

Técnica do "Chop": protocolo inovador de transporte de amostra de plasma fresco congelado para controle de qualidade

"Chop" technique: innovative protocol for transporting fresh frozen plasma samples for quality control

Adriana Guimarães Estácio¹, Higor Raphael Freitas Lavareda², Amanda Larissa Figueiredo do Rosário², Lacy Cardoso de Brito Junior³

¹ Mestre. Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA), Gerente da Gerência de Controle de Qualidade, Biomédica. Belém, PA, Brasil.

² Especialista em Hematologia Clínica com ênfase em Citologia Hematológica, Centro Universitário Faculdade Integrada Brasil Amazônia, Biomédico(a). Belém, PA, Brasil.

³ Doutor / Universidade Federal do Pará – Professor / Pesquisador. Belém, PA, Brasil.

Resumo

Objetivo: Descrição e validação de um novo protocolo de congelamento individual de amostras de plasma fresco congelado (PFC), técnica do "Chop" (sacolê), para o transporte de longas distâncias. **Método:** Baseia-se na adição de alíquota de 3mL de PFC em um tubo de ensaio seco com tampa, seguida de armazenamento do mesmo em um saco plástico de polietileno, padrão "chop" (sacolê), com retirada do ar e amarração superior; introdução desse conjunto em um copo plástico descartável de 200mL; posterior contenção da estrutura do tubo e saco plástico ao copo com fita adesiva de papel; e, por fim, preenchimento do copo com água e congelamento a -20°C por 24 horas. A validação foi realizada em duas etapas: uma randômica, para determinar o tempo máximo de estabilidade e de conservação das amostras através das dosagens do teor de fator VIII (FVIII:C) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa); e a outra em tempo real, através da avaliação do TTPa após transporte entre duas unidades da hemorrede estadual. **Resultados:** A validação randômica revelou perda média de $\leq 20\%$ de FVIII:C para transportes que não ultrapassem 8 horas. Na validação em tempo real as amostras foram transportadas entre os hemocentros regionais de Marabá ou Santarém e o hemocentro coordenador em Belém, com as dosagens de TTPa mostrando resultados semelhantes aos do estudo randômico. **Conclusão:** A técnica do "Chop" mostrou-se eficiente em manter a estabilidade da estrutura de gelo e das amostras de PFC durante o transporte por até 8 horas, com perda média de FVIII:C $\leq 20\%$.

Palavras-chave: Plasma; Estudo de Validação; Controle de Qualidade; Fator VIII.

Abstract

Objective: Description and validation of a new individual freezing protocol of frozen fresh plasma samples (FFPS), "Chop" technique (sacolê) for the transport of long distances. **Methods:** It is based on the addition of 3ml FFPS aliquot in a dry test tube with stored covers of the same in a plastic polyethylene bag, standard "chop" (sacolê), with air withdrawal and upper mooring; introduction of that set in a disposable plastic cup of 200ml; posterior containment of the tube structure and plastic bag to the glass with paper adhesive tape; and filling the glass with water and freezing at -20°C per 24 hours. Validation was carried out in two stages: a random to determine the maximum stability and storage time of the samples through the dosages of the factor VIII (FVIII: C) and the activated partial thromboplastin time (APTT); and another real-time, through the evaluation of APTT after transport between two units of the state hemorrhide. **Results:** Random validation revealed average loss of $\leq 20\%$ of FVIII: C for transportation that did not exceed 8 hours. In real-time validation the samples were transported between the regional hemocenters of Marabá or Santarém and the coordinator hemocenter in Bethlehem, with APTT dosages showing results similar to those of the random study. **Conclusion:** The "chop" technique was efficient in maintaining the stability of the ice structure and FFPS samples during transport for up to 8 hours, with a mean loss of FVIII: C $\leq 20\%$.

Keywords: Plasma; Validation Study; Quality Control; Factor VIII.

