

RECOMENDAÇÕES DA
Sociedade Brasileira
**de Patologia Clínica/
Medicina Laboratorial**
(SBPC/ML):

FATORES PRÉ-ANALÍTICOS
E INTERFERENTES EM
ENSAIOS LABORATORIAIS

Recomendações da
Sociedade Brasileira
de Patologia Clínica/
Medicina Laboratorial
(SBPC/ML)

**Fatores pré-analíticos
e interferentes em
ensaios laboratoriais**

Recomendações da
Sociedade Brasileira
de Patologia Clínica/
Medicina Laboratorial
(SBPC/ML)

**Fatores pré-analíticos
e interferentes em
ensaios laboratoriais**



Copyright © 2018 Editora Manole Ltda., por meio de contrato com a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML)

Copyright © Logotipo: Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML)

Minha editora é um selo editorial Manole

Capa: Sopros Design

Projeto gráfico: Vivian Valli

Diagramação: Dília Editorial

Coordenação Editorial: Dília Editorial

CIP-Brasil. Catalogação na Publicação
Sindicato Nacional dos Editores de livros, RJ

R248

Recomendações da sociedade brasileira de patologia clínica/medicina laboratorial (SBPC/ML) : fatores pré-analíticos e interferentes em ensaios laboratoriais / Adagmar Andriolo ... [et al.] ; organização Nairo Massakazu Sumita ... [et al.] - 1. ed. - Barueri [SP] : Manole, 2018.

464 p. : il. ; 24 cm.

Inclui índice

ISBN 978-85-7868-359-7

1. Diagnóstico de laboratório. I. Andriolo, Adagmar. II. Sumita, Nairo Massakazu.

18-50511

CDD: 616.0756

CDU: 616-074

Meri Gleice Rodrigues de Souza - Bibliotecária CRB-7/6439

Todos os direitos reservados.

Nenhuma parte deste livro poderá ser reproduzida, por qualquer processo, sem a permissão expressa dos editores.

É proibida a reprodução por xerox.

A Editora Manole é filiada à ABDR – Associação Brasileira de Direitos Reprográficos.

Edição – 2018

Editora Manole Ltda.

Avenida Ceci, 672 – Tamboré

06460-120 – Barueri – SP – Brasil

Tel.: (11) 4196-6000

www.manole.com.br

<https://atendimento.manole.com.br/>

Impresso no Brasil

Printed in Brazil

Durante o processo de edição desta obra, foram tomados todos os cuidados para assegurar a publicação de informações precisas e de práticas geralmente aceitas. Do mesmo modo, foram empregados todos os esforços para garantir a autorização das imagens aqui reproduzidas. Caso algum autor sinta-se prejudicado, favor entrar em contato com a Editora.

Os autores e os editores eximem-se da responsabilidade por quaisquer erros ou omissões ou por quaisquer consequências decorrentes da aplicação das informações presentes nesta obra. É responsabilidade do profissional, com base em sua experiência e conhecimento, determinar a aplicabilidade das informações em cada situação.

ORGANIZADORES

Nairo Massakazu Sumita
Adagmar Andriolo
Wilson Shcolnik
Gustavo Aguiar Campana
Fábio Vasconcellos Brazão
Carlos Alberto Mayora Aita
Guilherme Ferreira de Oliveira
Carlos Eduardo dos Santos Ferreira
César Alex de Oliveira Galoro
Maria Elizabete Mendes

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial (SBPC/ML)

Diretoria: Biênio 2018/2019

Presidente: Wilson Shcolnik

Vice-presidente: Gustavo Aguiar Campana

Diretoria Executiva:

Diretor Administrativo-financeiro: Fábio Vasconcellos Brazão

Diretor Científico: Nairo Massakazu Sumita

Diretor de Comunicação e Marketing: Carlos Alberto Mayora Aita

Diretor de Acreditação e Qualidade: Guilherme Ferreira de Oliveira

Diretor de Ensino: Carlos Eduardo dos Santos Ferreira

Presidente do Conselho de Ex-presidentes: César Alex de Oliveira Galoro

Organizadores

Adagmar Andriolo

Médico patologista clínico. Professor-associado e livre-docente de Medicina Laboratorial da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp). Chefe da Disciplina de Clínica Médica e Medicina Laboratorial do Departamento de Medicina da EPM-Unifesp. Editor-chefe do *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Coordenador da Comissão de Residência Médica da EPM-Unifesp.

Carlos Alberto Mayora Aita

Médico patologista clínico. Mestre em Imunologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Doutor em Bioquímica pelo Instituto de Química (IQ) da USP. Patologista clínico e responsável técnico do Diagnósticos do Brasil. Professor de Imunologia Clínica Laboratorial na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). Diretor de Comunicação e Marketing da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) – biênio 2018-2019. Presidente Regional Sul da SBPC/ML – biênio 2016-2017.

Carlos Eduardo dos Santos Ferreira

Médico patologista clínico. Gerente médico do Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE). Coordenador médico do Setor de Imunoquímica do Laboratório Central do Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp). Mestre em Medicina pela EPM-Unifesp. Doutor em Medicina pela Disciplina de Cardiologia – Setor de Lípidos da EPM-Unifesp. MBA em Gestão de Saúde pelo Instituto de Ensino e Pesquisa (Insper/HIAE). Diretor de Ensino da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) – biênio 2018-2019.

César Alex de Oliveira Galoro

Médico patologista clínico. Doutor em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). *Post-Doctoral Fellowship* na McGill University (Montreal, Canadá). MBA em Gestão da Saúde pela Fundação Getúlio Vargas (FGV-SP). Gestor médico institucional do Grupo Sabin. Presidente do Conex da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) – biênio 2018-2019.

Fábio Vasconcellos Brazão

Médico patologista clínico. Diretor médico do Laboratório Ruth Brazão (Belém/PA). Médico patologista clínico da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (FSCMP). Coordenador médico do Laboratório da Unimed Belém. Especialização em Patologia Clínica pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Presidente Regional Norte da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) – biênio 2016-2017. Diretor administrativo-financeiro da SBPC/ML – biênio 2018-2019. cursando MBA em Gestão de Cooperativas na Faculdades Integradas de Taquara (FACCAT).

