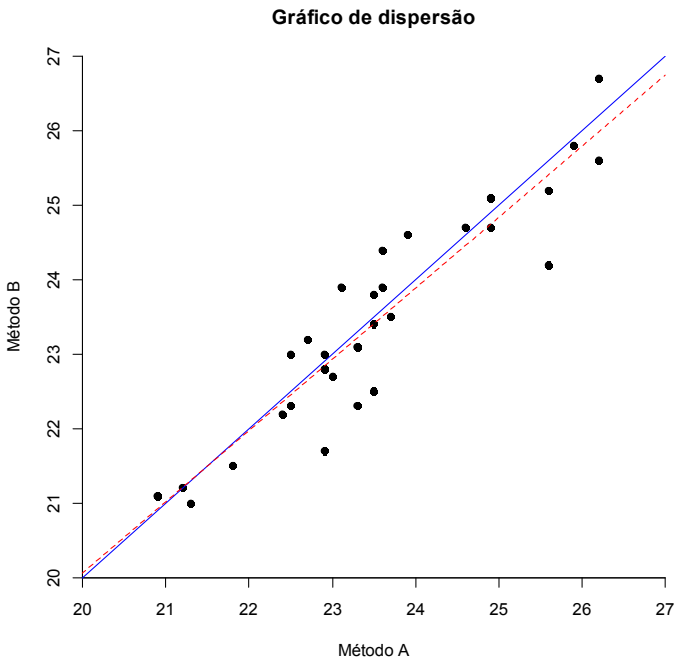
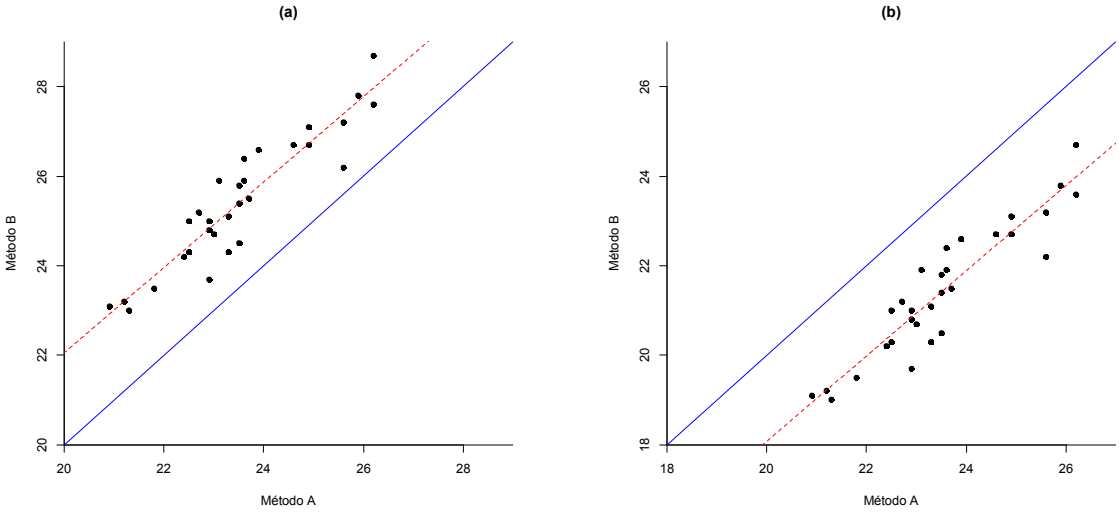


Figura 1. Gráfico de dispersão, dados fictícios (Tabela 2).



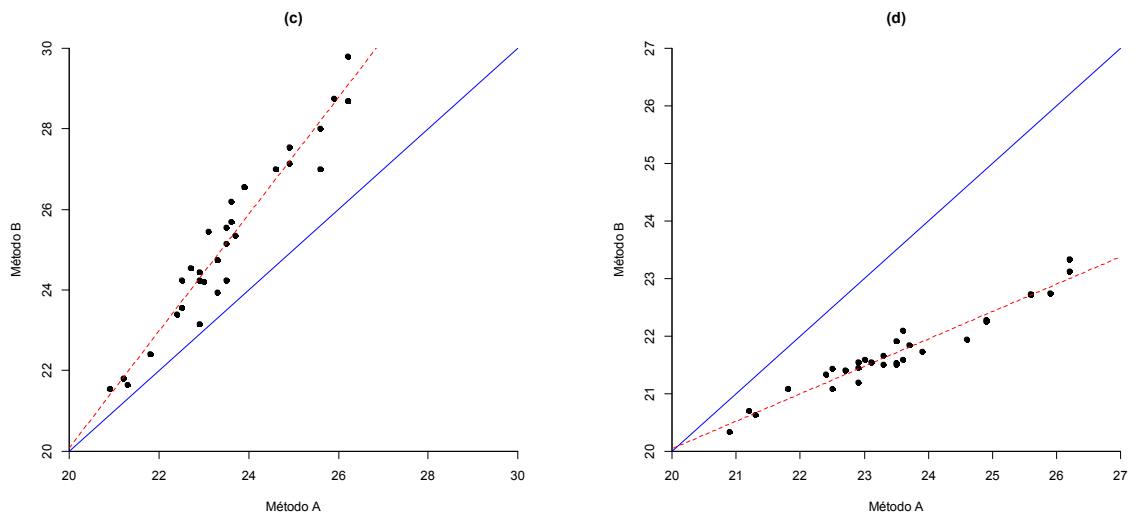


Figura 2. Gráficos de dispersão, considerando quatro diferentes conjuntos de dados fictícios.

O gráfico da Figura 1 descreve os pares de observações fictícias de hemoglobina total obtidas pelos Métodos A e B, representados nos eixos das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A linha azul é a diagonal que passa pela origem do gráfico e descreve as coordenadas em que os métodos apresentariam valores idênticos de hemoglobina total. Um ponto posicionado acima da linha azul representa um par de observações em que o Método B produziu um valor de hemoglobina total maior que o produzido pelo Método A. Analogamente, um ponto posicionado abaixo da linha azul representa um par de observações em que o Método A produziu um valor de hemoglobina total maior que o produzido pelo Método B. A linha vermelha pontilhada, obtida por uma regressão linear, descreve uma reta de mínimos quadrados que passa pelos pontos apresentados no gráfico. Quando os Métodos A e B apresentam observações perfeitamente concordantes, todos os pontos estarão representados sobre a linha azul, que coincidirá com a linha vermelha. Quando os Métodos A e B apresentam observações satisfatoriamente concordantes, espera-se que os pontos do gráfico estejam aleatoriamente dispersos ao redor da linha azul. Neste caso, a linha vermelha pontilhada estará próxima à linha azul.

A Figura 2 apresenta gráficos de dispersão considerando quatro diferentes cenários:

(a) No Painel (a) da Figura 2, é representada a situação em que o Método B sistematicamente produz observações maiores que o Método A. As linhas azul e vermelha são paralelas.

(b) No Painel (b) da Figura 2, é representada a situação em que o Método A sistematicamente produz observações maiores que o Método B. As linhas azul e vermelha são paralelas.

(c) No Painel (c) da Figura 2, é representada a situação em que o Método B produz observações maiores que o Método A, mas, em média, as diferenças entre as observações de cada par aumentam à medida que os valores de hemoglobina total tornam-se maiores. As linhas azul e vermelha agora não são paralelas.

(d) No Painel (d) da Figura 2, é representada a situação em que o Método A produz observações maiores que o Método B, mas, em média, as diferenças entre as observações de cada par aumentam à medida que os valores de hemoglobina total tornam-se maiores. As linhas azul e vermelha agora não são paralelas.

Em todos os painéis da Figura 2, observa-se que há uma grande correlação entre as observações produzidas pelos dois métodos, mas as diferenças observadas entre as linhas azul e vermelha sugerem que não há concordância entre os métodos. Assim, coeficientes de correlação de Pearson não são adequados para análises de concordância (BLAND, ALTMAN, 1986).

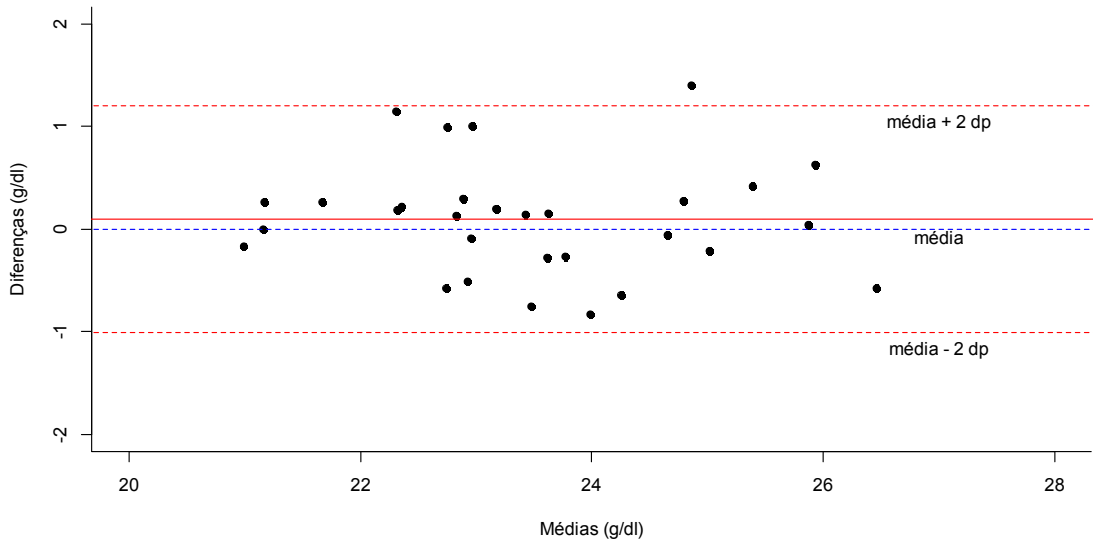


Figura 3. Gráfico de Bland-Altman, dados fictícios (Tabela 2).

Embora os gráficos de dispersão descrevam satisfatoriamente a distribuição dos pares de observações obtidas pelos métodos em comparação, a observação visual das diferenças entre as retas azuis e vermelhas dos gráficos da Figura 2 não quantifica objetivamente a concordância (ou ausência da concordância) entre os métodos. Os gráficos de Bland-Altman, por sua vez, trazem os limites de concordância que permitem uma avaliação mais objetiva. A Figura 3 ilustra a aplicação de um gráfico de Bland-Altman às observações exibidas na Tabela 2, que também exibe as diferenças entre as observações de cada par e as respectivas médias. O gráfico de Bland-Altman é um gráfico da dispersão entre as médias das observações (eixo das abcissas) e as diferenças entre as observações (eixo das ordenadas). Em adição, o gráfico exibe linhas horizontais que descrevem a posição da média das diferenças e os chamados limites de concordância. Estes limites são dados pela soma e subtração entre a média das diferenças e dois desvios padrão (dp) das diferenças. Sob o pressuposto de que as diferenças entre as observações possuem uma distribuição populacional próxima a uma curva normal, espera-se que aproximadamente 95% das observações encontrem-se no interior destes limites de concordância. Este percentual se deve às propriedades de uma distribuição normal, dado que em uma curva teórica 95% da população se encontram dentro do intervalo de ± 2 desvios padrão da média. Assim, nos gráficos de Bland-Altman, é sempre esperado que a maioria dos pontos (ou, em alguns casos, todos os pontos) esteja dentro destes limites.

Tabela 2. Resultados fictícios de hemoglobina total (g/dL) obtidos pelos métodos 1 e 2.

	Método 1	Método 2	Diferenças	Médias
1	23,5	23,4	0,1	23,45
2	25,6	24,2	1,4	24,90
3	26,2	25,6	0,6	25,90
4	25,6	25,2	0,4	25,40
5	21,3	21,0	0,3	21,15
6	23,5	22,5	1,0	23,00
7	22,7	23,2	-0,5	22,95
8	23,5	23,8	-0,3	23,65
9	22,9	23,0	-0,1	22,95

10	22,5	23,0	-0,5	22,75
11	22,9	21,7	1,2	22,30
12	23,1	23,9	-0,8	23,50
13	24,9	24,7	0,2	24,80
14	23,0	22,7	0,3	22,85
15	26,2	26,7	-0,5	26,45
16	24,6	24,7	-0,1	24,65
17	23,7	23,5	0,2	23,60
18	23,6	23,9	-0,3	23,75
19	22,5	22,3	0,2	22,40
20	25,9	25,8	0,1	25,85
21	23,6	24,4	-0,8	24,00
22	21,2	21,2	0,0	21,20
23	23,3	23,1	0,2	23,20
24	20,9	21,1	-0,2	21,00
25	23,3	22,3	1,0	22,80
26	23,9	24,6	-0,7	24,25
27	24,9	25,1	-0,2	25,00
28	21,8	21,5	0,3	21,65
29	22,4	22,2	0,2	22,30
30	22,9	22,8	0,1	22,85

Sob o pressuposto de que as observações obtidas dos dois métodos são concordantes, espera-se que a média das diferenças (descrita no gráfico da Figura 3 por uma linha horizontal contínua) seja razoavelmente próxima a zero (representado pela linha azul pontilhada, na Figura 3). Se a média é superior a zero, a uma distância considerada de grande magnitude pelo pesquisador, tem-se que o Método 1 tem a tendência de produzir sistematicamente observações maiores que o Método 2. Analogamente, tem-se que o Método 1 tem a tendência de produzir sistematicamente observações menores que o Método 2 se a média das

observações é menor que zero, em uma diferença considerada de grande magnitude pelo pesquisador.

Em adição, a avaliação da concordância também considera a amplitude dos limites de concordância. No gráfico da Figura 3, os limites inferior e superior são, respectivamente, -1,01 g/dL e 1,20 g/dL. Assim, se aproximamos estes valores para 1,2, espera-se que em 95% dos casos a diferença entre as observações produzidas pelos Métodos 1 e 2 não ultrapassem o valor de 1,2 g/dL. Se este valor é considerado razoavelmente pequeno pelo especialista, entende-se que há uma aceitável concordância entre os dois métodos. Observa-se, portanto, que a interpretação correta de um gráfico de Bland-Altman é dependente da avaliação do especialista, ao se avaliar o que ele considera aceitável como uma diferença entre os dois métodos. Informações mais detalhadas sobre o gráfico de Bland-Altman podem ser obtidas em Bland e Altman (1986; 1999).

O gráfico de Bland-Altman, como o ilustrado na Figura 3, tem por pressuposto que as diferenças entre as observações de cada par (mostradas no eixo das ordenadas) distribuem-se aleatoriamente ao redor das suas médias, sem uma tendência a modificarem-se de acordo com as médias das observações (mostradas no eixo das abscissas) (BLAND, ALTMAN, 1999). Quando esse pressuposto não é atendido, Bland e Altman (1999) sugerem que seja ajustado um modelo de regressão linear simples entre as diferenças entre os métodos (D) e as médias entre os métodos (A), na forma

$$D = b_0 + b_1 A.$$

O passo seguinte consiste em testar a hipótese nula H_0: $b_1 = 0$. Se essa hipótese não é rejeitada, considera-se que as diferenças D não tendem a se modificar de acordo com as médias A, e então se apresenta o gráfico de Bland-Altman como exemplificado na Figura 3. Se H_0 é rejeitada, apresenta-se a média de D de acordo com a reta de regressão e os limites de concordância 95% são dados por

$$b_0 + b_1 A \pm 1{,}96 \text{ dp}(r),$$

sendo dp(r) o desvio padrão dos resíduos (BLAND, ALTMAN, 1999).

Para ilustrar esta situação, a Tabela 3 exibe resultados de hemoglobina livre (g/dL) obtidos pelos métodos 1 (Drabkin) e 2 (Espectrofotométrico). A Figura 4 exibe gráficos de dispersão (painel (a)) e de Bland-Altman (Painel (b)) para estes dados.

Tabela 3. Resultados de hemoglobina livre (g/dL) obtidos pelos métodos 1 (Drabkin) e 2 (Espectrofotométrico).

	Método 1	Método 2	Diferenças (*D*)	Médias (*A*)
1	0,0620	0,0289	0,0331	0,04545
2	0,0765	0,0337	0,0428	0,05510
3	0,0885	0,0356	0,0529	0,06205
4	0,0885	0,0299	0,0586	0,05920
5	0,0378	0,0145	0,0233	0,02615
6	0,1312	0,0390	0,0922	0,08510
7	0,0918	0,0427	0,0491	0,06725
8	0,1811	0,0941	0,0870	0,13760
9	0,1642	0,0984	0,0658	0,13130
10	0,0966	0,0419	0,0547	0,06925
11	0,0596	0,0235	0,0361	0,04155
12	0,0547	0,0263	0,0284	0,04050
13	0,0724	0,0401	0,0323	0,05625
14	0,0918	0,0404	0,0514	0,06610
15	0,0926	0,0518	0,0408	0,07220
16	0,1030	0,0325	0,0705	0,06775
17	0,0531	0,0130	0,0401	0,03305
18	0,0781	0,0410	0,0371	0,05955
19	0,0901	0,0278	0,0623	0,05895
20	0,1111	0,0451	0,0660	0,07810
21	0,1054	0,0457	0,0597	0,07555
22	0,0797	0,0285	0,0512	0,05410
23	0,1376	0,0896	0,0480	0,11360

24	0,2173	0,1255	0,0918	0,17140
25	0,1087	0,0378	0,0709	0,07325
26	0,1988	0,0884	0,1104	0,14360
27	0,1360	0,0630	0,0730	0,09950
28	0,0958	0,0338	0,0620	0,06480
29	0,1706	0,0730	0,0976	0,12180

Considerando os dados da Tabela 3, o ajuste de um modelo de regressão da forma $D = b_0 + b_1A$ traz as estimativas -0,01224 e 0,56610 para b_0 e b_1, respectivamente. Ao testarmos a hipótese nula H_0: $b_1 = 0$, foi encontrado um valor-p menor que 0,01, evidenciado que as diferenças D crescem ($b_1>0$) conforme as médias A. O painel (a) da Figura 4 evidencia que as observações encontradas segundo o método 1 tendem a ser maiores que as encontradas segundo o método 2, dado que os pontos encontram-se todos abaixo da diagonal representada pela linha azul. Em adição, no painel (a), as retas vermelha e azul não são paralelas, como exemplificado nos painéis (a) e (b) da Figura 2. A reta vermelha distancia-se da reta azul à medida que as observações crescem. O painel (b) da Figura 4 mostra o gráfico de Bland-Altman, sendo que a reta vermelha contínua se refere às médias das diferenças, que crescem conforme a expressão

$$D = -0{,}01224 + 0{,}56610A$$

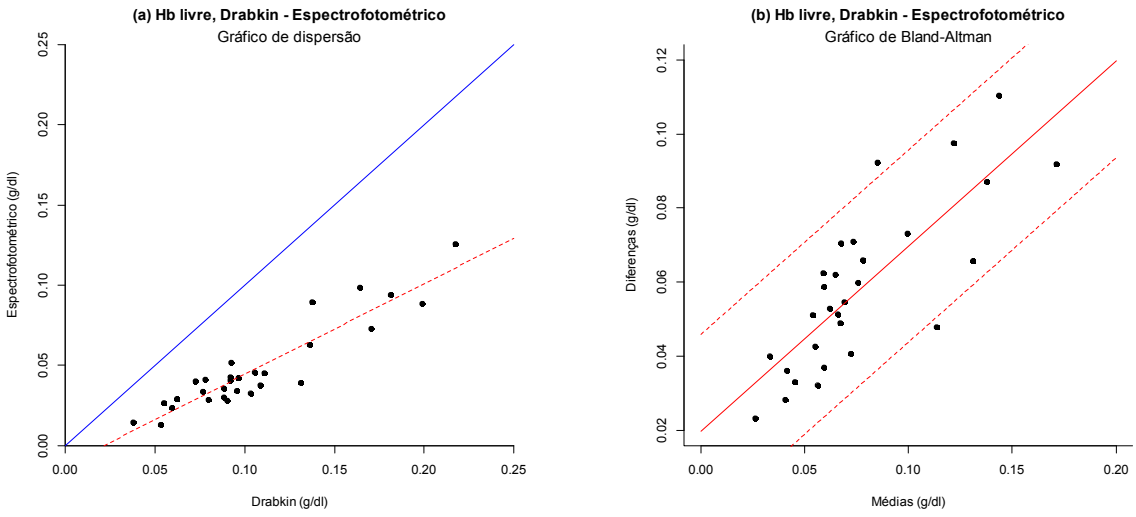


Figura 4. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman, dados da Tabela 3.

As retas vermelhas pontilhadas mostradas no painel (b) da Figura 4 são os limites de concordância 95%, dados por

$$D = -0{,}01224 + 0{,}56610A \pm 1{,}96 \times 0{,}01047,$$

sendo dp (r) = 0,01047. A interpretação do gráfico de Bland-Altman prevalece como no exemplo anterior.

Os gráficos de dispersão e de Bland-Altman foram construídos no programa R (CRAWLEY, 2012).

A reprodutibilidade e repetitividade de cada método foram ilustradas por gráficos, Os gráficos expressam a média (linha contínua), média + 2 desvios-padrão (linha pontilhada superior) e média -2 desvios-padrão (linha pontilhada inferior) dos ensaios realizados (mostrados no Apêndice).

6. Resultados

6.1. Curva de calibração de hemoglobina

Para determinar os valores de hemoglobina livre a partir do método de Drabkin, foi elaborada uma curva de calibração de hemoglobina a partir de uma amostra padrão. A Tabela 4 exibe os valores da absorbância em 540 (nm), obtidos por triplicatas, e as respectivas médias, de acordo com alguns valores especificados de diluição. O valor padrão da hemoglobina foi estabelecido em 11,2 g/dL pelo fabricante. Assim, os valores esperados de hemoglobina apresentados na Tabela 4 são dados pelo quociente entre 11,2 e o fator de diluição.

Tabela 4. Valores da absorbância em 540 (nm), segundo diluição.

Diluição (1/x)	Triplicatas (nm)			Média das Triplicatas (nm)	Hb esperada (g/dl)
	1	2	3		
25	2,731	2,691	2,661	2,694	0,448
40	1,838	1,835	1,834	1,836	0,28
80	0,927	0,882	0,924	0,911	0,14
100	0,746	0,712	0,722	0,727	0,112
160	0,458	0,467	0,436	0,454	0,07
200	0,379	0,376	0,391	0,382	0,056
400	0,182	0,186	0,180	0,183	0,028
800	0,090	0,085	0,090	0,088	0,014
1600	0,042	0,044	0,044	0,043	0,007
3200	0,016	0,016	0,016	0,016	0,0035
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0

nm: nanômetros; Hb: hemoglobina

A curva de calibração de hemoglobina está representada na Figura 5. Utilizando o programa R, ajustou-se um modelo linear de intercepto nulo, considerando as médias das triplicatas como variável dependente e a Hb esperada como variável independente, obtendo-se um coeficiente de inclinação estimado em b = 6,21. Desta forma, obteve-se um fator de correção de $1/b$ = 0,161.

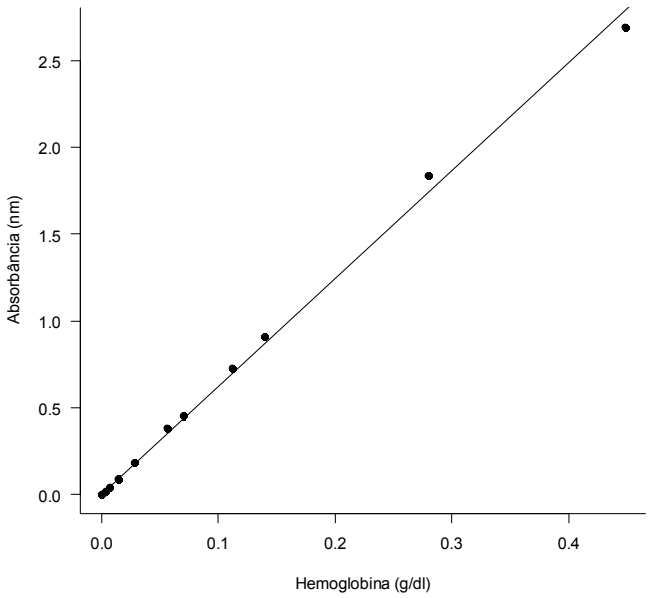


Figura 5. Curva de calibração de hemoglobina

6.2.Ensaios de Linearidade

6.2.1. Linearidade, Hemoglobina Plasmática

A partir das amostras obtidas, descritas na Tabela 1, foram realizadas novas diluições para que fosse avaliado a linearidade da hemoglobina plasmática em cada método proposto. As Tabelas 5, 6 e 7 apresentam os valores de hemoglobina plasmática encontrados nas técnicas de Drabkin, HemoCue Plasma Low e espectrofotométrico, respectivamente.

Tabela 5. Linearidade da hemoglobina plasmática obtida pelo método Drabkin.

Amostra	Diluição (1/x) (A)	Absorbância (nm) duplicatas		Média das duplicatas (nm) (B)	Hb esperado (g/dL)	Hb calculada (g/dL) (A)×(B) × 0,161
		1	2			
1	200	0,826	0,822	0,824	22,700	26,533
2	100	0,792	0,821	0,8065	11,360	12,985
3	100	0,395	0,4	0,3975	5,680	6,400
7	40	0,184	0,215	0,1995	1,136	1,285
8	5	0,173	0,172	0,1725	0,114	0,139
9	5	0,088	0,084	0,086	0,057	0,069
10	5	0,044	0,042	0,04300	0,028	0,035
11	5	0,019	0,02	0,01950	0,011	0,016
12	5	0,015	0,015	0,01500	0,006	0,012
13	5	0,009	0,009	0,00900	0,002	0,007

nm: nanômetros; Hb: hemoglobina

As Figuras 6 e 7 representam a curva de linearidade obtida para hemoglobina plasmática nos métodos de Drabkin, HemoCue Plasma Low e espectrofotométrico, respectivamente.

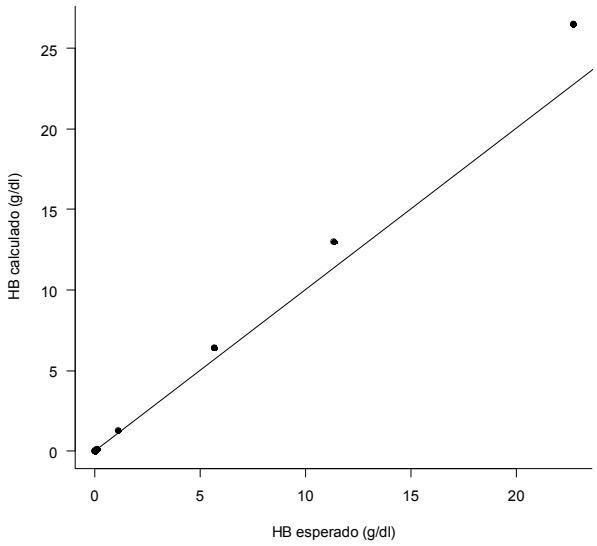


Figura 6. Linearidade hemoglobina plasmática (g/dL) pelo método de Drabkin.

Tabela 6. Linearidade da hemoglobina plasmática obtida pelo método Azida metahemoglobina do HemoCue® Plasma/LowHb.

Amostra	Duplicatas da Hb (g/dL)		Hb obtida média da duplicata (g/dL)	Hb esperada (g/dL)
	1	2		
1	(a)	(a)	-	22,700
2	(a)	(a)	-	11,350
3	(a)	(a)	-	5,675
4	(a)	(a)	-	3,243
5	(a)	(a)	-	2,838
6	2,75	2,68	2,72	2,522
7	1,040	1,19	1,12	1,135
8	0,140	0,15	0,15	0,114
9	0,070	0,08	0,08	0,057
10	0,030	0,03	0,03	0,028
11	0,010	0,01	0,01	0,011
12	0,000	0,0	0,00	0,006
13	0,000	0,0	0,00	0,002

(a) Leitura não realizada

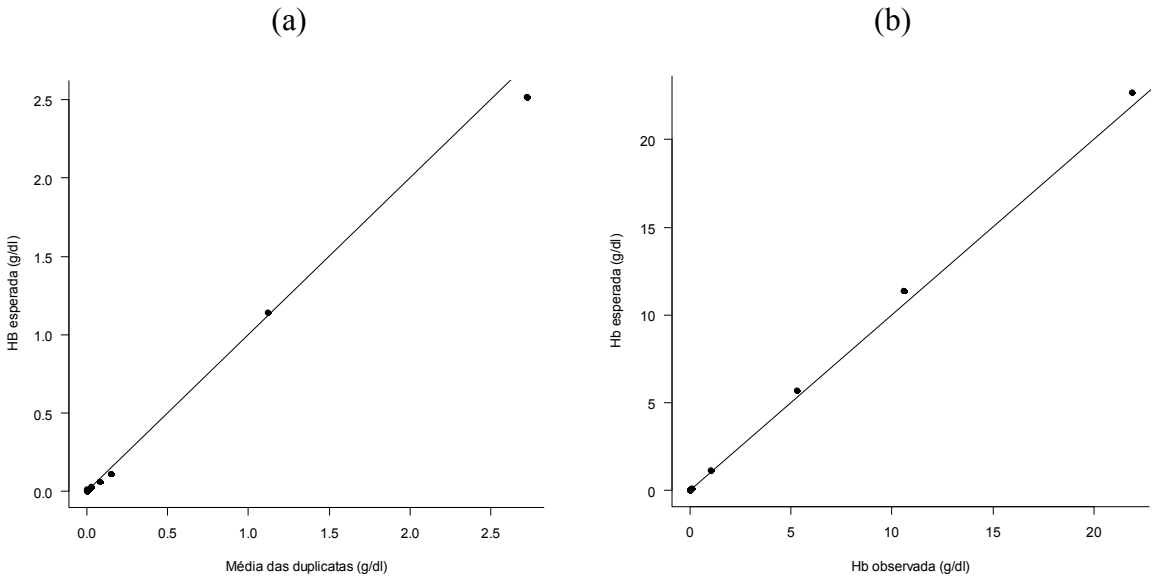


Figura 7. Linearidade hemoglobina plasmática (g/dL) pelo (a) métodoHemoCue Plasma Low e pelo (b) método Espectrofotométrico.

Tabela 7. Linearidade da hemoglobina plasmática obtida pelo método espectrofotométrico.

Identificação da amostra	Diluição (1/x)	Duplicatas da Hb livre (g/dL)		Média das duplicatas (g/dL)	Hb esperado (g/dL)
		1	2		
1	200	21,810	21,890	21,850	22,700
2	100	10,554	10,607	10,580	11,360
3	100	5,280	5,312	5,296	5,680
7	40	0,955	1,085	1,020	1,136
8	10	0,105	0,094	0,100	0,114
9	10	0,055	0,051	0,053	0,057
10	10	0,024	0,024	0,024	0,028
11	10	0,007	0,007	0,007	0,011
12	10	0,002	0,002	0,002	0,006
13	10	0,002	0,002	0,002	0,002

Hb: hemoglobina

6.2.2. Testes de Linearidade, Hemoglobina total e Hematócrito

As Tabelas 8 e 9 apresentam os valores encontrados de hemoglobina total no hemoglobinômetro EKF e no Cell Dyn, respectivamente. As Tabelas 10 e 11 apresentam os valores de hematócrito encontrados no método de microhematócrito e no equipamento Cell Dyn, respectivamente.

Tabela 8. Linearidade da hemoglobina total obtida pelo Hemoglobinômetro EKF.

Amostra	Identificação da alíquota	Diluição (1/x)	Duplicatas da Hb total (g/dL)		Média das duplicatas (g/dL)	Hb esperado (g/dL)
			1	2		
1	1	1	(a)	(a)	-	26,6
	2	2	14,2	13,7	14,0	13,3
	3	4	6,4	7,3	6,9	6,7
	4	8	3,6	3,6	3,6	3,3
	5	9	3,3	3,0	3,2	3,0
	6	10	3,0	2,7	2,9	2,7
	7	20	(a)	(a)	-	1,3
	8	40	(a)	(a)	-	0,7
2	1	1	23,3	23,1	23,2	23,2
	2	2	12,1	11,9	12,0	11,6
	3	4	6,0	6,0	6,0	5,8
	4	8	3,2	3,3	3,3	2,9
	5	9	2,8	2,8	2,8	2,6
	6	10	2,6	2,4	2,5	2,3
	7	20	(a)	1,9	1,9	1,2
	8	40	(a)	(a)	-	0,6
3	1	1	19,1	19,2	19,2	18,7
	2	2	9,5	9,6	9,6	9,4
	3	4	5,0	4,8	4,9	4,7
	4	8	2,6	2,7	2,7	2,3
	5	9	2,4	2,3	2,4	2,1
	6	10	2,2	2,0	2,1	1,9
	7	20	(a)	(a)	-	0,9
	8	40	(a)	(a)	-	0,5

(a) Leitura não realizada

Tabela 9. Linearidade da hemoglobina total obtida pelo analisador hematológico Cell Dyn.

Amostra	Identificação da alíquota	Diluição (1/x)	Duplicatas da Hb total (g/dL)		Média das duplicatas (g/dL)	Hb esperado (g/dL)
			1	2		
1	1	1	(a)	(a)	(a)	26,6
	2	2	13,4	13,2	13,3	13,3
	3	4	5,9	6,6	6,6	6,7
	4	8	3,2	3,1	3,2	3,3
	5	9	2,8	2,7	2,7	3,0
	6	10	2,6	2,4	2,5	2,7
	7	20	1,2	1,1	1,1	1,3
	8	40	0,4	0,4	0,4	0,7
2	1	1	23,2	23,2	23,2	23,2
	2	2	11,7	11,7	11,7	11,6
	3	4	5,7	5,6	5,6	5,8
	4	8	2,8	2,7	2,8	2,9
	5	9	2,5	2,3	2,4	2,6
	6	10	2,1	2,1	2,1	2,3
	7	20	1,3	1,4	1,3	1,2
	8	40	0,7	0,6	0,7	0,6
3	1	1	18,6	18,8	18,7	18,7
	2	2	9,5	9,5	9,5	9,4
	3	4	4,8	4,6	4,7	4,7
	4	8	2,4	2,3	2,3	2,3
	5	9	1,8	2,0	1,9	2,1
	6	10	1,0	1,8	1,4	1,9
	7	20	0,6	0,8	0,7	0,9
	8	40	0,1	0,2	0,2	0,5

(a) Leitura não realizada

Tabela 10. Linearidade do hematócrito obtido pelo método de microhematócrito.

Amostra	Identificação da alíquota	Diluição (1/x)	Duplicatas do hematócrito (%)		Média das duplicatas (%)	Hematócrito esperado (%)
			1	2		
1	1	1	76,0	75,0	75,5	75,5
	2	2	38,0	37,0	37,5	37,8
	3	4	17,0	18,0	18,0	18,9
	4	8	9,0	8,5	8,8	9,4
	5	9	8,0	8,0	8,0	8,4
	6	10	7,0	7,0	7,0	7,6
	7	20	4,0	3,0	3,5	3,8
	8	40	1,0	1,0	1,0	1,9
2	1	1	70,0	70,0	70,0	70,0
	2	2	35,0	34,0	34,5	35,0
	3	4	17,0	17,0	17,0	17,5
	4	8	8,0	8,5	8,3	8,8
	5	9	8,0	7,0	7,5	7,8
	6	10	6,5	7,0	6,8	7,0
	7	20	4,0	5,0	4,5	3,5
	8	40	2,0	2,0	2,0	1,8
3	1	1	58,0	58,0	58,0	58,0
	2	2	28,0	28,0	28,0	29,0
	3	4	14,0	13,0	13,5	14,5
	4	8	7,0	7,0	7,0	7,3
	5	9	6,0	5,0	5,5	6,4
	6	10	2,0	5,0	3,5	5,8
	7	20	1,5	1,0	1,3	2,9
	8	40	1,0	1,0	1,0	1,5

Tabela 11. Linearidade do hematócrito obtido pelo analisador hematológico Cell Dyn Ruby.

Amostra	Identificação da alíquota	Diluição (1/x)	Duplicatas do hematócrito (%)		Média das duplicatas (%)	Hematócrito esperado (%)
			1	2		
1	1	1	(a)	(a)	-	75,9
	2	2	38,2	37,7	38,0	38,0
	3	4	16,5	18,8	18,8	19,0
	4	8	9,0	9,0	9,0	9,5
	5	9	7,8	7,6	7,7	8,4
	6	10	7,1	6,7	6,9	7,6
	7	20	3,6	3,4	3,5	3,8
	8	40	1,7	1,9	1,8	1,9
2	1	1	(a)	(a)	-	68,9
	2	2	34,1	34,8	34,5	34,5
	3	4	17,2	17,0	17,1	17,2
	4	8	8,6	8,3	8,4	8,6
	5	9	7,4	7,4	7,4	7,7
	6	10	6,6	6,8	6,7	6,9
	7	20	4,4	4,8	4,6	3,4
	8	40	2,4	2,4	2,4	1,7
3	1	1	59,9	60,4	60,2	60,2
	2	2	29,1	28,9	29,0	30,1
	3	4	14,6	13,8	14,2	15,1
	4	8	7,2	7,1	7,1	7,5
	5	9	6,4	6,0	6,2	6,7
	6	10	5,4	5,5	5,4	6,0
	7	20	2,6	2,8	2,7	3,0
	8	40	1,2	1,4	1,3	1,5

(a) Leitura não realizada

A Figura 8 apresenta as curvas de linearidade da hemoglobina total no hemoglobinômetro EKF, considerando as três amostras utilizadas.