Correspondência

Lacy Cardoso de Brito Junior

E-mail: lcdbrito2@gmail.com

Recebido em 26/07/2021 | Aprovado em 10/03/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202202169

INTRODUÇÃO

O plasma humano é constituído basicamente de água, proteínas (albumina, globulinas, fatores de coagulação, entre outras), carboidratos e lipídios. Sua constituição permite a produção de diversos produtos de uso na prática médica, como hemocomponente e hemoderivado. Em especial o hemocomponente chamado plasma fresco congelado (PFC) pode ser produzido por processo de centrifugação de uma unidade de sangue total ou por extração direta do paciente através do método de aférese. Nos dois casos, o hemocomponente produzido deve ser submetido a congelamento em -20°C (ou temperaturas inferiores), entre 8 horas e 24 horas após a coleta, e mantido sob as mesmas condições afim de manter a estabilidade dos fatores de coagulação.⁽¹⁻⁴⁾

O PFC, em função das suas características bioquímicas, pode ter o seu uso terapêutico associado a pelo menos três condições específicas, como bolsas de plasma convalescente rico em anticorpos neutralizantes para uso em pacientes graves no curso da Covid-19;⁽⁵⁻⁷⁾ fracionado a crioprecipitado rico em fator VIII:C da coagulação para uso em pacientes deficientes desse fator; ou ainda para ser beneficiado na indústria para a produção de medicamentos (hemoderivados).^(1,3,4)

Especificamente em relação ao uso terapêutico das bolsas de PFC para o tratamento de distúrbios da coagulação é necessário, porém, após o descongelamento das bolsas, garantir a qualidade desse produto mediante testes laboratoriais de controle de qualidade para a determinação do teor de fator VIII da coagulação (FVIII:C) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Segundo a legislação brasileira vigente, essa prática é realizada de forma amostral de pelo menos 1% da produção mensal de PFC ou de 10 unidades/mês produzidas.^(2,3,8) Os resultados desses testes, contudo, podem ser prejudicados quando as amostras de bolsas de PFC a serem testadas precisam ser transportadas de uma unidade hemoterápica para outra, seja pelas grandes distâncias a serem percorridas, por falhas nas condições de acondicionamento das amostras ou mesmo em função do tipo de transporte (aéreo ou terrestres) das mesmas, ocasionando o decréscimo de FVIII:C na amostra em função de descongelamento da amostra.⁽⁸⁾

Este cenário é bem evidenciado, por exemplo, na hemorrede do estado do Pará, onde as condições geográficas, grandes distâncias intermunicipais e a logística de transporte aéreo diário são os grandes desafios para manter a qualidade das amostras de PFC transportadas entre as unidades da hemorrede estadual e o hemocentro coordenador (Fundação

HEMOPA). Sendo essa também a realidade de tantas outras unidades da federação em todo o País.

Assim, o objetivo deste estudo foi promover a descrição e validação de um novo protocolo de congelamento individual de amostras de plasma fresco congelado (PFC), técnica do "Chop" (sacolê), para o transporte de longas distâncias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização do estudo

Estudo metodológico de descrição e validação randomizada e em tempo real da técnica do "Chop" (sacolê) de transporte de amostras de PFC destinadas a teste de controle de qualidade entre unidades da hemorrede do estado do Pará a ser implantada na Fundação HEMOPA.

Descrição da técnica do "Chop"

Baseou-se na criação de metodologia inovadora e de baixo custo para o transporte de amostras de PFC destinadas a teste de controle de qualidade entre unidades de uma hemorrede. Para tanto, primeiro realizou-se o descongelamento de quatro unidades de bolsa de PFC em banho-maria a 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), com posterior coleta de 3mL de amostras de cada uma das bolsas em tubos de ensaio de vidro de dimensões de 12x75mm com tampas devidamente identificados.

