

# **UTILIZAÇÃO DO VÓRTEX PARA CORREÇÃO DA PLAQUETOMETRIA EM CASOS DE PSEUDOTROMBOCITOPENIA INDUZIDA POR EDTA**

Nathan Nascimento Lima

Biomédico, pós-graduado em Oncologia e Hematologia pela Faculdade Unyleya – RJ. Especializando em Hematologia Clínica e Laboratorial pela Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto – SP.

## **RESUMO**

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos, que possuem atuação fisiológica tanto na hemostasia primária quanto secundária. Nos laboratórios, a quantificação de plaquetas é realizada com o auxílio de equipamentos de automação, que podem sofrer interferências analíticas, especialmente nos métodos de impedância. A presença de agregados plaquetários pode produzir um resultado falsamente diminuído, e uma alternativa para corrigir estes resultados é o uso do vórtex. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia do vórtex para correção de resultados quantitativos de plaquetas. Foram selecionadas 40 amostras para o estudo, que durante a análise morfológica, apresentaram agregados plaquetários. Pode-se observar que o vórtex demonstrou-se uma ferramenta eficaz na correção da pseudotrombocitopenia, com percentual de correção dos resultados de 100%. Percebeu-se que o tempo de agitação das amostras no vórtex pode exercer certa influência sobre o eritograma, provocando alterações mínimas que não inviabilizam sua utilização na rotina laboratorial.

## **ABSTRACT**

Platelets are cytoplasmic fragments of megakaryocytes, which have a physiological role in both primary and secondary hemostasis. In laboratories, quantification of platelets is performed with the aid of automation equipment, which may suffer analytical interference, especially in impedance methods. The presence of platelet aggregates can produce a falsely diminished result, and an alternative to correct these results is the use of vortex. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of vortex to correct quantitative platelet results. 40 samples were selected for the study, which during the morphological analysis, showed platelet aggregates. It can be observed that the vortex proved to be an effective tool in the correction of pseudothrombocytopenia, with a percentage of correction of the results of 100%. It was noticed that the time of agitation of the samples in the vortex can exert some influence on the red blood cells, causing minimal alterations that do not preclude its use in the laboratory routine.

## **INTRODUÇÃO**

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos, e possuem como principal função a participação no processo de hemostasia primária, a partir da formação do tampão plaquetário, diante de uma lesão vascular (NAOUM, 2017).

Além da atuação na hemostasia primária, as plaquetas desempenham importante função na hemostasia secundária, através do fornecimento de fosfolípidos de membrana, que auxiliam na ativação dos fatores de coagulação (BRASIL, 2016).

A atuação plaquetária pode ser subdividida em três processos distintos: adesão, agregação e secreção plaquetária. A adesão plaquetária ocorre a partir da exposição do colágeno subendotelial quando há uma lesão vascular, utilizando o fator de von Willebrand e o complexo glicoprotéico (GP) Ib/IX/V nesta ligação. A agregação plaquetária envolve a interação entre mais plaquetas, através do complexo GP IIb/IIIa e do fibrinogênio. O resultado da agregação plaquetária forma o tampão plaquetário, que inicia o bloqueio da lesão vascular. Para que as plaquetas sejam recrutadas ao local da lesão e possam se agregar, é necessário que secretem o conteúdo de seus grânulos, processo denominado secreção plaquetária (BRASIL, 2016).

Para a maioria dos laboratórios, os valores de referência para a contagem de plaquetas circulam entre 140.000 a 450.000/mm<sup>3</sup>. A quantificação de plaquetas é, geralmente, realizada com o auxílio de automações, mas a análise citológica é de suma importância, especialmente quando há resultados alterados, sejam aumentados ou diminuídos (NAOUM, 2017).