Guilherme Ferreira de Oliveira

Médico patologista clínico. Mestre em Promoção da Saúde pela Universidade de Franca/SP (Unifran). Especialista em Medicina Tropical pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). MBA em Gestão Empresarial pela Fundação Getúlio Vargas (FGV). Diretor adjunto-administrativo de Expansão do Grupo Sabin. Diretor de Acreditação e Qualidade da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) – biênios 2004-2005 e 2018-2019.

Gustavo Aguiar Campana

Médico especialista em Patologia Clínica/Medicina Laboratorial pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). MBA em Gestão em Saúde pela Fundação Getúlio Vargas (FGV-SP). Vice-presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) – biênio 2018-2019. Diretor médico da Diagnósticos da América (Dasa).

Maria Elizabete Mendes

Médica patologista clínica. Doutora em Patologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Chefe de Seção Técnica de Bioquímica de Sangue da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas (HC) da FMUSP. Responsável pelo Núcleo de Qualidade e Sustentabilidade da Divisão

de Laboratório Central do HC da FMUSP. Membro do Grupo de Discussão de Indicadores da Controllab da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). Certificado *Green Belt* em Seis Sigma pela Fundação Carlos Alberto Vanzolini (FCAV).

Nairo Massakazu Sumita

Médico patologista clínico. Professor-assistente doutor da Disciplina de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Diretor do Serviço de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP (LIM 03 da Patologia Clínica). Assessor médico em Bioquímica Clínica do Fleury Medicina e Saúde. Consultor científico do Latin American Preanalytical Scientific Committee (Lasc) e membro do editorial *Board* (specimencare.com). Diretor científico da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) – biênio 2018-2019. Diretor para a América Latina da World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (WASPaLM).

Wilson Shcolnik

Médico patologista clínico. Doutorando em Patologia pela Universidade de São Paulo (USP). Mestre em Saúde Pública pela Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP/Fiocruz). MBA em Gestão pela Qualidade Total pela Universidade Federal Fluminense (UFF). Gerente corporativo de Relações Institucionais do Grupo Fleury. Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) – biênio 2018-2019. *Fellow* do Colégio Brasileiro de Executivos em Saúde (CBEX-RJ).

Autores

Adagmar Andriolo

Médico patologista clínico. Professor-associado e livre-docente de Medicina Laboratorial da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp). Chefe da Disciplina de Clínica Médica e Medicina Laboratorial do Departamento de Medicina da EPM-Unifesp. Editor-chefe do *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Coordenador da Comissão de Residência Médica da EPM-Unifesp.

Adriana Caschera Leme Faulhaber

Bacharela em Ciências Biológicas pela Universidade São Judas Tadeu (USJT). Especialista em Análises Clínicas pelo Conselho Regional de Biologia (CRBio-SP). MBA em Gestão de Saúde pelo Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (Insper/HIAE). Coordenadora técnica do Serviço de Química Clínica do Laboratório Clínico do HIAE.

Alicia Olascoaga Denis

Médica patologista clínica. Pós-graduação em Patologia Clínica pela Escuela de Graduados de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República (UdelaR). Especialista em Gestão da Qualidade para Laboratórios Clínicos pela Universidade Tiradentes (Unit). Professora-agregada responsável pela Unidade de Bioquímica do Departamento de Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de las Clínicas de la Facultad de Medicina de la UdelaR. Coordenadora da Comissão de Educação Médica Continuada da Sociedad Uruguaya de Patología Clínica (Supac).

Alvaro Pulchinelli Junior

Médico patologista clínico. Médico do trabalho. Doutor em Ciências pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp). Professor-afluído da Disciplina de Patologia Clínica da EPM-Unifesp. Preceptor Centro Alfa da EPM-Unifesp. Presidente regional da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) – biênio 2018-2019. Membro da Câmara Técnica de Patologia Clínica do Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo (Cremesp). Assessor médico em Bioquímica Clínica e Toxicologia do Fleury Medicina e Saúde.

Ana Margarita Baldion Elorza

Médica anatomopatologista e patologista clínica. Docente cátedra da Universidad de los Andes e da Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá, Colômbia). Chefe da Seção de Patologia do Hospital Universitario da Fundación Santa Fe de Bogotá. Membro do Latin American Scientific Preanalytical Committee (Lasc).

Andreza Oliveira dos Santos

Graduada em Biomedicina pela Fundação Lusíada (Santos-SP). Mestra em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Analista de laboratório no Setor de Hematologia e Coagulação do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE). Analista em Coagulação da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Anna Barindelli Denis

Médica patologista clínica. Professora-agregada e chefe do Laboratório de Urgências e Emergências do Hospital de Clínicas (Montevideu, Uruguai). Especialista em Gestão da Qualidade em Laboratórios de Análises Clínicas. Presidente da Comissão de *Point of Care* do Hospital de Clinicas (Montevideu, Uruguai).

Antonia Maria de Oliveira Machado

Médica patologista clínica. Mestra e doutora em Medicina pelo Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp). Professora-afluída da Disciplina de Clínica Médica/Medicina Laboratorial do Departamento de Medicina da EPM-Unifesp. Coordenadora técnica do Laboratório Central do Hospital São Paulo (HU-Unifesp).

Carlos Augusto Senne Soares

Médico patologista clínico. Professor instrutor da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Santa Casa de São Paulo. Médico responsável pelo Serviço de líquido cefalorraquidiano (LCR) do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE). Coordenador do Laboratório de LCR do Hospital Emílio Ribas. Diretor-presidente do Laboratório Senne Liqueur Diagnóstico.

Carlos Eduardo dos Santos Ferreira

Médico patologista clínico. Gerente médico do Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE). Coordenador médico do Setor de Imunoquímica do Laboratório Central do Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp). Mestre em Medicina pela EPM-Unifesp. Doutor em Medicina pela Disciplina de Cardiologia – Setor de Lípidos da EPM-Unifesp. MBA em Gestão de Saúde pelo Instituto de Ensino e Pesquisa (Insper/HIAE). Diretor de Ensino da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) – biênio 2018-2019.