Em seguida cada tubo tampado foi armazenado individualmente em um saco plástico de polietileno de dimensões de 6x24cm, padrão "Chop" (sacolê), sendo retirado todo o ar do saco e feita uma amarração na extremidade aberta do mesmo. Em seguida esse conjunto tubo-saco foi colocado dentro de um copo plástico descartável com capacidade de 200mL que, por sua vez, foi envolto com fita adesiva de papel desde a parte superior da tampa do tubo até o fundo do copo, dando-se uma volta completa da fita sobre este conjunto tubo-copo, com o intuito de fixar o tubo a 90° em relação ao fundo do copo. Posteriormente, esse conjunto tubo-copo foi preenchido com água até o volume máximo do copo e submetido a congelamento em temperatura -20°C por, no mínimo 24 horas para a formação de bloco de gelo que envolveu o tubo com a amostra de PFC.

Embalagem de transporte

As amostras de PFC já congeladas através da técnica do "Chop" foram então colocadas em uma embalagem secundária de isopor de tamanho médio, com capacidade de 8 litros e dimensões externas de 286x204x244mm e dimensões internas de 250x168x202mm, contendo quatro unidades de

gelox distribuídas da seguinte forma: uma unidade de gelox no fundo do isopor e sobre essa uma folha de papelão ou isopor fino; duas unidades de gelox nas paredes laterais de maior extensão da caixa de isopor; e por fim uma folha de papelão ou isopor fino que foi colocada sobre as amostras seguida da última unidade de gelox. Posteriormente, essa embalagem de isopor foi tampada, vedada com fita gomada transparente e acondicionada em uma embalagem terciária rígida de papelão de dimensões externas de 286x204x244mm que foi submetida a validação de transporte em tempo real.

Validação da técnica do “Chop”

Para a validação da técnica primeiro foi feita a validação do tempo máximo de estabilidade e de conservação das amostras de modo a simular de forma randômica o transporte de amostra de PFC. Para tanto, o tempo máximo de conservação das amostras foi testado com quatro amostras de bolsas de PFC descongeladas e armazenadas em tubos em duplicatas (n=50). O primeiro tubo de cada amostra, identificado como “tubo A”, foi submetido aos testes de dosagens do teor de FVIII:Ce TTPa de forma imediata; enquanto o segundo tubo de cada amostra, identificado como “tubo B”, foi submetido a congelamento pela técnica do “Chop” para dosagem posterior.

Em seguida, as quatro amostras dos “tubos B”, já congeladas pela técnica do “Chop” e embaladas conforme descrito, foram colocadas na embalagem secundária de isopor contendo agora um termômetro digital externo com sensor de temperatura acoplado à parede interna da embalagem de modo a garantir o controle de temperatura desse conjunto hora a hora. E ainda a identificação do momento exato do início do descongelamento e o tempo máximo de conservação das amostras de PFC congeladas pela técnica do “Chop”.

Depois dessa etapa foi realizada a validação em tempo real do transporte das amostras de PFC congeladas pela técnica do “Chop” através do transporte de amostras entre os Hemocentros Regionais de Marabá e de Santarém, que tem transporte aéreo e as maiores distâncias a serem percorridos, 441km e 697km, além do maior tempo entre a entrega das amostras, transporte e o recebimento das mesmas no hemocentro coordenador da Fundação HEMOPA.

Nesta validação, após o recebimento das amostras de PFC congeladas pela técnica do “Chop”, foi realizada a inspeção visual da integridade do conjunto do copo-tubo em relação à qualidade da estrutura de gelo e do congelamento da amostra. Posteriormente, procedeu-se à avaliação da qualidade do plasma recebido através da dosagem TTPa.

Metodologia de determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e dosagem de fator VIII da coagulação (FVIII:C)

As dosagens de TTPa e de teor FVIII:C foram realizadas por metodologia automatizada com o uso dos quites STA®-PTT Automate 5e STA®-Immuno Def VIII, Stago® (Paris, França), através do equipamento STA Compact. Contudo, como não existe um valor de referência para a avaliação da conformidade de TTPa no PFC na legislação brasileira, foi realizado o que preconiza o Ministério da Saúde,⁽⁸⁾ isto é, a obtenção do valor de testemunho normal para o TTPa através da dosagem de um *pool* de PFC acrescido de 20% do valor encontrado. Assim, para este estudo adotou-se como testemunho normal para o TTPa o intervalo de 35 a 42 segundos.