Plaquetopenias intensas têm um impacto negativo indiscutível na vida dos pacientes. Entretanto, os valores de referência são apenas um parâmetro de normalidade, que deve ser analisado com cuidado de acordo com a clínica de cada paciente. Sabe-se que, com valores de plaquetas menores que 100.000/mm<sup>3</sup>, sangramentos espontâneos não costumam ocorrer. Em casos de traumas e cirurgias, uma plaquetometria de 50.000/mm<sup>3</sup> demonstrou-se suficiente para impedir casos de hemorragias (PRETTI et al., 2018).

Por serem fragmentos de uma célula de origem, as plaquetas apresentam volume reduzido, tendo o diâmetro de aproximadamente 1/3 dos eritrócitos (PRETTI et al., 2018).

Especialmente nos casos em que a automação do laboratório utiliza o método de impedância para contagem de plaquetas, o tamanho é um fator importante na análise. A partir desta observação, é importante considerar possíveis interferentes na contagem de plaquetas derivados de seu próprio tamanho (como no caso de plaquetas cujo volume ultrapassa 30fL), e também de eritrócitos, que por decorrência de fragmentações, podem ter seu volume reduzido (abaixo de 25fL) e serem confundidos, pela automação, com plaquetas, causando um falso aumento da plaquetometria (NAOUM, 2017).

Dentre outros possíveis interferentes, a presença de agregados plaquetários formados “*in vitro*” pode produzir um falso resultado de plaquetopenia, já que os agregados não são contados normalmente nos canais da automação específicos para plaquetas. Quando este fenômeno ocorre em função do uso do anticoagulante EDTA, denomina-se “pseudotrombocitopenia induzida por EDTA” (NAOUM, 2017).

As pseudotrombocitopenias são responsáveis por aproximadamente 15-30% dos resultados isolados de plaquetopenia encontrados em laboratórios. Além da formação de agregados pelo contato com o EDTA, outras possíveis causas são: problemas na coleta ou no processamento inicial do material, síndrome das plaquetas gigantes, uso de medicamentos e doenças autoimunes (COSTA et al., 2020).

O mecanismo de interferência do EDTA ainda não é precisamente descrito. Tem sido proposto que a agregação baseia-se na ligação entre auto-anticorpos presentes no plasma a um epitopo da glicoproteína IIb, que somente seria exposto no complexo GPIIb/IIIa na presença de EDTA (DUSSE, VIEIRA, CARVALHO, 2004).

Um dos métodos rotineiramente utilizados pelos laboratórios na tentativa de solucionar a formação de agregados plaquetários é a agitação por vórtex. A metodologia de utilização do vórtex ainda não é definida, podendo sofrer alterações quanto ao tempo e velocidade de agitação (MOURAD et al., 2011).

Apesar de, em diversas situações, o vórtex se apresentar de modo eficaz, é necessário atentar-se a um detalhe: as causas de hemólise (rompimento de eritrócitos) pós-coleta são diversas, como a transferência do sangue coletado por seringa para um tubo a vácuo sem a retirada da agulha de punção, centrifugação elevada de tubos de coleta, homogeneização excessiva do tubo, etc. Em todas estas causas, a hemólise *in vitro* está associada a um processo mecânico. Dito isto, é necessário avaliar, de acordo com o protocolo definido de uso do vórtex, se a agitação a que a amostra é submetida pode ser capaz de romper eritrócitos e, neste caso, criar fragmentos (esquizócitos) que podem ser erroneamente contabilizados como plaquetas (Diagnósticos do Brasil, 2022).

## **OBJETIVO**

Avaliar a eficácia do vórtex para correção de resultados quantitativos de plaquetas nos casos de pseudotrombocitopenia induzida por EDTA, e verificar seu impacto nos parâmetros do eritrograma.

## **MATERIAL E MÉTODO**

O estudo foi realizado a partir do processamento de amostras de hemograma, colhidas em tubos EDTA, de pacientes do laboratório Hemolab Medicina Laboratorial. Os dados foram colhidos a partir da análise das amostras no equipamento Sysmex XN-550™, que utiliza como metodologia para determinação de eritrócitos e plaquetas a impedância com foco hidrodinâmico.