Carlos Vega

Tecnólogo médico formado pela Universidade de Talca (Chile), com 30 anos de experiência no laboratório clínico. Chefe do laboratório da Clínica Dávila. Líder do projeto de Acreditação pela Norma ISO 15189. Presidente da Sociedade Científica de Tecnólogos Médicos do Chile. Auditor do Sistema Nacional de Acreditação. Membro do Latin American Scientific Preanalytical Committee (Lasc). Coordenador do projeto de Acreditação do laboratório da Clínica Dávila pelo American College of Pathologists (ACP).

Carolina Giselle Trunzo

Bioquímica formada pela Universidad de Morón (Buenos Aires). Mestra em Gestão e Administração de Sistemas e Serviços de Saúde pela Universidad Favaloro. Chefe de Gestão e Processos do Laboratório do Hospital Británico de Buenos Aires – Laboratório Central. Membro do Latin American Scientific Preanalytical Committee (Lasc).

Célia Regina Garlipp

Farmacêutica-bioquímica com mestrado em Genética e Biologia Molecular e doutorado em Genética Humana pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). MBA em Gerência em Saúde pela Fundação Getúlio Vargas (FGV). Diretora-associada da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unicamp no período de 07/2014-08/2016. Atualmente, é professora-associada do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Celso Francisco Hernandez Granato

Médico infectologista e patologista clínico. Professor livre-docente da Disciplina de Infectologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp). Médico-assessor para Infectologia do Grupo Fleury.

Christiane Pereira Gouvea

Médica hematologista. Doutora pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Responsável pelo Setor de Coagulação da Divisão do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Assessora para Hemostasia do Fleury Medicina e Saúde.

Cristóvão Luis Pitangueira Mangueira

Médico patologista clínico e reumatologista. Doutor em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). MBA em Gestão de Saúde pelo Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (Insper-HIAE). Diretor médico do Departamento de Patologia Clínica e Anatomia Patológica do HIAE. Docente colaborador do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEP-HIAE). Supervisor do Programa de Residência Médica em Patologia Clínica do HIAE.

Denise dos Anjos Laurentis de Sousa Campos

Médica patologista clínica. Médica-assistente do Setor de Imunologia do Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE). Preceptora do Programa de Residência Médica em Patologia Clínica do HIAE.

Eduardo Brambila Colombres

Farmacologista químico. Graduado pela Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), México. Tem 35 anos de experiência. Mestre e Doutor em Ciências, especialidade em Biologia Clínica, pelo Instituto Politécnico Nacional (México). Professor-pesquisador da Facultad de Ciencias Químicas da BUAP. Responsável pelo Laboratório de Pesquisa em Química Clínica da Facultad de Ciencias Químicas. Diretor do Programa de Controle de Qualidade ECCEX-CONAQUIC (México). Membro do Latin American Scientific Preanalytical Committee (Lasc).

Eduardo Jorge Emery Carvalho Pinto

Médico patologista clínico. Ex-professor-assistente de Imunologia da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (Unirio). Mestre em Imunologia e Microbiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Coordenador do

Comitê de Imunologia da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). Presidente Regional (Rio de Janeiro) da SBPC/ML – biênio 2018-2019. Membro da Câmara Técnica de Patologia Clínica do Conselho Regional de Medicina do Estado do Rio de Janeiro (Cremerj).

Fabiano de Almeida Brito

Médico patologista clínico e reumatologista. Doutorando em Patologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Professor-assistente do Departamento de Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina da UFMG. Assessor-médico do Laboratório Hermes Pardini.

Felipe Magalhães Furtado

Médico hematologista. Doutor em Ciências Médicas pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Consultor médico do Sabin Medicina Diagnóstica. Médico do Hospital da Criança de Brasília José de Alencar.

Fernando Brunale Vilela de Moura Leite

Médico patologista clínico. Título de especialista em Patologia Clínica. Médico do Laboratório Senne Liquor Diagnóstico.

Gustavo Barcelos Barra

Farmacêutico clínico industrial. Doutor em Ciências da Saúde pela Universidade de Brasília (UnB). Professor orientador do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UnB. Coordenador de Pesquisas do Sabin Medicina Diagnóstica.

Gustavo Bruniera Peres Fernandes

Médico especialista em Patologia Clínica/Medicina Laboratorial pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). Membro associado da Academia Brasileira de Neurologia (ABN). Mestre pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp). Diretor operacional do Senne Liquor Diagnóstico.

Gustavo Loureiro

Médico hematologista e patologista clínico. Doutor em Ciências pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp). Assessor-médico para Hospitais e Bioquímica Clínica do Grupo Fleury.

Ismar Venâncio Barbosa

Médico patologista clínico. Pós-graduação em Gestão Empresarial pela Fundação Getúlio Vargas (FGV). *Leader Auditor* ISO pela MCG. Assessor-médico do Grupo Fleury Nova América no Rio de Janeiro. Diretor médico da Qualilab Serviços Médicos. Suplente do Conselho Fiscal da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) – biênio 2017-2018.

Jellin Chiaoting Chuang Zambon

Médica endocrinologista formada pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp). Especialista em Clínica Médica e em Endocrinologia e Metabologia. Membro da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) e da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Membro da Câmara Técnica do Médico Jovem do Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo (Cremesp).

João Carlos de Campos Guerra

Médico hematologista, onco-hematologista e patologista clínico. Especialista em Patologia Clínica pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). Especialista em Hematologia e Hemoterapia pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) e pela Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (ABHH). Doutor em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Membro do Corpo Clínico e Responsável pelo Laboratório Clínico do Centro de Hematologia de São Paulo (CHSP). Professor colaborador do Programa de Pós-Graduação em Patologia Clínica e da Residência Médica em Hematologia. Coordenador Médico do Setor de Hematologia/Coagulação do Departamento de Patologia Clínica do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE). Membro do Centro de Oncologia e Hematologia do HIAE.

Kaline Maria Nogueira de Lucena Fonseca

Médica patologista clínica. Formada pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Residência médica em Patologia Clínica na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Diretora técnica no Centro de Patologia Clínica de Natal/Rio Grande do Norte (RN). Representante regional da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) do RN – biênio 2018-2019.