Análise estatística

As determinações de médias, desvio padrão, máximos e mínimos foram realizadas através do software Graph Pad Prism 5.0.

RESULTADOS

No Quadro 1 estão apresentados os resultados da validação randômica para as condições de tempo máximo de estabilidade da estrutura de gelo e da conservação das amostras de PFC congeladas pela técnica do “Chop”. Como resultados dessa validação foi observado que a estrutura de gelo e a conservação das amostras congeladas pela técnica do “Chop” são mantidas estáveis por até 8 horas.

No Quadro 2, por sua vez, são apresentados os resultados de teor de FVIII:C entre os tubos A e B do processo de validação randomizada para a definição da perda de FVIII:C pós-descongelamento. Tendo sido observado que para o tempo máximo de 8 horas a perda do teor FVIII é em média de 20%.

Já no Quadro 3 são apresentados os resultados da estabilidade das amostras de PFC congeladas pela técnica do “Chop” que foram submetidas à validação em tempo real através de transporte de amostras entre os Hemocentros Regionais de Marabá ou Regional de Santarém e o hemocentro coordenador da Fundação HEMOPA, em Belém. Para tanto, foram realizadas as dosagens de TTPa de todas as amostras em relação ao tempo máximo de transporte validado de 8 horas. Para esta etapa não foram realizadas as dosagens do teor de FVIII:C por não serem essas dosagens parte da rotina dessa Fundação HEMOPA.

Quadro 1

Resultado do tempo máximo de estabilidade da estrutura de gelo e de conservação das amostras de PFC congeladas pela técnica do "Chop" utilizadas na validação randômica de transporte.

Tempo Decorrido	Temperatura Interna do Isopor	Estado da Amostra e da Estrutura de Gelo
No momento do armazenamento	-25°C	Congelada
1 hora após	-25°C	Congelada
2 horas após	-25°C	Congelada
3 horas após	-24°C	Congelada
4 horas após	-23°C	Congelada
5 horas após	-23°C	Congelada
6 horas após	-21°C	Amostra congelada com bloco de gelo iniciando descongelamento
7 horas após	-20°C	Amostra congelada com bloco de gelo iniciando descongelamento
8 horas após	-20°C	Amostra congelada com bloco de gelo iniciando descongelamento
9 horas após	-18°C	Amostra descongelada com bloco de gelo diminuído de volume

Fonte: Gerência de Controle de Qualidade da Fundação HEMOPA.

Quadro 2

Resultado das dosagens de TTPa e do teor FVIII:C das amostras de PFC congeladas pela técnica do "Chop" utilizadas na validação randômica.

Amostra	Tubo A FVIII:C (UI/mL)	Tubo B FVIII:C (UI/mL)	Perda de FVIII (%)	Recuperação de FVIII:C (%)	Tubo A TTPa (seg)	Tubo B TTPa (seg)
1	1,00	0,90	10	90	37,1	42,4
2	0,90	0,70	22	78	39,3	44,5
3	1,50	1,20	20	80	35,0	37,6
4	1,60	1,30	19	81	38,8	47,5
Média	1,20	1,00	17,7	82,2	37,5	43
Mínimo	0,90	0,70	10	78	35,0	37,6
Máximo	1,60	1,30	22	90	39,3	47,5
Referência*	³ 0,70 UI/mL	³ 0,70 UI/mL	----	----	----	----
Testemunho Normal	----	----	Até 20%	³ 75%	35-42 seg	

Fonte: Gerência de Controle de Qualidade da Fundação HEMOPA.

Legenda: FVIII:C – teor de Fato VIII; TTPa - tempo de tromboplastina parcial ativado; seg – segundo; % - valor relativo; *Dados extraídos da Portaria de Consolidação nº 05/2017 (MS/Brasil).

Quadro 3

Resultados das dosagens de TTPa referentes às amostras de PFC congeladas pela técnica do "Chop" utilizadas na validação em tempo real para as condições de transporte do Hemocentro Regional de Marabá (HRM), do Hemocentro Regional de Santarém (HRS) para o hemocentro coordenador da Fundação HEMOPA em Belém, Pará.