Não foram selecionados critérios de exclusão como idade e sexo dos pacientes. Visto que o intuito do estudo era avaliar a eficácia do uso do vórtex na correção de resultados de pseudotrombocitopenia, foram selecionadas amostras que, durante a análise morfológica, apresentaram agregados plaquetários. A confecção das lâminas foi feita manualmente. A coloração foi realizada no aparelho Vyttra Slidelnk Plus, utilizando o Kit Colorgram específico para a automação. A análise microscópica foi feita através do CellaVision® DC-1, automação que possui metodologia digital para realizar a contagem diferencial de células sanguíneas, tendo a capacidade de identificar e classificar os agregados plaquetários.

Foram selecionadas 40 amostras para o estudo, sendo estas submetidas à agitação no Agitador Tipo Vórtex Labor Import, com rotação fixa de 2500 RPM. Para verificar se o tempo de agitação é uma variável de importância no resultado final, as amostras foram subdivididas em 2 grupos, com tempos diferentes de agitação (2 minutos e 4 minutos).

Além da avaliação pela automação, foram confeccionadas lâminas em duplicata de 10 amostras aleatórias, antes e após agitação no vórtex, para verificar se há alterações significativas de anisocitose e poiquilocitose nos parâmetros da série vermelha. Para a avaliação morfológica, foi utilizado como auxílio o CellaVision® DC-1.

## **RESULTADO**

Para evitar que variações normais da automação causassem um viés nos resultados do estudo, 20 amostras aleatórias foram previamente analisadas em duplicata, com o objetivo de se obter o desvio padrão para a contagem de hemácias e plaquetas do equipamento.

Tabela 1 - Resultados de dosagens em duplicata de amostras aleatórias, incluindo desvios.

Amostras	Hemácias 1ª análise (x10 <sup>6</sup> )	Hemácias 2ª análise (x10 <sup>6</sup> )	Desvios hemácias (x10 <sup>6</sup> )	Plaquetas 1ª análise	Plaquetas 2ª análise	Desvios plaquetas
AA*01	4,35	4,40	0,05	302.000	318.000	16.000
AA02	4,00	4,12	0,12	302.000	302.000	0
AA03	4,78	4,90	0,12	342.000	350.000	8.000
AA04	5,13	5,17	0,04	359.000	355.000	4.000
AA05	4,87	4,88	0,01	217.000	217.000	0
AA06	4,65	4,65	0	381.000	389.000	8.000
AA07	4,57	4,54	0,03	306.000	320.000	14.000
AA08	4,69	4,70	0,01	390.000	397.000	7.000

AA09	4,76	4,80	0,04	259.000	266.000	7.000
AA10	3,86	3,89	0,03	222.000	214.000	8.000
AA11	5,29	5,30	0,01	310.000	327.000	17.000
AA12	4,68	4,59	0,09	210.000	212.000	2.000
AA13	4,53	4,37	0,16	256.000	256.000	0
AA14	3,75	3,81	0,06	165.000	178.000	13.000
AA15	5,14	5,21	0,07	281.000	285.000	4.000
AA16	4,04	4,06	0,02	464.000	466.000	2.000
AA17	3,80	3,85	0,05	376.000	383.000	7.000
AA18	4,86	4,91	0,05	357.000	371.000	14.000
AA19	4,30	4,33	0,03	178.000	168.000	10.000
AA20	4,54	4,65	0,11	236.000	236.000	0
-	-	-	$M_A = 0,055$	-	-	$M_A = 7.050$