Kátia Regina Cesar

Biomédica. Mestra em Ciências Nefrológicas pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/Unifesp). Coordenadora técnica de Controle de Qualidade e *Point of Care* do Fleury Medicina e Saúde.

Leonardo de Souza Vasconcellos

Médico patologista clínico. Mestre e Doutor em Medicina pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Professor de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina da UFMG. Professor orientador pleno do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG. Coordenador do Programa de Residência Médica em Patologia Clínica/Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG). Coordenador da Unidade de Laboratório de Patologia Clínica do HC-UFMG. Presidente do Departamento de Patologia Clínica da Associação Médica de Minas Gerais. Coordenador do Comitê Científico “Educação em Patologia Clínica” da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML), biênios 2016-2017 e 2018-2019.

Lívia de Oliveira Soares

Graduada em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Celso Lisboa. Especialista em Qualidade, Segurança, Meio Ambiente e Saúde. Supervisora da Gestão de Serviços da Controllab.

Lívia Sachi Gazarini

Biomédica. Pós-graduada em Biotecnologia pela Faculdade Oswaldo Cruz. MBA em Marketing pela Fundação Getúlio Vargas (FGV). Gerente de *Medical Affairs* da BD Life Sciences – Preanalytical Systems.

Luiza Bottino Grangeiro Balli

Bacharela em Química com Atribuições Tecnológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Mestra em Química pela UFRJ. MBA em Gestão de Serviços pela Fundação Getúlio Vargas (FGV/RJ) e Supervisora da Gestão de Serviços da Controllab.

Marcelo Cidade Batista

Médico patologista clínico e endocrinologista. Formado pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Doutor em Tecnologia Nuclear Aplicada à Medicina pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da USP. Pós-doutorado no Developmental Endocrinology Branch, National Institutes of Health (NIH, Estados Unidos). Médico consultor do Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE) e Diretor médico dos Laboratórios Endoplus e Bio-Médico.

Marcelo Henrique Wood Faulhaber

Médico patologista clínico. MBA executivo pela Coppead da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). MBA em Gestão Estratégica de Saúde pela Estácio de Sá. Ex-diretor-geral do Laboratório Sérgio Franco. Ex-coordenador médico do

Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE). Ex-diretor técnico do Instituto Adolfo Lutz. Assistente de Direção da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Maria Elizabete Mendes

Médica patologista clínica. Doutora em Patologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Chefe de Seção Técnica de Bioquímica de Sangue da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP. Responsável pelo Núcleo de Qualidade e Sustentabilidade da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP. Membro do Grupo de Discussão de Indicadores da Controllab da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). Certificado *Green Belt* em Seis Sigma pela Fundação Carlos Alberto Vanzolini (FCAV).

Maria Julia Santana Kenj

Enfermeira graduada pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). MBA em Gestão da Saúde pela Fundação Getulio Vargas (FGV-SP). Mestre pela Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP). Doutora pela Universidade de São Paulo (USP). Pós-doutorado pela USP. Coordenadora do Departamento de Enfermagem da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) – gestão 2016-2017. Coordenadora do Grupo Brasileiro de Tecnologias e Controle do Diabetes da SBD – gestão 2018-2019. Representante na América Latina da American Association of Diabetes Educators (AADE) – gestão 2014-2016.

Maria Julieta Garcia

Bioquímica. Graduada pela Universidad Nacional del Sur (Argentina). Supervisora clínica da Conosur Hub, BD PAS. Membro do Latin American Scientific Preanalytical Committee (Lasc).

Maria Mercedes Zirpoli

Bioquímica. Graduada pela Universidade de Buenos Aires (UBA). Especialista em Gestão e Administração de Sistema de Saúde concedido pela Universidad Austral (Argentina). Especialista em Gestão da Qualidade pelo Colégio de Bioquímica da Província de Buenos Aires (Argentina). Subchefe do Laboratório do Hospital Universitario Austral (Buenos Aires, Argentina). Auditora do Organismo Argentino de Acreditação, Norma ISO 15189. Membro do Latin American Scientific Preanalytical Committee (Lasc).

Maria Rita Elmor de Araujo

Médica patologista e microbiologista clínica. Coordenadora médica do Setor de Microbiologia do Laboratório Clínico do Hospital do Coração de São Paulo (HCor-SP) e médica do Setor de Microbiologia do Departamento de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Marileia Scartezini

Farmacêutica bioquímica. Mestre em Bioquímica e Doutora em Genética pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Pós-doutorado em Hipercolesterolemia Familiar pela University College London (UCL, Reino Unido). Professora-associada da UFPR na Disciplina de Bioquímica Clínica (aposentada). Professora colaboradora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR. Membro do Conselho Editorial do periódico científico *Clinical Chimica and Laboratory Medicine* (2010-2013). Consultora científica em Dislipidemias e *Point of Care Testing*.

Marinês Dalla Valle Martino

Médica patologista clínica. Especialista em Patologia Clínica pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). Mestre e doutora pela Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP). Professora-adjunta da Disciplina de Microbiologia da FCMSCSP. Coordenadora médica do Setor de Microbiologia do Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE).

Nairo Massakazu Sumita

Médico patologista clínico. Professor-assistente Doutor da Disciplina de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Diretor do Serviço de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP (LIM 03 da Patologia Clínica). Assessor médico em Bioquímica Clínica do Fleury Medicina e Saúde. Consultor científico do Latin American Pre-analytical Scientific Committee (Lasc) e membro do editorial *Board* (specimencare.com). Diretor científico da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) – biênio 2018-2019. Diretor para a América Latina da World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (WASPaLM).

Nelson Medeiros Junior

Médico patologista clínico. Doutor em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). MBA em Gestão Executiva na Área de Saúde pelo Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein

(Insper-HIAE). Auditor do American College of Pathologists. Diretor do Serviço de Hematologia, Citologia e Genética da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas (HC) da FMUSP e médico patologista clínico do Laboratório do Hospital do Coração de São Paulo (HCor-SP).

Paschoalina Romano

Farmacêutica bioquímica. Graduada pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Especialista em Análises Clínicas e Toxicológicas pela FCF-USP. Mestra em Ciências da Saúde pela Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). Doutoranda em Ciências da Saúde na FMUSP. Membro das Comissões de Controle de Qualidade e Indicadores de Desempenho da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas (HC) da FMUSP.