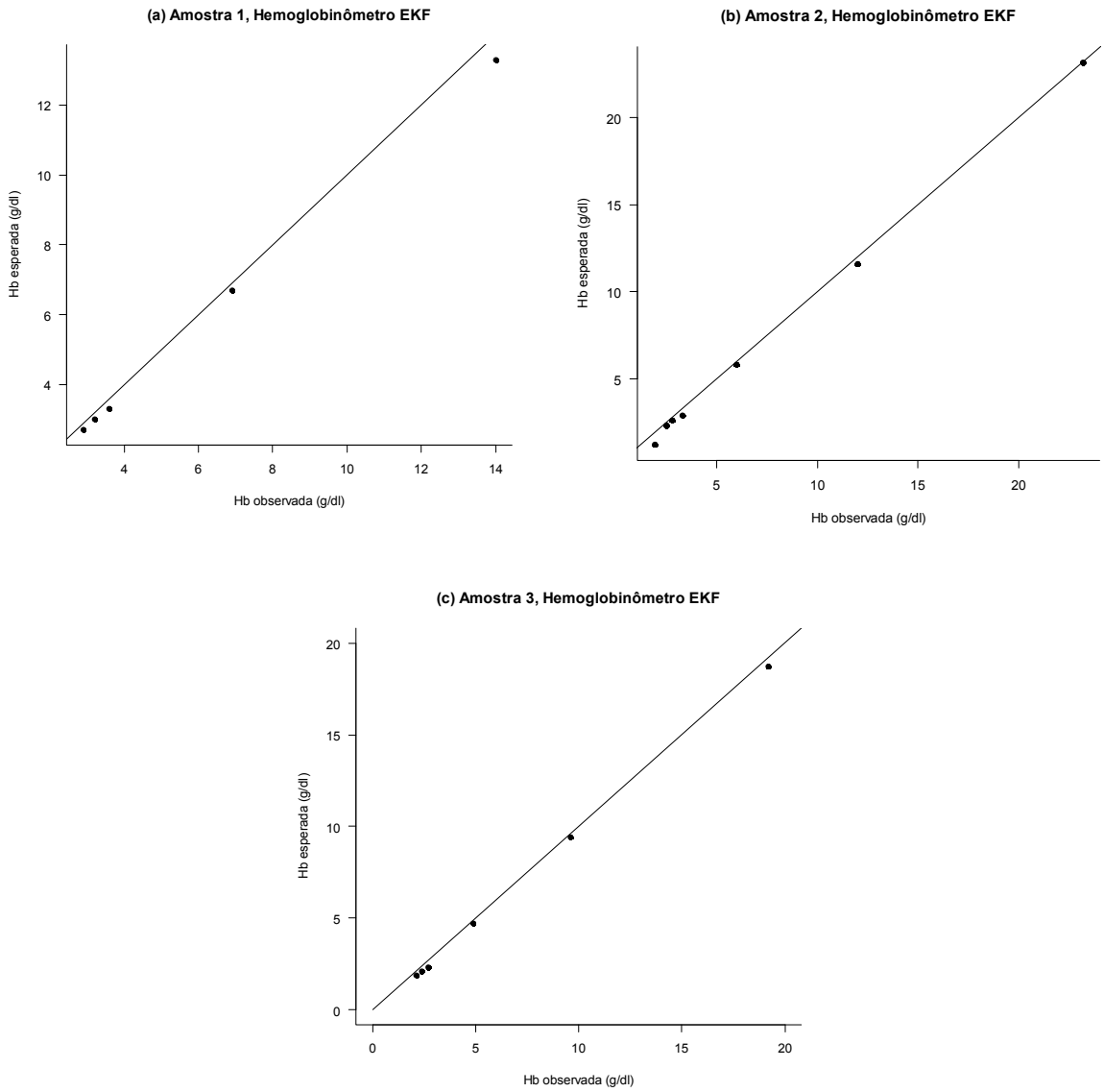


Figura 8. Linearidade hemoglobina total (g/dL) no Hemogloninômetro EKF, considerando as amostras 1, 2 e 3 (gráficos (a), (b) e (c), respectivamente).

A Figura 9 apresenta as curvas de linearidade obtidas pelo analisador hematológico Cell Dyn.

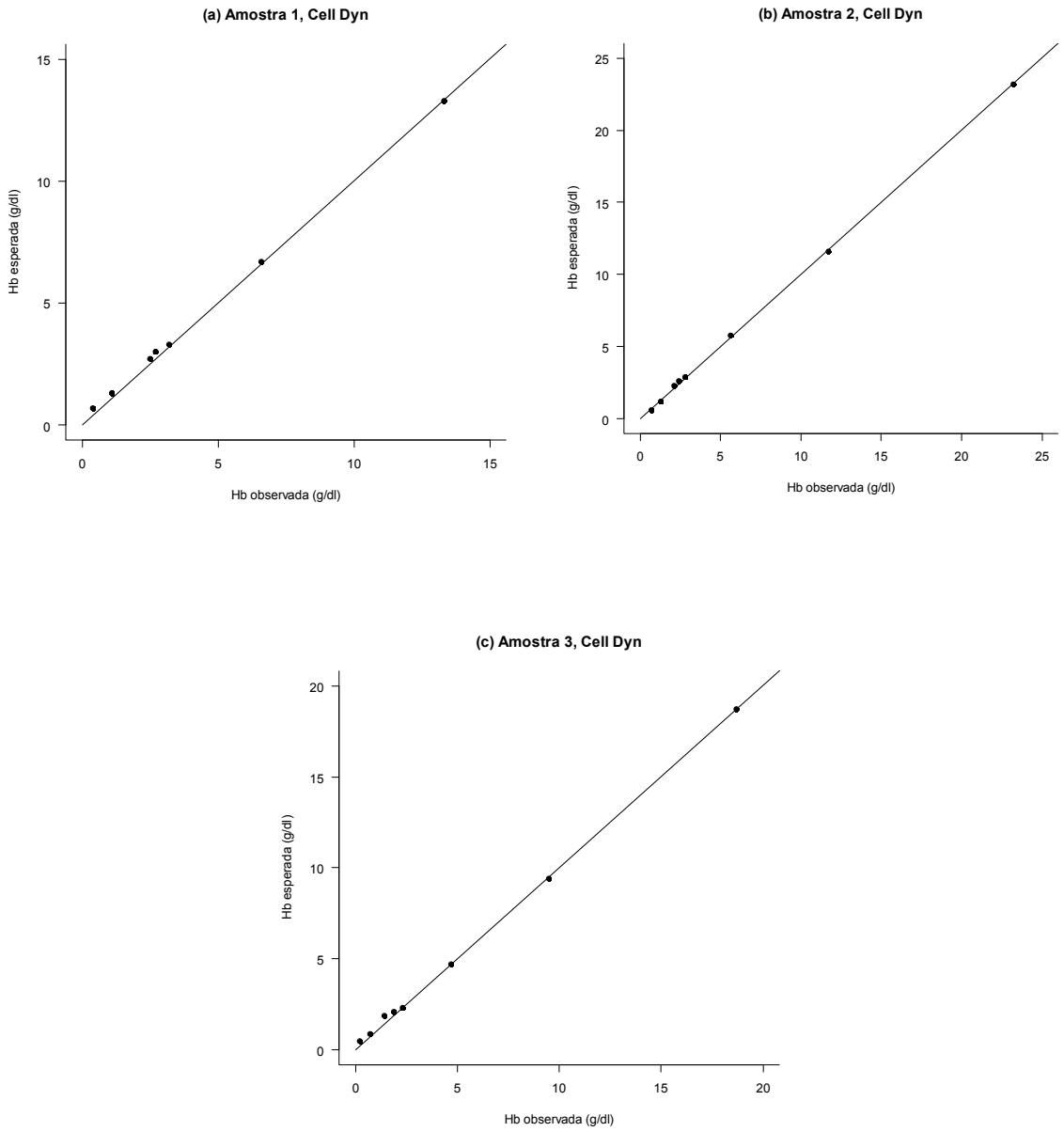


Figura 9. Linearidade hemoglobina total (g/dL) no analisador hematológico, considerando as amostras 1, 2 e 3 (gráficos (a), (b) e (c), respectivamente).

A Figura 10 apresenta as curvas de linearidade da hematócrito no método de microhematócrito.

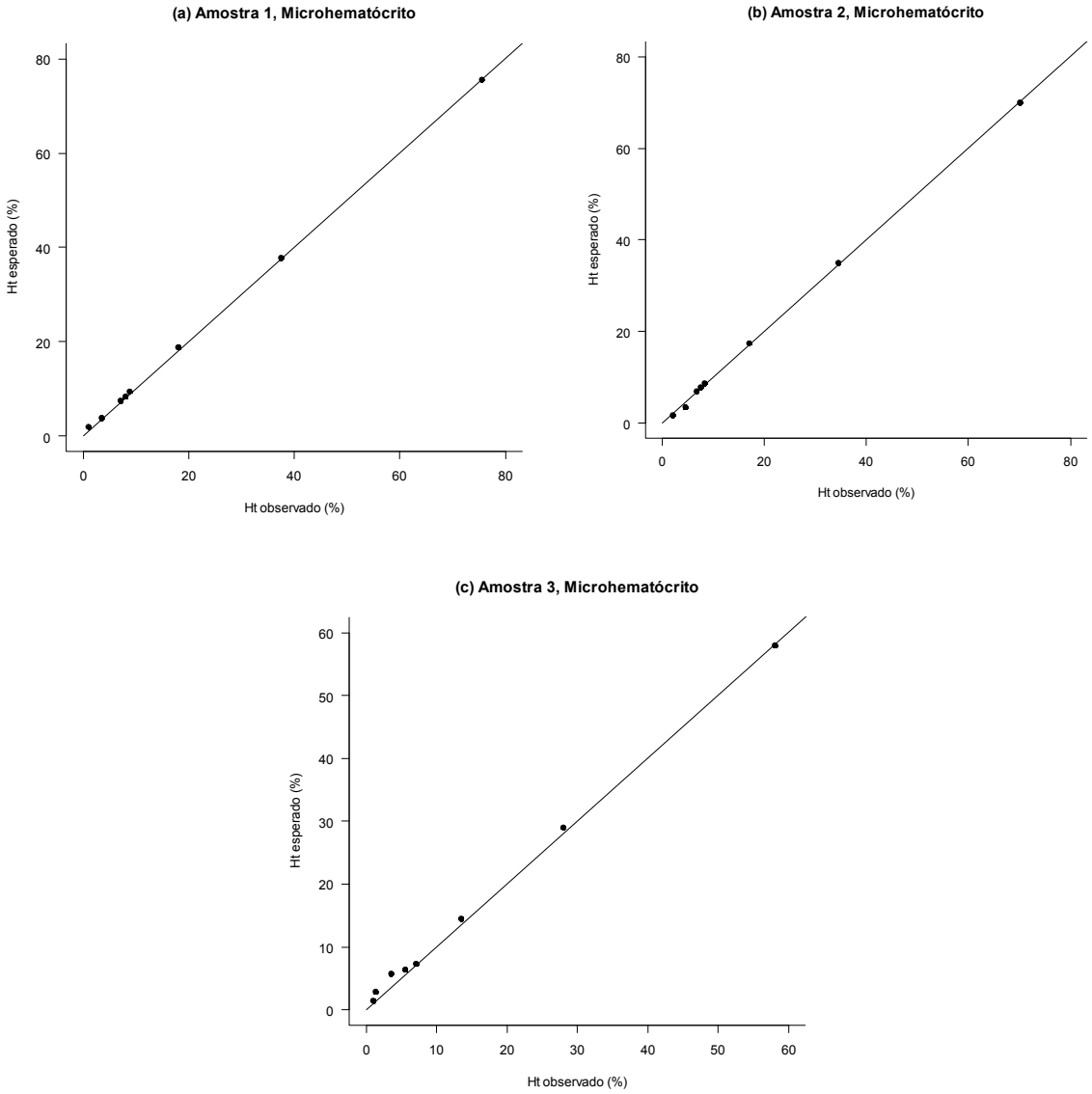


Figura 10. Linearidade hematócrito (%) no método de microhematócrito, considerando as amostras 1, 2 e 3 (gráficos (a), (b) e (c), respectivamente).

A Figura 11 apresenta as curvas de linearidade do hematócrito obtida pelo analisador hematológico Cell Dyn.

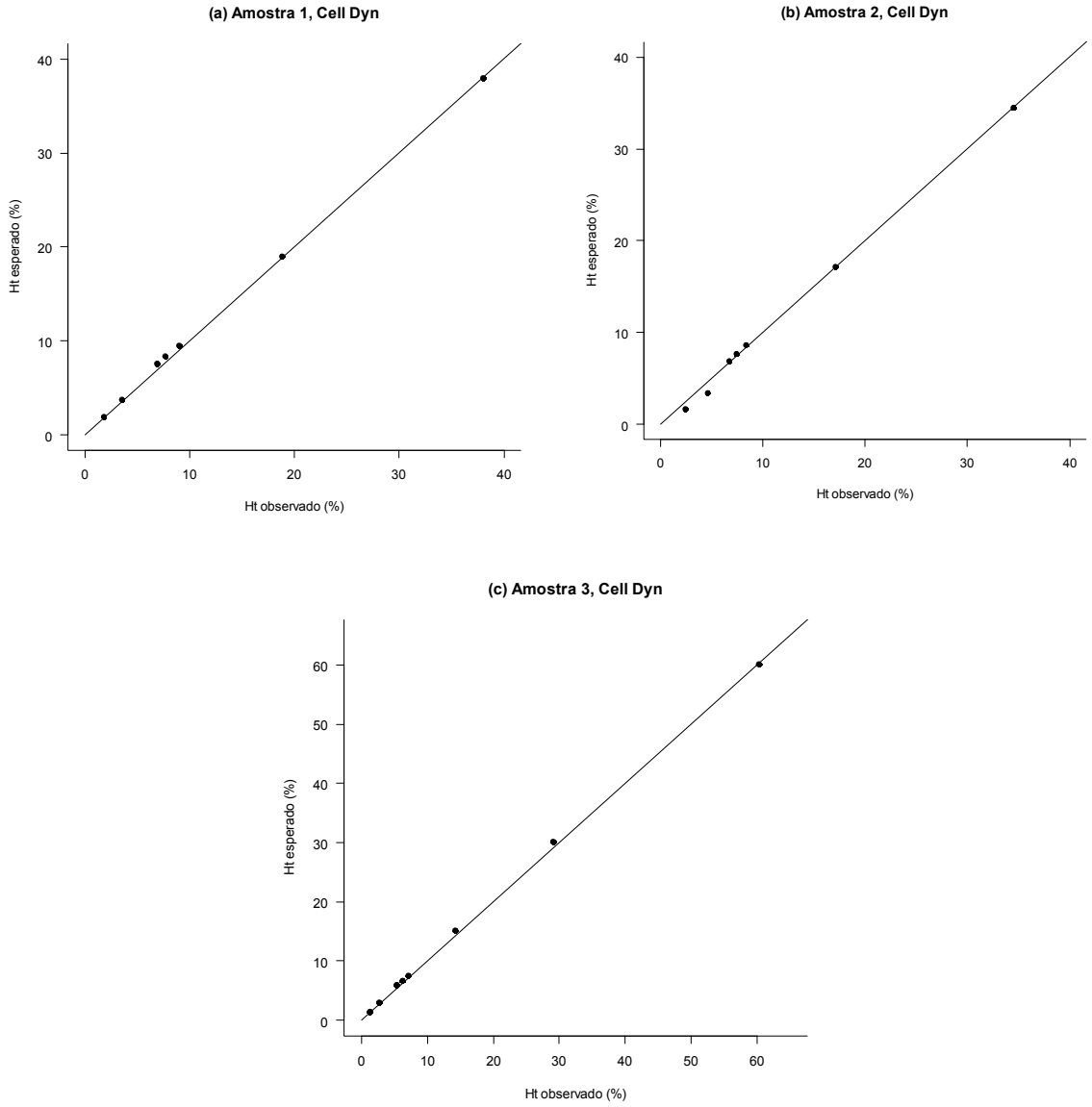


Figura 11. Linearidade hematócrito (%) no analisador hematológico Cell Dyn, considerando as amostras 1, 2 e 3 (gráficos (a), (b) e (c), respectivamente).

6.3. Análises de Hb total, Hb plasmática e hematócrito ao longo do armazenamento

Foram analisados dois grupos de hemocomponentes, sendo 29 bolsas de CH CPDA1 e 30 bolsas de CH CPD/SAG manitol. As bolsas foram analisadas em três momentos distintos ao longo do armazenamento dos hemocomponentes.As médias e os desvios padrão das medidas de Hb total, hematócrito e Hb plasmática, considerando as bolsas de CH CPDA1 analisadas nos dias 1, 19 e 35 do armazenamento, estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12.Média e desvio padrão de hemoglobina (Hb) total, hematócrito e Hb plasmática obtidos a partir de diferentes métodos no grupo de bolsas CH CPDA1 em momentos distintos do armazenamento.

		CH CPDA1		
Variável	**Método**	**Dia 1 Média (dp)**	**Dia 19 Média (dp)**	**Dia 35 Média (dp)**
HbTotal (g/dL)	Hemoglobinômetro	23,5 (1,2)	23,6 (1,1)	23,3 (1,2)[(a)(b)]
	CellDynRuby	23,3 (1,3)	23,0 (1,3)[(a)]	23,1 (1,2)
Hematócrito (%)	Microhematócrito	72,9 (2,9)	72,3 (2,4)[(a)]	71,7 (2,6)[(a)(b)]
	CellDynRuby	69,7 (2,7)	70,9 (2,8) [(a)]	71,1 (3,0) [(a)]
HbPlasmática(g/dL)	Drabkin	0,106 (0,04)	0,442 (0,20)[(a)]	0,732 (0,40) [(a)(b)]
	Espectrofotométrico	0,048 (0,03)	0,251 (0,17) [(a)]	0,316 (0,21) [(a)]
	HemoCue Plasma Low	0,078 (0,04)	0,393 (0,22) [(a)]	0,540 (0,34) [(a)(b)]

(a) Estatisticamente diferente do Dia 1, segundo modelo de efeitos mistos ($p<0,05$).
(b) Estatisticamente diferente do Dia 19, segundo modelo de efeitos mistos ($p<0,05$).

O modelo linear de efeitos mistos detectou diferenças médias dos valores de Hb Total entre os dias 35 e 1, e dias 35 e 19, considerando o método de hemoglobinômetro (os respectivos valores-p são menores que o nível de significância fixado em 0,05). Considerando o método de Cell-Dyn Ruby, o modelo detectou diferenças entre os dias 19 e 1 (Tabela 12). Entretanto, observa-se que as médias de Hb Total apresentadas na Tabela 12 são muito

próximas entre os três distintos momentos de armazenamento, o que sugere que as diferenças apontadas pelo modelo não sejam importantes em um ponto de vista prático, tendo sido detectadas devidas às pequenas magnitudes dos desvios padrão.

Foi observado que os resultados de hematócrito obtido pelo método de microhematócrito foram superiores aos encontrados no Cell-Dyn. Neste equipamento foi possível notar que ao longo do armazenamento os resultados de hematócrito aumentaram, sendo que a média ao final da validade foi de 71,1% versus 69,7% no início do armazenamento (respectivo valor-p menor que 0,05, segundo o modelo estatístico).

Em todos os métodos utilizados para análise da Hb plasmática foi observado um aumento da concentração dessa variável com o decorrer do armazenamento (Tabela 12).

A Tabela 13 apresenta as médias e desvios padrão daHb total, hematócrito e Hb plasmática para as bolsas CH CPD/SAG manitol analisadas por diferentes métodos ao longo do armazenamento. Nesse grupo de bolsas, também foi observado que os valores de Hb plasmática aumentaram ao longo do armazenamento em todos os métodos analisados. Os resultados de hematócrito obtidos pelo método de microhematócrito foram superiores ao Cell-Dyn. Além disso, em ambos os métodos analisados, os resultados de hematócrito aumentaram durante o armazenamento.

Tabela 13. Média e desvio padrão de hemoglobina (Hb) total, hematócrito e Hb plasmática obtidos a partir de diferentes métodos no grupo de bolsas CH CPD/SAG manitol em momentos distintos do armazenamento.

		CH CPD/SAG manitol		
Variável	**Método**	**Dia 1 Média (dp)**	**Dia 19 Média (dp)**	**Dia 42 Média (dp)**
Hb Total (g/dL)	Hemoglobinômetro	19,3 (1,1)	19,4 (1,1)[(a)]	19,5 (1,1)[(a)]
	Cell-Dyn Ruby	19,0 (1,2)	19,0 (1,0)	18,9 (1,1)
Hematócrito (%)	Microhematócrito	58,4 (2,6)	58,8 (2,8)	59,0 (3,0) [(a)]
	Cell-Dyn Ruby	57,2 (3,0)	58,2 (2,8) [(a)]	58,6 (3,2) [(a)]
Hb Plasmática (g/dL)	Drabkin	0,021 (0,008)	0,059 (0,018) [(a)]	0,134 (0,057) [(a)(b)]
	Espectrofotométrico	0,016 (0,006)	0,040 (0,013) [(a)]	0,087 (0,039) [(a)(b)]
	HemoCue Plasma Low	0,010 (0,009)	0,047 (0,021) [(a)]	0,127 (0,061) [(a)(b)]

(a) Estatisticamente diferente do Dia 1, segundo modelo de efeitos mistos ($p<0,05$).
(b) Estatisticamente diferente do Dia 19, segundo modelo de efeitos mistos ($p<0,05$).

6.3. Análise do percentual de hemólise nos hemocomponentes durante o armazenamento

As Tabelas 14 a 17 mostram o grau médio de hemólise, nos vários momentos ao longo do armazenamento, utilizando a combinação de diferentes métodos de determinação de hemólise.Considerando-se o CH CPDA1, observa-se que o método espectrofotométrico trouxe percentuais médios menores que o Drabkin, em todos os diferentes dias de armazenamento (Tabelas 14 e 15). Neste caso, percentual médio de hemólise variou, ao final da validade (dia 35) de 0,37% a 0,92%, dependendo da combinação de métodos utilizados.

Tabela 14. Percentual médio (%) de hemólise em CH CPDA1 em diferentes dias de armazenamento utilizando o Cell-Dyn para determinação da hemoglobina total e hematócrito.

Armazenamento	Drabkin Média (dp)	HemoCue Plasma Low Média (dp)	Espectrofotométrico Média (dp)
Dia 1	0,14 (0,06)	0,10 (0,06) [(a)]	0,06 (0,04) [(a)(b)]
Dia 19	0,56 (0,25)	0,49 (0,27)	0,31 (0,20) [(a)(b)]
Dia 35	0,92 (0,52)	0,67 (0,42)	0,39 (0,27) [(a)(b)]

(a) Estatisticamente diferente do Drabkin ($p<0,05$).
(b) Estatisticamente diferente do HemoCue Plasma Low ($p<0,05$).

Tabela 15. Percentual médio (%) de hemólise em CH CPDA1 em diferentes dias de armazenamento utilizando o hemoglobinômetro EKF para dosagem da hemoglobina total e microhematócrito para determinação do hematócrito.

Armazenamento	Drabkin Média (dp)	HemoCue Plasma Low Média (dp)	Espectrofotométrico Média (dp)
Dia 1	0,12 (0,05)	0,09 (0,05) [(a)]	0,05 (0,03) [(a)(b)]
Dia 19	0,54 (0,28)	0,48 (0,31)	0,30 (0,23) [(b)]
Dia 35	0,88 (0,47)	0,64 (0,39)	0,37 (0,25) [(a)(b)]

(a) Estatisticamente diferente do Drabkin ($p<0,05$).
(b) Estatisticamente diferente do HemoCue Plasma Low ($p<0,05$).

Considerando o CH CPD/SAG manitol, o percentual médio de hemólise, ao final da validade (dia 42), variou de 0,18% a 0,29% (Tabelas 16 e 17).Foram excluídas dez bolsas analisadas no dia 1 no método HemoCue Plasma Low, pois o valor de hemoglobina livre encontrado nesses hemocomponentes estava abaixo da linearidade deste método, não sendo possível calcular o grau de hemólise dos mesmos.

Tabela 16. Percentual médio de hemólise em CH CPD/SAG manitol em diferentes dias de armazenamento utilizando o Cell-Dyn para determinação da hemoglobina total e hematócrito.

Armazenamento	Drabkin Média (dp)	HemoCue Plasma Low Média (dp)	Espectrofotométrico Média (dp)
Dia 1	0,05 (0,02)	0,03 (0,02)[(a)]	0,04 (0,02)[(b)]
Dia 19	0,13 (0,02)	0,10 (0,04)[(a)]	0,09 (0,02)[(a)]
Dia 42	0,29 (0,08)	0,28 (0,12)	0,19 (0,08)[(a)(b)]

(a) Estatisticamente diferente do Drabkin ($p<0,05$).
(b) Estatisticamente diferente do HemoCue Plasma Low ($p<0,05$).

Tabela 17. Percentual médio de hemólise em CH CPD/SAG manitol em diferentes dias de armazenamento utilizando o hemoglobinômetro EKF para dosagem da hemoglobina total e microhematócrito para determinação do hematócrito.

Armazenamento	Drabkin Média (dp)	HemoCue Plasma Low Média (dp)	Espectrofotométrico Média (dp)
Dia 1	0,04 (0,02)	0,02 (0,02)[(a)]	0,03 (0,01) [(b)]
Dia 19	0,12 (0,03)	0,10 (0,04)[(a)]	0,08 (0,02) [(a)]
Dia 42	0,27 (0,11)	0,26 (0,12)	0,18 (0,07) [(a)(b)]

(a) Estatisticamente diferente do Drabkin ($p<0,05$).
(b) Estatisticamente diferente do HemoCue Plasma Low ($p<0,05$).

Em relação ao percentual de conformidade do grau de hemólise no vencimento das bolsas, foi observado que a escolha do método de hemoglobina livre influenciou a conformidade desse parâmetro nas bolsas CPDA1. Dependendo da escolha do método, o percentual mínimo de hemólise de 75% exigido pela portaria brasileira MS 158/2016, ao final do armazenamento não seria alcançado (Tabela 18). O mesmo não foi observado nas bolsas CPD/SAG manitol, pois em todos os métodos utilizados o percentual de conformidade foi de 100% ao final da validade. Em todas as bolsas analisadas, tanto CPDA1, quanto CPD/SAG

manitol os testes microbiológicos foram negativos. Dessa forma, os resultados de hemólise encontrados não foram influenciados por uma possível contaminação bacteriana.

Tabela 18. Percentual de conformidade do grau de hemólise em bolsas CPDA1 no vencimento.

Método Hemólise	Drabkin	HemoCue Plasma Low	Espectrofotométrico
Percentual de conformidade (%)	48,0	72,0	93,0

Valor de hemólise permitido ao final da validade < 0,8%, conforme Portaria MS 158/2016

6.4. Variabilidade Inter-ensaio (Reprodutibilidade)

Todos os métodos analisados apresentaram níveis aceitáveis de variabilidade inter-ensaio (Tabelas 19 e 20). Nas análises de hemoglobina livre o método espectrofotométrico apresentou melhor precisão inter-ensaio que os demais métodos na amostra 1, o que não foi observado na amostra 2. Os métodos de Drabkin e HemoCue Plasma Low apresentaram variações inter-ensaio equivalentes em ambas as amostras (Tabela 19).

Tabela 19. Coeficiente de variação(CV) inter-ensaio para os métodos de determinação da hemoglobina livre.

	CV (%) Inter-ensaio		
	Espectrofotométrico	Drabkin	HemoCue Plasma Low
Amostra 1	2,6	4,3	5,1
Amostra 2	11,0	7,3	8,8

Tabela 20. Coeficiente de variação(CV) inter-ensaio para os métodos de determinação da hemoglobina total e hematócrito.

	CV (%) Inter-ensaio			
	Hematócrito		Hemoglobina	
	Cell-Dyn	Microhematócrito	Cell-Dyn	Hemoglobinômetro EKF
Amostra 1	2,1	0,0	2,0	1,8
Amostra 2	1,9	0,0	2,4	1,4
Amostra 3	1,3	0,6	1,4	1,4

O método microhematócrito, nas análises de hematócrito, apresentou menores variações inter-ensaio que o analisador hematológico Cell-Dyn, O mesmo foi observado com hemoglobinômetro, que apresentou melhor precisão inter-ensaio que o Cell-Dyn, nas análises de hemoglobina total (Tabela 20).

6.5. Variabilidade Intra-ensaio (Repetitividade)

Todos os métodos apresentaram níveis aceitáveis de variação intra-ensaio (Tabelas 21 e 22). Dentre os métodos de determinação da hemoglobina livre, o método HemoCue Plasma Low apresentou maior variação intra-ensaio nas amostras 2 e 3 (Tabela 21).

Tabela 21. Coeficiente de variação (CV) intra-ensaio para os métodos de determinação da hemoglobina livre

	CV (%) Intra-ensaio		
	Espectrofotométrico	Drabkin	HemoCue Plasma Low
Amostra 1	10,8	3,0	7,3
Amostra 2	2,1	4,0	6,8
Amostra 3	3,9	2,0	9,1

Ambos os métodos para determinação de hematócrito, bem como os métodos para determinação de hemoglobina total apresentaram alta precisao intra-ensaio (Tabela 22).

Tabela 22. Coeficiente de variação (CV) intra-ensaio para os métodos de determinação da hemoglobina total e hematócrito.

	CV (%) Intra-ensaio			
	Hematócrito		Hemoglobina	
	Cell-Dyn	Microhematócrito	Cell-Dyn	Hemoglobinômetro EKF
Amostra 1	0,9	0,7	0,9	1,2
Amostra 2	0,9	0,7	1,2	0,7
Amostra 3	0,5	0,6	0,8	1,7
Amostra 4	1,0	0,4	1,0	1,1

Os gráficos da análises de reprodutibilidade e repetitividade estão apresentados no Apêndice.

6.6. Análises de Concordância

Foram realizadas as análises de concordância, através dos gráficos de Bland-Altman, entre os diferentes métodos de determinação de hemoglobina plasmática, hemoglobina total, hematócrito e hemólise. As análises foram feitas em dois grupos de bolsas. O grupo de bolsas CH CPDA1 foi identificado como “Amostra 1” e o grupo corresponde as bolsas CH CPD/ SAG Manitol como “Amostra 2”.

No grupo de bolsas CPD/SAG manitol do dia 1 de armazenamento, em que foram feitas as análises de concordância entre os métodos de determinação de hemoglobina livre e hemólise, utilizando a técnica HemoCue Plasma Low, foi necessária a retirada de dez bolsas da análise (n=20). Nesse período de armazenamento o valor de hemoglobina livre era tão baixo que não pode ser lido pelo equipamento.

As demais analises foram realizadas com 30 bolsas CPD/SAG manitol e 29 bolsas CPDA1.

6.6.1. Hemoglobina Total: Concordância entre Cell-Dyn e Hemoglobinômetro EKF

As Figuras 12 e 13 representam as análises de concordância entre analisador hematológico (Cell-Dyn Ruby) e hemoglobinômetro EKF para determinação da hemoglobina total em três períodos ao longo do armazenamento, considerando respectivamente as Amostras 1 e 2. Em ambos os testes as amostras foram processadas diluídas.

Pode-se observar que em ambas as amostras e em todos os períodos de armazenamento os resultados de hemoglobina obtidos pelo hemoglobinômetro tendem a ser superiores aos obtidos pelo Cell-Dyn (nos gráficos de dispersão das Figuras 12 e 13, a maioria dos pontos é disposta acima da diagonal representada pela reta azul, e a linha vermelha é sempre disposta acima da azul). As análises realizadas ao final da validade (dia 35), nas bolsas CPDA1, demostraram que a média das diferenças entre o Cell-Dyn e o hemoglobinômetro EKF foi -0,55 g/dL, sendo que os limites de concordância variaram de 1,14 a -2,25 g/dL (Figura 12, painel (f)). Nas análises realizadas ao final da validade (dia 42), considerando as bolsas CPD/SAG manitol, observa-se uma média de diferença entre os métodos Cell-Dyn e Hemoglobinômetro EKF de – 0,88 g/dL, sendo os limites de concordância entre os métodos de 0,31 a -2,07 g/dL (Figura13, painel (f)). As análises realizadas no inicio do armazenamento apresentaram médias das diferenças inferiores, sendo que nas bolsas CPDA1 a média entre o Cell-Dyn e o hemoglobinômetro foi de -0,31g/dL e nas bolsas CPD/SAG manitol foi de -0,4 g/dL (painéis (b) das Figuras 12 e 13, respectivamente).

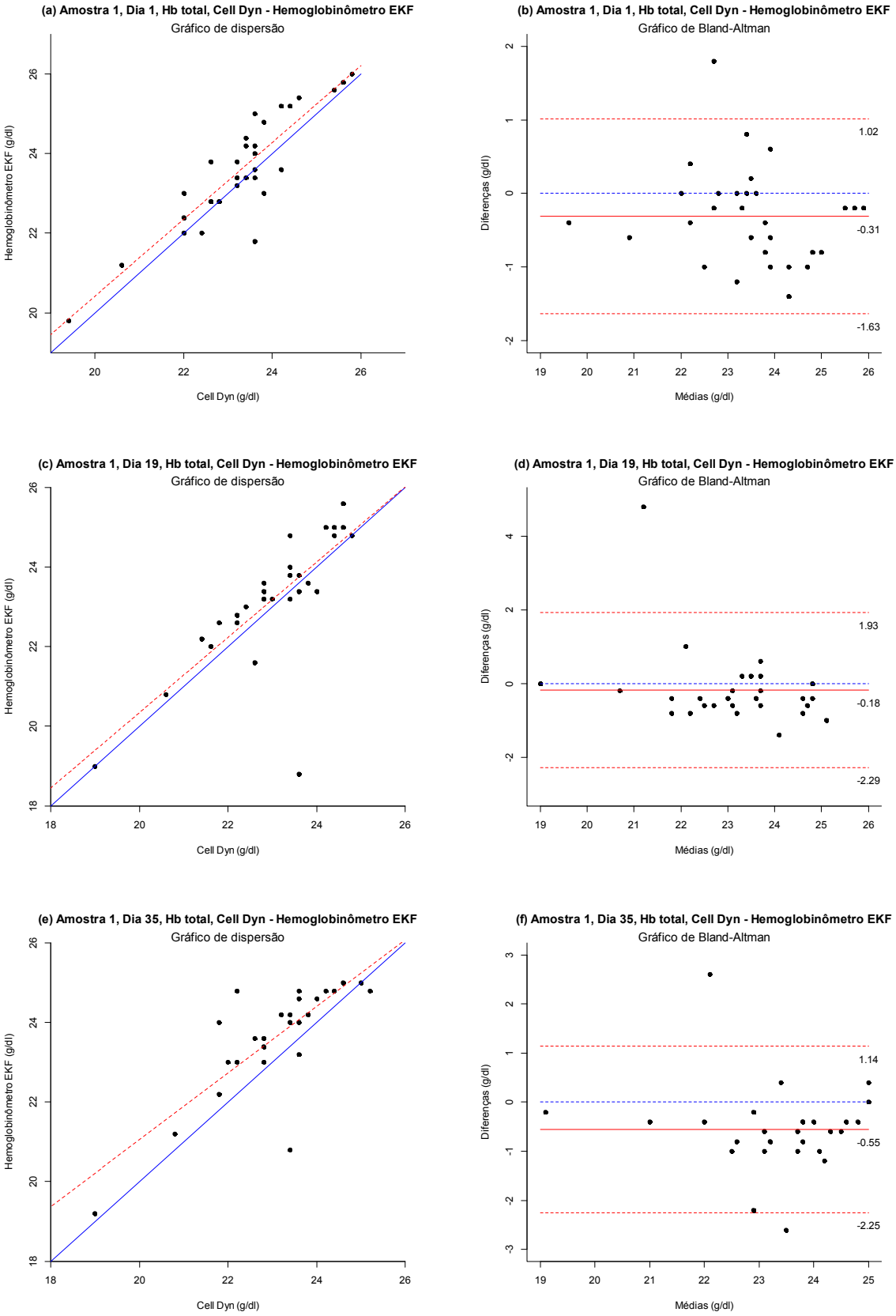


Figura 12. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hemoglobina total obtida no Cell Dyn e no hemoglobinômetro, Amostra 1, dias 1, 19 e 35.