HRM	Amostras	1	2	3	4	Testemunho Normal
	TTPa (seg)	46,5	58,7	48,2	44,3	
HRS	Amostras	1	2	3	4	
	TTPa (seg)	46,5	58,7	48,2	44,3	

Fonte: Gerência de Controle de Qualidade da Fundação HEMOPA.

Legenda: TTPa - tempo de tromboplastina parcial ativado; seg - segundo.

DISCUSSÃO

A Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017,⁽⁸⁾ no item que trata sobre a prática de controle de qualidade de bolsas de PFC, estabelece que esses testes devem ser realizados em 1% da produção mensal ou dez unidades/mês,^(2,3,8) e deve obedecer a percentual mínimo de conformidade $\geq 75\%$ em relação ao quantitativo do teor de Fator VIII (FVIII:C), Fator V da coagulação e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).^(8,9)

Essa realidade, porém, fica prejudicada quando os testes de controle de qualidade nessas amostras precisam ser realizados em uma unidade hemoterápica diferente da que produziu a bolsa de PFC, com condições geográficas, de logística e tempo de transporte desafiadoras. Nesse sentido, a Portaria Conjunta Anvisa/SAS nº 370 de 7 de maio de 2014⁽¹⁰⁾ foi criada para dispor sobre o Regulamento Técnico-Sanitário para o transporte de sangue e componentes, e ainda assim, mesmo que todos os procedimentos preconizados nessa portaria sejam observados, não fica claro qual a melhor embalagem secundária ou terciária para o transporte de amostras congeladas, a temperatura ideal de conservação e nem o tempo máximo que essas embalagens conseguem manter a amostra viável para os testes de controle de qualidade.

Diante desse cenário, criamos uma embalagem primária, técnica do "Chop" (sacolê), que permite o transporte das amostras de PFC congeladas entre unidades hemoterápicas distantes por até 8 horas de transporte, sem descongelamento da estrutura de gelo ou da amostra a ser submetida a dosagens do teor de FVIII:C e TTPa para controle de qualidade. Sendo ainda evidenciado que a perda de teor de FVIII:C nas amostras acondicionadas através da técnica do "Chop" (sacolê) tende a uma perda de teor de FVIII:C de 20%, o que está em consonância com a legislação vigente.⁽⁸⁾

Outra vantagem oferecida com a utilização da técnica do "Chop" (sacolê) de transporte de amostras de PFC para testes no controle de qualidade é que a embalagem primária, nesse caso, composta pelo conjunto tubo com amostra – saco plástico – copo plástico com estrutura de gelo, impede o vazamento da amostra para a embalagem secundária ou intermediária, garantindo assim a integridade e a estabilidade da amostra.

Na literatura, porém, são escassos os trabalhos que versam sobre esse tema. Um dos poucos estudos que encontramos que avaliam o transporte de unidades de PFC para a indústria farmacêutica como insumo para produção de medicamentos hemoderivados foi o de Adati et al.,⁽¹¹⁾ que analisaram apenas indicadores do processo de obtenção das unidades de PFC

como: validação do processo de congelamento e o tempo e a temperatura praticados entre a coleta do sangue total e o congelamento das unidades de PFC,⁽¹²⁻¹⁵⁾ ao passo que a metodologia de transporte das unidades de PFC se baseou no acondicionamento das unidades de PFC de forma individual em sacos plásticos munidos de fecho hermético em caixas de material rígido e gelo reciclável visando à manutenção das amostras e seguindo o recomendado na Portaria Conjunta Anvisa/SAS nº 370.⁽¹⁰⁾

Esses autores, contudo, não avaliaram a temperatura do transporte de amostras como fator crítico para os resultados de teor de Fator VIII:C, e desse modo apenas 38,5% (131) das unidades de PFC analisadas puderam ser consideradas conformes, com teor de Fator VIII:C recuperado $\geq 0,70$ UI/mL, para uso como insumo farmacêutico. Isso sugere que possivelmente as embalagens secundárias, terciárias e quaternárias poderiam ter influenciado no baixo número de unidades de PFC com teor de FVIII:C dentro do esperado.