Paula Virginia Bottini

Médica patologista clínica. Doutora em Clínica Médica pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). MBA em Gerência em Saúde pela Fundação Getúlio Vargas (FGV). Atualmente, é supervisora da Seção de Líquidos Biológicos da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp.

Persio de Almeida Rezende Ebner

Biomédico. Graduado pelo Centro Universitário Barão de Mauá. Biologista chefe do Serviço de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Ex-auditor interno do Sistema Integrado de Gestão pelas Normas NBR ISO 9001 e PALC na Divisão de Laboratório Central do HC-FMUSP. Especialista em Administração Hospitalar pelo Centro Universitário São Camilo.

Rafael Monsoreo Lopes

Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade do Grande Rio (Unigranrio). Gestor de Serviços de Ensaio de Proficiência e Controles Internos da Controllab e membro do Comitê Consultivo do Programa de Indicadores Laboratoriais da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) e da Controllab.

Renan Barros Domingues

Médico neurologista clínico. Doutor em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Pós-doutorado em Neurologia pela Université Lille Nord de France (França). Assessor científico do Laboratório Senne Liquor Diagnóstico.

Silvia Sanches Rodrigues

Bacharel em Biomedicina. Analista de laboratório pleno do Setor de Imunologia do Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE).

Valdir Fernandes de Aranda

Graduado em Farmácia-Bioquímica nas Modalidades Análises Clínicas e Análises Toxicológicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Está vinculado às áreas de Hematologia e Coagulação do Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE/MDP – Laboratório Clínico).

William Pedrosa de Lima

Médico endocrinologista. Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Assessor médico do Hermes Pardini.

Sumário

Apresentação	XXVII
1 Gestão da qualidade como ferramenta para minimizar os erros pré-analíticos.....	1
Marcelo Henrique Wood Faulhaber, Adriana Caschera Leme Faulhaber	
2 Sistematização para estudo de interferentes na avaliação de um método laboratorial bioquímico.....	21
Leonardo de Souza Vasconcellos	
3 Fatores pré-analíticos que interferem no desempenho dos ensaios de proficiência e controle interno da qualidade	31
Controllab: Lívia de Oliveira Soares, Luiza Bottino Grangeiro Balli, Rafael Monsores Lopes	
4 Flexibilização do jejum para avaliação do perfil lipídico	49
Carlos Eduardo dos Santos Ferreira, Marileia Scartezini	
5 Potenciais interferências do gel separador e novas tecnologias.....	58
Lívia Sachi Gazarini	
6 Hemólise	71
Latin American Preanalytical Scientific Committee (Lasc): Maria Mercedes Zirpoli, Eduardo Brambila Colombres, Ana Margarita Baldion Elorza, Carlos Vega, Carolina Giselle Trunzo, Lívia Sachi Gazarini, Maria Julieta Garcia, Nairo Massakazu Sumita	
7 Índice sérico: contribuição para a qualidade e a confiabilidade dos resultados laboratoriais	87
Alicia Olascoaga Denis	

8	O impacto da temperatura no armazenamento e no transporte para estabilidade das amostras.....	96
	Anna Barindelli Denis	
9	Interferentes em imunoenaios: aspectos históricos e evolução dos métodos	111
	Eduardo Jorge Emery Carvalho Pinto	
10	Interferência da biotina nos imunoenaios	135
	Marcelo Cidade Batista	
11	Interferência da biotina nos imunoenaios: caso clínico-laboratorial	155
	William Pedrosa de Lima	
12	Sorologia de doenças infecciosas.....	161
	Celso Francisco Hernandez Granato	
13	Anticorpos antinucleares.....	167
	Cristóvão Luis Pitangueira Manguiera, Denise dos Anjos Laurentis de Sousa Campos, Silvia Sanches Rodrigues	
14	Anticorpos antinucleares: caso clínico-laboratorial.....	174
	Fabiano de Almeida Brito	
15	Interferência dos anticorpos humanos circulantes reativos contra proteínas animais (anticorpos antianimais) – <i>human anti-animal antibody (HAAA)</i>.....	178
	Maria Elizabete Mendes, Nairo Massakazu Sumita	
16	Fatores pré-analíticos no uso do teste laboratorial remoto.....	195
	Kátia Regina Cesar	
17	Dosagem de glicose capilar por glicosímetro.....	205
	Jellin Chiaoting Chuang Zambon, Maria Julia Santana Kenj	
18	Troponinas cardíacas	220
	Carlos Eduardo dos Santos Ferreira	
19	Gasometria.....	231
	Nairo Massakazu Sumita, Maria Elizabete Mendes	
20	Hemograma	249
	Nelson Medeiros Junior	
21	Dímero D.....	269
	Christiane Pereira Gouvea	

22 Cuidados pré-analíticos em citometria de fluxo para doenças hematológicas	275
Felipe Magalhães Furtado	
23 Líquido cefalorraquidiano.....	285
Fernando Brunale Vilela de Moura Leite, Renan Barros Domingues, Gustavo Bruniera Peres Fernandes, Carlos Augusto Senne Soares	
24 Tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).....	294
João Carlos de Campos Guerra, Andreza Oliveira dos Santos, Valdir Fernandes de Aranda	
25 Eletroforese de proteínas.....	301
Gustavo Loureiro	
26 Fatores pré-analíticos e interferentes no diagnóstico molecular	310
Gustavo Barcelos Barra	
27 Coleta de exames de rotina de urina.....	330
Kaline Maria Nogueira de Lucena Fonseca	
28 Exame de rotina de urina.....	339
Paula Virginia Bottini, Célia Regina Garlipp	
29 Hemocultura	346
Antonia Maria de Oliveira Machado	
30 Urocultura	358
Marinês Dalla Valle Martino	
31 Cultura geral.....	365
Maria Rita Elmor de Araujo	
32 Marcadores tumorais bioquímicos circulantes	376
Adagmar Andriolo	
33 Monitoramento terapêutico de medicamentos	386
Paschoalina Romano, Persio de Almeida Rezende Ebner	
34 Drogas de abuso	408
Alvaro Pulchinelli Junior	
35 A assessoria médica como ferramenta para discussão dos erros pré-analíticos e interferentes no laboratório clínico	416
Ismar Venâncio Barbosa	
Índice remissivo	421

Apresentação

A ATUAL DIRETORIA da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) sente-se honrada em dar continuidade à publicação de recomendações e diretrizes técnicas visando a difundir as boas práticas em laboratórios clínicos, bem como a contribuir para o processo de educação continuada dos profissionais que trabalham nesse setor da assistência à saúde.