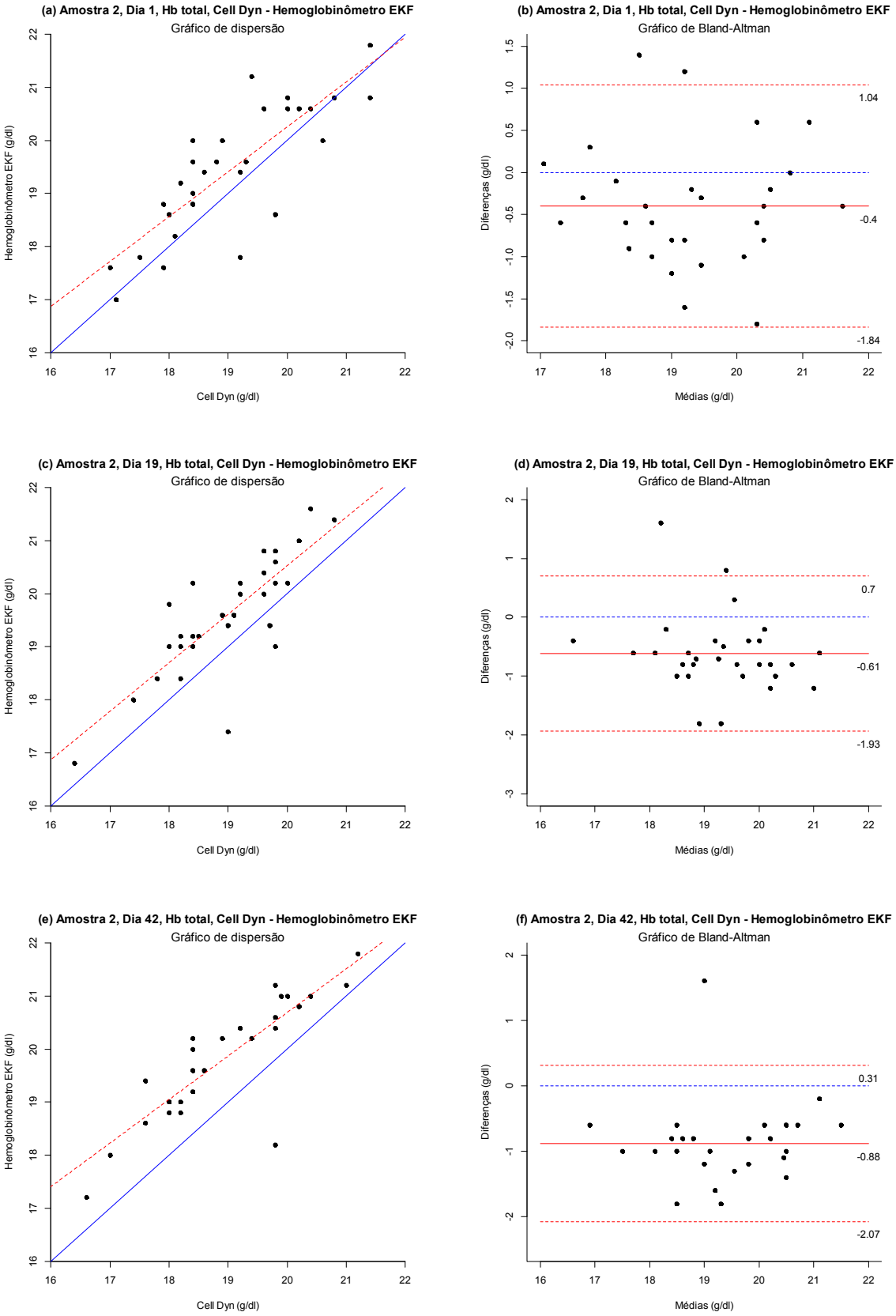


Figura 13. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hemoglobina total obtida no Cell Dyn e no hemoglobinômetro, Amostra 2, dias 1, 19 e 42.

6.6.2. Hematócrito: Concordância entre Cell-Dyn e Microhematócrito

As Figuras 14 e 15 apresentam as análises de concordância entre o Cell-Dyn e método de microhematócrito para determinação do hematócrito, considerando as Amostras 1 e 2, respectivamente. Em ambas as amostras e em todos os períodos de armazenamento, os resultados de hematócrito obtidos pelo método de microhematócrito foram superiores aos determinados pelo Cell-Dyn, na maior parte das observações (ver gráficos de dispersão).

Ao final da validade nas bolsas CPDA1, foi observada uma média das diferenças dos resultados entre o método Cell-Dyn e microhematócrito de -0,56%. Os limites de concordância, para esse grupo de bolsas variaram de 2,12 a -3,25% (Figura 14, painel (f)), Nas bolsas CPD/SAG manitol, ao final da validade, a média das diferenças entre o Cell-Dyn e microhematócrito foi de -0,42%, sendo os limites de concordância de 2,23 e -3,08% (Figura 15, painel (f)). As análises realizadas no início do armazenamento (dia 1), em ambos os tipos de bolsas, estimaram médias das diferenças entre os métodos e limites de concordância, superiores aos observados no último dia de armazenamento de cada grupo de bolsas (painéis (b) das Figuras 14 e 15).

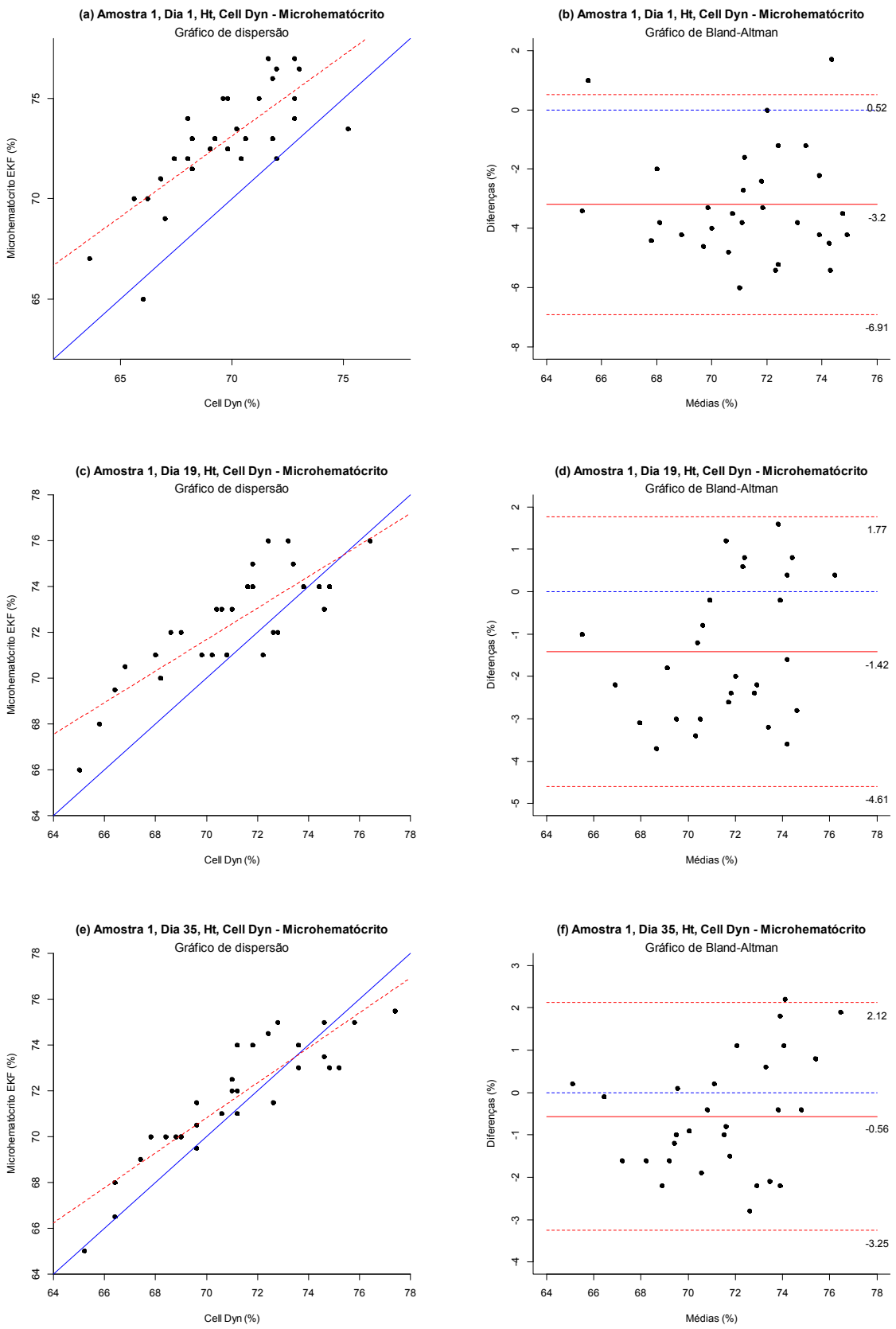


Figura 14. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hematócrito obtido no Cell Dyn e no microhematócrito, Amostra 1, dias 1, 19 e 35.

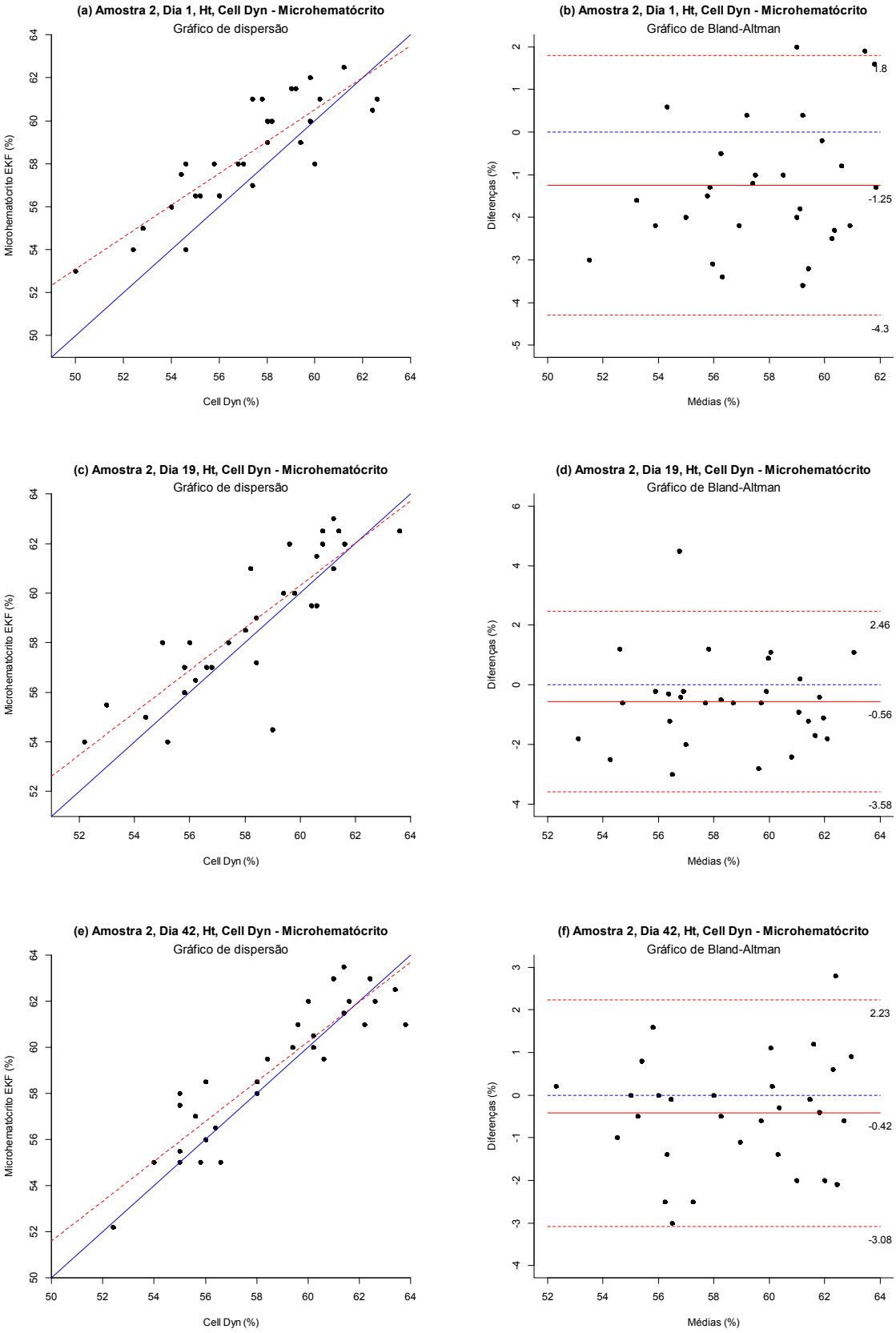


Figura 15. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hematócrito obtido no Cell Dyn e no microhematócrito, Amostra 2, dias 1, 19 e 42.

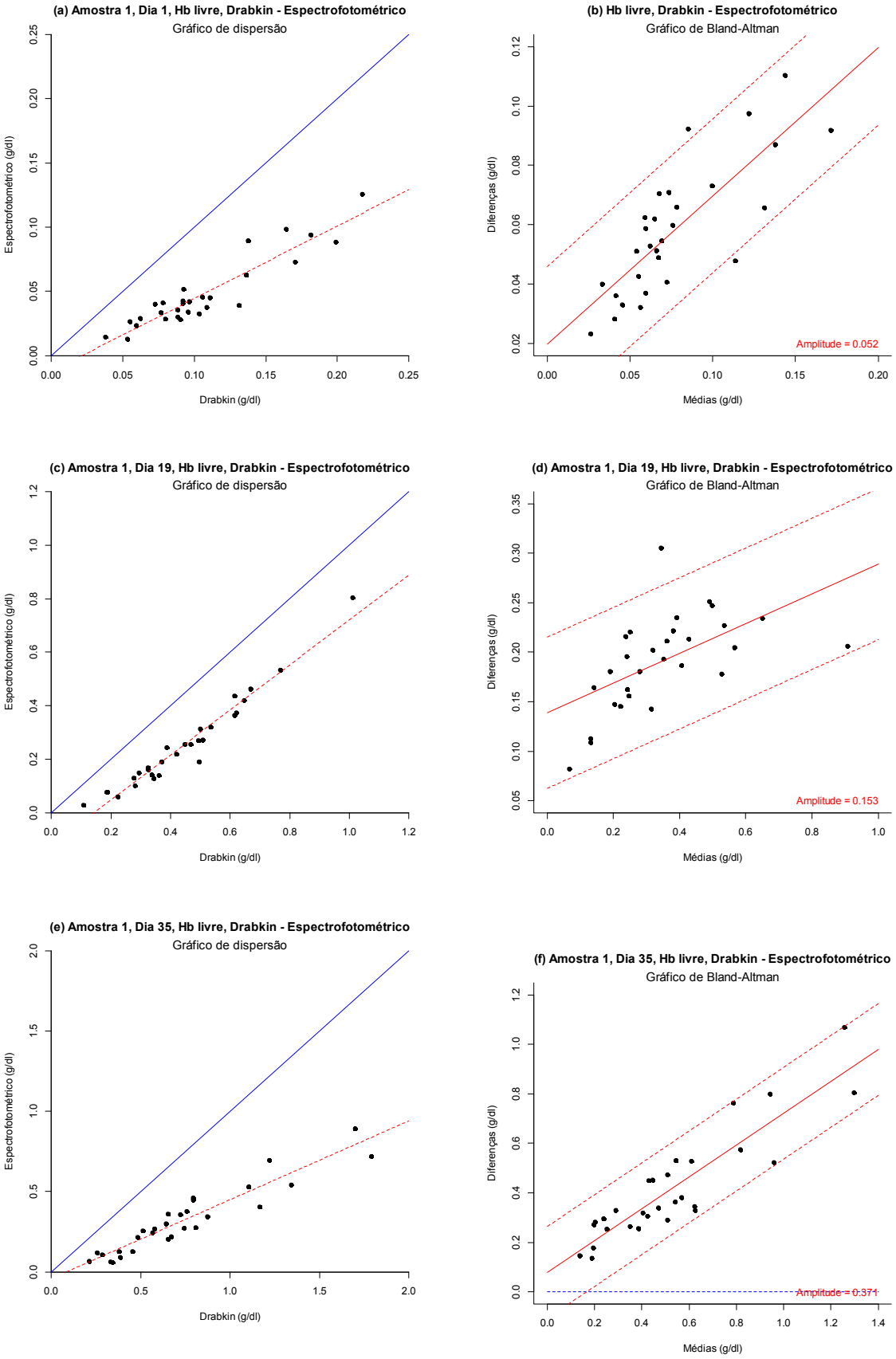


Figura 16.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da Hb livre obtidas nos métodos de Drabkin e Espectrofotométrico, Amostra 1, dias 1, 19 e 35.

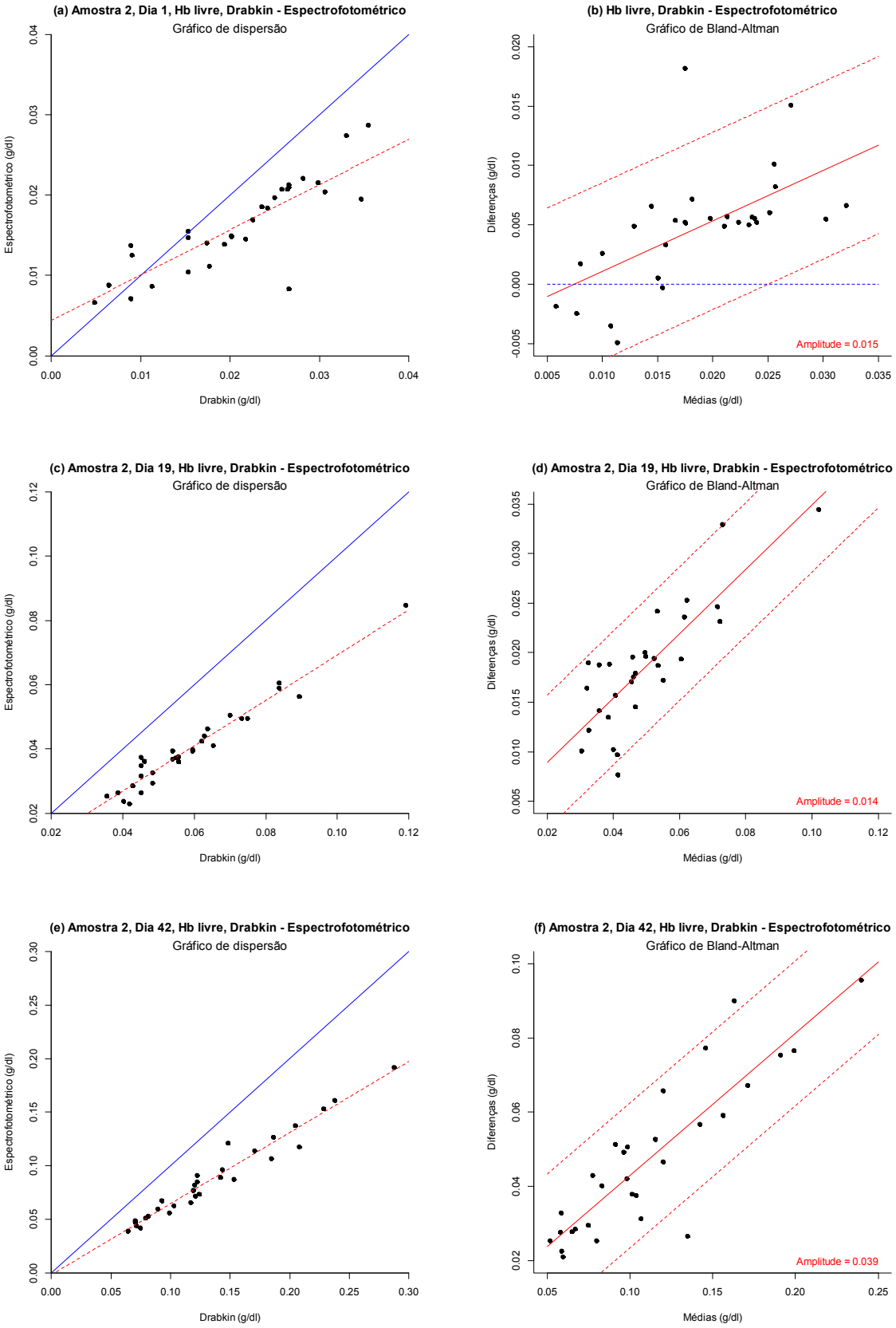


Figura 17. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da Hb livre obtidas nos métodos de Drabkin e Espectrofotométrico,Amostra 2, dias 1, 19 e 42.

6.6.3. Hemoglobina livre: Concordância entre método de Drabkin e Espectrofotométrico

As Figura 16 e 17 apresentam as análises de concordância entre o método de Drabkin e o espectrofotométrico considerando as duas amostras avaliadas (respectivamente, bolsas CPDA1 e CPD/SAG manitol) para determinação da hemoglobina livre. Pode-se observar que em ambos os grupos de bolsas e em todos os períodos de armazenamentos avaliados, os resultados de hemoglobina livre obtidos pelo método de Drabkin tendem a ser superiores aos determinados pelo método espectrofotométrico. Observa-se também que quanto maior o valor de Hb livre, menor é a concordância entre os métodos (as diferenças entre as linhas azul e vermelha, nos gráficos de dispersão das Figuras 16 e 17, aumentam conforme crescem os valores de Hb livre).

6.6.4. Hemoglobina livre: Concordância entre método de Drabkin e HemoCue® Plasma Low

O método de Drabkin apresentou resultados de hemoglobina livre quase sempre superiores ao método HemoCue Plasma Low, em ambos os tipos de bolsa e em todos os períodos de armazenamento avaliados (Figuras 18 e 19).Considerando a Amostra 1, observou-se que as médias das diferenças não variaram conforme as médias das observações (Figura 18, painel (b)). Entretanto, observou-se que, no dia 19, as médias das diferenças decrescem conforme as médias das observações (painel (d)) e, no dia 35, crescem conforme as médias das observações (painel (f)).

Ao final da validade foi observado, nas bolsas CPD/SAG manitol (Amostra 2), uma média das diferenças de 0,01g/dL, sendo que os limites de concordância variaram de 0,05 a -0,03g/dL (Figura 19, painel (f)).

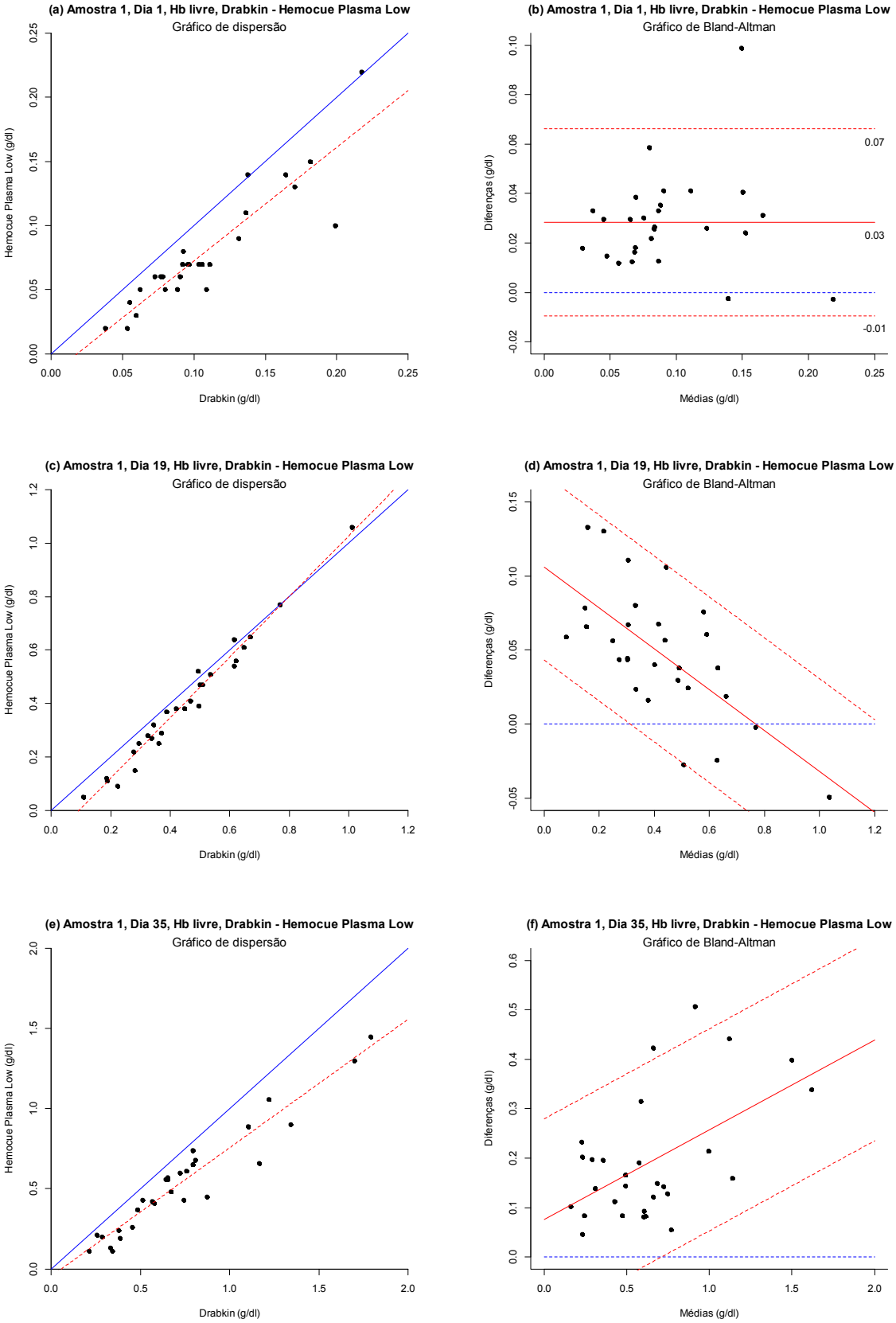


Figura 18. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hemoglobina livre obtidas nos métodos de Drabkin e HemoCue Plasma Low, Amostra 1, dias 1, 19 e 35.

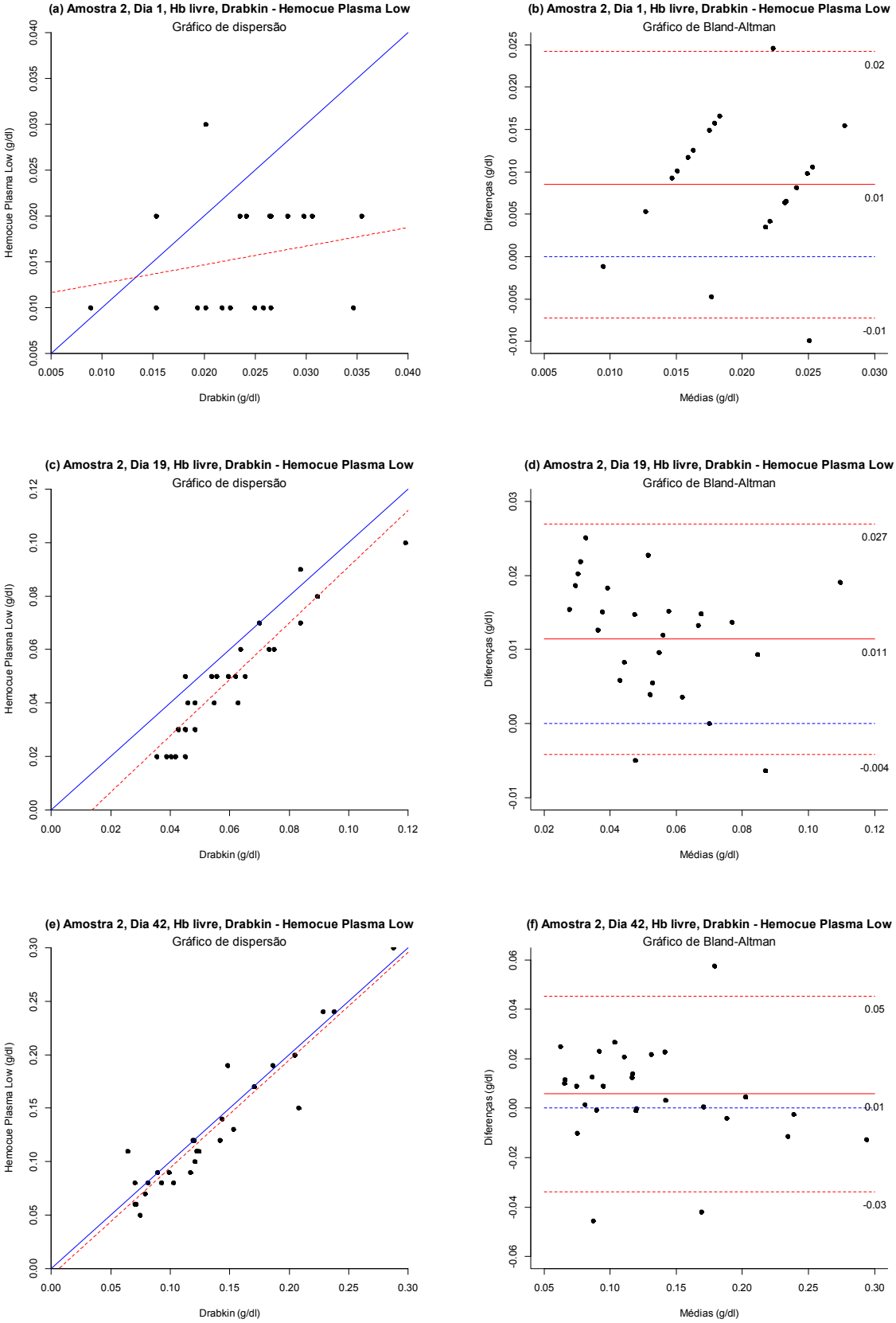


Figura 19. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hemoglobina livre obtidas nos métodos de Drabkin e HemoCue Plasma Low, Amostra 2, dias 1, 19 e 42.

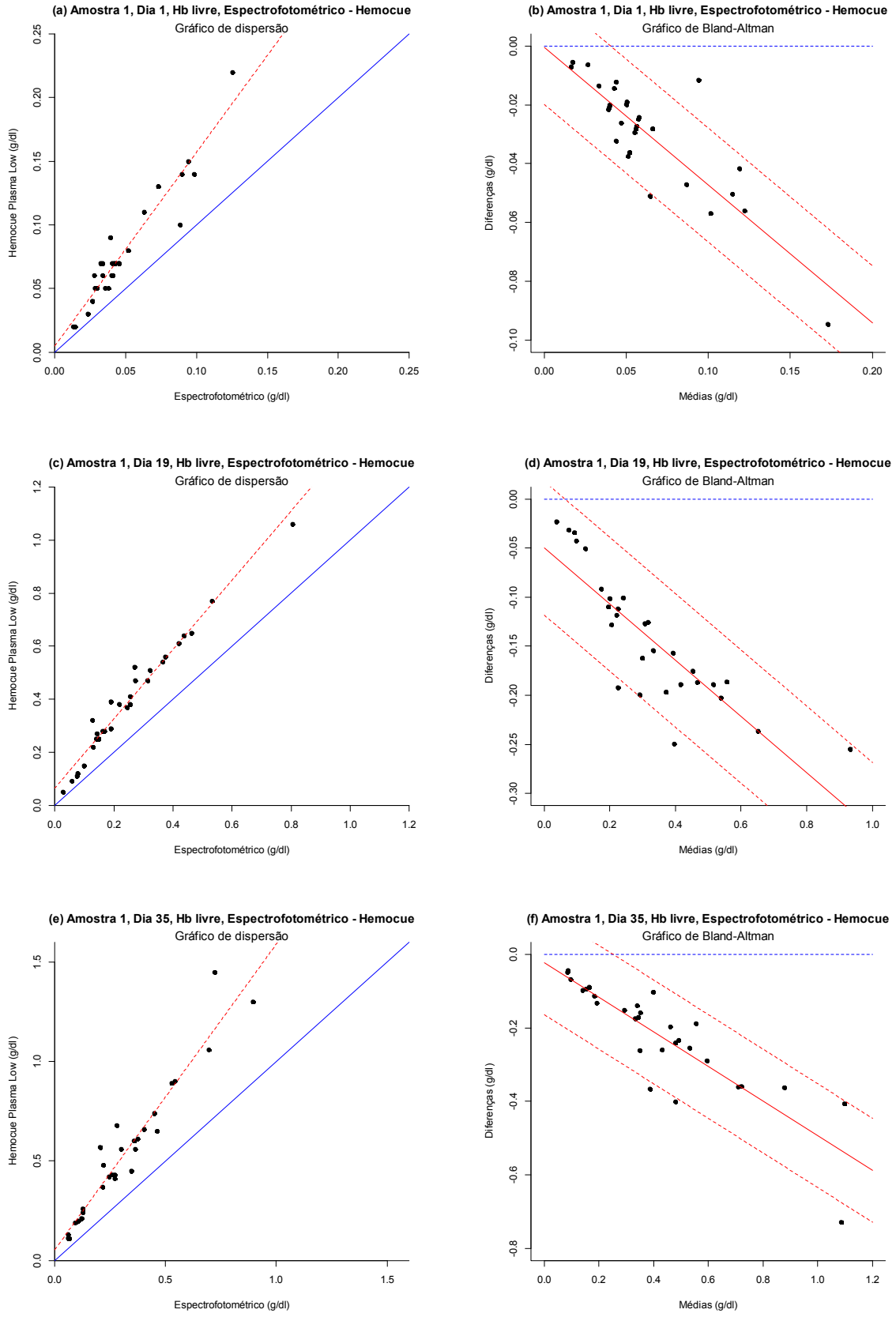


Figura 20. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da Hb livre obtidas nos métodos Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low, Amostra 1, dias 1, 19 e 35.

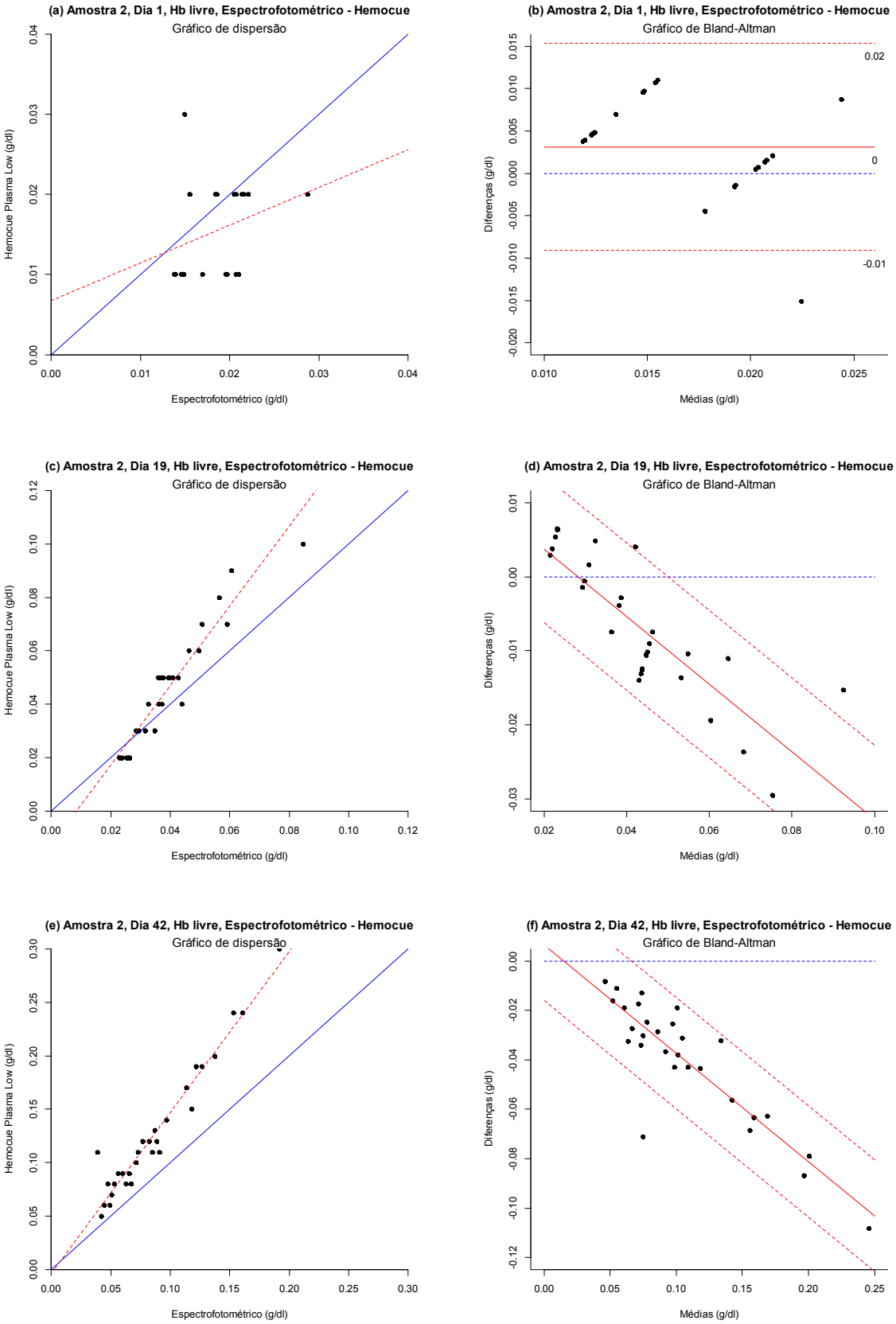


Figura 21. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da Hb livre obtidas nos métodos Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low, Amostra 2, dias 1, 19 e 42.