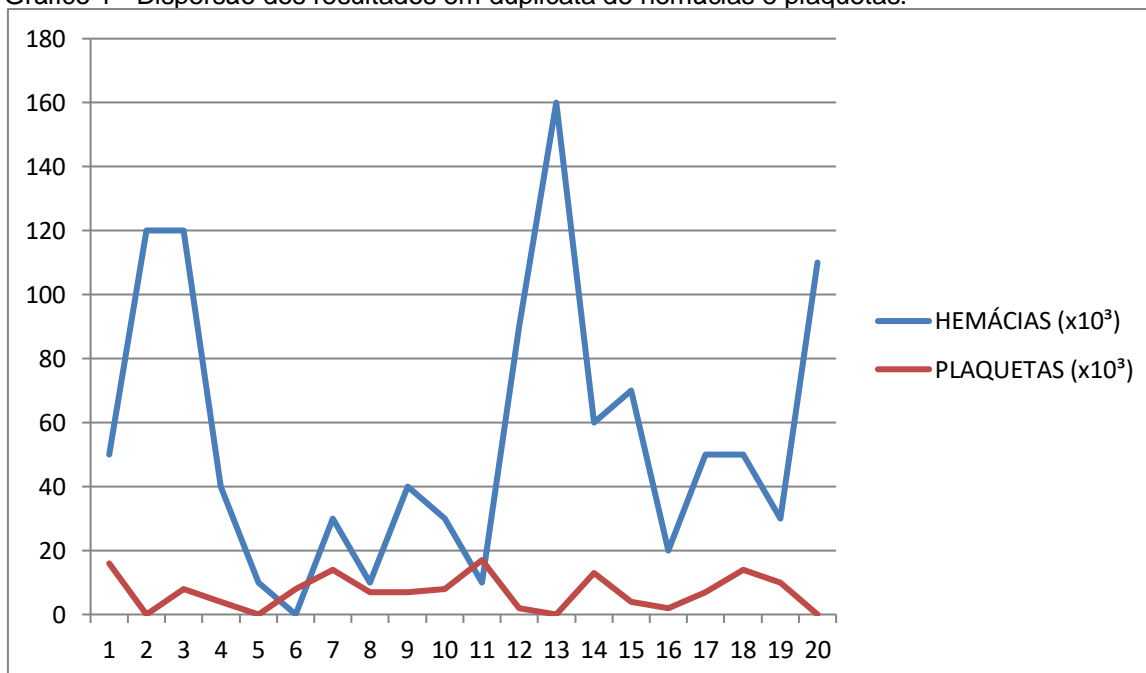
Fonte: autoria própria.

\*AA: Amostra aleatória.

A partir dos resultados obtidos das médias aritméticas, desvios e variâncias para eritrócitos e plaquetas, foram calculados os desvios padrões dos conjuntos. A média aritmética dos desvios foi obtida a partir do somatório dos resultados dos desvios, dividido pelo n total do grupo (20). O cálculo da variância é realizado a partir do somatório dos quadrados dos desvios, dividido pelo n total do grupo (20). Por fim, o desvio padrão é calculado a partir da raiz quadrada da variância.

A partir dos cálculos iniciais, pode-se concluir que a média de variação de eritrócitos é de 55.000/mm<sup>3</sup>, com desvio padrão de 70.000/mm<sup>3</sup>. Para plaquetas, a média de variação é de 7.050/mm<sup>3</sup>, com desvio padrão de 8.902/mm<sup>3</sup>.

Gráfico 1 - Dispersão dos resultados em duplicata de hemácias e plaquetas.



Fonte: autoria própria.

As tabelas a seguir apresentam os resultados obtidos de eritrócitos e plaquetas em determinações pré e pós-utilização do vórtex, para cada amostra analisada. Para facilitar a análise dos dados, a variação entre as determinações se encontra em parênteses.

Tabela 2 - Resultados de análises de amostras do grupo 1.