Esta obra, dedicada a abordar fatores pré-analíticos e interferentes em exames laboratoriais, mostra-se muito oportuna, visto que a fase pré-analítica ainda compreende a que revela maior vulnerabilidade entre todas as demais que reúnem os processos laboratoriais, merecendo especial e permanente atenção.

Como novidade, esta publicação foi enriquecida com a inclusão de casos clínicos com comentários e temas relacionados a decisivas contribuições da área laboratorial, como a utilização da troponina e a definição de diagnósticos de doenças hematológicas.

Deixo aqui registrado o meu agradecimento aos autores que, gentilmente, concordaram em participar desse projeto, em especial ao Dr. Nairo Sumita, diretor científico da SBPC/ML e incansável organizador que tem nos proporcionado essas importantes realizações.

Fica também registrado o meu igual agradecimento às empresas que contribuíram com a SBPC/ML, tornando possível a concretização deste projeto: ABBOTT, BD, Controllab, Hemocue, Radiometer, Roche, Shift, Softeasy, Sysmex e TM Informática.

WILSON SHCOLNIK
Presidente da Sociedade Brasileira de
Patologia Clínica/Medicina Laboratorial
(SBPC/ML) – Biênio 2018-2019

1 Gestão da qualidade como ferramenta para minimizar os erros pré-analíticos

INTRODUÇÃO

Por definição, “qualidade” é a capacidade de atender às necessidades e expectativas do cliente. Para que um produto tenha essa característica, precisa ser produzido de maneira adequada, dentro de determinado padrão que atenda a essas necessidades e expectativas; para que isso se dê, quem o produziu precisa ter implantado um sistema de gestão da qualidade.

A medicina laboratorial pode ser considerada o setor pioneiro, na área de saúde, a introduzir e promover os conceitos da qualidade. Quando se leva esse conceito para a área do laboratório clínico, pode-se dizer que a gestão da qualidade em laboratórios funciona como um diferencial competitivo, por demonstrar um controle efetivo dos processos e de sua rastreabilidade em todos os procedimentos. A gestão da qualidade resulta em um aumento da produtividade, já que passa a otimizar melhor o tempo, a partir da utilização de procedimentos padronizados. É importante ressaltar que a implementação de Programas de Certificação e de Acreditação da Qualidade aumenta a adesão ao controle de processos e pessoas, de modo a reduzir riscos e falhas que possam comprometer a qualidade do serviço e afetar a segurança dos pacientes.

A gestão da qualidade deve seguir políticas, prevendo nestas treinamentos com foco na correta identificação do paciente e da amostra. Deve-se priorizar mecanismos informatizados que impeçam trocas de amostras.

Todas as etapas devem ser monitoradas por um sistema de indicadores, de maneira a registrar eventuais desvios e poder atuar para garantir eventuais melhorias.

Como é sabido, resultados de laboratórios são muito importantes para as decisões médicas. Estima-se que aproximadamente 70% de todos os diagnósticos são feitos com base nos testes laboratoriais, cujos resultados são responsáveis por afetar a maioria das decisões quanto à admissão, à alta hospitalar e ao regime tera-

pêutico dos pacientes. Por esses motivos, é imprescindível que médicos e pacientes tenham confiança nos laudos fornecidos pelos laboratórios clínicos. A fase do laboratório conhecida como pré-analítica é apontada como a grande responsável pelos erros laboratoriais, em razão da grande evolução e automatização das fases analíticas e pós-analíticas, com significativa diminuição do número de erros. A fase pré-analítica é bem mais difícil de controlar, pois algumas etapas, como o preparo do paciente, fogem do controle direto do laboratório. Para evitar esses problemas, é preciso se cercar de procedimentos e controles bem definidos, que visem a aumentar a segurança e a confiabilidade dessa fase. A educação continuada dos profissionais que realizam a coleta e manipulam as amostras também se mostra extremamente importante.

Os problemas pré-analíticos podem estar relacionados à elevada rotatividade de pessoal, à negligência, à falta de entendimento sobre boas práticas em laboratório e ao treinamento insuficiente.

Resultados laboratoriais equivocados provocam condutas médicas errôneas, que podem ser catastróficas aos pacientes, colaborando para a insegurança no sistema de saúde.

DEFINIÇÃO DE ERROS PRÉ-ANALÍTICOS

Segundo a ABNT AMN ISO/TS 22367:2009:

erro de laboratório é a falha de uma ação planejada que não se completou como foi proposta, ou o uso de um plano incorreto para alcançar uma meta, que pode ocorrer em qualquer parte do ciclo de laboratório (desde o pedido da análise até o laudo de resultados e sua interpretação e a reação aos erros).¹

Na Tabela 1, demonstra-se a frequência de erros na fase pré-analítica em laboratórios clínicos.

TABELA 1 Frequência de erros na fase pré-analítica em laboratórios clínicos

Ano	Frequência (%)	
	1997	2007
Coleta da amostra inadequada	2,1	0,6
Interpretação incorreta da solicitação médica	3,2	3,8
Perda da solicitação médica	18,1	1,9
Erro na identificação do paciente	2,6	8,8
Coleta em tubo inadequado	2,6	8,1

(continua)

TABELA 1 Frequência de erros na fase pré-analítica em laboratórios clínicos
(continuação)

Ano	Frequência (%)	
	1997	2007
Amostra coletada em membro com rota de infusão intravenosa	20,6	1,9
Tubo vazio	-	6,9
Ausência da entrada da solicitação médica no sistema de informática	-	2,5
Incorreta proporção entre sangue e anticoagulante	-	13,1
Amostra sem refrigeração	-	1,9
Perda do tubo	-	3,1
Total	49,2	52,6

Fonte: Adaptada de Guimarães et al., 2011.²

O erro pré-analítico é aquele que ocorre em uma das etapas descritas a seguir.