6.6.5.Hb livre: Concordância entre método de Espectrofotométrico e HemoCue® Plasma Low

O método espectrofotométrico apresentou resultados de hemoglobina livre inferiores ao HemoCue Plasma Low em todos os períodos de armazenamento das bolsas CPDA1 e nos dias 19 e 42 das bolsas CPD/SAG manitol (gráficos de dispersão, Figuras 20 e 21). Pode-se perceber que a concordância entre os métodos diminui à medida que os valores de Hb livre aumentam (nos gráficos de Bland-Altman das Figuras 20 e 21, a linha vermelha contínua, que representa as médias das diferenças, afasta-se progressivamente da linha azul, que representa a situação em que os métodos são perfeitamente concordantes).Como exceção, os painéis (a) e (b) da Figura 21 (Amostra 2, dia 1) são de difícil interpretação, dado que HemoCue Plasma Low forneceu valores com pequena diversidade (apenas valores iguais a 0,01, 0,02 ou 0,03).

6.6.6. Hemólise: Concordância entre os métodos de Drabkin e Espectrofotométrico

As Figuras 22 a 25 apresentam as análises de concordância entre os métodos Drabkin e espectrofotométrico para determinação de hemólise. Nas Figuras 22 e 23, a hemólise foi realizada utilizando Cell-Dyn para dosagem da hemoglobina total e hematócrito. Nas Figuras 24 e 25, a hemólise foi realizada utilizando hemoglobinômetro para determinação da hemoglobina total e microhematócrito para determinação do hematócrito. Em todas as situações, percebe-se que a hemólise obtida pelo método de Drabkin apresenta resultados superiores aos obtidos pelo método espectrofotométrico em todos os períodos de armazenamento e ambos os tipos de bolsas estudadas. À medida que o valor de hemólise aumenta, a concordância entre os métodos diminui (gráficos de dispersão, Figuras 22 a 25).

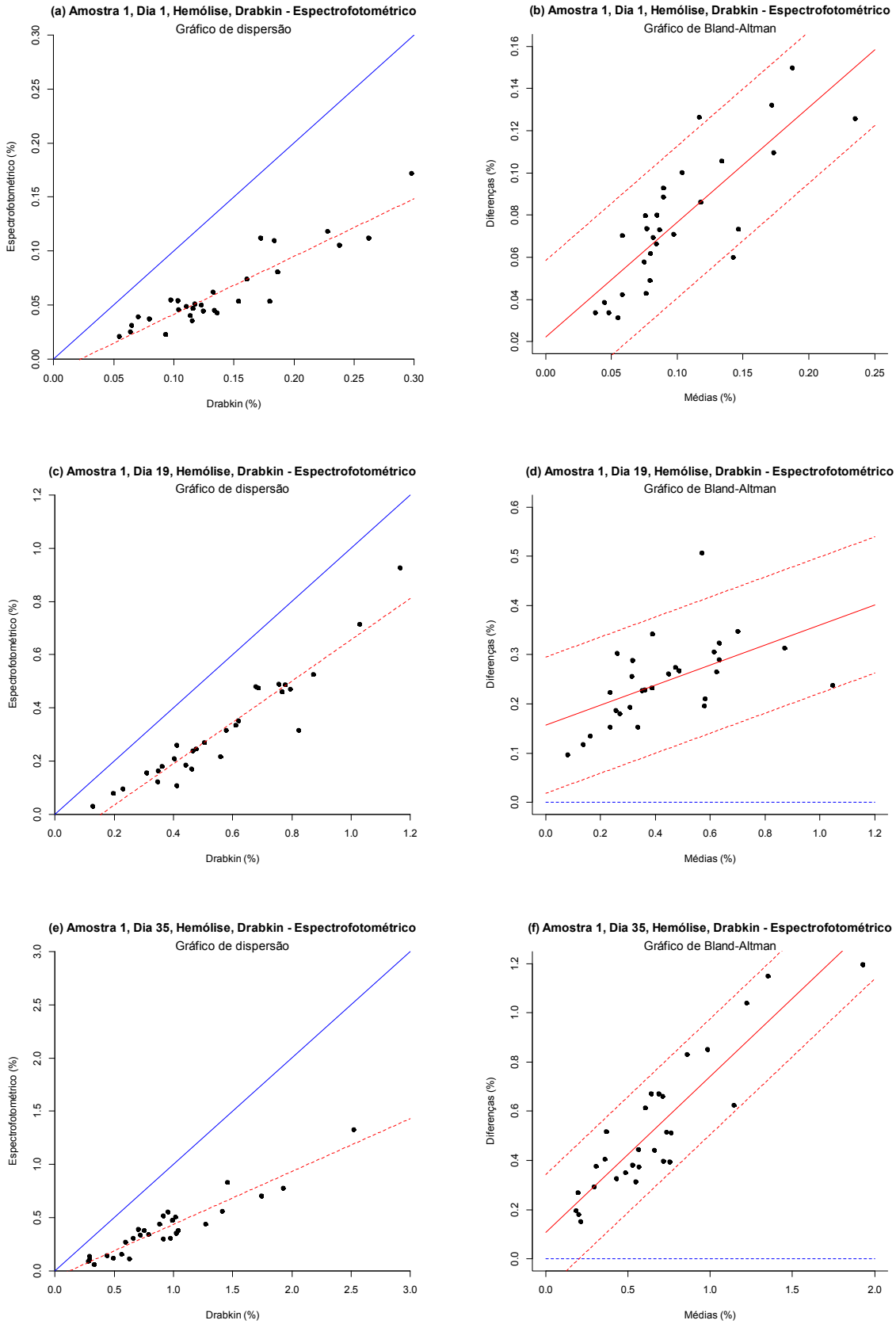


Figura 22. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos de Drabkin e Espectrofotométrico (Hb total e Ht Cell Dyn), Amostra 1, dias 1, 19 e 35.

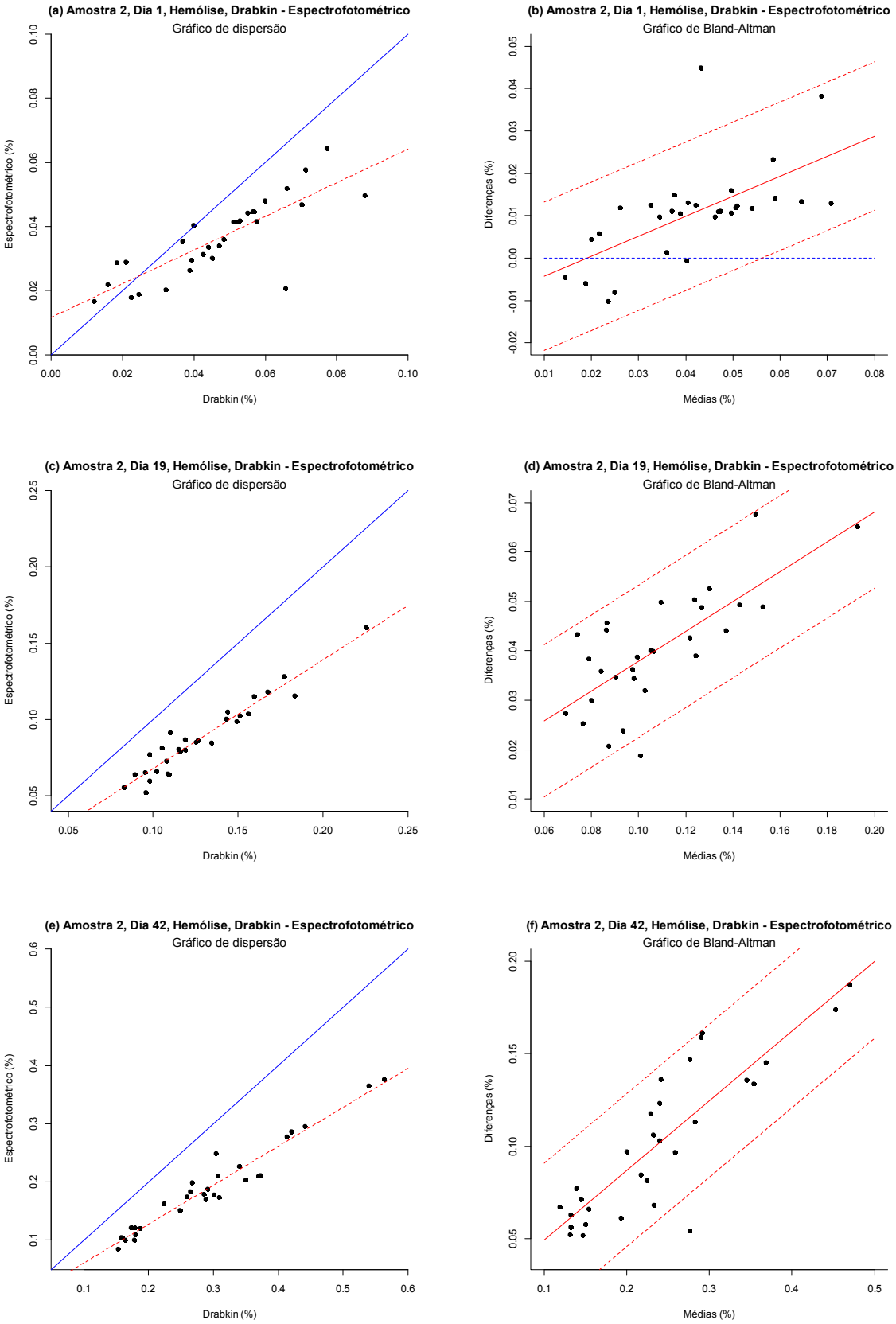


Figura 23.Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos de Drabkin e Espectrofotométrico (Hb total e Ht Cell-Dyn), Amostra 2, dias 1, 19 e 42.

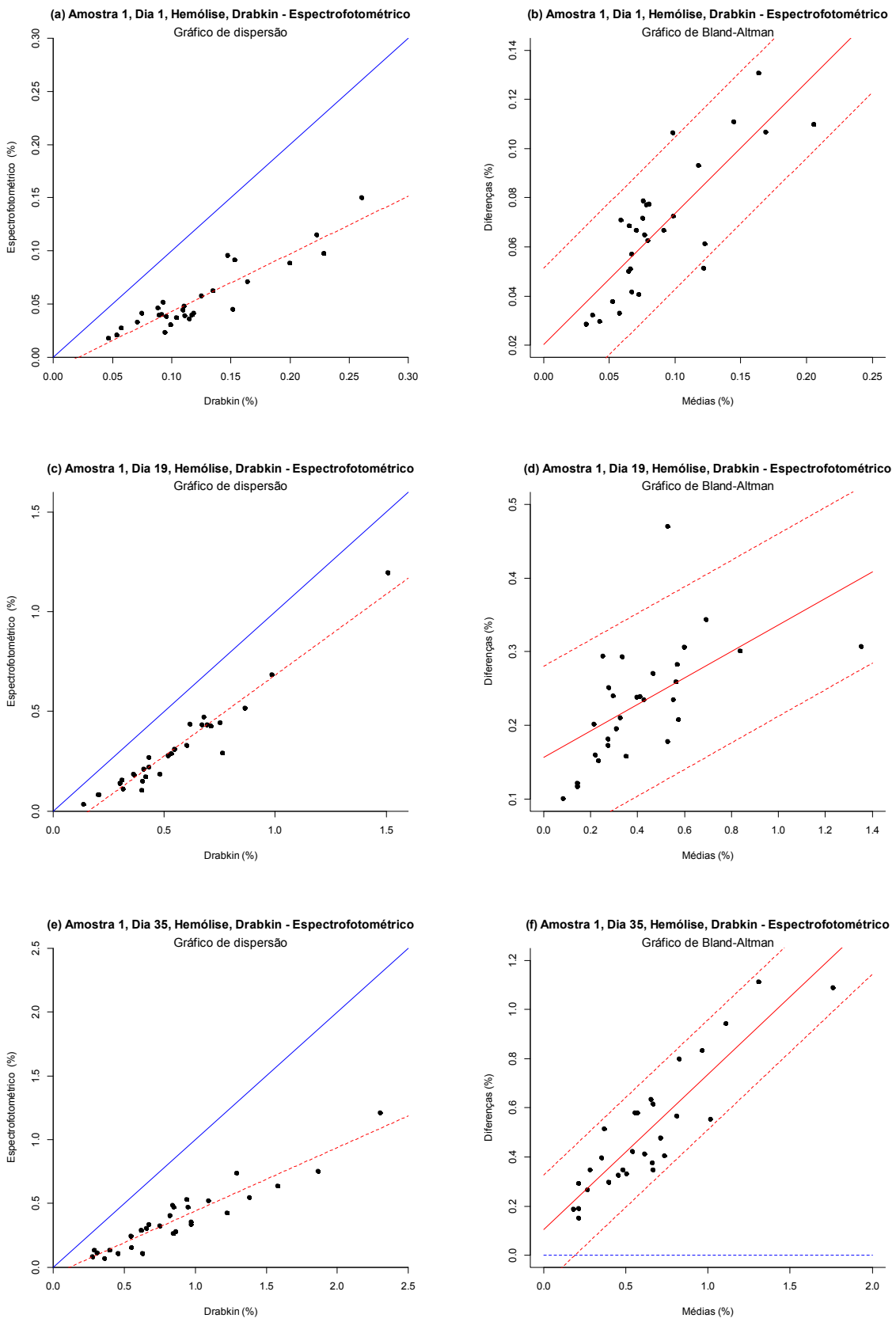


Figura 24. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos Drabkin e Espectrofotométrico (Hb total hemoglobinômetro e Ht microhematócrito), Amostra 1, dias 1, 19 e 35.

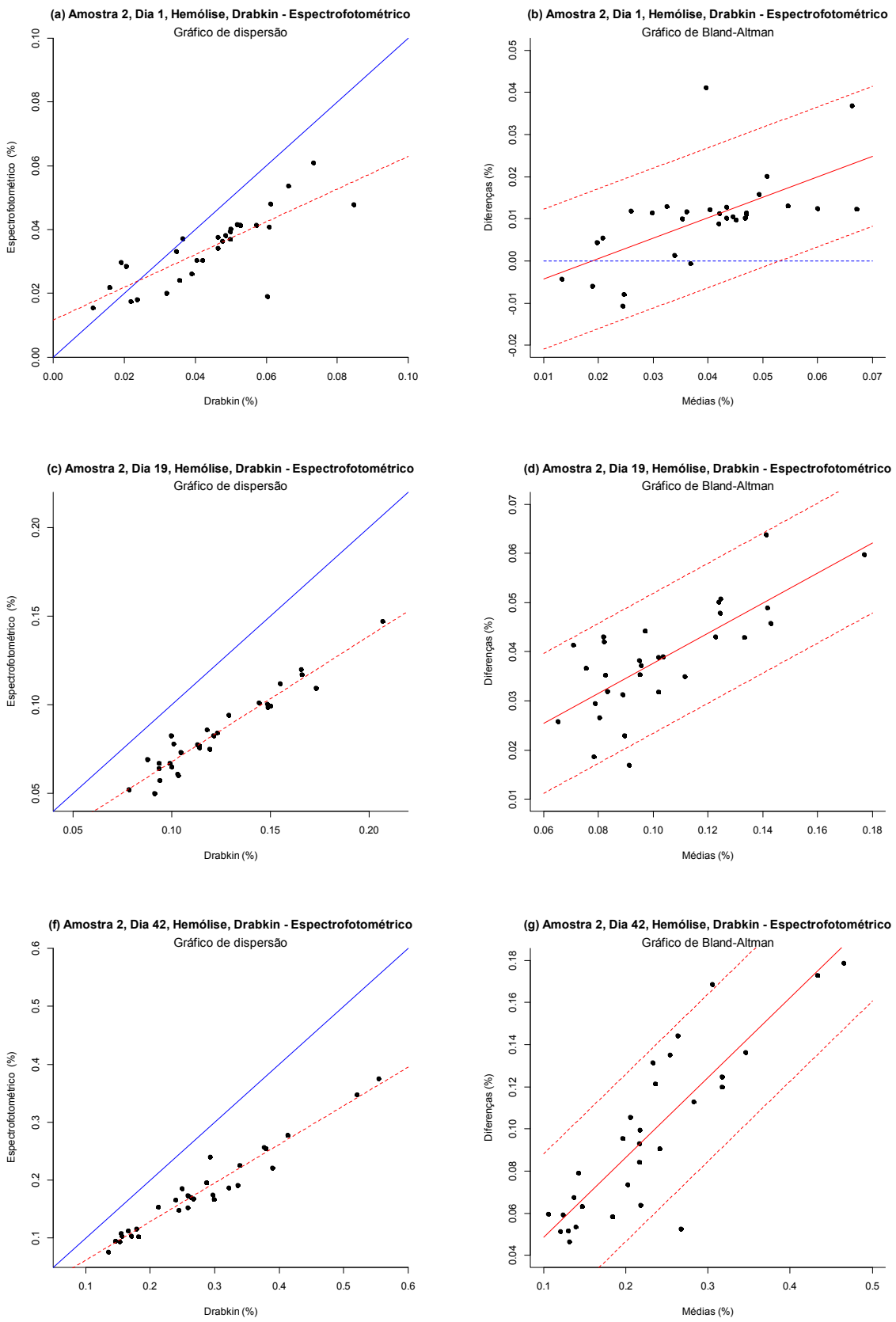


Figura 25. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos Drabkin e Espectrofotométrico (Hb total hemoglobinômetro e Ht microhematócrito), Amostra 2, dias 1, 19 e 42.

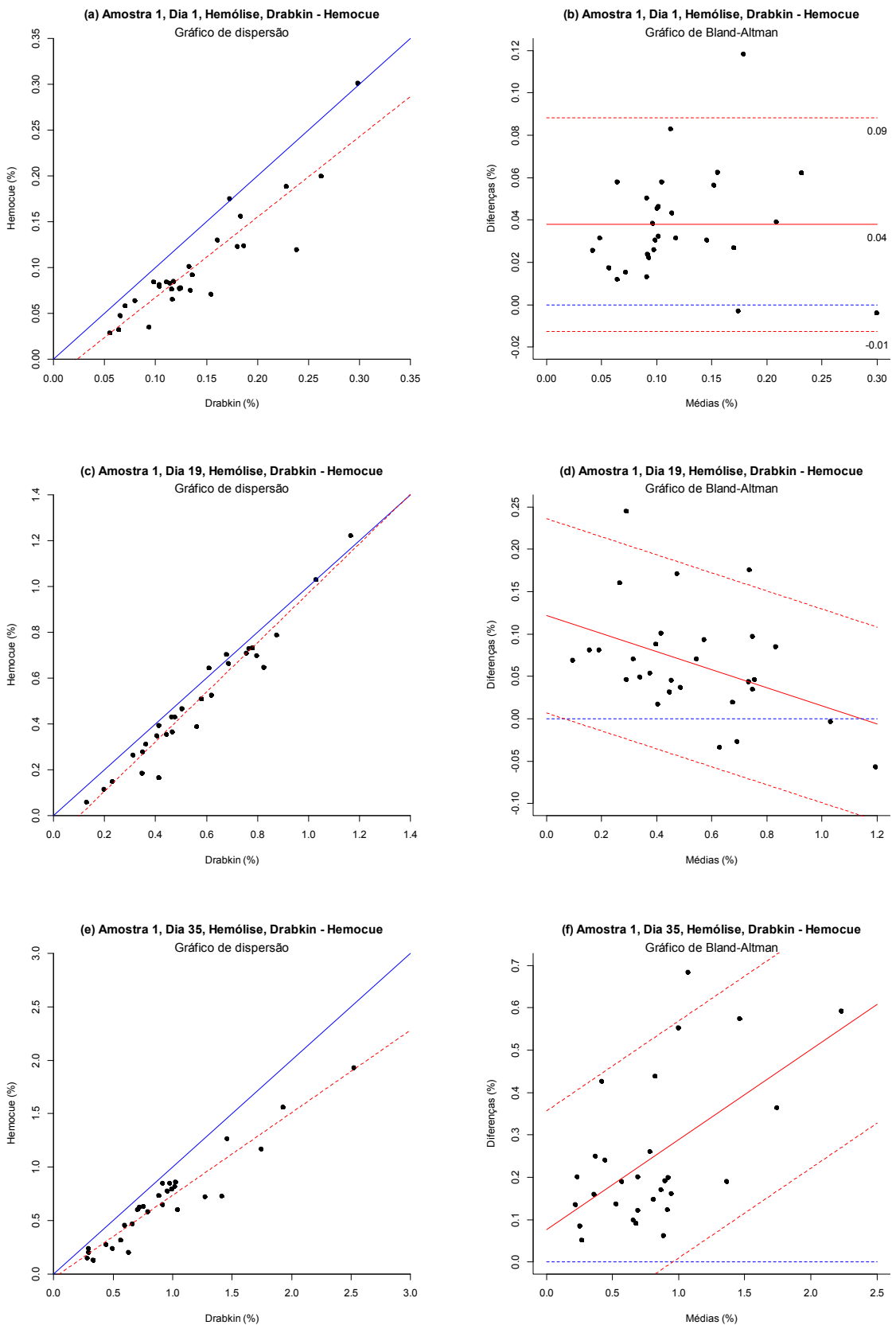


Figura 26. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos de Drabkin e HemoCue Plasma Low (Hb total e Ht Cell -Dyn), Amostra 1, dias 1, 19 e 35.

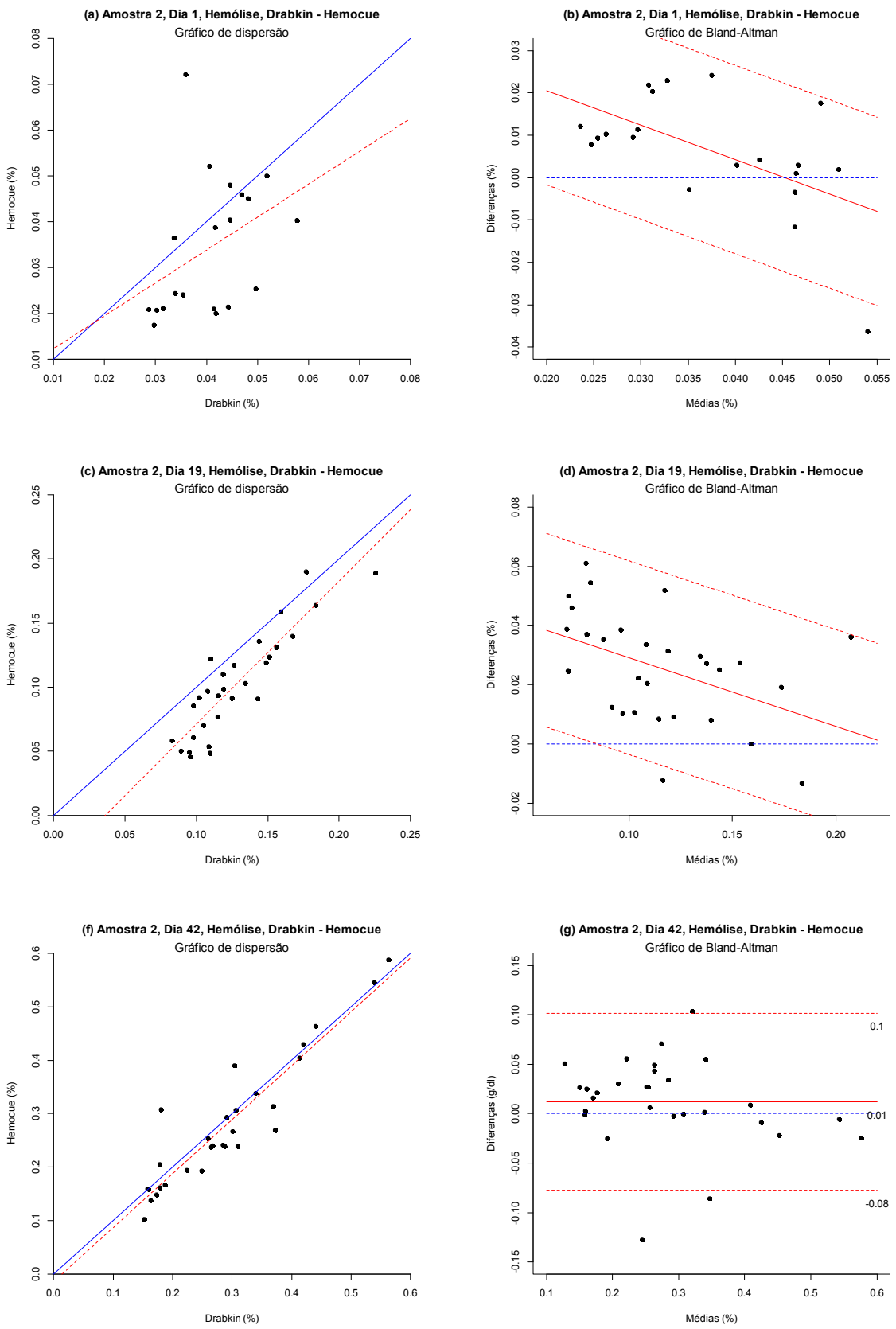


Figura 27. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hemólise utilizando os métodos de Drabkin e HemoCue Plasma Low (Hb total e Ht Cell -Dyn), Amostra 2, dias 1, 19 e 42.

6.6.7. Hemólise: Concordância entre os métodos de Drabkin e HemoCue Plasma Low

As Figuras 26 a 29 apresentam as análises de concordância entre os métodos Drabkin e HemoCue Plasma Low para determinação de hemólise. Nas Figuras 26 e 27, a hemólise foi realizada utilizando Cell-Dyn para dosagem da hemoglobina total e hematócrito. Nas Figuras 28 e 29, a hemólise foi realizada utilizando hemoglobinômetro para determinação da hemoglobina total e microhematócrito para determinação do hematócrito.

Em todos os períodos do armazenamento e em ambos os tipos de bolsas analisadas, foi observado que o método de Drabkin tende a apresentar resultados de hemólise superiores ao método HemoCue Plasma Low (Figuras 26 a 29).

Os métodos apresentaram boa concordância em todos os períodos de armazenamento, principalmente nas bolsas CPD/SAG manitol (Figura 27, painéis (b), (d) e (g); Figura 29, painéis (b), (d) e (g)), A média das diferenças entre os métodos nesse tipo de bolsa, ao final da validade foi 0,01% e os limites de concordância ficaram entre -0,08 e 0,1% (Figura 27, painel (g)), Resultados semelhantes também foram obtidos no grau hemólise utilizando os métodos microhematócrito, para hematócrito e hemoglobinômetro para hemoglobina (Figura 29, painel (g)),

Nas bolsas CPDA1 foi possível notar uma boa concordância entre os métodos nos hemocomponentes que foram analisados no início e meio de armazenamento (Figura 26, painéis (b) e (d), e Figura 28, painéis (b) e (d)). Nesse grupo de bolsas, analisadas ao final da validade, foi observada que quanto maior o valor de hemólise maior a diferença entre os métodos . (Figura 26, painel (f), e Figura 28, painel (f)).

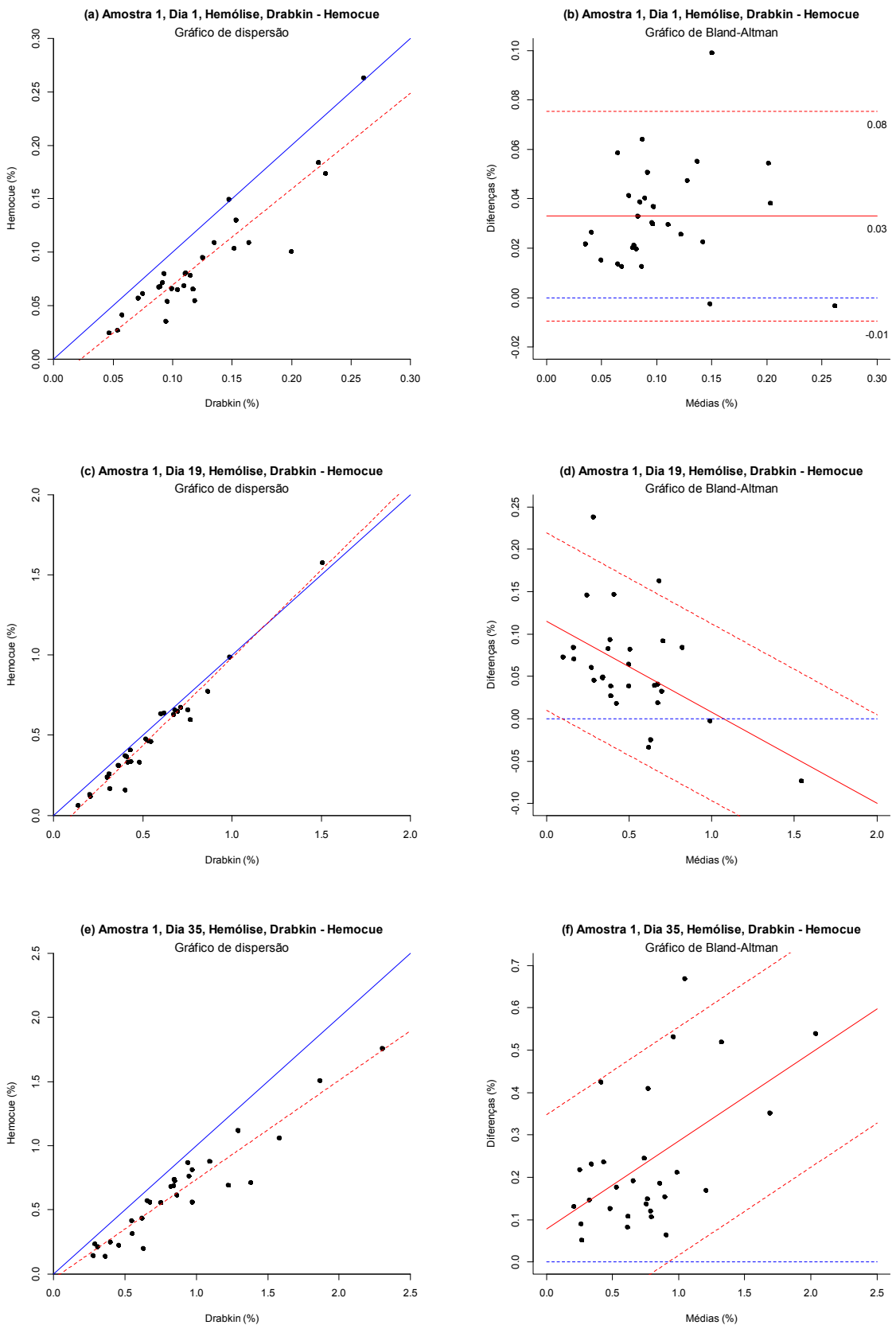


Figura 28. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação da hemólise utilizando os métodos deDrabkin e HemoCue Plasma Low(Hb total hemoglobinômetro e Ht microhematócrito), Amostra 1, dias 1, 19 e 35.

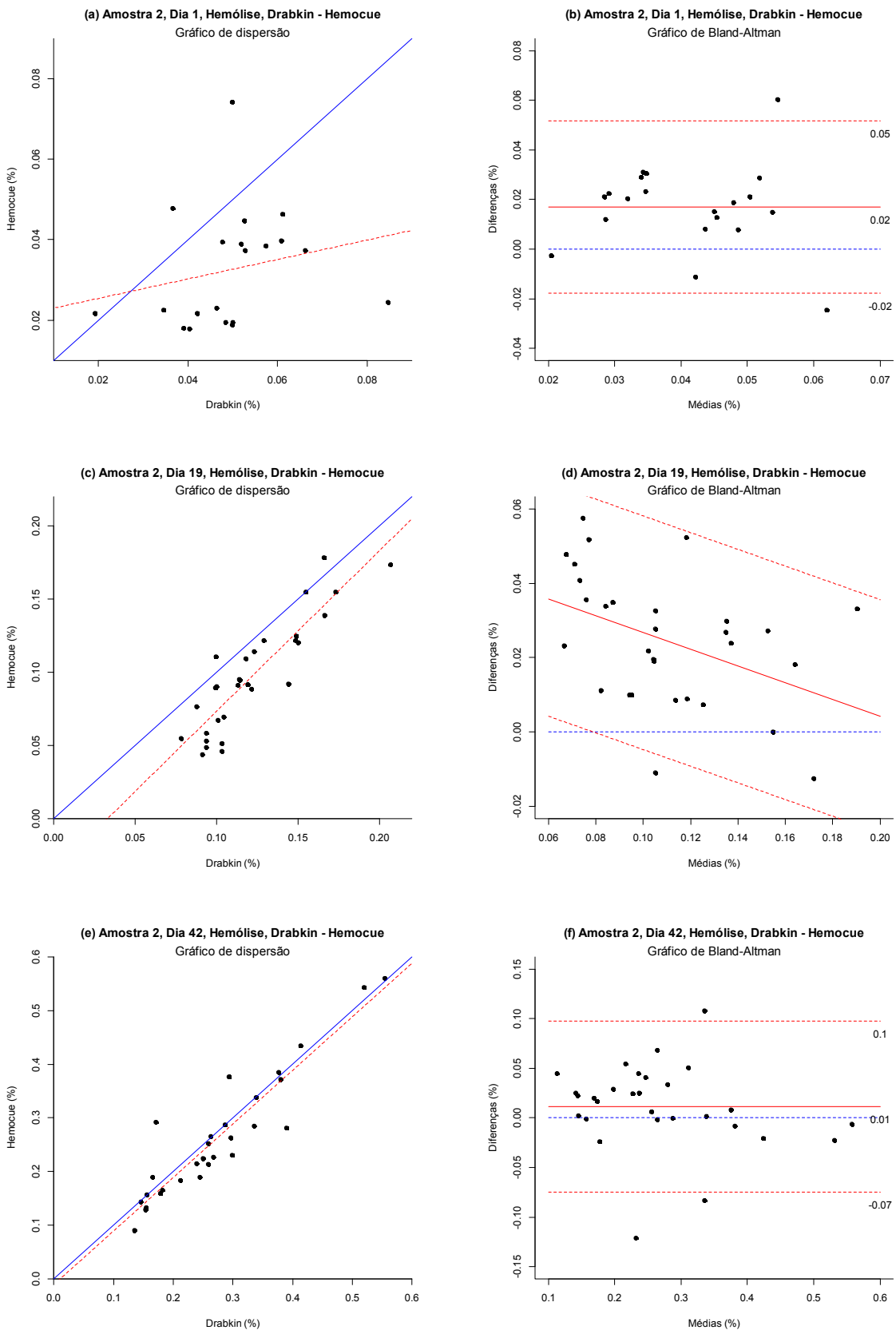


Figura 29. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos de Drabkin e HemoCue Plasma Low (Hb total hemoglobinômetro e Ht microhematócrito), Amostra 2, dias 1, 19 e 42.

6.6.8. Hemólise: Concordância entre método Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low

As Figuras 30 a 33 apresentam as análises de concordância entre os métodos Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low para determinação de hemólise. Nas Figuras 30 e 31, a hemólise foi realizada utilizando Cell-Dyn para dosagem da hemoglobina total e hematócrito. Nas Figuras 32 e 33, a hemólise foi realizada utilizando hemoglobinômetro para determinação da hemoglobina total e microhematócrito para determinação do hematócrito.

O método HemoCue Plasma Low, quando comparado com o espectrofotmétrico apresentou resultados de hemólise superiores (nos gráficos de dispersão Figura 30, painéis (a), (c), (e) , a linha pontilhada vermelha está sempre disposta acima da linha contínua azul). Foi observada boa concordância entre os métodos nos dias 1 e 19 das bolsas CPD/SAG manitol (Figura 31, painéis (b) e (d)). A medida que o valor de hemólise aumenta, diminui a concordância entre os métodos (Figura 30, painéis (d) e (f). Figura 31, painel (f)).