<b>GRUPO 1 – AGITAÇÃO DE 2 MINUTOS</b>				
<b>Amostras</b>	<b>Hemácias</b>	<b>Hemácias pós-vórtex</b>	<b>Plaquetas</b>	<b>Plaquetas pós-vórtex</b>
Amostra 01	5,28	5,16 (-0,12)	136.000	313.000(177.000)
Amostra 02	4,37	4,37 (0)	119.000	190.000 (71.000)
Amostra 03	4,29	4,16 (-0,13)	33.000	385.000 (352.000)
Amostra 04	3,81	3,88 (0,07)	135.000	168.000 (33.000)
Amostra 05	5,04	5,15 (0,11)	106.000	153.000 (47.000)
Amostra 06	5,52	5,56 (0,04)	137.000	191.000 (54.000)
Amostra 07	4,62	4,74 (0,12)	87.000	252.000 (165.000)
Amostra 08	4,49	4,53 (0,04)	47.000	182.000 (135.000)
Amostra 09	4,61	4,69 (0,08)	118.000	243.000 (125.000)
Amostra 10	4,43	4,59 (0,16)	131.000	253.000 (122.000)
Amostra 11	5,52	5,60 (0,08)	97.000	202.000 (105.000)
Amostra 12	5,04	5,20 (0,16)	99.000	291.000 (192.000)
Amostra 13	4,48	4,44 (-0,04)	131.000	243.000(112.000)
Amostra 14	5,41	5,48 (0,07)	114.000	177.000 (63.000)
Amostra 15	5,43	5,24 (-0,19)	68.000	290.000 (222.000)
Amostra 16	4,99	5,08 (0,09)	72.000	341.000 (269.000)
Amostra 17	5,29	5,28 (-0,01)	29.000	223.000 (194.000)
Amostra 18	4,33	4,37 (0,04)	108.000	159.000 (51.000)
Amostra 19	4,96	4,93 (-0,03)	97.000	200.000 (103.000)
Amostra 20	4,72	4,87 (0,15)	138.000	315.000 (177.000)

Fonte: autoria própria.

Tabela 3 - Resultados de análises de amostras do grupo 2.

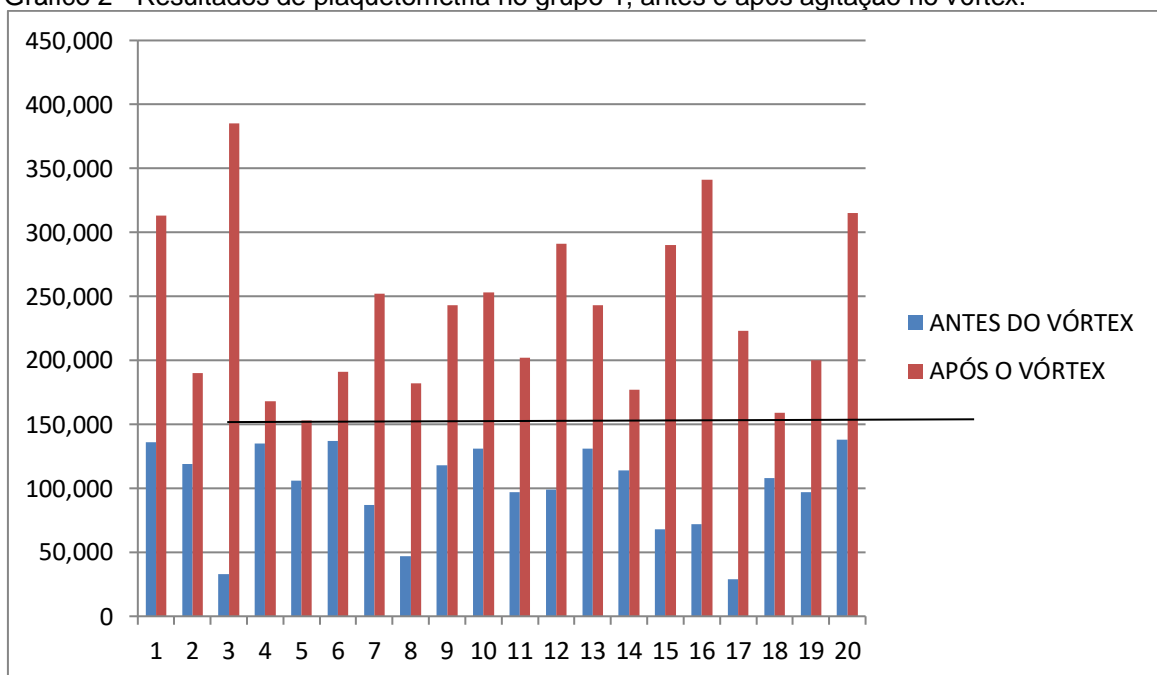
<b>GRUPO 2 – AGITAÇÃO DE 4 MINUTOS</b>				
<b>Amostras</b>	<b>Hemácias</b>	<b>Hemácias pós-vórtex</b>	<b>Plaquetas</b>	<b>Plaquetas pós-vórtex</b>
Amostra 21	4,29	4,50 (0,21)	128.000	363.000 (235.000)
Amostra 22	3,81	3,99 (0,18)	131.000	174.000 (43.000)
Amostra 23	4,54	4,64 (0,10)	127.000	170.000 (43.000)
Amostra 24	4,75	4,80 (0,05)	101.000	349.000 (248.000)
Amostra 25	4,38	4,37 (-0,01)	124.000	239.000 (115.000)
Amostra 26	5,06	5,13 (0,07)	138.000	278.000 (140.000)
Amostra 27	4,62	4,59 (-0,03)	111.000	169.000 (58.000)
Amostra 28	5,22	5,24 (0,02)	72.000	239.000 (167.000)
Amostra 29	4,27	4,43 (0,06)	126.000	162.000 (36.000)
Amostra 30	4,57	4,68 (0,11)	126.000	211.000 (85.000)
Amostra 31	4,80	4,99 (0,19)	98.000	182.000 (84.000)
Amostra 32	5,06	5,24 (0,18)	96.000	180.000 (84.000)
Amostra 33	4,01	4,17 (0,16)	127.000	233.000 (106.000)
Amostra 34	4,85	4,95 (0,10)	116.000	220.000 (104.000)
Amostra 35	4,76	4,68 (-0,08)	105.000	169.000 (64.000)
Amostra 36	4,54	4,66 (0,12)	48.000	249.000 (201.000)
Amostra 37	5,18	5,17 (-0,01)	119.000	372.000 (253.000)
Amostra 38	4,95	5,10 (0,15)	108.000	236.000 (128.000)
Amostra 39	5,10	5,26 (0,16)	96.000	156.000 (62.000)