Indicação pré-teste

A possibilidade de os erros ocorrerem tem início no momento da solicitação do exame pelo médico, que deve ser instruído com relação à solicitação de exames, já que pedidos desnecessários podem ocasionar conclusões errôneas, condutas desnecessárias e elevação de custos no sistema de saúde. São exemplos de solicitações desnecessárias:

- Antígeno prostático específico (PSA) em mulheres;
- CK-MB para diagnóstico de infarto na ausência da troponina;
- *Screening* de marcadores tumorais.

Deve-se priorizar o uso racional de exames, evitando a solicitação de alguns que não agregarão valor ao paciente, sem deixar de pedir aqueles que, por protocolos clínicos, são essenciais. Também é da responsabilidade do médico patologista clínico assessorar os médicos a interpretar corretamente os resultados dos exames.

Para destacar a importância do uso consciente dos exames laboratoriais, a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC) participa do projeto colaborativo Choosing Wisely Brasil, criado em 2015, a partir da iniciativa Choosing Wisely, lançada em 2011 pela Fundação American Board of Internal Medicine (ABIM), nos Estados Unidos.

Nessa primeira etapa, foi elaborada uma lista de recomendações com cinco itens – também chamadas *Top Five* –, que pode ser acessada em: <<http://www.sbpc.org.br/noticias-e-comunicacao/sbpcml-participa-do-choosing-wisely-brasil/>>.

Pedido médico

A dificuldade de interpretar a lista de exames solicitados, pela caligrafia do médico, pode provocar interpretações errôneas e lançamentos de exames incorretos, retardando o cuidado do paciente. A falha poderá somente ser percebida no momento de retorno do paciente ao médico com os resultados.

Atualmente, muitos serviços já implementaram prontuários eletrônicos, situação em que o contato com o médico para elucidar dúvidas quanto às solicitações é bem mais fácil. O médico solicitante deve ser responsável pelas instruções ao paciente quanto às condições requeridas para a realização do exame. Ele deve informar a paciente quanto à necessidade de realizar jejum, interromper o uso de alguma medicação, fazer uma dieta específica ou, ainda, se pode realizar ou não uma atividade física antes da coleta dos exames. De qualquer maneira, os pacientes continuarão ligando aos laboratórios para receber informações sobre o melhor horário de coleta ou a necessidade de frascos adequados para a coleta de amostras em sua casa.

Dieta

A partir de recentes publicações que questionam a necessidade de jejum para a realização dos exames, principalmente aqueles que determinam os níveis de lipídios no sangue, como o *Fasting is not routinely required for determination of a lipid profile: clinical and laboratory implications including flagging at desirable concentration cut-points – a joint consensus statement from the European Atherosclerosis Society and European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*,³ tem havido uma verdadeira revolução no conceito da necessidade ou não de jejum para coleta dos exames laboratoriais. Esse trabalho sugere que cada país deve adotar estratégias para implementar o uso rotineiro do não jejum e deve sinalizar valores anormais com base em pontos de corte de concentração desejável em vez de usar intervalos de referência. Vários serviços, inclusive no Brasil, já adotaram essa prática, o que facilitou muito a coleta de exames de pacientes diabéticos, crianças ou idosos, em horários mais flexíveis.

É importante citar que a informação sobre a dieta do paciente pode fazer toda a diferença para evitar julgamentos errôneos com relação aos resultados de laboratório (p. ex., as amostra de pacientes que consumirem muito leite integral podem ser lipêmicas, em razão do excesso de gordura, capaz de se mostrar como um interferente para determinadas reações). Ácido úrico elevado, acidose sem explicação ou elevação de lactato podem estar relacionados à ingestão excessiva de álcool às

vésperas da coleta. Se as informações sobre a dieta não forem transparentes, o médico poderá investigar problemas que não existem.

Nordestgaard e colaboradores³ descreveram a variação dos níveis lipídicos em uma população canadense (Figura 1).

Dependendo do tempo decorrido desde a ingestão até a quantidade de bebida consumida, a ingestão de bebidas alcoólicas pode alterar vários resultados de exames. Existem variações mais nítidas quando do uso crônico de bebidas alcoólicas, como elevação na gama GT e transaminases, e outras mais características, quando agudo. Em um período de 2 a 4 horas após a sua ingestão, pode haver redução de glicemia e aumento de lactato e ácido úrico.