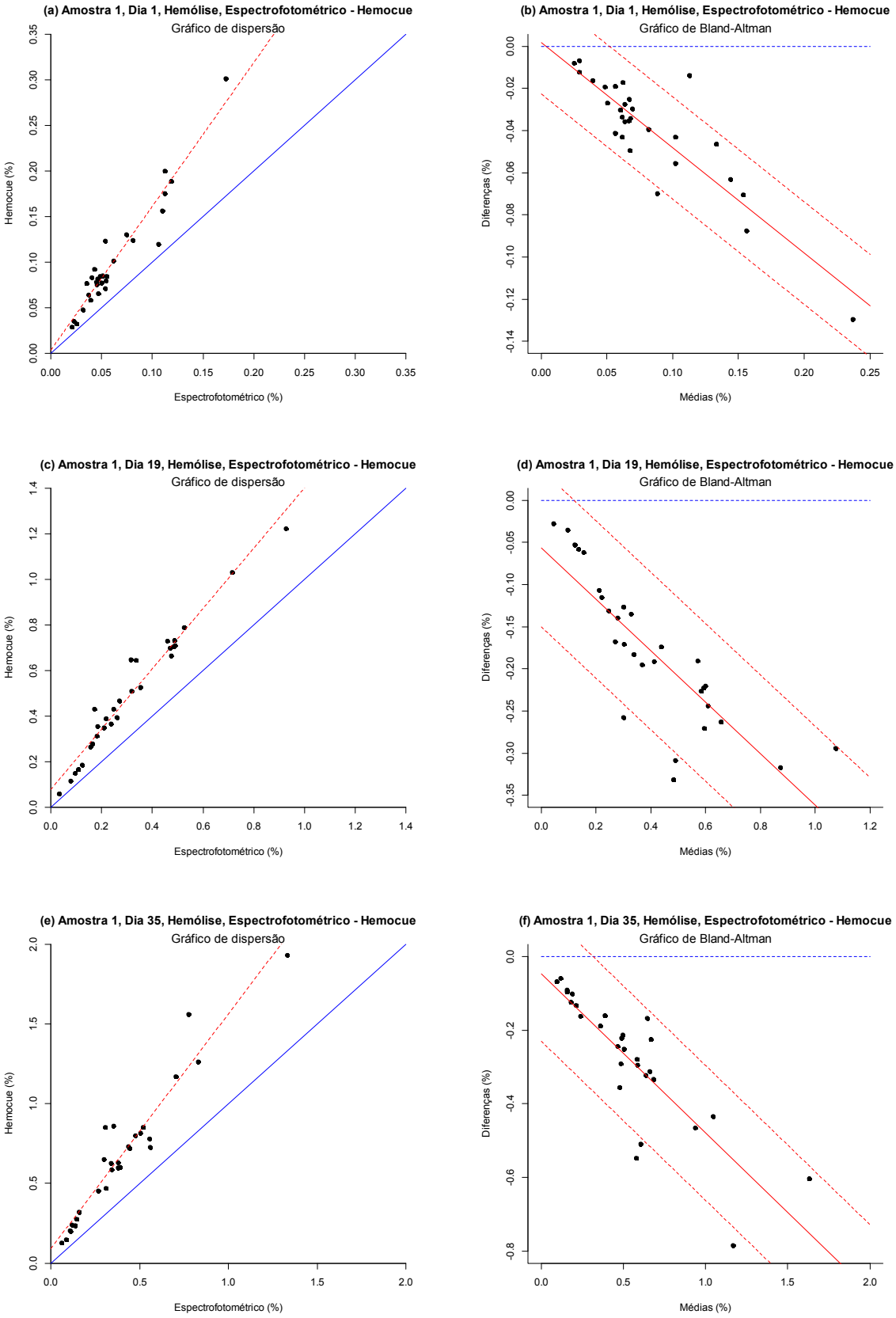


Figura 30. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low (Hb total e Ht Cell Dyn), Amostra 2, dias 1, 19 e 35.

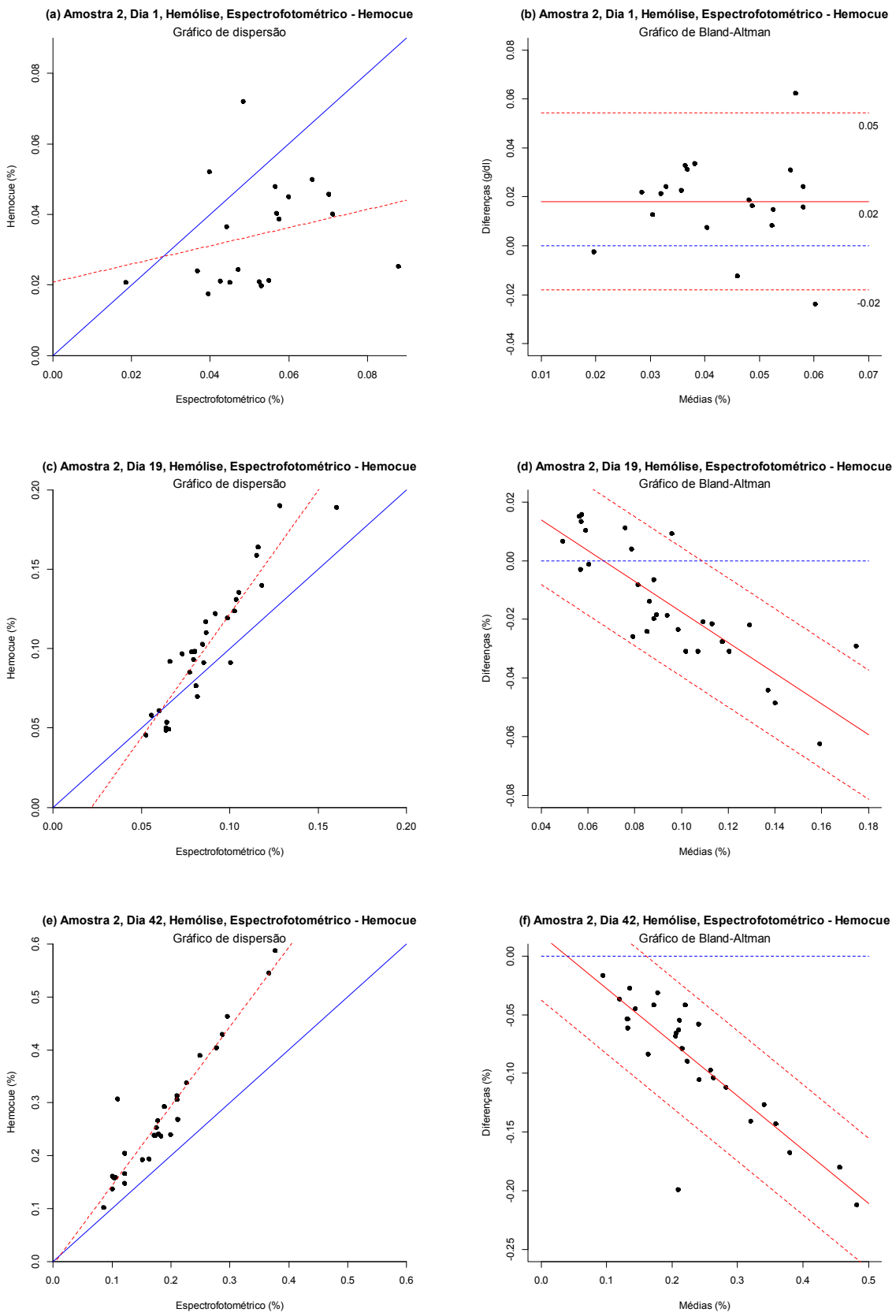


Figura 31. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low (Hb total e Ht Cell Dyn), Amostra 2, dias 1, 19 e 42.

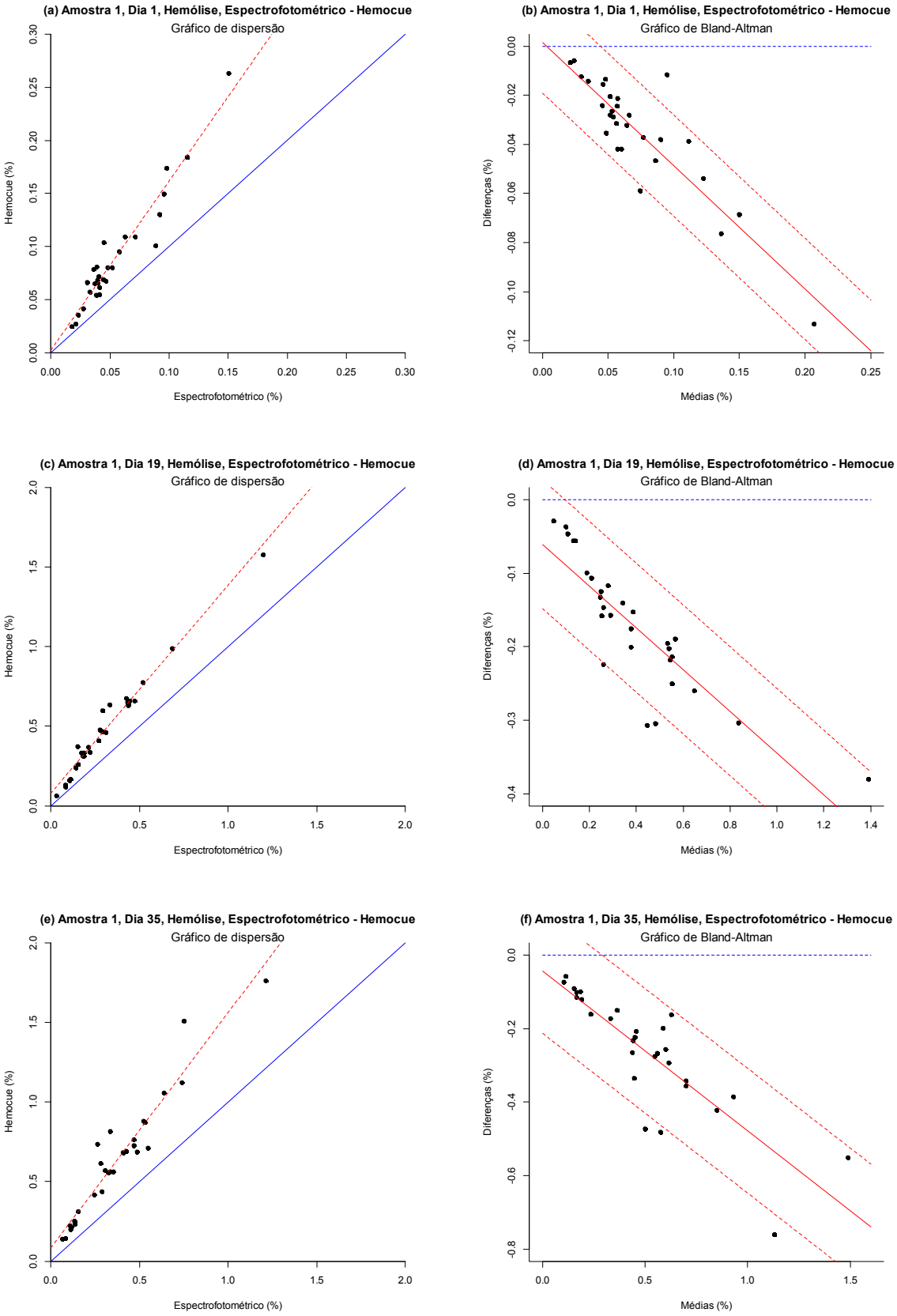


Figura 32. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos de Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low(Hb total hemoglobinômetro e Ht microhematócrito), Amostra 1, dias 1, 19 e 35.

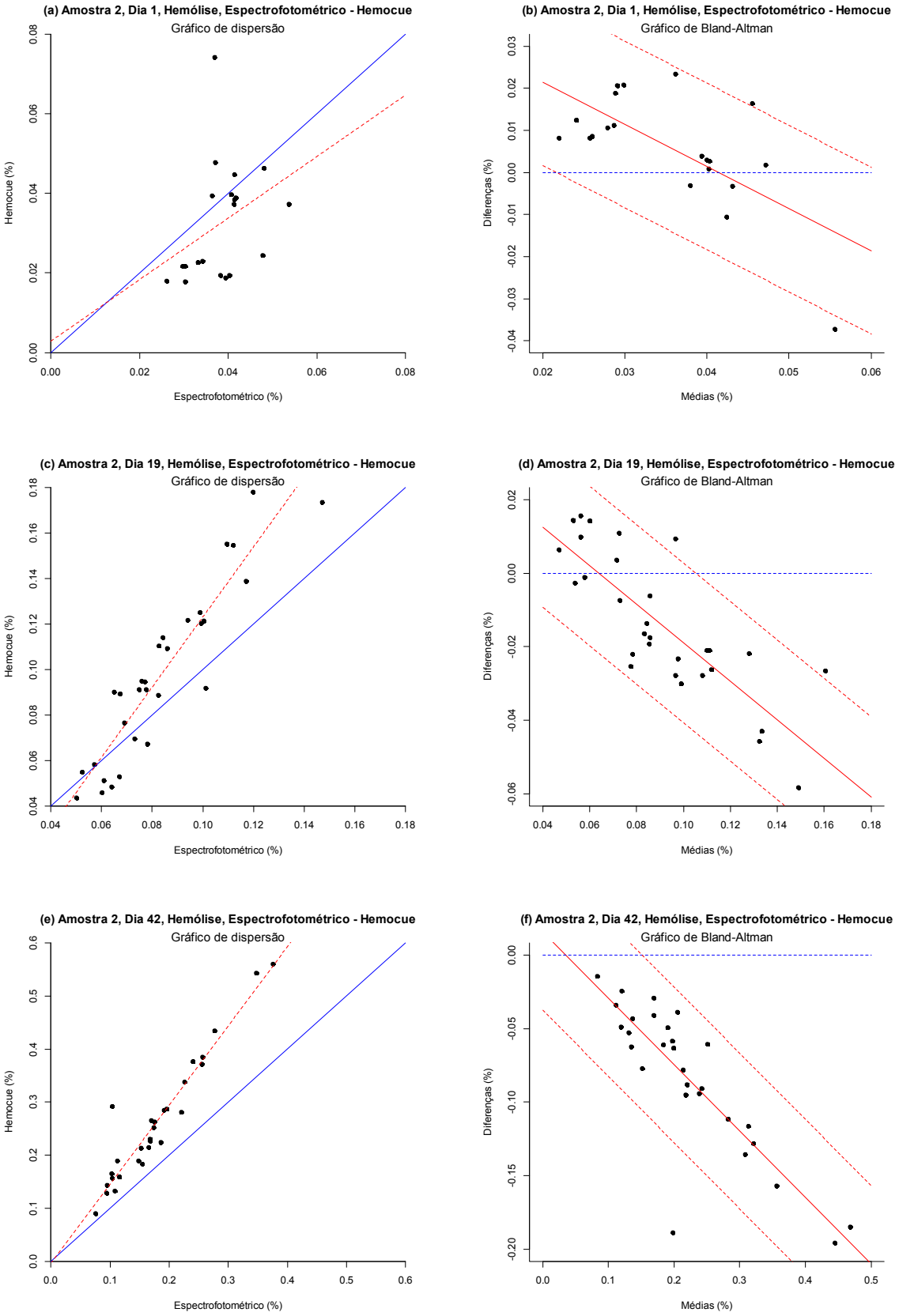


Figura 33. Gráficos de dispersão e de Bland-Altman para avaliação hemólise utilizando os métodos de Espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low(Hb total hemoglobinômetro e Ht microhematócrito), Amostra 2, dias 1, 19 e 42.

7. Discussão

Nas análises de hemoglobina total, foi observada satisfatória concordância entre o analisador hematológico Cell-Dyn Ruby e o hemoglobinômetro HemoControl EKF, embora as dosagens de hemoglobina obtidas pelo hemoglobinômetro tenham sido ligeiramente superiores as obtidas pelo Cell-Dyn. As médias das diferenças entre os métodos foram pequenas, principalmente nas dosagens realizadas no início e meio da validade. Ao final do armazenamento, as médias das diferenças entre os métodos foram um pouco mais elevadas (-0,55 g/dL nas bolsas CPDA1 e -0,88g/dL nas SAG manitol, conforme painéis (f) das Figuras 12 e 13). Os limites de concordância entre os métodos obtidos ao final da validade (CPDA1, -2,25g/dL e CPD/SAG, -2,07 g/dL, painéis (f) das Figuras 12 e 13, respectivamente), apesar de serem maiores que o esperado para dosagens de hemoglobina, foram aceitáveis para as análises em CH. De acordo com o critério de RICOS (1999), o erro total permitido para hemoglobina de sangue total é de 4,19%. Porém, cabe ressaltar que ambos os equipamentos foram projetados para análise de sangue total em que os valores de hemoglobina normalmente encontrados são bem inferiores aos obtidos em hemocomponentes. Além disso, devido à linearidade destes equipamentos, todas as amostras testadas foram diluídas para que fosse possível a leitura nos mesmos, aumentando a chance de erros durante os processos de pipetagem.

Ambos os métodos foram lineares até 23,2 g/dL o que é compatível com o estipulado pelo fabricante dos dois equipamentos. O hemoglobinômetro possui intervalo de trabalho de 0,0 a 25, 6 g/dL e o Cell-Dyn de 0,0 a 25,0 g/dL. Foi testada uma amostra com valor de hemoglobina esperado de 26, 6 g/dL, e em ambos os equipamentos não foi possível a leitura.

Foi verificada concordância entre o método de microhematócrito e Cell-Dyn nas análises do hematócrito em ambos os tipos de bolsas. A concordância entre os métodos foi melhor ao final da validade, quando foram obtidas médias de diferenças entre os métodos menores e amplitudes entre os limites de concordância mais estreitas do que os verificados no início da validade.

As discrepâncias entre os resultados de hematócrito obtidos pelo método padrão ouro (microhematócrito) e analisadores hematológicos já estão bem descritas na literatura

(FAIRBANKS, 1980). No presente estudo, os resultados de hematócrito obtidos pelo método de microhematócrito foram superiores aos determinados pelo Cell-Dyn nos dois tipos de bolsas. Resultados semelhantes também foram encontrados em um estudo conduzido por Acker et al. (2012), em que foi feita a comparação do hematócrito de CH CPD/SAG manitol pelo método de microhematócrito e pelo analisador hematológico Cell-Dyn 1700. A justificativa para resultados superiores de hematócrito no método de referência se deve ao fato de que em CH estocados há um aumento do plasma aprisionado, especialmente devido à esferocitose que ocorre com a idade da célula, o que acarreta valores mais altos de hematócrito obtidos no microhematócrito (ACKER; CROTEAU;YI, 2012).

Nas amostras CPD SAG manitol testadas no Cell-Dyn e no microhematócrito foi observado um aumento dos valores médios de hematócrito ao longo do armazenamento. Nas bolsas CPDA1 também foi verificado que os valores médios de hematócrito dosados pelo Cell-Dyn aumentaram ao final da estocagem. Porém, os resultados obtidos no microhematócrito diminuíram. O aumento do hematócrito no analisador hematológico ao longo do armazenamento ocorre devido ao inchaço osmótico da membrana da hemácia, alterando os valores de VCM utilizados nos cálculos. Essa alteração da hemácia ocorre em ambos os tipos de CH estudados, porém nas bolsas CPD/SAG manitol a solução aditiva atua no sentido de reduzir o inchaço da célula (HESS e GREENWAL, 2002; HAN, SERRANO, DEVINE, 2010).

Essas diferenças do comportamento do hematócrito das bolsas CPDA1 ao longo da estocagem podem explicar a melhor concordância dos métodos ao final da validade, já que os valores de hematócrito aumentaram e um método e diminuíram em outro gerando uma menor diferença entre os resultados.

É importante ressaltar que os equipamentos utilizados foram desenvolvidos para análise de sangue fresco. Em adição, sabe-se que mudanças ocorrem nas células durante o período de estocagem dos hemocomponentes. Com o armazenamento das hemácias, as células perdem o seu formato bicôncavo devido à perda de ATP e microvesiculação da membrana, e essas alterações podem afetar o hematócrito obtido por centrifugação como por automação. Para o hematócrito determinado por centrifugação, a alteração na forma das hemácias pode afetar o empilhamento das células no tubo capilar, e no método automatizado

essa mudança de formato celular altera a determinação do VCM, o que indiretamente afeta o cálculo do hematócrito (ACKER; CROTEAU;YI, 2012).

Dentre as amostras testadas para o estudo de linearidade, observou-se que o Cell-Dyn Ruby possui boa linearidade até 60,2% (amostra 3). Acima desse valor, foram testadas outras amostras até o limite de 75,9%. De acordo com o fabricante, o limite de trabalho desse equipamento varia de 8,3% a 79,8% de hematócrito. Porém, foram testadas duas amostras com valores de hematócrito dentro do "*range*" proposto (amostra 1, com 75,9%, e amostra 2, com 68,9%) em que não foi possível a leitura pelo equipamento. Os resultados não inviabilizam o uso do método, uma vez que as amostras de CH podem ser processadas diluídas. O microhematócrito apresentou boa linearidade até mesmo para amostras com valores de hematócrito mais elevado. Devido a essa característica, as amostras de CH podem ser utilizadas concentradas para este método.

Dentre os métodos utilizados nas análises de hemoglobina livre, o Drabkin apresentou resultados superiores quando comparado com o método espectrofotométrico e com o HemoCue Plasma Low. O método espectrofotométrico foi o que apresentou resultados mais baixos nas comparações com os outros dois métodos testados. Essas diferenças de resultados foram vistas em ambos os tipos de bolsas e em todos os períodos do armazenamento. A superestimação dos resultados pelo método de Drabkin pode ocorrer, pois este método mede todas as formas de hemoglobina, exceto a sulfahemoglobina (ACKER; CROTEAU;YI, 2012).

Foi observada uma melhor concordância entre o método de Drabkin e o Espectrofotométrico nas análises de Hb livre de bolsas CPD/SAG manitol. O mesmo não foi verificado com bolsas CPDA1, principalmente ao final da validade. Nos testes realizados nessas amostras, no último dia do armazenamento, a média da diferença entre os métodos foram muito elevadas, assim como os limites de concordância apresentaram uma amplitude relativamente grande. Nas bolsas CPDA1, quanto maior o valor de hemoglobina livre, menor foi a concordância entre os métodos. Resultados semelhantes também foram obtidos nas comparações dos métodos espectrofotométrico e HemoCue Plasma Low, ou seja, quando a Hb livre foi dosada em bolsas CPD/SAG manitol, os métodos apresentaram melhor concordância do que quando utilizados nas análises de bolsas CPDA1. Porém, na comparação desses dois métodos, as médias das diferenças foram inferiores às obtidas na comparação entre os métodos Espectrofotometrico e Drabkin.

A melhor concordância da Hb livre entre o método de Drabkin e Espectrofotométrico nas bolsas CPD/SAG manitol pode ocorrer devido aos fatores interferentes contidos no plasma. As análises das concentrações de hemoglobina livre no plasma sofrem interferência de outras substâncias, principalmente bilirrubina e lipídeos (FAIRBANKS, ZIEMER, O'BRIEN,1992). As bolsas CPDA1 possuem uma quantidade de plasma bem mais expressiva que as bolsas SAG manitol. De acordo com Moore et al. (1981) a absorbância no método de Drabkin é substancialmente aumentada na presença de constituintes plasmáticos. Além disso, a presença de lipídeos comumente contidos no plasma superestima o valor de hemoglobina livre no método de Drabkin (HAN, SERRANO, DEVINE, 2010). Como nas bolsas SAG manitol quase não há plasma, a superestimação no método de Drabkin é reduzida, diminuindo as médias das diferenças entre os métodos.

A metahemoglobina aumenta ao longo do armazenamento e pode ser capturada pelo método de Drabkin (ACKER; CROTEAU;YI, 2012) e pelo HemoCue plasma Low, não sendo determinada pelo método Espectrofotométrico. Isso explicaria a menor concordância ao final da validade entre os métodos de Drabkin e Espectrofotométrico e entre HemoCue Plasma Low e Espectrofotométrico nas bolsas CPDA1. A presença da metahemoglobina, sulfahemoglobina, metalbumina e outros pigmentos podem limitar os resultados obtidos por técnicas que são especificas para oxihemoglobina (FAIRBANKS, ZIEMER, O'BRIEN,1992). Como as técnicas de Drabkin e HemoCue Plasma Low dosam várias formas de hemoglobina, incluindo a metahemoglobina, foi possível notar uma boa concordância entre os métodos em ambos os tipos de bolsas e em todos os períodos do armazenamento.

Cabe ressaltar que durante a revisão bibliográfica não foram encontrados artigos com pesquisas realizadas em bolsas de CH com solução anticoagulante CPDA1. Dessa forma, a ausência de estudos de comparação de métodos para determinação da hemoglobina livre e hemólise em hemocomponentes com solução anticoagulante CPDA1 dificultam o esclarecimento da baixa concordância e da grande diferença de resultados entre o método de Espectrofotmétrico e o Drabkin nesses hemocomponentes ao final da validade. Por outro lado, os artigos encontrados relacionados ao tema deste trabalho são de países europeus, Estados Unidos e Canadá, em que são utilizadas bolsas com solução anticoagulante e solução aditiva (por exemplo CPD/SAG manitol). No presente trabalho foi possível notar uma boa concordância entre os métodos de Drabkin, HemoCue Plasma Low e o espectrofotométrico

em bolsas com solução aditiva (CPD/SAG manitol). A diferença entre os resultados de hemoglobina livre entre as técnicas analisadas foi muito baixa. O mesmo foi também descrito por outros autores, quando avaliada a concordância entre o método de Drabkin e métodos que utilizam espectrofotometria óptica direta. (HAN, SERRANO, DEVINE, 2010; ACKER; CROTEAU;YI, 2012; MALINAUSKAS, 1997)).

Todos os métodos utilizados nas análises de Hb total, hematócrito e Hb livre apresentaram boa precisão nas análises intra e inter-ensaio. O coeficiente de variação (CV)intra e inter-ensaio nas análises de Hb total e hematócrito obtidos foram inferiores aos estabelecidos para amostras de sangue fresco pelo critério de RICOS (1999). O CV intra e inter-ensaio para Hb total segundo esse autor, é de 2,85% e 6,8%, respectivamente. Para o hematócrito o CV intra e inter-ensaio estabelecido é de 2,7 e 6,41%, respectivamente. No presente estudo, o CV intra- ensaio para Hb total e hematócrito no CellDyn foi de 1,2% e 0,9%, respectivamente, sendo que no hemoglobinômetro e no método de microhematócrito os resultados obtidos foram ainda inferiores. Outros estudos com CH apresentaram CV intra e inter-ensaio semelhantes aos obtidos no presente trabalho (ACKER, CROTEAU, YI, 2012; HAN, SERRANO, DEVINE, 2010).

Nas análises de Hb livre o CV intra-ensaio obtido no método de Drabkin foi de 2,0% em uma das amostras testadas, sendo semelhante ao obtido por outros autores (2,0% por ACKER et al., 2012, e 2,46% por HAN, SERRANO, DEVINE, 2010). Nas análises inter-ensaio o CV encontrado foi de 4,3% semelhante aos 5,0% obtidos por ACKER et al. (2012).

O HemoCue Plasma Low apresentou CV intra e inter-ensaio de 6,8 e 5,1%, respectivamente. Resultados próximos aos encontrados por Cardigan, Smith (2002), que encontraram 5,5% no inta-ensaio e 5,6% no inter-ensaio.

A determinação da hemólise requer a dosagem da hemoglobina total, hematócrito e hemoglobina livre. Os métodos de hemoglobina total e hematócrito analisados foram concordantes entre si, de modo que tanto a escolha de um quanto o outro não acarretaram diferenças nos resultados de hemólise. Assim como observado nos métodos utilizados para hemoglobina livre, a hemólise obtida pelo método de Drabkin apresenta resultados superiores aos determinados pelos demais métodos, o mesmo foi descrito em outros estudos (ACKER, CROTEAU, YI, 2012; HAN, SERRANO, DEVINE, 2010). Quando se compara os métodos de Drabkin e o Espectrofotométrico observa-se que quanto maior o valor de hemólise, menor

é a concordância entre os métodos, sendo que nas bolsas CPD/SAG manitol a concordância entre os métodos é melhor do que nas bolsas CPDA1. Nessas bolsas, ao final da validade, os limites de concordância são muito amplos, incluindo valores que seriam inaceitáveis para o grau de hemólise. Contudo, apesar do método espectrofotométrico subestimar os resultados de hemólise de bolsas que apresentam altas concentrações de hemoglobina livre, ele apresentou boa concordância com o Drabkin e com o HemoCue Plasma Low nas bolsas CPD/ SAG manitol em todos os períodos do armazenamento e nas bolsas CPDA1 analisadas no início da validade. O HemoCue Plasma Low e o Drabkin foram concordantes entre si nas análises de hemólise de bolsas CPD/SAG manitol e nas bolsas CPDA1. Porém, ao final da validade, no grupo composto por bolsas CPDA1 os limites de concordância tiveram uma amplitude um pouco mais elevada. Esses achados são coerentes com demais encontrados na literatura. Em comparações entre laboratórios uma grande variação no grau de hemólise foi observada devido as diferentes técnicas utilizadas para análise de hemoglobina livre.O coeficiente de variação para o grau de hemólise entre os laboratórios foi de 31% (HESS et al., 2005).

Como previsto na Portaria MS 158/2016, os testes de controle de qualidade que avaliam o grau de hemólise devem ser realizados ao final da validade. Diante disso, tanto os métodos de Drabkin, quanto o HemoCue Plasma Low podem ser utilizados de forma segura nas análises de controle de qualidade, tanto em bolsas CH CPDA1, como CH CPD/SAG manitol.

O método de Drabkin possui como vantagens: boa lineraridade e reprodutibilidade; baixo custo na realização dos testes; disponibilidade de um padrão internacional de HiCN; facilidade e rapidez no processamento das amostras, já que a leitura o espectrofotômetro é feita em um único comprimento de onda, possibilidade de utilização de um espectrofotômetro mais barato. As desvantagens seriam o uso de substância química perigosa e a interferência dos resultados na presença de alguns constituintes do plasma. Embora, não seja o ideal, alguns laboratórios tentam compensar as interferências no espectro utilizando como branco um composto preparado por plasma humano (MALINAUSKAS, 1997). Considerando as vantagens descritas para técnica de Drabkin, ela pode ser boa opção para utilização em testes de hemólise em serviços hemoterápicos públicos, em que os recursos financeiros são mais restritos.

Embora o HemoCue Plasma Low apresente um custo mais elevado a curto prazo, esse método também seria confiável, reprodutível e possibilitaria uma maior agilidade na liberação dos resultados pelo laboratório.O método apresenta boa reprodutibilidade, facilidade e rapidez na realização dos testes, uma vez, que os resultados são obtidos em até 60 segundos; o equipamento utilizado para leitura é portátil e de fácil manuseio; o plasma sobrenadante pode ser processado sem necessidade de diluição; há disponível comercialmente amostras controles em três diferentes concentrações. A desvantagem se dá pela linearidade do método. O mesmo deve ser usado com cautela nas amostras com concentrações de Hb livre inferiores a 0,02 g/dL, mais comuns em amostras CPD/SAG manitol em início de armazenamento. Por exemplo, em CH que serão desleucocitados, os testes de controle de qualidade são realizados imediatamente após esse procedimento, que segundo a Portaria MS 158/2016, deve ocorrer em até 48 horas após a coleta. Já amostras com concentrações acima de 2,7 g/dL precisam ser diluídas. Entretanto, considerando que a grande parte das análises de controle de qualidade é realizada ao final da validade do hemocomponente, em que os valores de hemoglobina livre são mais elevados, esse método pode ser utilizado fornecendo resultados seguros.

O método espectrofotométrico apresenta como vantagens: boa linearidade e reprodutibilidade, o baixo custo na realização dos testes, redução do risco químico, já que utiliza água deionizada como reagente. Porém, a desvantagem se dá pela baixa concordância com demais métodos nas análises de CH CPDA1 com valores de hemoglobina livre mais elevados, mais comuns ao final da validade.

A falta de padronização de métodos seguros e confiáveis para determinação da hemoglobina livre pode exercer grande influência nas avaliações de novos processos produção de hemocomponentes, aquisição de equipamentos de extração de plasma, bem como outros insumos críticos como bolsas de coletas de sangue e filtros de remoção de leucócitos, em que a hemólise é um importante indicador de qualidade utilizado nos processos de qualificação e compra. Dessa forma, tornam-se primordiais novos estudos, incluindo análises em hemocomponentes CPDA1, que auxiliem a padronização de métodos para determinação do grau de hemólise pelos órgãos nacionais e internacionais responsáveis por normatizar os procedimentos técnicos hemoterápicos.

8. Conclusão

Todos os métodos de hemólise utilizados foram reprodutíveis e confiáveis para bolsas CPD/SAG manitol ao longo do armazenamento. Porém, nas análises dessas bolsas logo após a coleta, em que as concentrações de hemoglobina livre são baixas, resultados obtidos pelo método HemoCue Plasma Low, abaixo de 0,02 g/dL devem ser avaliados com cuidado.Esse método não é o ideal para análise desse tipo de bolsa, logo após a coleta.

O estudo permitiu concluir que a escolha do método de determinação de hemoglobina livre exerce papel fundamental nos resultados de hemólise, podendo gerar um percentual maior de não conformidade nas análises de controle de qualidade e um aumento no número de descarte de bolsas por esse motivo. Ao final da validade, nas bolsas CPDA1 o método espectrofotométrico subestimou resultados de hemólise, principalmente nos hemocomponentes com altas concentrações de hemoglobina livre, sendo que essa técnica apresentou uma pior concordância com as demais técnicas avaliadas. Os métodos de Drabkin e HemoCue Plasma Low apresentaram uma melhor concordância nas análises de hemólise durante esse período do armazenamento.

9. Recomendações

A partir dos resultados obtidos nesse estudo foi possível propor dois fluxogramas (Figuras 34 e 35) que poderão auxiliar na escolha do método de hemoglobina livre para determinação do percentual de hemólise a ser utilizado nas análises de controle de qualidade, considerando o tipo de concentrado de hemácia produzido, disponibilidade de recursos financeiros e porte do serviço hemoterápico.

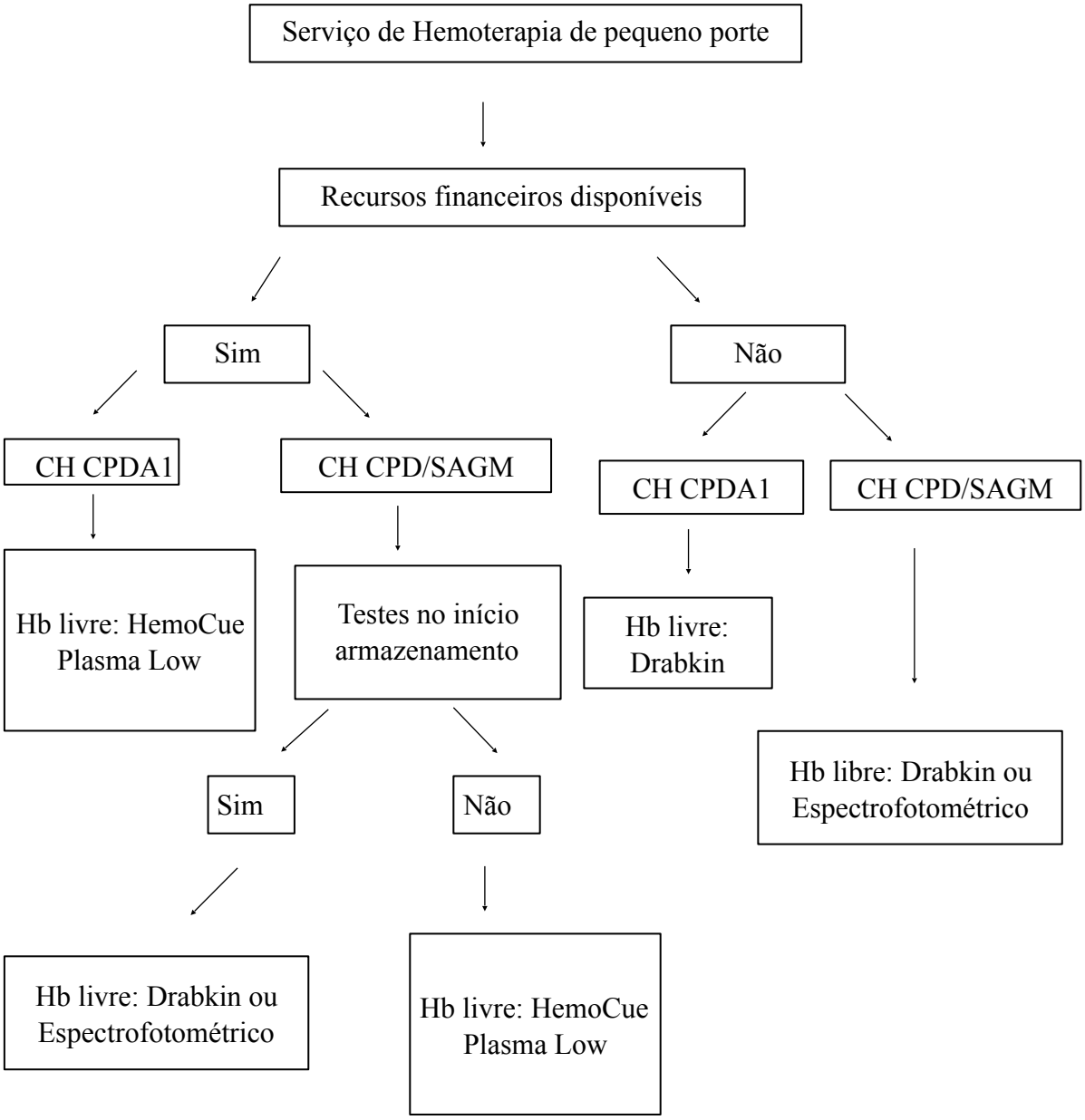


Figura 34. Fluxograma para escolha do método de hemoglobina livre (Hb livre) para determinação do percentual de hemólise em serviço de hemoterapia de pequeno porte.