Amostra 40	5,30	5,40 (0,10)	91.000	191.000 (100.000)
------------	------	-------------	--------	-------------------

Fonte: autoria própria.

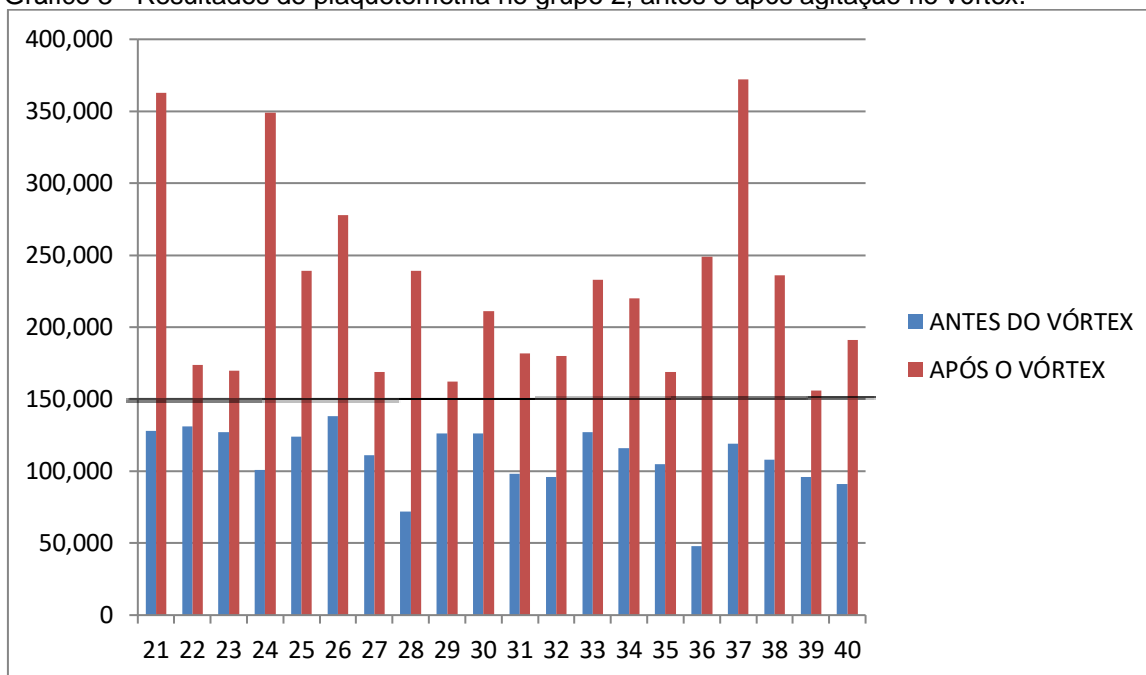
Pode-se observar, com os resultados de plaquetas após agitação, que em ambos os grupos, o vórtex demonstrou-se uma ferramenta eficaz na correção da pseudotrombocitopenia, elevando a plaquetometria além do desvio padrão estabelecido, e também além do valor mínimo de referência (estipulado pelo laboratório em 140.000/mm<sup>3</sup>, como demonstram os gráficos 2 e 3). O percentual de correção dos resultados foi de 100%.