CONCLUSÃO

A descrição e a validação do protocolo de congelamento individual de amostras de plasma fresco congelado (PFC), técnica do "Chop" (sacolê), para o transporte de longas distâncias aqui propostas mostraram-se eficientes em manter a estabilidade da estrutura de gelo e as amostras de PFC congeladas por até 8 horas de transporte, com perda média do teor de FVIII de 20%, demonstrando assim a sua viabilidade para uso entre unidades da federação brasileira que tenham características geográficas e de logística semelhantes à da hemorrede do estado do Pará.

REFERÊNCIAS

1. Sousa RL, Ferreira LC, Garcia FL, Franco LHM, Alves LL. Plasma fresco congelado, plaquetas e crioprecipitado: quando e como usar. Hospital Madre Teresa, Belo Horizonte, MG, Brasil. Rev Méd Minas Gerais. 2014;24(Supl.8):S81-S86. doi: 10.5935/2238-3182.20140131.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação no 05 de 28/09/2017, do Ministério da Saúde. Brasília: Diário Oficial da União, 2017.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Guia para uso de hemocomponentes, 2. ed., 1. Reimp. Brasília, 2015. 136p.
4. Campos LR, Cerqueira AJB, Campos CJB, Souza JGBP, Novello R, Pessôa VLR, Feitosa ACF. Transfusão de hemocomponentes em crianças: o quê, quando e como usar? Resid Pediatr. 2015;5(1):14-20. doi: <https://doi.org/10.25060/residpediatr-2015.v5n1-03>.
5. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al. China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. N Engl J Med. 2020;28. doi: 10.1056/NEJMoa2002032.

6. Chenguang Shen, Zhaoqin Wang, Fang Zhao, Yang Yang, Jinxiu Li, Jing Yuan, et al. Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma. *JAMA*. 2020;323(16):1582-89.
7. Roback JD, Guarner J. Convalescent Plasma to Treat COVID-19 Possibilities and Challenges. *JAMA*. 2020;323(16):1561-2.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Manual de vigilância sanitária para o transporte de sangue e componentes no âmbito da hemoterapia. 2. ed. Brasília, DF: MS; 2016.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 34, de 11 de junho de 2014. Dispõe sobre as boas práticas no ciclo do sangue. *Diário Oficial União*, nº113, de 16 de junho de 2014.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Secretaria de Atenção a Saúde – SAS. Portaria conjunta Anvisa/SAS nº 370, de 07 de maio de 2014. Dispõe sobre o regulamento técnico sanitário para transporte de sangue e componentes. *Diário Oficial União*. 8 de maio de 2014.
11. Adati MC, Almeida AECC, Ribeiro AS, Balthazar HC, Borges G, Issope MAS. Plasma fresco congelado: insumo farmacêutico para produção de medicamentos hemoderivados. *Vigil. sanit. debate* 2019;7(2):51-61. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.01283>.
12. Farrugia A. Plasma for fractionation: safety and quality issues. *Haemophilia*. 2004;10(4):334-40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2004.00911>.
13. Naghadeh HT, Roudkenar MH. A study of the quantity of some stable and labile coagulation factors in fresh frozen plasma produced from whole blood stored for 24 hours in Iran. *Blood Transfus*. 2009;7(1):39-42. <https://doi.org/10.2450/2008.0022-08>.
14. Cardigan R, Lawrie AS, Mackie IJ, Williamson LM. The quality of fresh-frozen plasma produced from whole blood stored at 4°C overnight. *Transfusion*. 2005;45(8):1342-8. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.00219.x>.
15. Cardigan R, Van der Meer PF, Pergande C, Cookson P, Baumann-Baretti B, Cancelas JA et al. Coagulation factor content of plasma produced from whole blood for 24 hours at ambient temperature: results from an international multicenter BEST Collaborative study. *Transfusion*. 2011;51 (Supl.1); s50-7. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02963>.