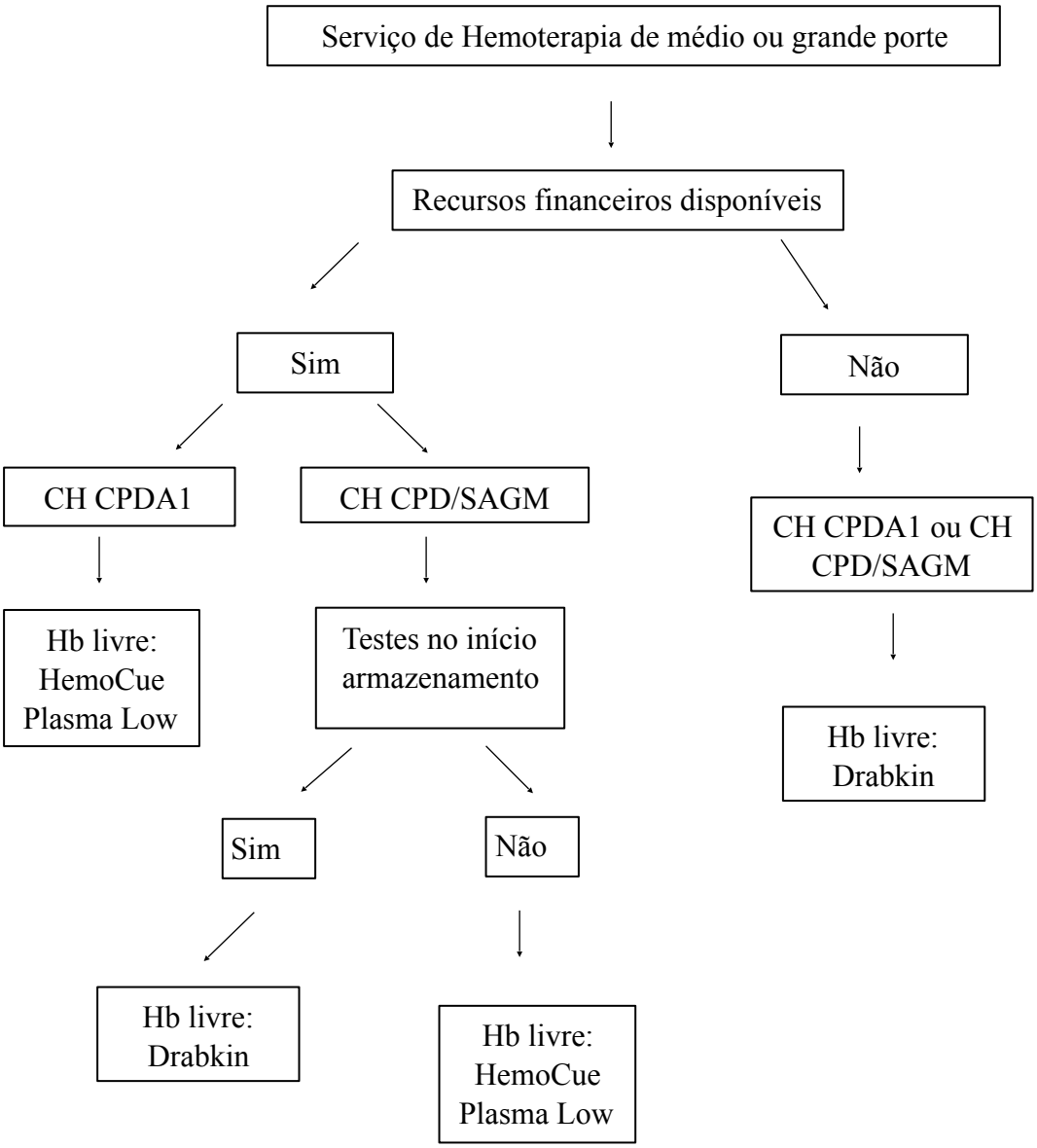


Figura 35. Fluxograma para escolha do método de hemoglobina livre (Hb livre) para determinação do percentual de hemólise em serviço de hemoterapia de médio ou grande porte.

10.Referências

ACKER, J. P.; CROTEAU, I.M.; YI, Q.An analysis of the bias in red cell hemolysis measurement using several analytical approaches.**Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 21-22, p. 1746-1752, 2012.

ADAMS, F.;BELLAIRS, G.; BIRD, A. R.; OGUNTIBEJU, O. Biochemical storage lesions occurring in non irradiated and irradiated red blood cells: a brief review.**BioMed Research International**,v. 2015, p.1-8, 2015.

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS (AABB).**Technical Manual.**17thedition. Bethesda: AABB, 2011. p. 210-222.

BLAND,J. M.; ALTMAN, D. G. Measuring agreement in method comparison studies.**Lancet**, v. 327, p. 307-310,1986.

_____. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement.**StatisticalMethods in Medical Research**, v. 8, p. 135-160, 1999.

BRASIL.Ministério da Saúde. Portaria 158 de 4 de fevereiro de 2016. Redefine o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 fev 2016. Disponível em <http://portal,datalegis,inf,br>.Acesso em: 09 de ago. 2016.

CARDIGAN,R.; SMITH,K. Evaluation of HemoCue plasma haemoglobinanalyser for assessing haemolysis in red Cell concentrates during storage.**VoxSanguinis**, v. 82, p. 76-79, 2002.

CRAWLEY, M. J. **The R Book**.2nd Edition.Hoboken: Wiley, 2012. 1076p.

COUNCIL OF EUROPE.**Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components.**18thedition.Strasbourg: EDQM, 2015. 530p.

DAVIS,B.; JUNGERIUS,B.International Council for Standardization in Haematology technical report 1-2009: new reference material for haemiglobincyanide for use in standardization of blood haemoglobin measurements. **International Journal of Laboratory Hematology**,v. 32, p. 139-141, 2010.

FAIRBANKS,V. Nonequivalence of automated and manual hematocrit and erythrocytic indices. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 73, n. 1, p. 55-62,1980.

FAIRBANKS,V.; ZIESMER, S.; O'BRIEN, P.Methods for measures plasma haemoglobin in micromolar concentration compared.**Clinical Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 132-140, 1992.

HAN, V.; SERRANO, K.; DEVINE, D. V. A comparative study of common techniques used to measure hemolysis in stored red cell concentrates. **Vox Sanguinis**, v. 98, n. 2, p. 116-123, 2010.

HESS, J. R.An update on solutions for red cell storage.**Vox Sanguinis**, v. 91, n. 1, p. 13-19, 2006.

_____.Measures of stored red blood cell quality.**Vox Sanguinis**, v. 107, n. 1, p. 1-9, 2014.

HESS, J. R.et al.Interlaboratory comparison of red-cell ATP, 2,3diphosphoglycerate and haemolysis measurements.**Vox Sanguinis**, v. 89, n. 1, p. 44-48, 2005.

HESS, J. R. et al.Red blood cell hemolysis during blood bank storage: using national quality management data to answer basic scientific questions.**Transfusion**, v. 49, n. 12, p. 2599-2601, 2009.

HESS, J.; GREENWAL, T. T.Storage of red blood cells: new approaches.**Transfusion Medicine Reviews**, v. 16, n. 4, 283-295, 2002.

JANATPOUR, K. et al. Visual Assessment of hemolysis in red blood cell units and segments can be deceptive.**Transfusion**, v. 44, n. 7, p. 984-989, 2004.

LEWIS, M.; BAIN, B. J.; BATES, I.**Hematologia Prática de Dacie e Lewis**, 9ªEdição.Porto Alegre:Artmed, 2006. p. 34-47.

LITTELL, R. C. et al. **SAS for mixed models**.2nd Edition.Cary: SAS institute, 2006. 840p.

MALINAUSKAS, R.Plasma hemoglobin measurement techniques for the in vitro evaluation of blood damage caused by medical devices.**Artificial Organs**, v. 21, n. 1, p. 1255-1267, 1997.

MOORE, G.; LEDFORD, E.; MERYDITH, A.A micromodification of the Drabkin hemoglobin assay for measuring plasma hemoglobin in the range of 5 to 2000 mg/ dL.**Biochemical Medicine**, v. 26, n. 2, p. 167-173, 1981.

REDE DE SERVIÇOS TECNOLÓGICOS PARA SANGUE E HEMODERIVADOS,**Manual para Controle de Qualidade para sangue e Hemoderivados.** São Paulo:Redsang-SIBRATEC, 2011.

RICOS C, et al. Current databases on biologic variation: pros, cons and progress.**Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation,**v. 59, n. 7, p. 491-500, 1999.

SOWEMIMO-COKER, S. O.Red blood cell hemolysis during processing.**Transfusion Medicine Reviews**, v. 16, n. 1, p. 46-60, 2002.

ZWART, A, et al.Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemiglobinocyanide standard (4th edition).**Journal of Clinical Pathology**,v. 49, n. 4, p. 271-274.

APÊNDICE

Gráficos de Reprodutibilidade e Repetitividade

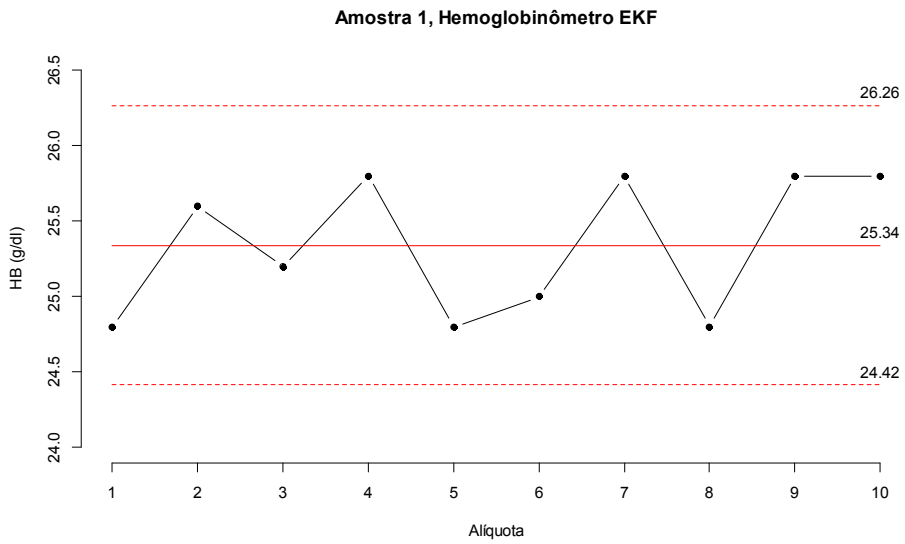


Figura36. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina total (amostra 1) no Hemoglobinômetro HemoControl EKF.

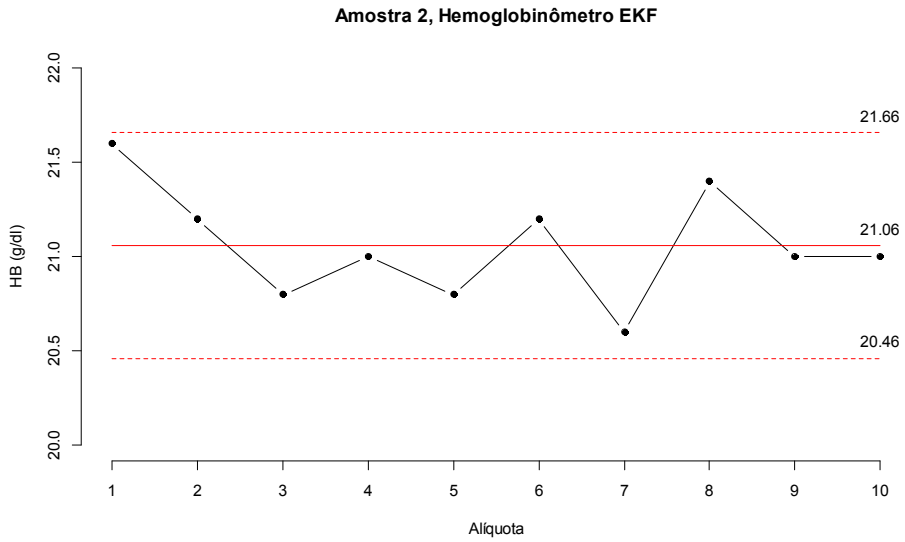


Figura37. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina total (amostra 2) no Hemoglobinômetro HemoControl EKF.

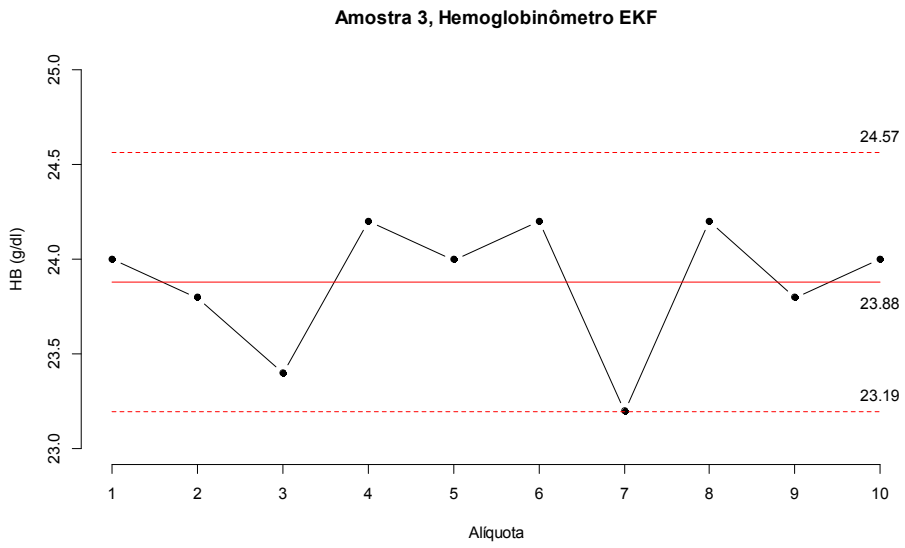


Figura38. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina total (amostra 3) no Hemoglobinômetro HemoControl EKF.

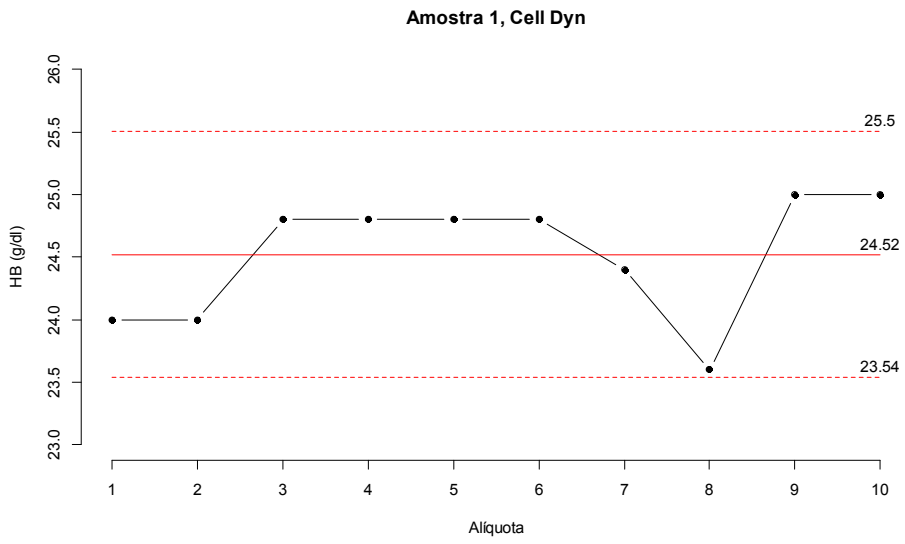


Figura39. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina total (amostra 1) no analisador hematológico Cell Dyn Ruby.

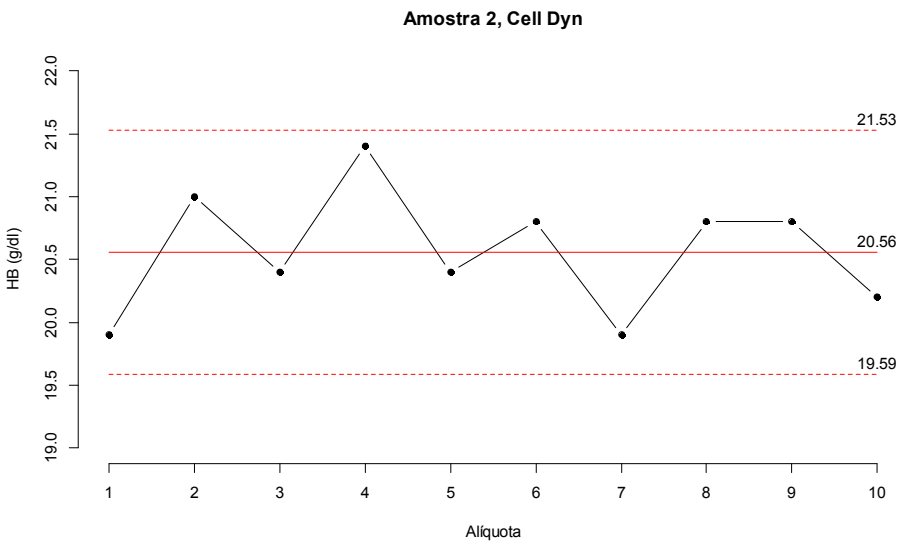


Figura40. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina total (amostra 2) no analisador hematológico Cell Dyn Ruby.

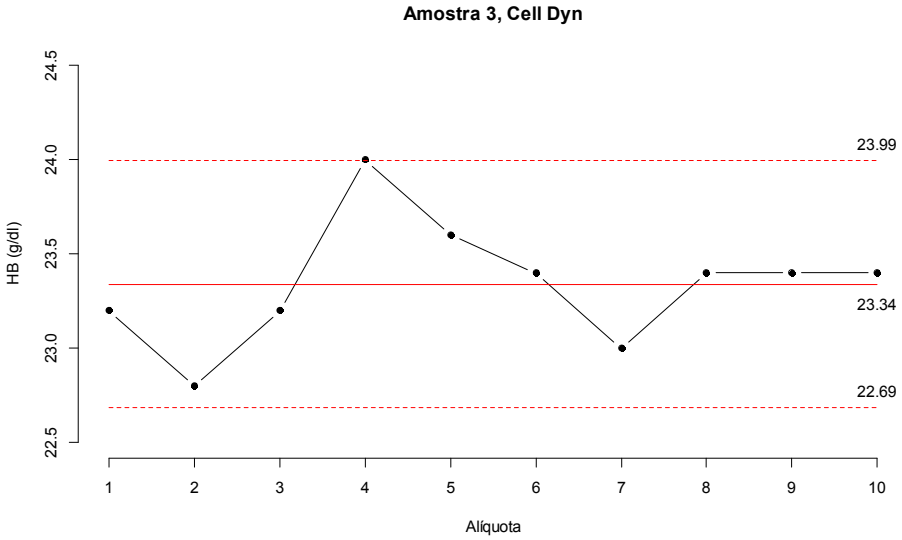


Figura41. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina total (amostra 3) no analisador hematológico Cell Dyn Ruby.

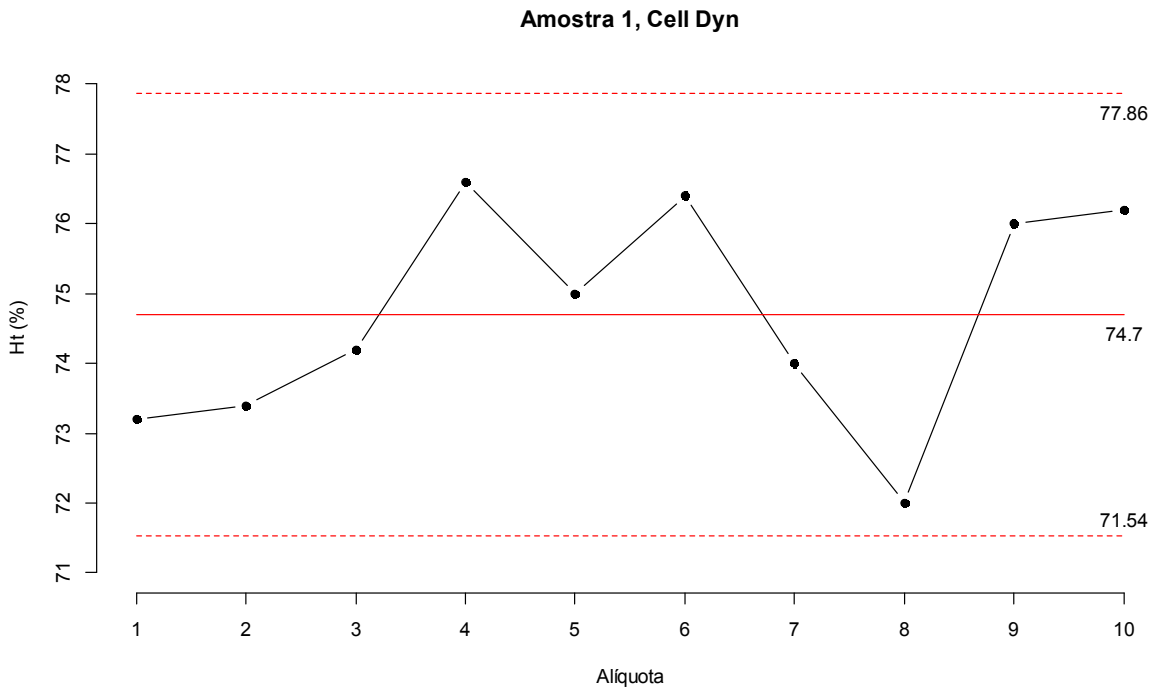


Figura42. Gráfico reprodutibilidade da hematócrito (amostra 1) no analisador hematológico Cell Dyn Ruby.

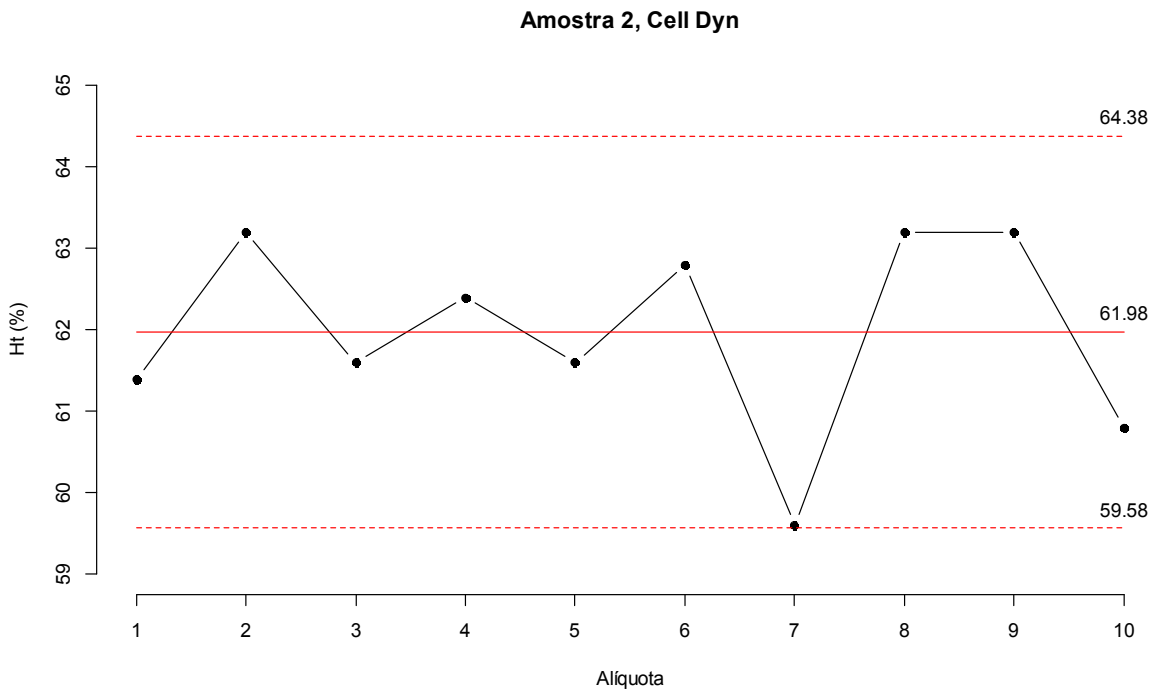


Figura43. Gráfico reprodutibilidade da hematócrito (amostra 2) no analisador hematológico Cell Dyn Ruby.

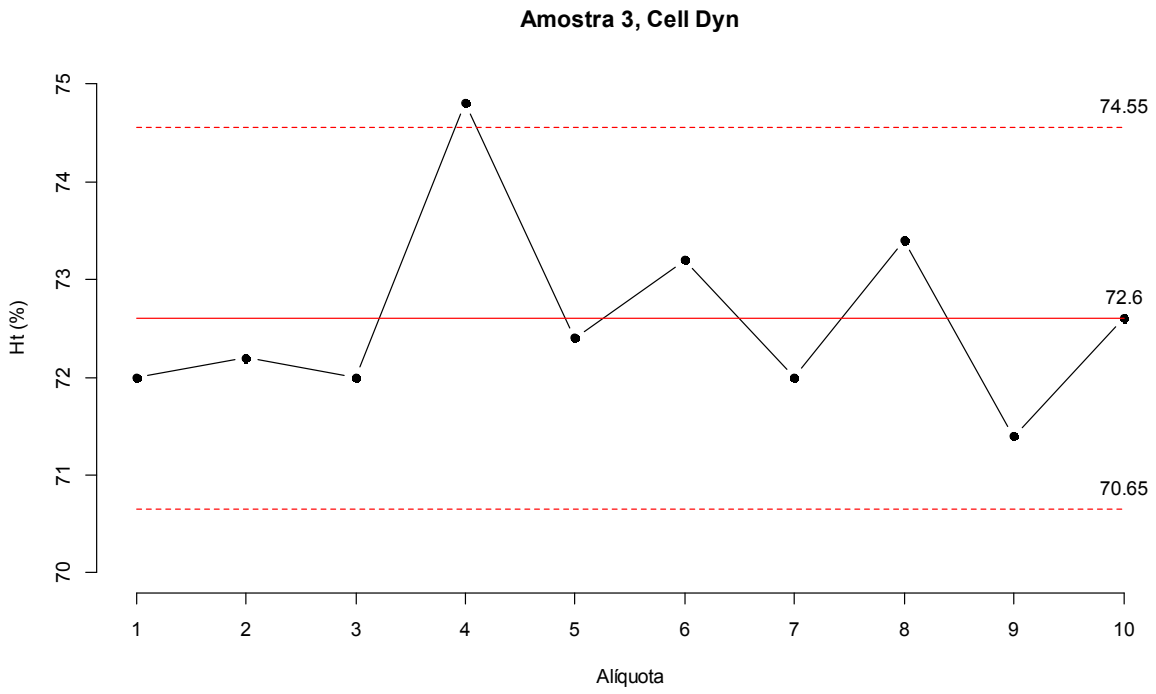


Figura44. Gráfico reprodutibilidade da hematócrito (amostra 3) no analisador hematológico Cell Dyn Ruby.

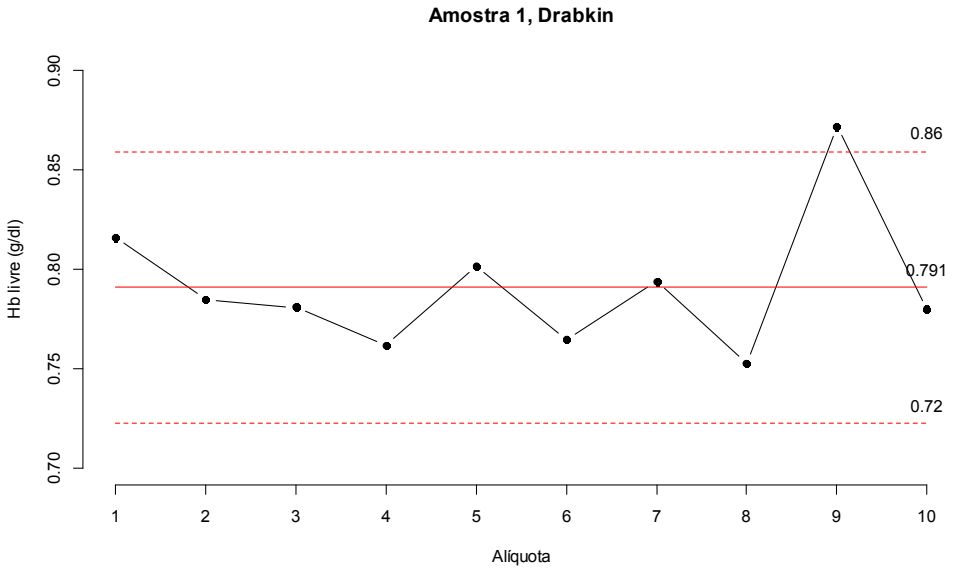


Figura45. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina livre (amostra 1) no método de Drabkin.

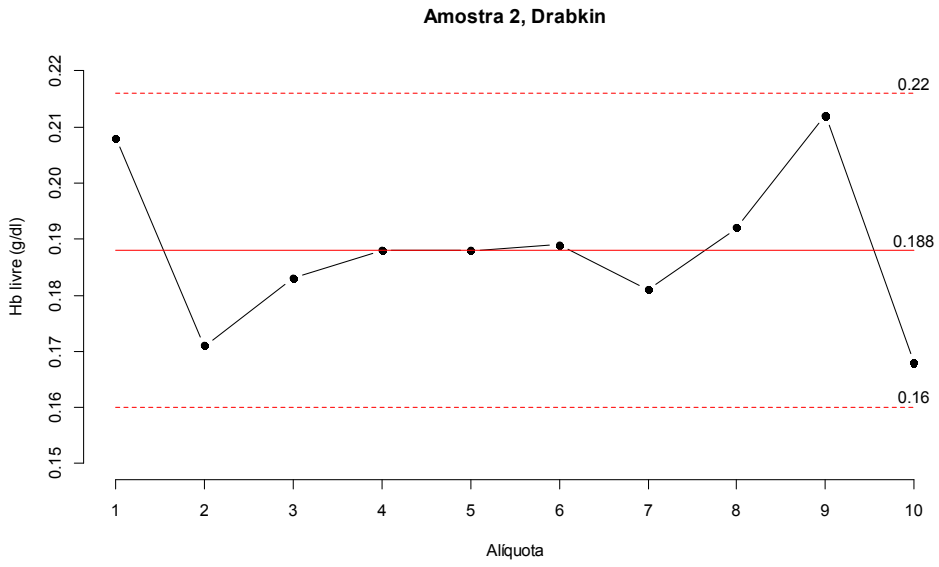


Figura46. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina livre (amostra 2) no método de Drabkin.

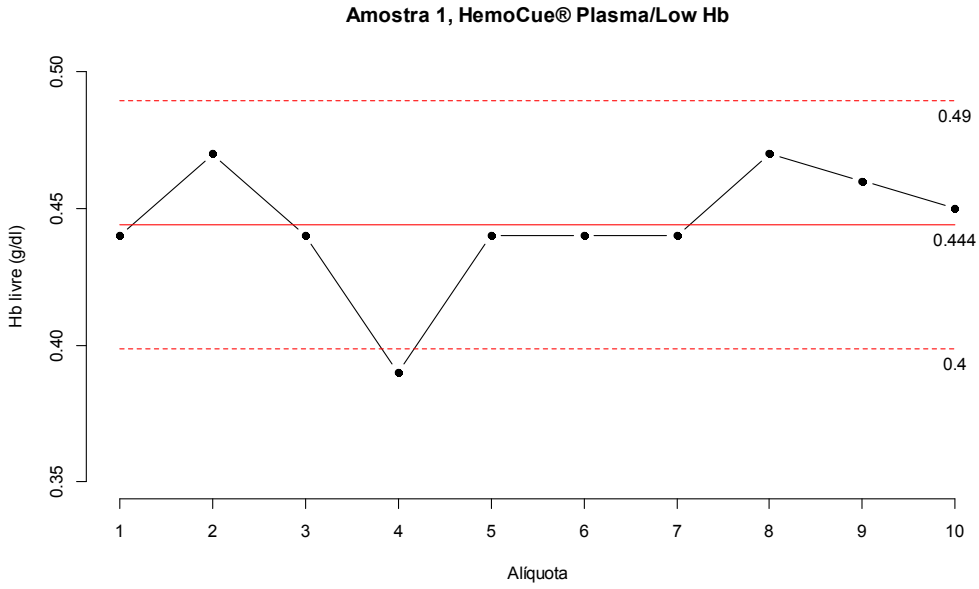


Figura47. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina livre (amostra 1) no método HemoCue Plama Low.

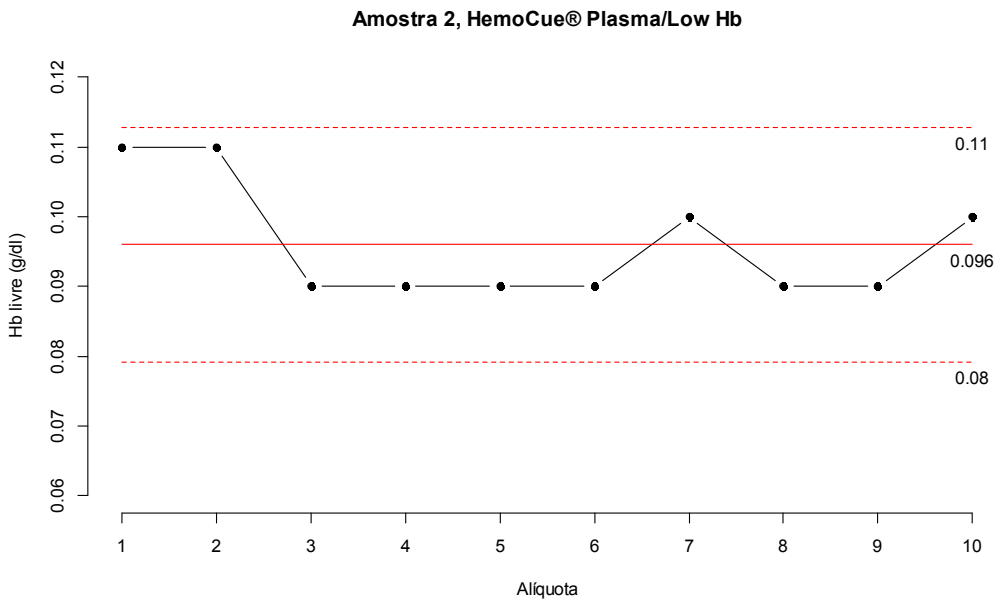


Figura48. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina livre (amostra 2) no método HemoCue Plama Low.

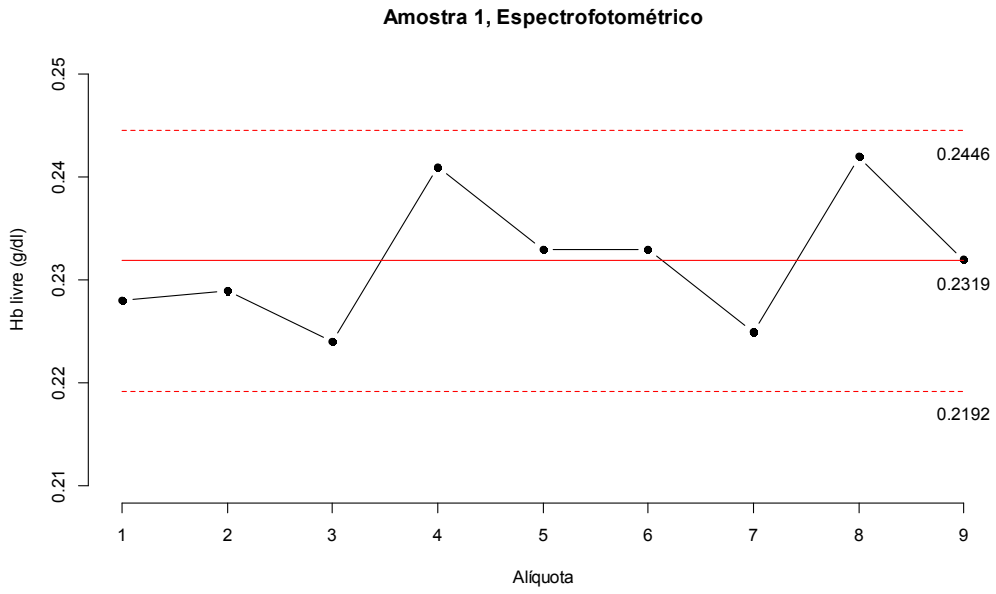


Figura49. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina livre (amostra 1) no método Espectrofotométrico.

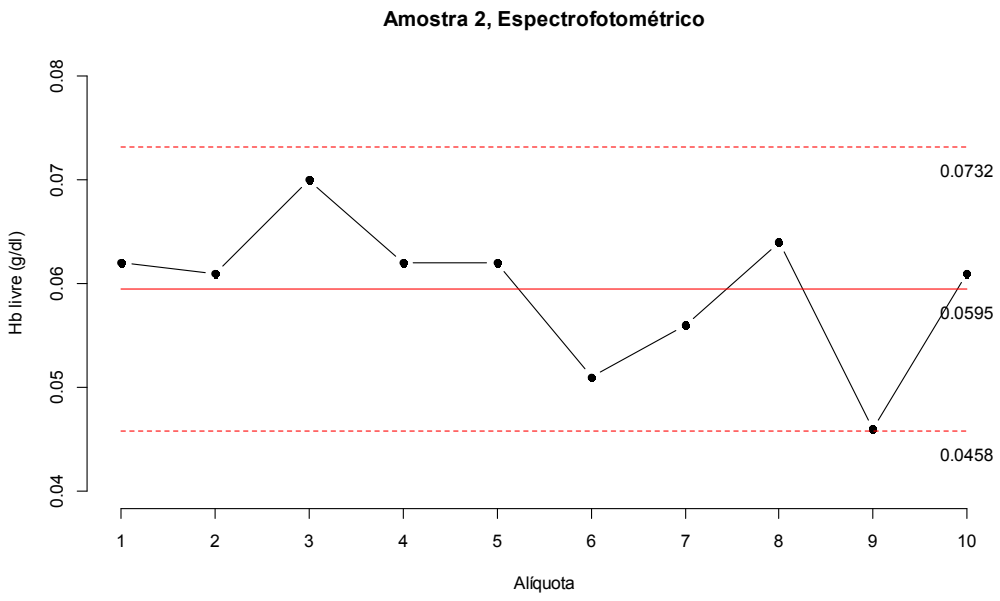


Figura50. Gráfico reprodutibilidade da hemoglobina livre (amostra 2) no método Espectrofotométrico.