Gráfico 2 - Resultados de plaquetometria no grupo 1, antes e após agitação no vórtex.



Fonte: autoria própria.

Gráfico 3 - Resultados de plaquetometria no grupo 2, antes e após agitação no vórtex.



Fonte: autoria própria.

Observando a tabela 2, foi possível perceber que 4 amostras (20%) analisadas apresentaram variação de hemácias em quantidade superior ao desvio padrão previamente estabelecido, quando submetidas à agitação por 2 minutos. Já no grupo 2 (tabela 3), 7 amostras (35%) extrapolaram o desvio, após 4 minutos de agitação. Percebeu-se, por este aumento, que o tempo de agitação das amostras no vórtex pode exercer certa influência sobre o resultado final, de forma proporcional. No entanto, é importante observar que, dentre as 11 amostras alteradas, 9 demonstraram um resultado final de eritrócitos maior que o inicial. Portanto, conclui-se que não houve grau de hemólise significativo na maior parte do grupo, visto que as contagens de hemácias não diminuíram.

Utilizando o CellaVision® DC-1, é possível obter uma pré-análise da série vermelha, com quantificação percentual de parâmetros como a anisocitose e poiquilocitose. Além da quantificação, a automação estabelece diferentes níveis, de acordo com os valores obtidos, sendo eles:

- 0 – valores normais;
- 1 – alteração discreta/leve;
- 2 – alteração moderada;
- 3 – alteração intensa/acentuada.

Os resultados de variação de anisocitose e poiquilocitose encontram-se nas tabelas abaixo:



Tabela 4 - Resultados de análises de lâminas do grupo 1.

<b>GRUPO – 2 MINUTOS (ANÁLISE DE LÂMINA – CELLAVISION)</b>				
<b>Identificação</b>	<b>Poiquilocitose %</b>	<b>Anisocitose %</b>	<b>Poiquilocitose pós-vórtex</b>	<b>Anisocitose pós-vórtex</b>
Amostra 41	5,6 (0)	12,4 (0)	2,5 (0)	12,5 (0)
Amostra 42	5,4 (0)	13,1 (0)	5,4 (0)	17,2 (1)
Amostra 43	6,2 (0)	14,7 (0)	14,2 (1)	19,9 (1)
Amostra 44	5,0 (0)	16,4 (1)	8,1 (0)	17,2 (1)
Amostra 45	5,0 (0)	11,4 (0)	9,3 (0)	11,0 (0)

Fonte: autoria própria.

Tabela 5 - Resultados de análises de lâminas do grupo 2.

<b>GRUPO – 4 MINUTOS (ANÁLISE DE LÂMINA – CELLAVISION)</b>				
<b>Identificação</b>	<b>Poiquilocitose %</b>	<b>Anisocitose %</b>	<b>Poiquilocitose pós-vórtex</b>	<b>Anisocitose pós-vórtex</b>
Amostra 46	3,8 (0)	13,5 (0)	4,7 (0)	12,8 (0)
Amostra 47	2,5 (0)	12,0 (0)	2,5 (0)	13,4 (0)
Amostra 48	3,5 (0)	12,4 (0)	3,6 (0)	13,1 (0)
Amostra 49	29,6 (2)	18,8 (1)	28,2 (2)	19,0 (1)
Amostra 50	4,5 (0)	14,8 (0)	19,8 (1)	15,5 (1)

Fonte: autoria própria.

Percebe-se que, em 3 das 10 amostras analisadas, foram detectadas alterações no valor de anisocitose após a agitação no vórtex, sugerindo uma maior variação no tamanho das hemácias. Além disso, em 2 destas amostras, o cálculo de poiquilocitose também se alterou, podendo sugerir a presença de hemácias morfológicamente anormais.

Baseando-se nas atuais recomendações do ICSH (International Council for Standardization in Hematology) de 2015 para avaliação das alterações morfológicas em sangue periférico, há um consenso de que alterações consideradas “discretas” não devem ser descritas em laudo, por não apresentar, na maioria dos casos, relevância no quadro clínico em questão (PALMER et al., 2015). Aplicando este consenso ao trabalho em questão, pode-se dizer que o vórtex não apresentou potencial para interferir de forma significativa na interpretação morfológica da série vermelha.

Um estudo similar, realizado em 2017, avaliou 56 amostras com agregados plaquetários. Submetendo-as a agitação no vórtex, o trabalho evidencia que os tempos de 2 e 3 minutos foram resolutivos em dois terços das amostras analisadas, sendo o tempo de 2 minutos mais seguro, por produzir menores efeitos sobre a série vermelha (PRATES et al., 2017).

## **CONCLUSÃO**

A contagem de plaquetas apresentou aumento significativo em todas as amostras, de ambos os grupos. Demonstrou-se, portanto, que nas condições descritas para este trabalho, o vórtex foi resolutivo na correção de pseudotrombocitopenia por agregados plaquetários. Não foi possível estabelecer uma relação direta entre o tempo de agitação no vórtex e o valor de aumento de plaquetas, sendo esta última característica mais associada ao número de agregados apresentado na amostra inicial.

Avaliando a série vermelha, percebeu-se interferência mínima do uso do vórtex em seus parâmetros, não sendo possível, através deste estudo, destacar dados importantes que inviabilizem a utilização do equipamento na rotina laboratorial.

## **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial das coagulopatias hereditárias e plaquetopatias 2010; 67-69.

Costa BMB, Vellés MC, Viana MMFB, Pereira ACM, Rocha SCP, Rocha LP, et al. Plaquetograma: relato de caso de pseudotrombocitopenia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2020; 56:1.

Diagnósticos do Brasil. HEMÓLISE – DICAS PARA EVITAR E PRINCIPAIS CAUSAS – CARTAZ. *Diagnósticos do Brasil* 2022.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Pseudotrombocitopenia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2004; 40:5.

Mourad SC, Sandes AF, Takihi IY, Pacheco LZC, Chauffaille ML, Rizzatti EG. Fluxo específico na rotina laboratorial detecta e soluciona os casos de pseudoplaquetopenia. *Revista Médica* 2011; 9.

Naoum FA. Doenças que alteram os exames hematológicos. Atheneu, Rio de Janeiro, 2017.

Palmer L, Briggs C, McFadden S, Zini G, Burthem J, Rozenberg G, et al. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int J Lab Hematol.* 2015 Jun;37(3):287-303.

Prates RF, Viana RC, Oliveira MV, Souza CL. Pseudotrombocitopenia: incidência e estratégia para resolução em laboratório de análises clínicas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2017; 53:6.