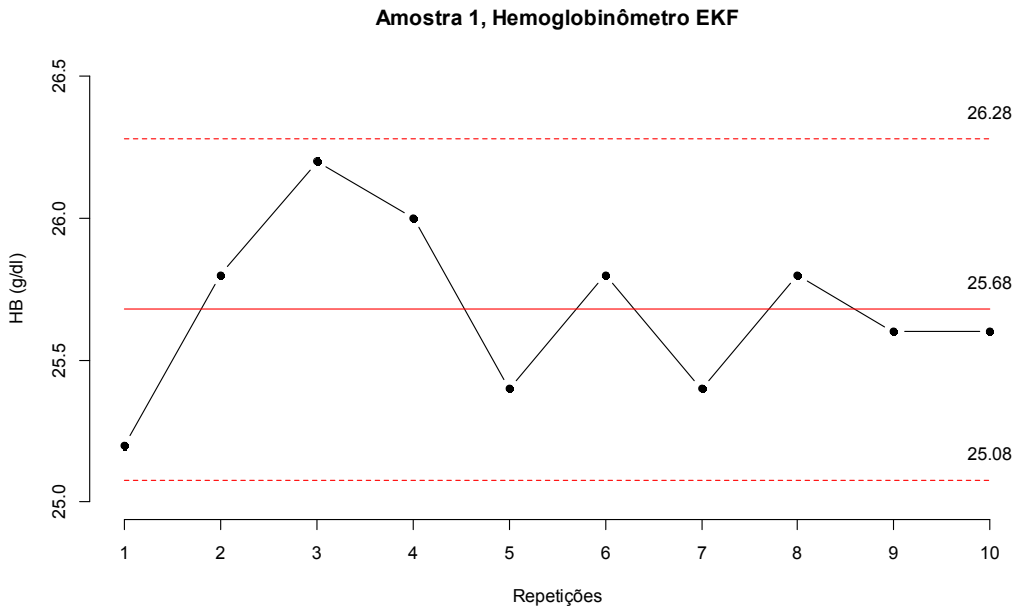


Figura51. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 1) no Hemoglobinômetro HemoControl EKF.

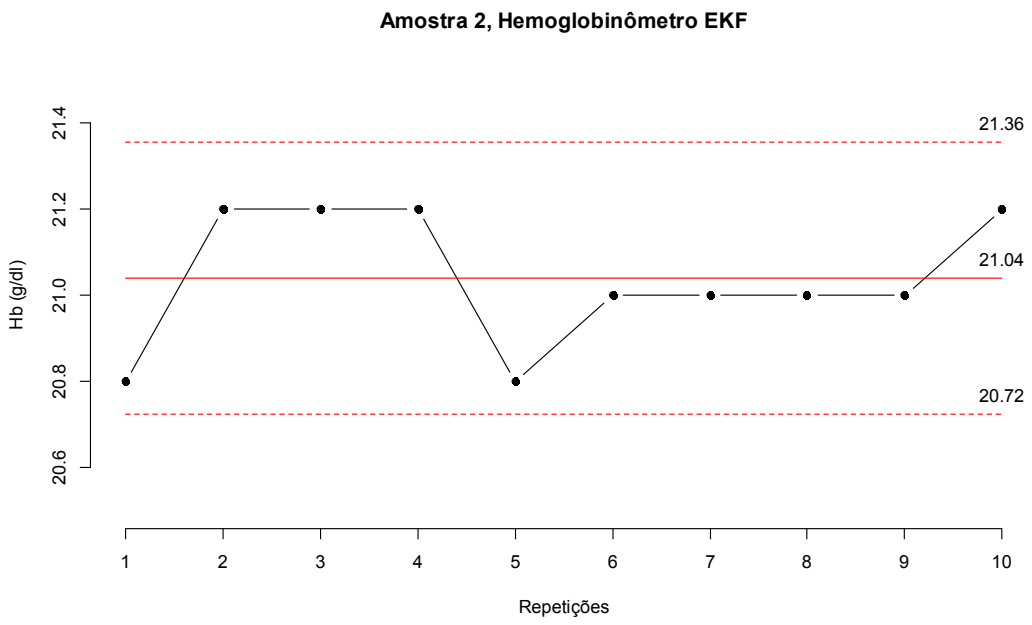


Figura52. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 2) no Hemoglobinômetro HemoControl EKF.

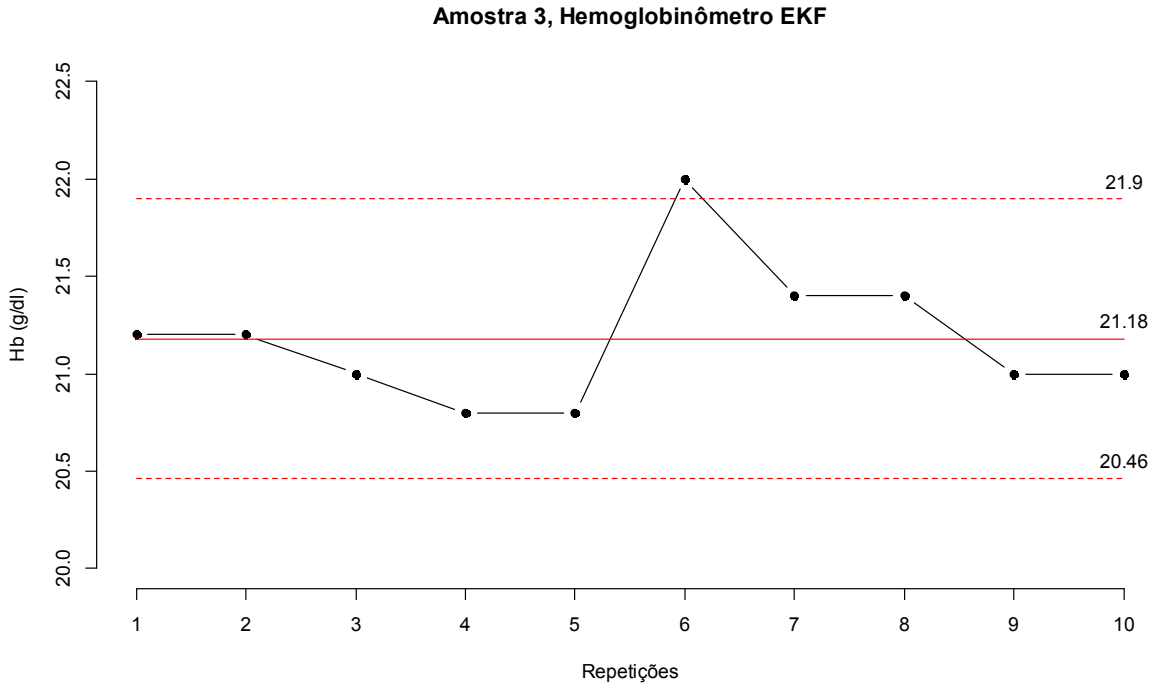


Figura53. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 3) no Hemoglobinômetro HemoControl EKF.

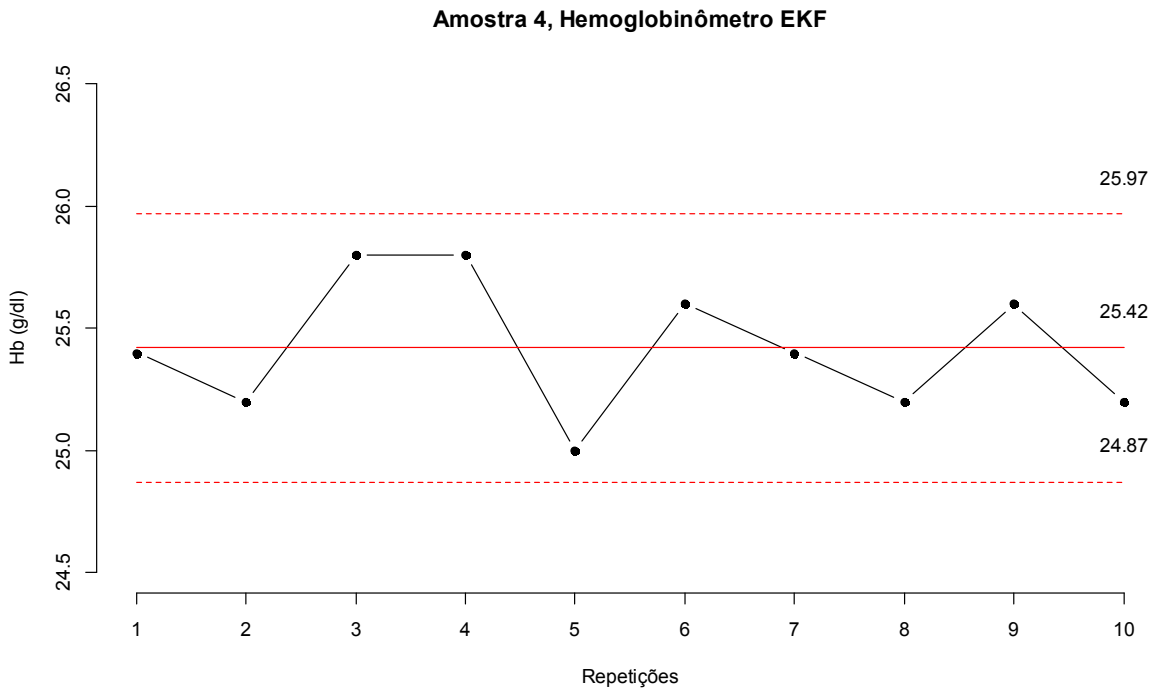


Figura54. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 4) no Hemoglobinômetro HemoControl EKF.

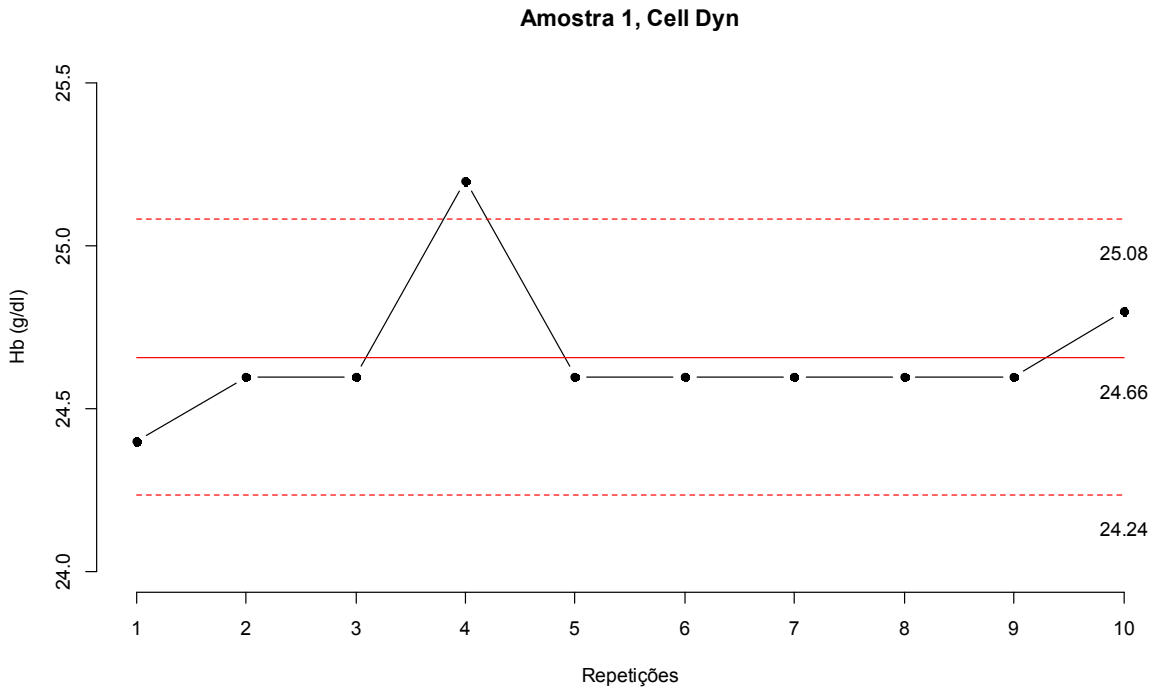


Figura55. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 1) no CellDyn.

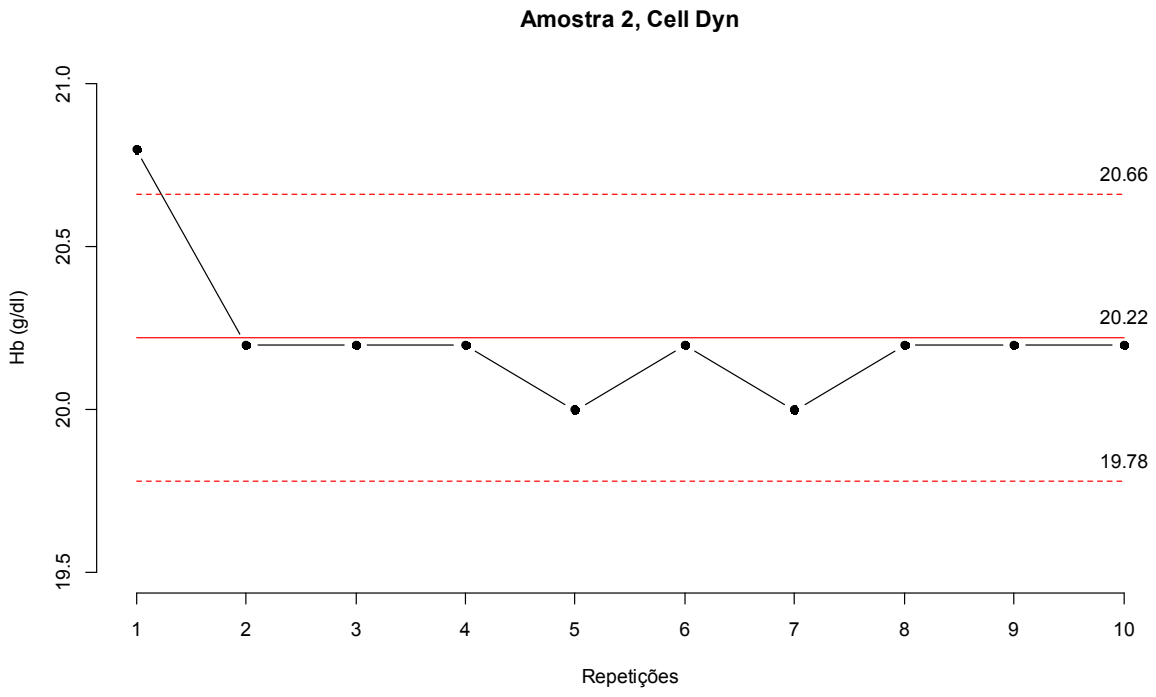


Figura56. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 2) no CellDyn.

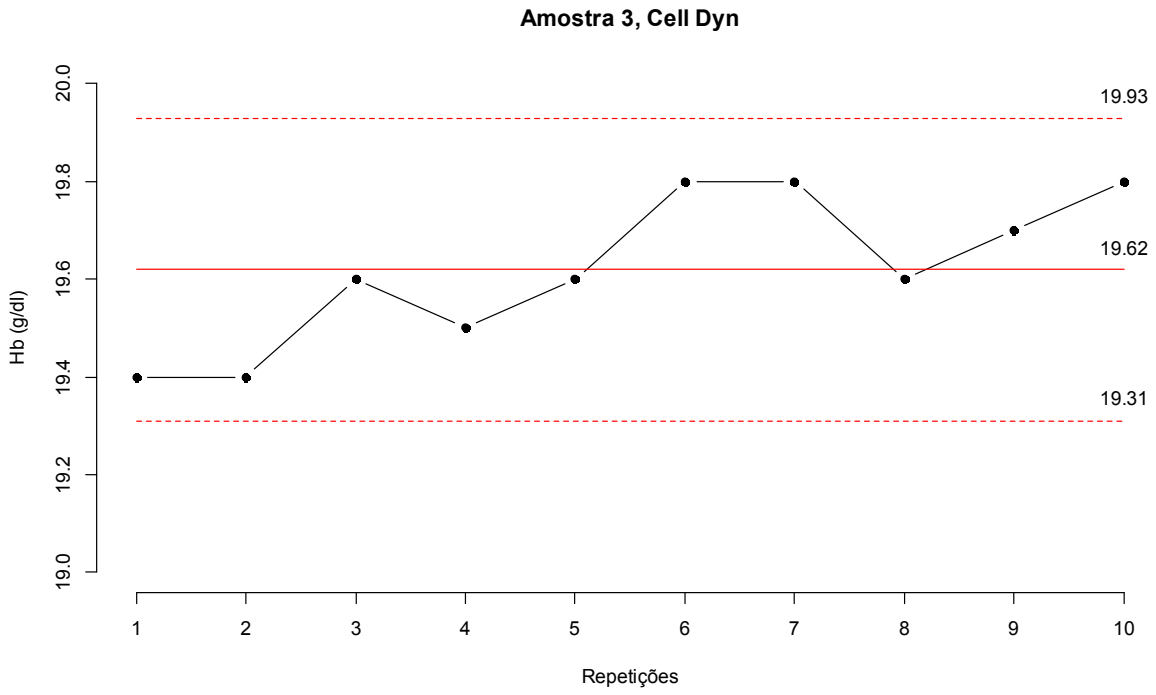


Figura57. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 3) no CellDyn.

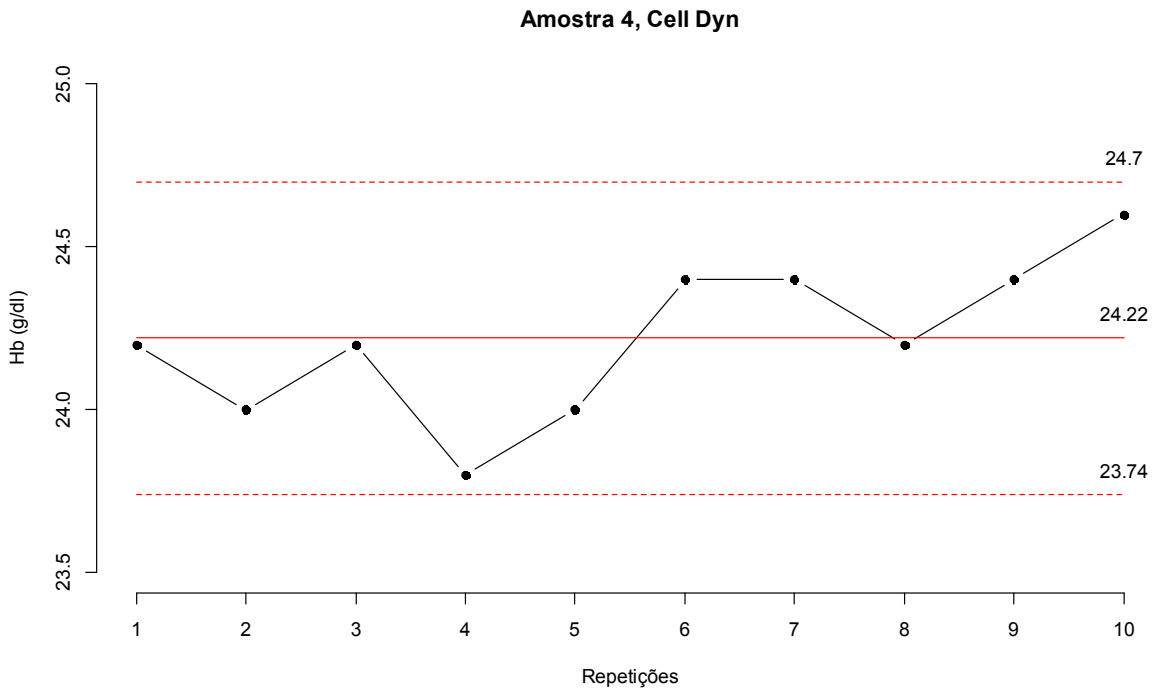


Figura58. Gráfico repetitividade da hemoglobina total (amostra 4) no CellDyn.

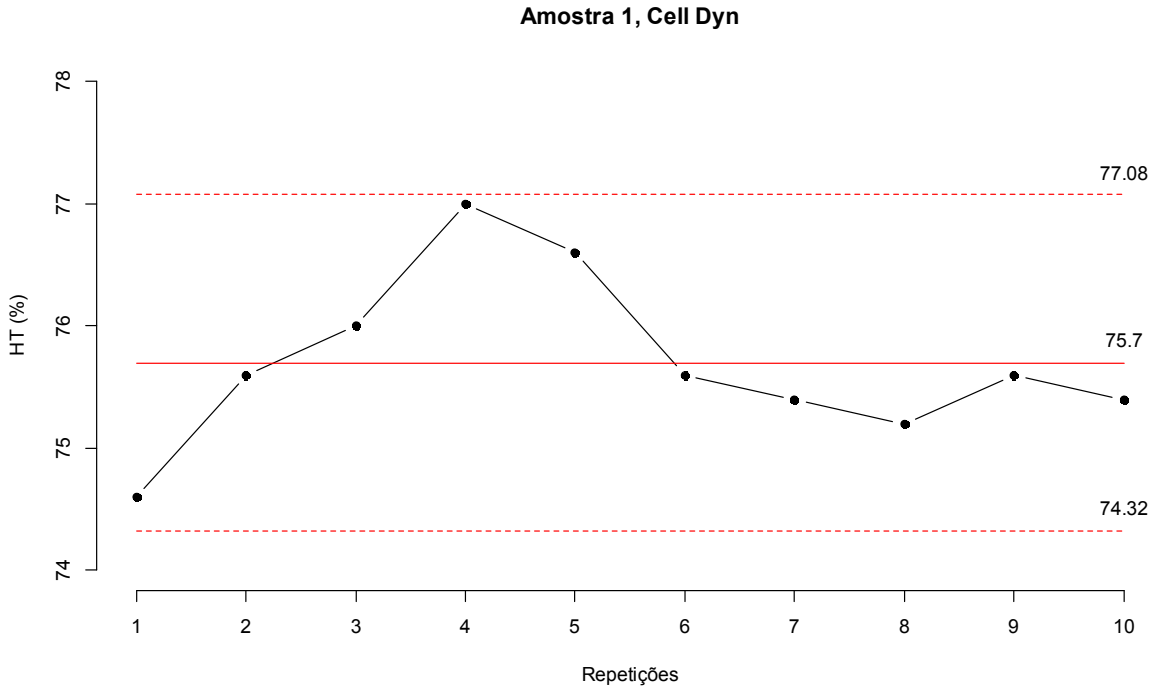


Figura59. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 1) no CellDyn.

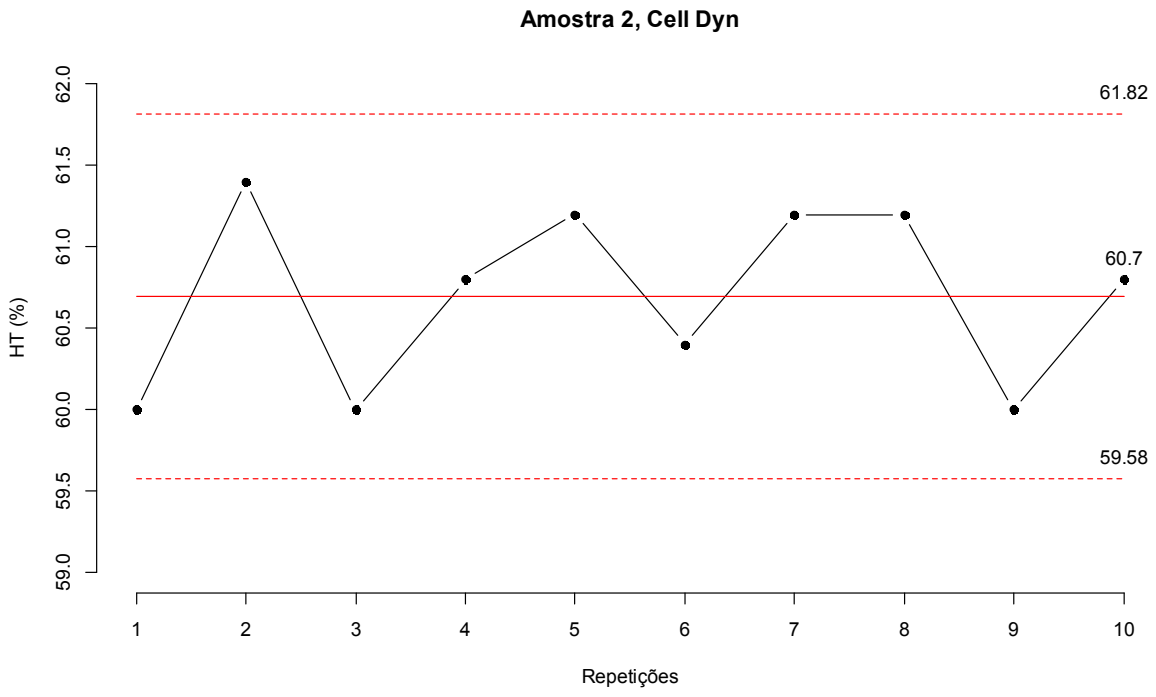


Figura60. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 2) no CellDyn.

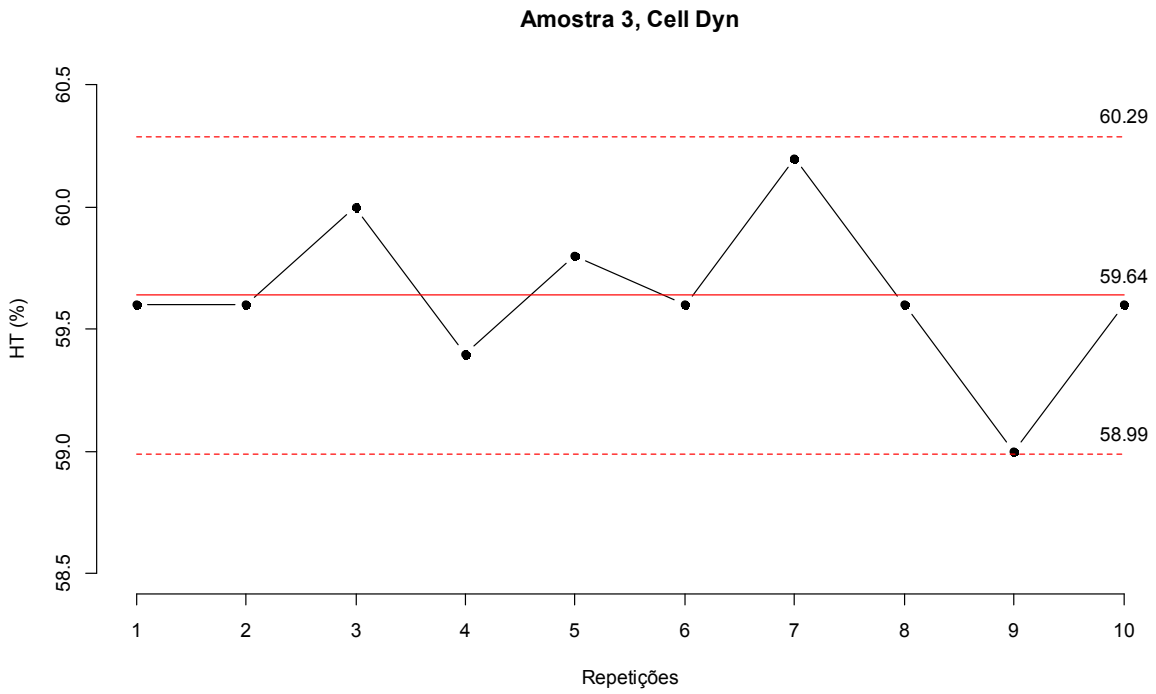


Figura61. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 3) no CellDyn.

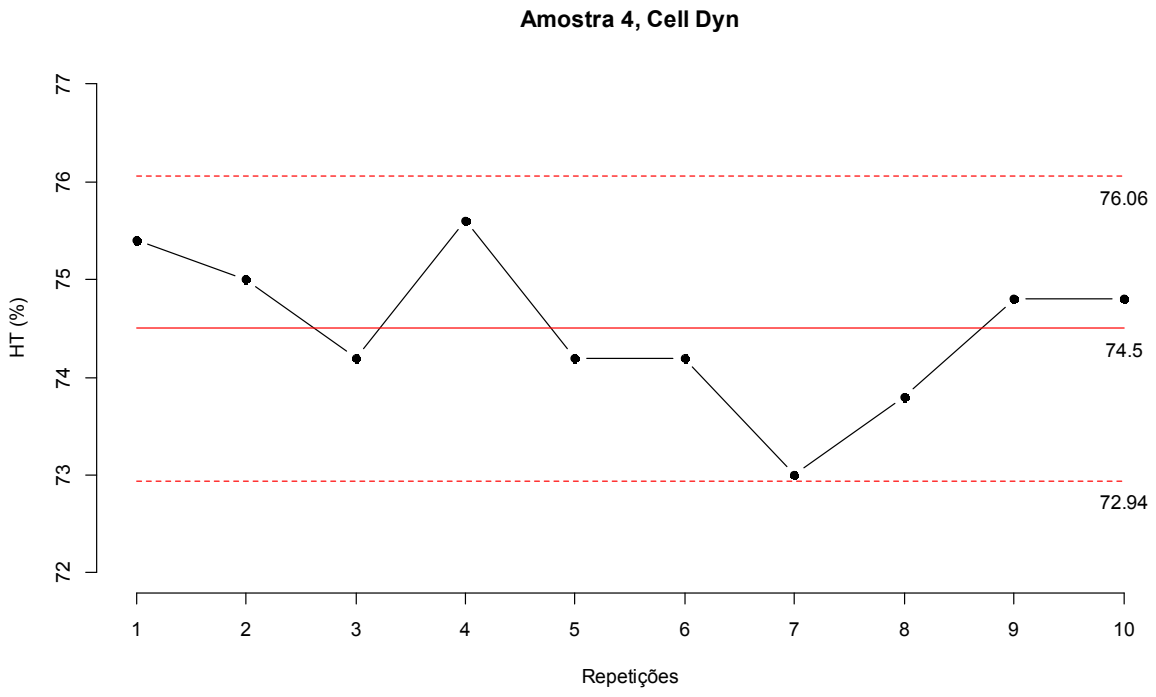


Figura62. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 4) no CellDyn.

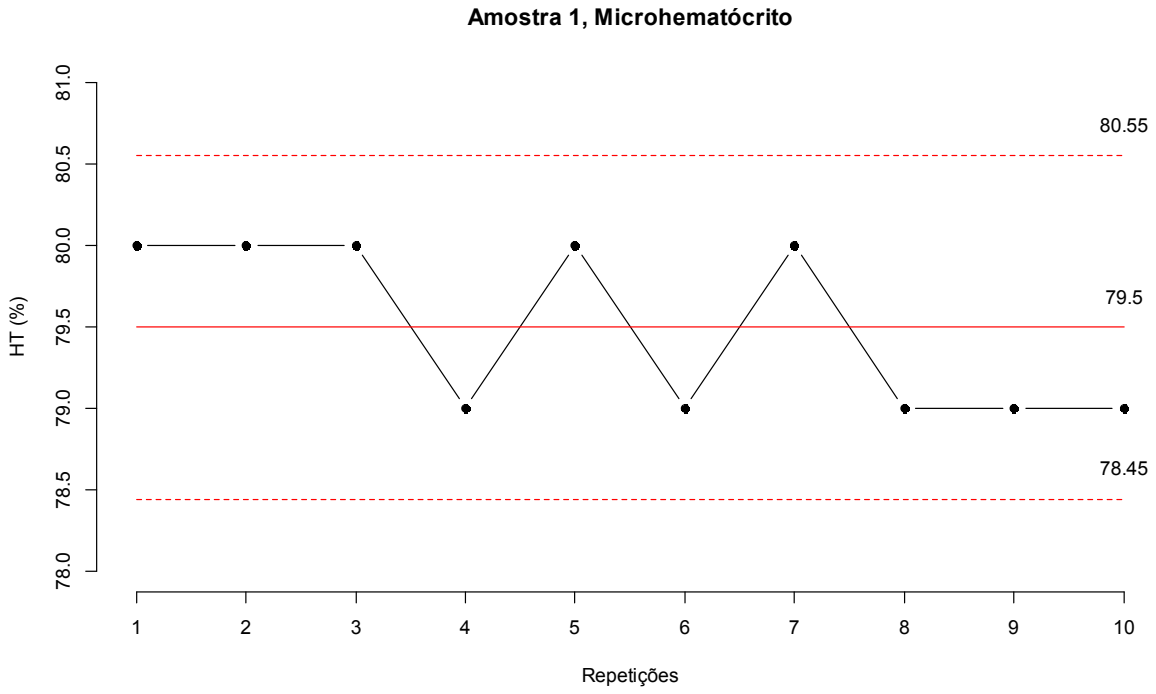


Figura63. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 1) no método microhematócrito.

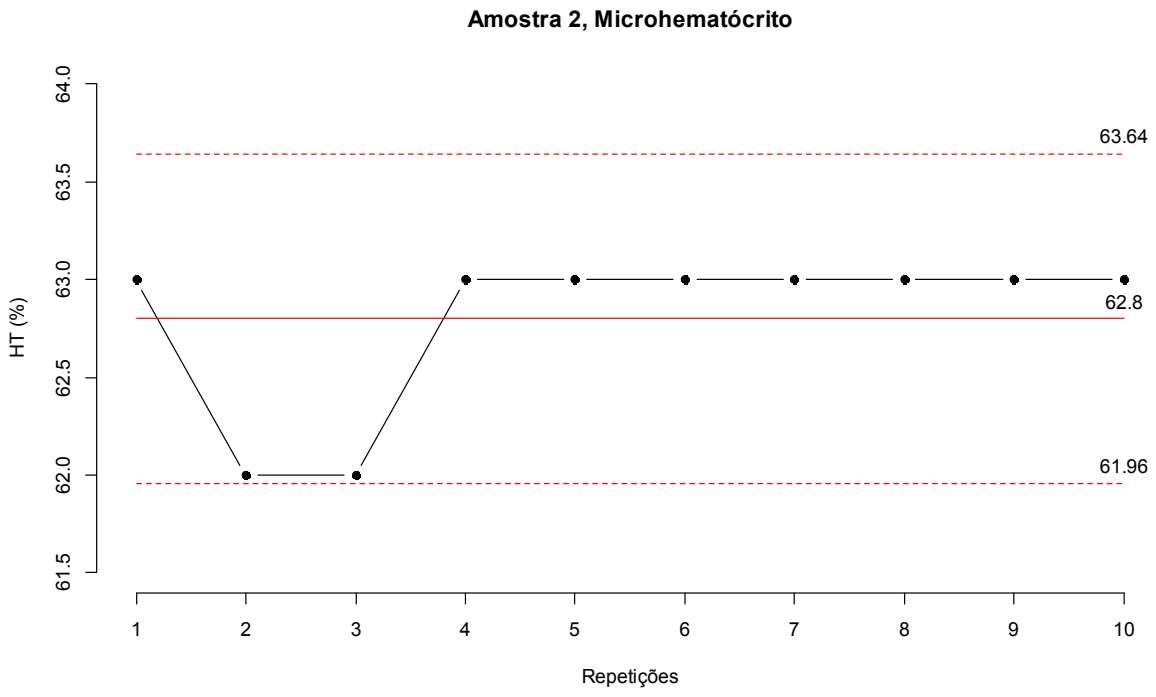


Figura64. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 2) no método microhematócrito.

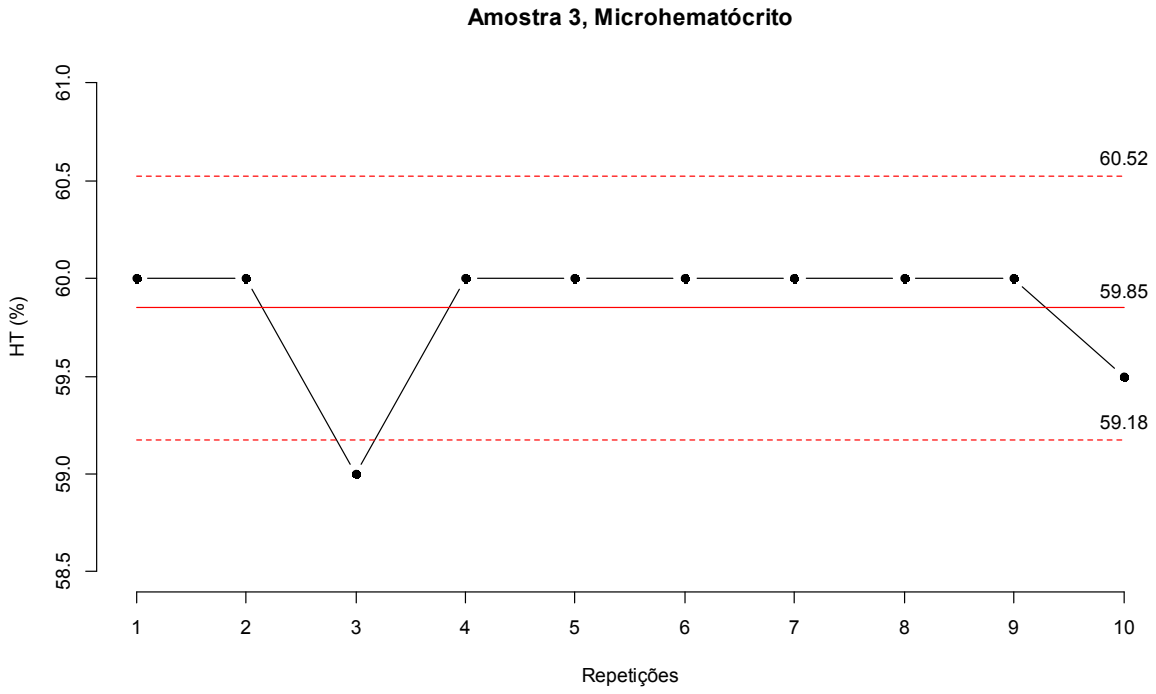


Figura65. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 3) no método microhematócrito.

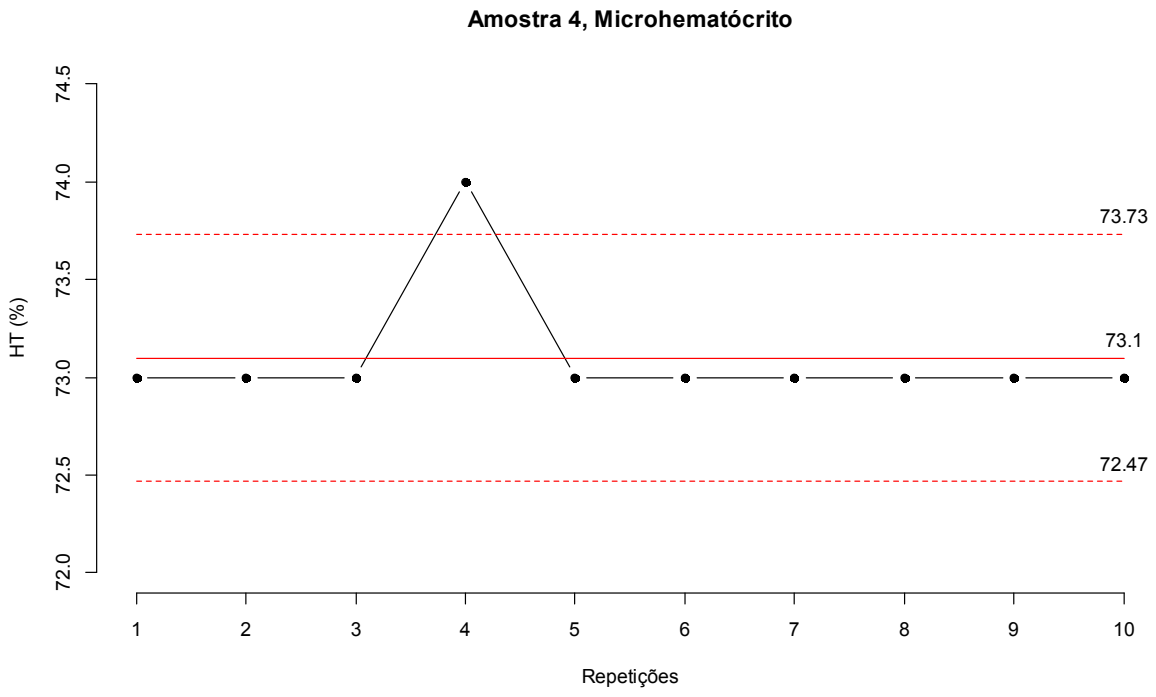


Figura66. Gráfico repetitividade da hematócrito (amostra 4) no método microhematócrito.

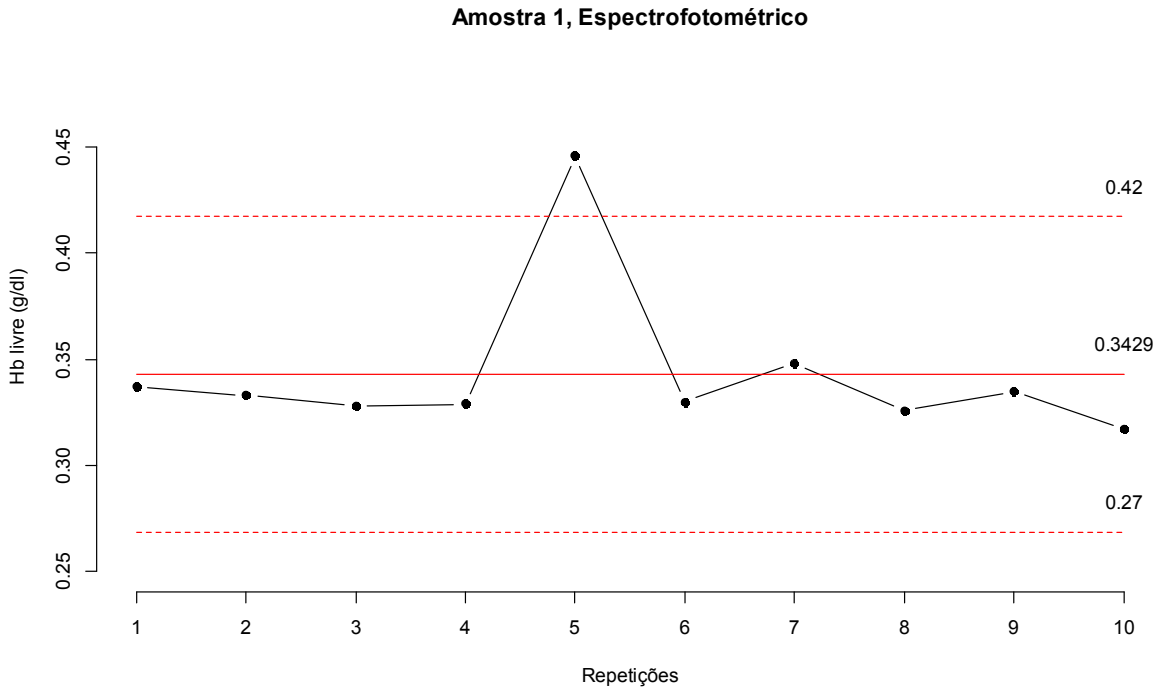


Figura67. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 1) no método Espectrofotométrico.

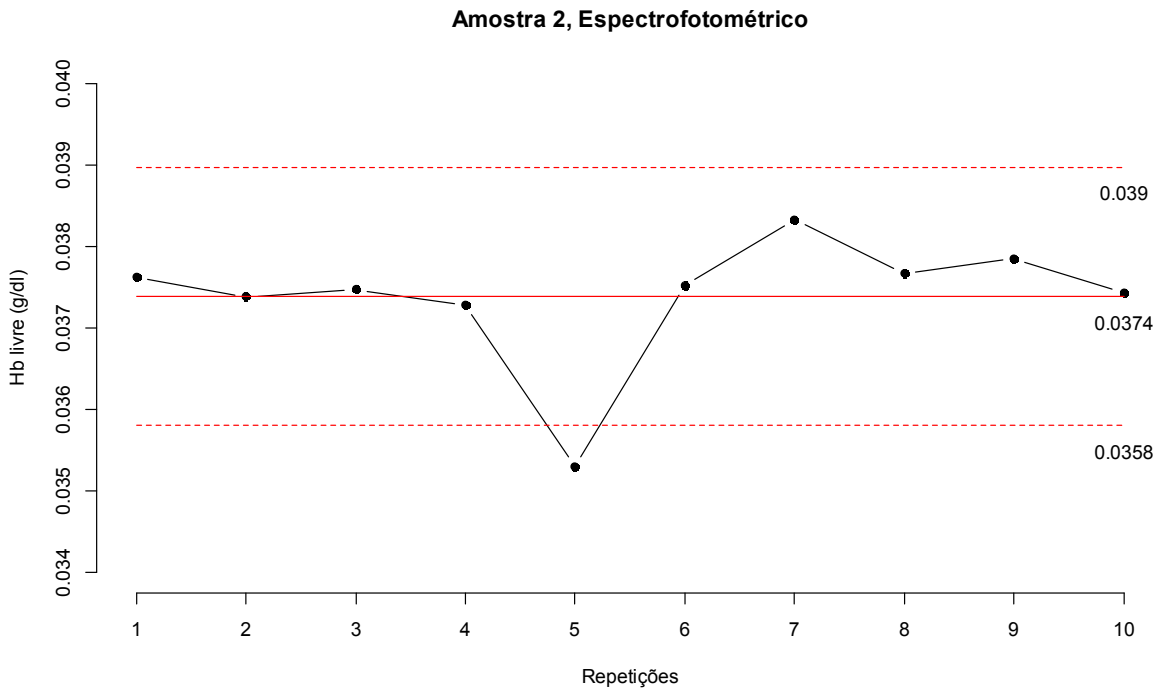


Figura68. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 2) no método Espectrofotométrico.

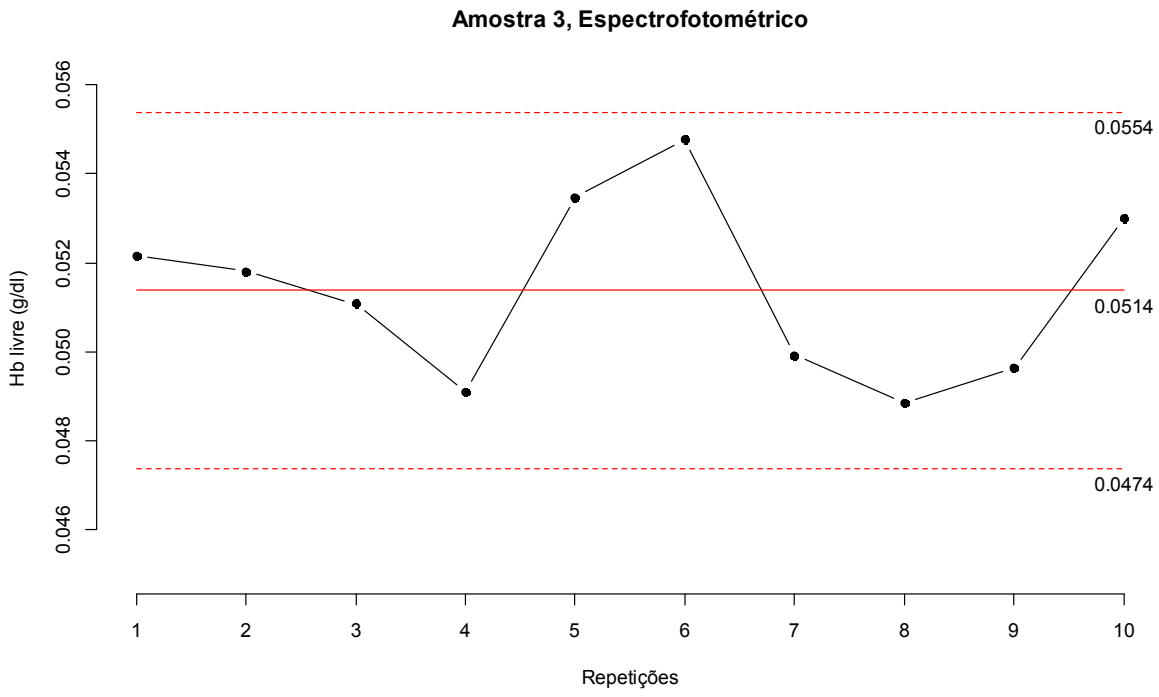


Figura69. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 3) no método Espectrofotométrico.

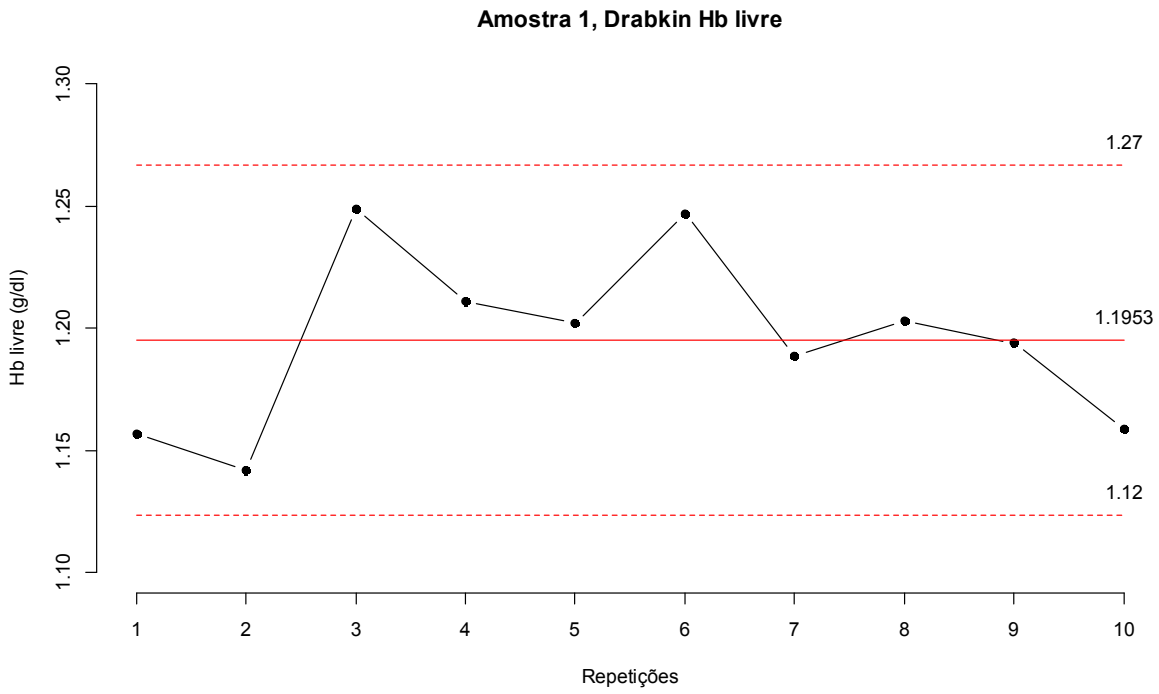


Figura70. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 1) no método Drabkin.

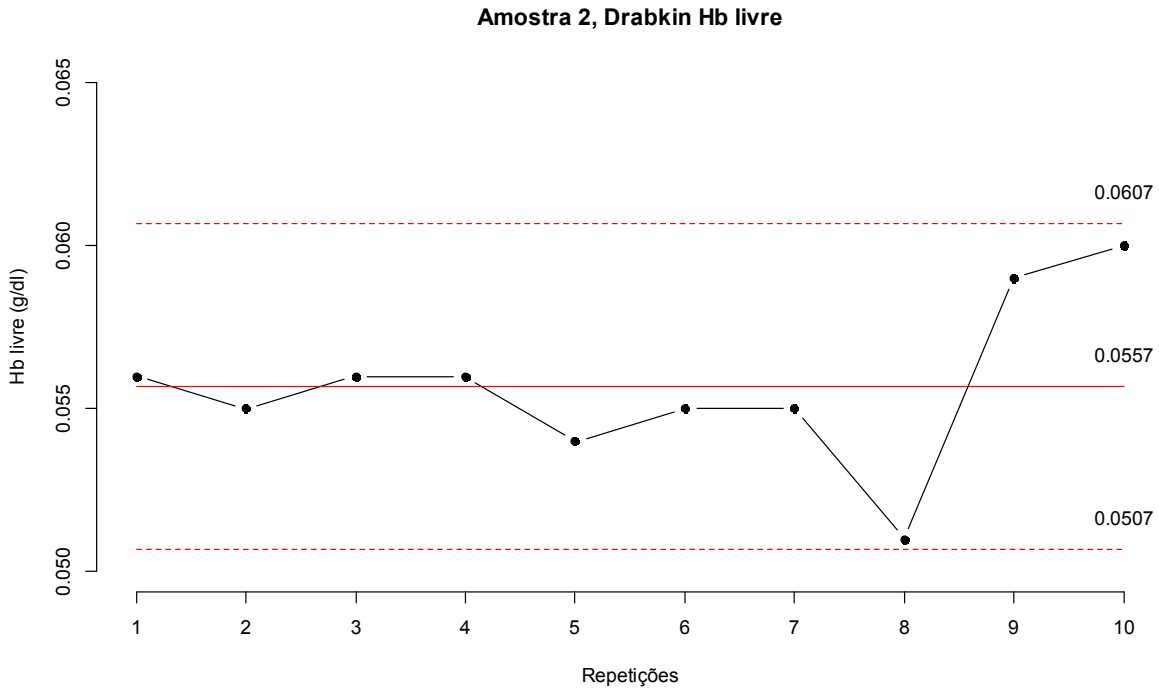


Figura71. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 2) no método Drabkin.

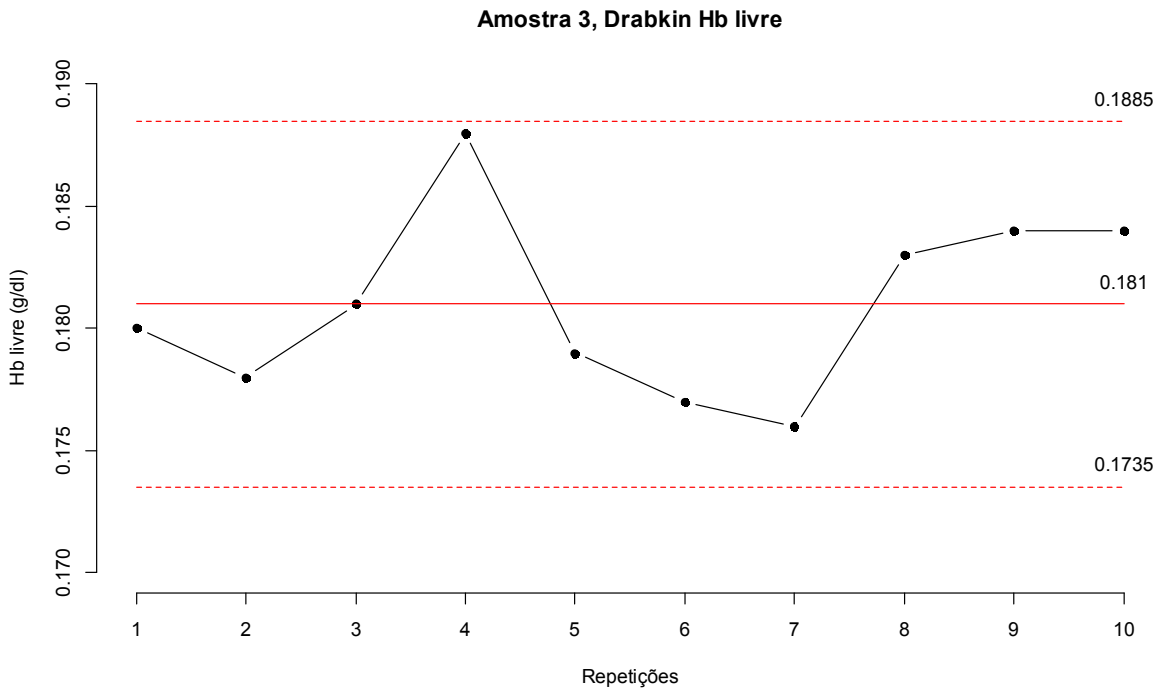


Figura72. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 3) no método Drabkin.

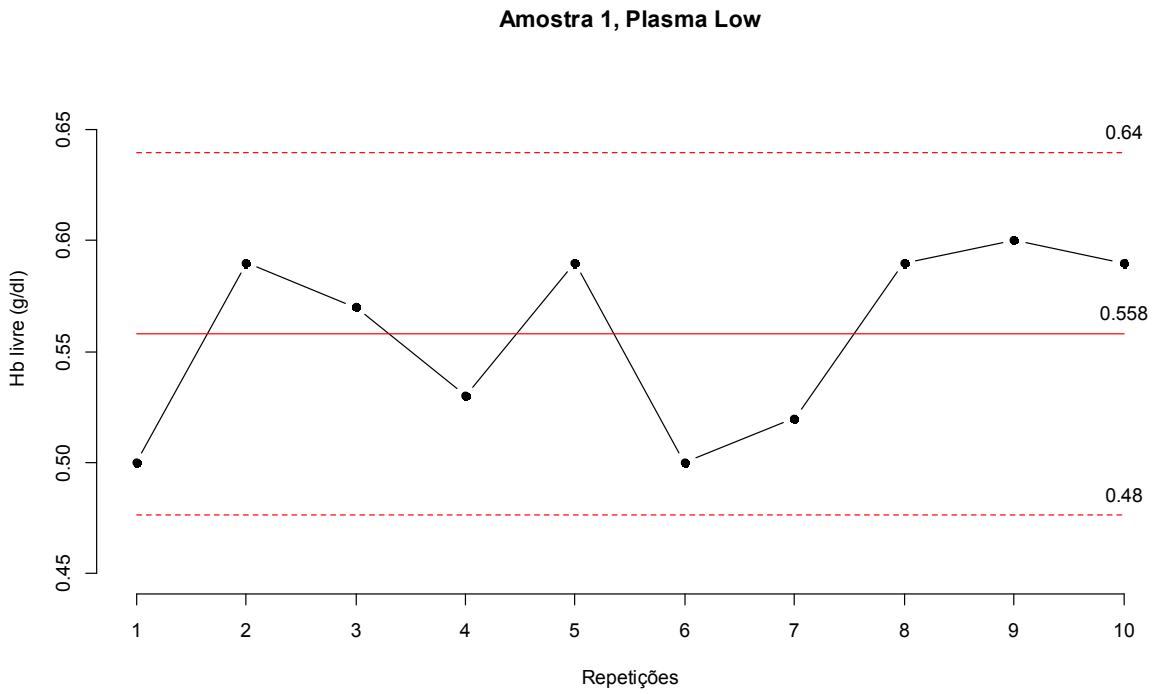


Figura73. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 1) no método HemoCue Plasma Low.

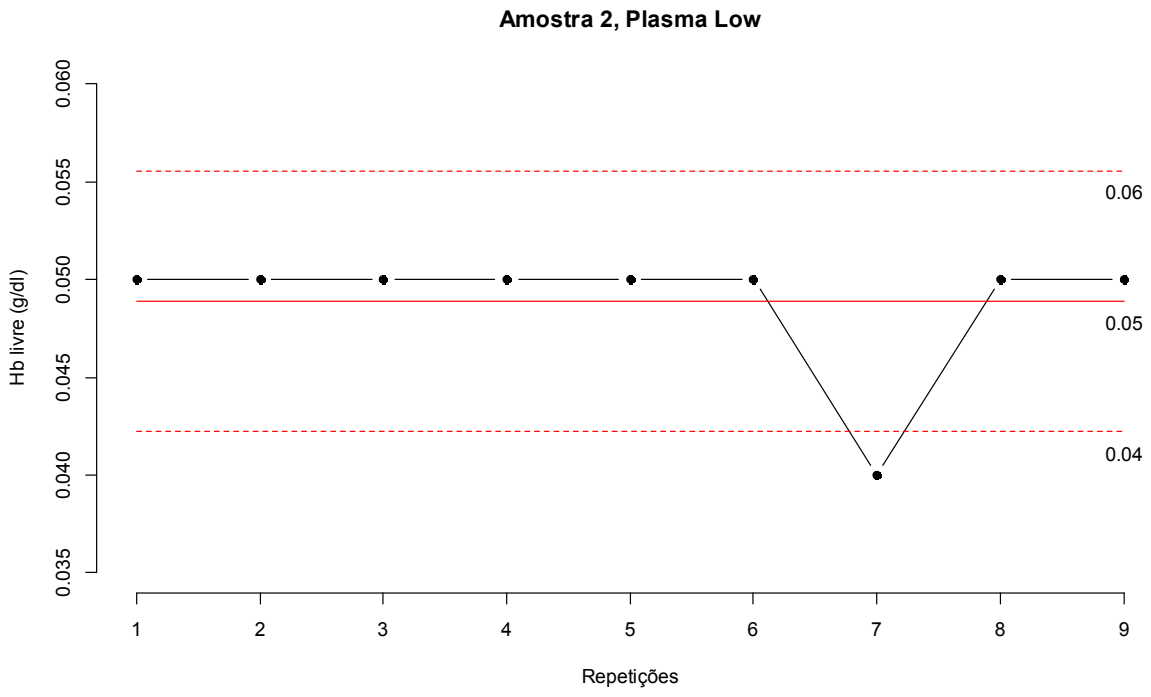


Figura74. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 2) no método HemoCue Plasma Low.

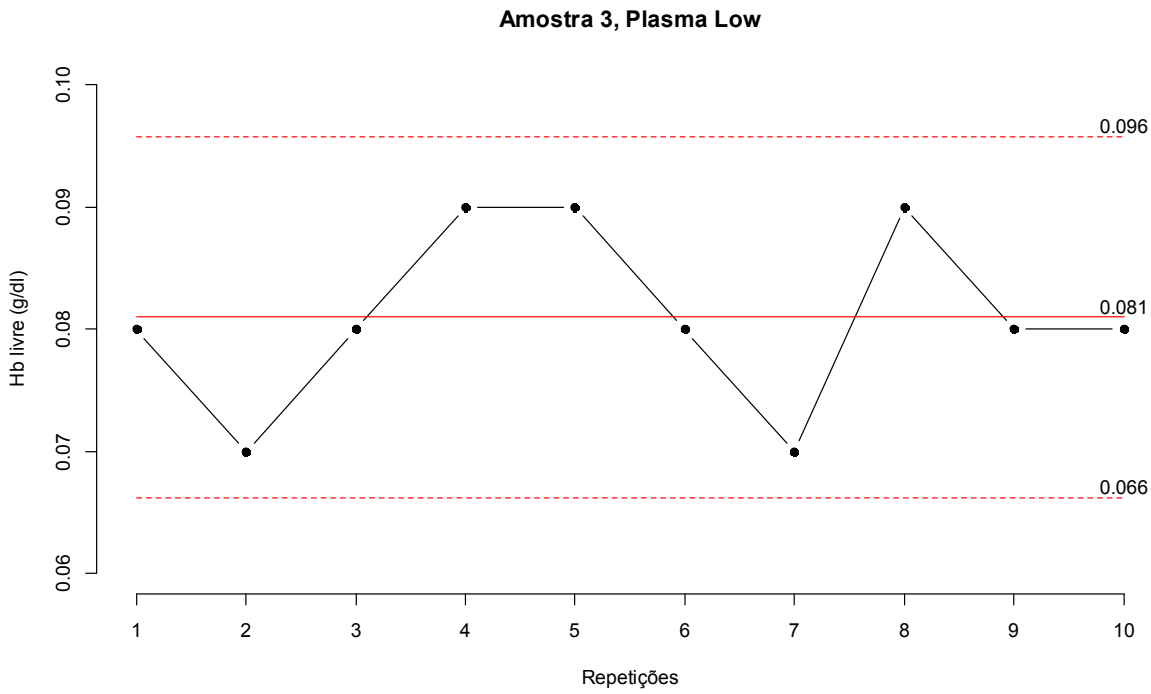


Figura75. Gráfico repetitividade da hemoglobina livre (amostra 3) no método HemoCue Plasma Low.

ANEXO

FUNDAÇÃO HEMOMINAS

FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG

PlataForma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo comparativo de técnicas para determinação do grau de hemólise em concentrado de hemácias durante o armazenamento

Pesquisador: Gabriela Coelho de Resende

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 37762114.5.0000.5119

Instituição Proponente: FUND CENTRO HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: FUND CENTRO HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 530.061

Data da Relatoria: 07/01/2015

Apresentação do Projeto:

A determinação do grau de hemólise é um importante indicador utilizado para assegurar a qualidade de armazenamento dos concentrados de hemácias, sendo um dos parâmetros avaliados nas análises de controle de qualidade de hemocomponentes. No Brasil, de acordo com a Portaria MS 2712/2013, o grau de hemólise considerado aceitável em bolsas de CHM deve ser menor que 0,8% no último dia de validade da bolsa. A hemólise se dá pelo dano ou rompimento da integridade da membrana da hemácia com consequente liberação da hemoglobina para o plasma. A hemólise em unidades de concentrados de hemácias pode ser causada por diversos fatores, tais como: procedimentos inadequados de manuseio durante o processamento do sangue, procedimentos especiais realizados nas bolsas como filtração e irradiação, condições impróprias de armazenamento, contaminação bacteriana e outros fatores anormais no sangue do doador. Para determinação do grau de hemólise em concentrado de hemácias são necessários a análise da hemoglobina total, hemoglobina plasmática e hematócrito. Esses três testes podem ser mensurados por diversas técnicas: manuais, semi-automatizada e automatizada. Nos serviços de hemoterapia existem vários métodos para determinação do grau de hemólise em concentrados de hemácias. Tem sido demostrado na literatura que esta variabilidade de técnicas podem conduzir a falsos que impedem a comparação dos resultados entre os laboratórios de controle e de qualidade.

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321
Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.130-110
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31) 3756-4687 Fax: (31) 3856-4800 E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br

FUNDAÇÃO HEMOMINAS

FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG

Plataforma Brasil

Continuação do Parecer: 930.041

O laboratório de Controle de Qualidade da Fundação Hemominas, localizado em Belo Horizonte, realiza por mês, aproximadamente 200 testes de hemólise em hecomponentes produzidos pelas unidades da Fundação Hemominas. Utiliza-se a metodologia espectrofotométrica para determinação da hemoglobina plasmática , e a metodologia automatizada para determinação da hemoglobina total e hematócrito. A determinação manual da hemoglobina plasmática é trabalhosa, e assim como outras técnicas manuais utilizadas para análise dos demais hemocomponentes consomem muitas horas de trabalho dos profissionais do laboratório. A automação permite a realização dos testes de forma mais rápida e quando os equipamentos estão devidamente calibrados é possível atingir o mesmo grau de acurácia das técnicas manuais. O objetivo geral deste projeto é avaliar a concordância entre métodos manuais e automatizados para determinação do grau de hemólise em concentrados de hemácias em relação linearidade, reprodutibilidade, custos, praticidade e viabilidade. Para determinação do grau de hemólise serão avaliados dois métodos de dosagem de hemoglobina total (azida metahemoglobina- Hemo Control e analisador hematológico Cell Dyn Ruby), dois métodos determinação do hematócrito (microhematócrito e analisador hematológico Cell Dyn Ruby) e três métodos para determinação da hemoglobina plasmática (Drabkin, espectrofotométrico óptico e azida metahemoglobina HemoCue® Plasma/Low Hb). Serão analisadas 60 bolsas concentrado de hemácias, sendo 30 coletadas em bolsas triplas com anticoagulante CPDA-1 e 30 coletadas em bolsas triplas "Top and Bottom" com anticoagulante CPD e solução aditiva SAG-MANITOL. As análises de hemoglobina total, hemoglobina plasmática e hematócrito serão realizadas em todas as unidades nos dias 1, 19 e 35 para CPDA-1 e 1, 19 e 42 SAG-MANITOL. As bolsas serão retiradas do estoque de forma gradativa, para que o mesmo não seja comprometido. Semanalmente serão separadas para análise 06 bolsas de cada tipo.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a concordância entre métodos manuais de Drabkin (cianometahemoglobina), espectrofotométrico óptico e método automatizado azida metahemoglobina [HemoCue® Plasma/Low Hb] para determinação do grau de hemólise em concentrados de hemácias em relação linearidade, reprodutibilidade, custos, praticidade e viabilidade. Objetivo secundário: Avaliar a concordância entre os métodos de azida metahemoglobina (HemoCue® Plasma/Low Hb) Drabkin (cianometahemoglobina) e espectrofotométrico óptico para determinação de hemoglobina livre. Avaliar a concordância entre o método manual de Drabkin (cianometahemoglobina) e método automatizado por meio de analisador hematológico (Cell Dyn Ruby) para determinação da hemoglobina total.Avaliar a concordância entre o método manual de microhematócrito e método

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.130-110
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3768-4587 **Fax:** (31)3768-4580 **Email:** cep@hemominas.mg.gov.br

Carimbo oficial de registro do SIPEC
00001875 2821 2015
03016

FUNDAÇÃO HEMOMINAS

FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG

PlataForma Brasil

Continuação do Parecer: 930.061

automatizado por meio do analisador hematológico (Cell Dyn Ruby) para determinação do hematócrito.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Perda da confidencialidade do doador. Risco minimizado pelo fato das bolsas de concentrado de hemácias possuírem como identificação o número de doação e código de barras. Para se ter acesso aos dados do doador é necessário acesso ao sistema do doador por meio de senha individual. O laboratório de controle de qualidade e a pesquisadora não possuem acesso ao sistema do doador. A maioria das técnicas utilizadas para controle de qualidade de hemocomponentes são executadas manualmente, que apesar do baixo custo, consomem muitas horas de trabalho dos profissionais do laboratório. Para determinação do grau de hemólise em concentrado de hemácias são necessárias a análise de hemoglobina total, hemoglobina plasmática e hematócrito. Estes três testes podem ser mensurados por diversas técnicas: manuais, semiautomatizada e automatizada. A automação permite a realização dos testes de forma mais rápida e quando os equipamentos estão corretamente calibrados é possível atingir o mesmo grau de acurácia das técnicas manuais. O laboratório de Controle de Qualidade da Fundação Hemominas, localizado em Belo Horizonte, realiza, por mês, aproximadamente 200 testes de hemólise em hecomponentes produzidos pelas unidades da Fundação Hemominas. Utiliza-se a metodologia espectrofotométrica para determinação da hemoglobina plasmática, e a metodologia automatizada para determinação da hemoglobina total e hematócrito. A determinação manual da hemoglobina plasmática é trabalhosa, e assim como outras técnicas manuais utilizadas para análise dos demais hemocomponentes no laboratório de controle de qualidade, consomem muitas horas do trabalho dos profissionais do laboratório. Além disso, a metodologia espectrofotométrica para dosagem de hemoglobina plasmática não dispõe de amostras comerciais para realização de controle interno. A determinação de hemoglobina plasmática através de uma metodologia semi-automatizada, como o sistema HemoCue plasma/low, associada a determinação de hemoglobina total e hematócrito através do uso de analisador hematológico automatizado permitirá ao laboratório de controle de qualidade a realização de um grande número de testes de hemólise de forma objetiva e rápida, além de fornecer resultados reprodutíveis e precisos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto possui relevância por tratar de avaliação de metodologias e proposta de melhorias nos processos relacionados à qualidade do sangue na Fundação Hemominas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Endereço: Alameda Araguaia Dias, 321
Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.130-110
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3755-4587 Fax: (31)3788-4600 E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br

FUNDAÇÃO HEMOMINAS

FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG

Plataforma Brasil

Continuação de Parecer: 990.061

O projeto foi apresentado dentro do padrão estabelecido.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. A justificativa para a dispensa de TCLE não está bem sustentada. No arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_374479.pdf 21-10-2014.pdf" a pesquisadora informa que "os testes que serão realizados na pesquisa (hemoglobina, hematócrito e hemólise) já são rotineiramente realizados nas análises mensais de controle de qualidade. São testes exigidos por lei.". Por outro lado, no arquivo "Projeto_Hemólise_plataforma.pdf 19-10-2014.pdf" a pesquisadora relata que "As bolsas serão retiradas do estoque de forma aleatória, para que o mesmo não seja comprometido. Semanalmente serão separadas para análise 05 bolsas de cada tipo." Solicita-se esclarecimento quanto à fonte de material biológico utilizado no projeto. Serão utilizadas bolsas já separadas para o Laboratório de Controle de Qualidade ou serão utilizadas bolsas do estoque da Fundação Hemominas que poderiam ser transfundidas?
ANÁLISE: Justificativa fundamentada foi incluída no projeto. PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Caso sejam utilizadas bolsas do estoque da Fundação Hemominas que poderiam ser transfundidas, os pesquisadores devem aplicar TCLE aos doadores de sangue e solicitar autorização para o uso de seu concentrado de hemácias no projeto. Neste caso, um modelo de TCLE deve ser apresentado.
ANÁLISE: Projeto foi dispensado de assinatura de TCLE. PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. No caso de apresentação de TCLE, solicita-se que os pesquisadores atentem-se para a idade dos participantes da pesquisa. Participantes menores de 18 anos devem assinar Termo de Assentimento acompanhado de Termo de Consentimento assinado pelos pais/responsáveis legais.
ANÁLISE: Projeto foi dispensado de assinatura de TCLE. PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. O projeto está relacionado a um Mestrado Profissional, mas apenas a Fundação Hemominas é colocada como instituição participante, sendo considerada Instituição Proponente. Solicita-se inclusão da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como instituição coparticipante.
ANÁLISE: Pesquisadora incluiu a instituição coparticipante. PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321
Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.130-110
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3768-4987 Fax: (31)3768-4990 E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br

FUNDAÇÃO HEMOMINAS

FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG

Plataforma Brasil

Continuação do Parecer: 930.861

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BELO HORIZONTE, 08 de Janeiro de 2015

Daniel Gonçalves Chaves
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Hemominas

Assinado por:
Daniel Gonçalves Chaves
(Coordenador)

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30130-110
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3768-4587 **Fax:** (31)3768-4600 **E-mail:** cep@hemominas.mg.gov.br