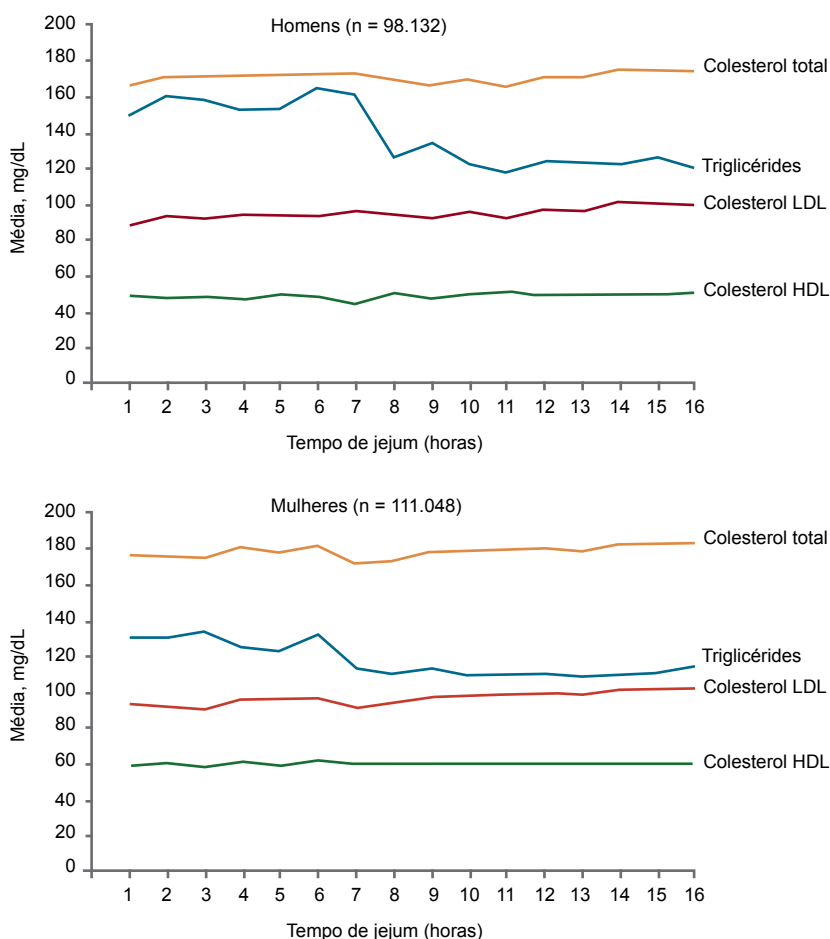


FIGURA 1 Variação dos níveis lipídicos em uma população canadense.

Fonte: adaptada de Nordestgaard et al., 2016.³

Drogas de abuso

A morfina, por exemplo, pode causar espasmos no esfíncter de Oddi, elevação do nível das enzimas pancreáticas (amilase e lipase) e redução da insulina e da nora-drenalina. Já a maconha pode aumentar os níveis de sódio, potássio, ureia e cloro, bem como reduzir a glicose e o ácido úrico.

Influência do ritmo biológico

A concentração plasmática de várias substâncias flutua durante o dia, por variações cíclicas (diárias, sazonais ou biológicas) e lineares (idade).

Cadastro

A identificação do paciente, com a inclusão de dados demográficos, informações sobre uso de medicamentos, peso e altura, data da última menstruação (quando aplicável) e tempo de jejum, deve ser corretamente registrada, sendo fundamental na hora da análise da consistência dos resultados dos exames.

Identificação do paciente e de suas amostras

Fundamental atenção deve ser dispensada durante a identificação do paciente. Ao entrar no posto de coleta, o profissional deverá checar a identificação do paciente *versus* o pedido médico e etiquetas de seus tubos. Já existem dispositivos móveis (PALM) com aplicativos passíveis de utilização no momento da coleta, possibilitando a migração das informações do paciente diretamente ao sistema de informática laboratorial. Com eles, é possível extrair rapidamente estatísticas de produtividade por colhedor e sobre o tempo gasto desde o acionamento do colhedor até a confirmação de coleta, entre outras informações. Deve-se lembrar sempre da importância de utilizar dois identificadores para todas as etapas de identificação, como nome completo e número de prontuário.

Sequência de tubos

O flebotomista precisa observar a sequência correta dos tubos que serão utilizados, verificar o volume de sangue apropriado para cada tubo e realizar a correta homogeneização dos tubos, pois compreendem fatores determinantes na obtenção de amostras adequadas para a realização de exames. Conforme a norma do *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, o flebotomista deve observar, ainda, a correta técnica de utilização do torniquete e da venopunção, pois esses procedimentos podem interferir nos resultados de alguns parâmetros analíticos. Caso não se siga a ordem de coleta dos tubos com critério, podem ocorrer variações de resultados, muitas vezes difíceis de detectar. Por exemplo, coletar amostra em um tubo que contenha heparina antes de coletar no tubo que

contém citrato de sódio pode levar a heparina para dentro do tubo de citrato e causar resultados errôneos em exames de coagulação; e efetuar coleta no tubo de EDTA k3 antes do tubo seco pode causar elevação nos níveis de potássio. Segundo a Norma H3-A6 do CLSI, a ordem dos tubos deve considerar a sequência descrita na Figura 2.

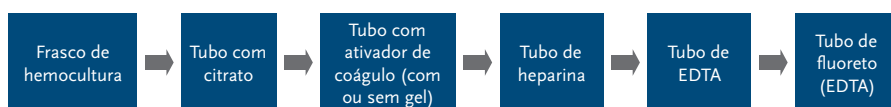


FIGURA 2 Sequência dos tubos para coleta de sangue conforme Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético.

Torniquete

É utilizado para facilitar a visualização da veia apropriada. Porém, se não forem respeitadas as orientações quanto ao tempo de garroteamento, poderá haver interferência em analitos, como potássio, hematócrito ou quaisquer outros influenciados pela hemoconcentração.

Hemólise

Mesmo que discreta, a hemólise tem alto impacto em alguns analitos, como a troponina. Entretanto, quando a intensidade da hemólise é maior, pode haver aumento de algumas enzimas, como aldolase, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase (DHL), aspartato transaminase (AST), potássio, magnésio e outras, causando a rejeição da amostra. Se o fato não for percebido durante a análise, o laboratório poderá liberar resultados com grandes alterações, que não refletem o quadro do paciente. Modernas linhas de automação pré-analítica dispõem de módulos capazes de detectar hemólise e lipemia nas amostras, antes de serem passadas para os módulos analíticos.

Os fatores que aumentam o risco de hemólise incluem:

- Usar agulha de calibre muito pequeno (23 ou menos) ou muito grande para o vaso;
- Pressionar o êmbolo da seringa para forçar a entrada de sangue em um tubo, aumentando, assim, o cisalhamento dos glóbulos vermelhos;
- Coletar espécimes sanguíneos de um cateter intravenoso (IV) ou uma linha central;

- Encher um tubo de maneira insuficiente, de tal modo que a razão anticoagulante/sangue seja maior que 1:9;
- Reutilizar tubos que foram preenchidos à mão com quantidades impróprias de anticoagulantes;
- Agitar um tubo de maneira excessivamente vigorosa;
- Não esperar que o álcool ou desinfetante seque na pele;
- Usar tubo grande demais para coleta a vácuo (p. ex., tubo de adulto para um paciente pediátrico).

É importante lembrar que, em determinadas patologias, a amostra poderá estar com hemólise, em virtude de doença hemolítica. Nesses casos, o laboratório pode optar por liberar os resultados com a informação sobre a presença da hemólise, para que o médico solicitante tenha ciência e interprete corretamente os resultados.

Lipemia

Ensaio turbidimétricos ou colorimétricos podem sofrer interferência da lipemia (consequência de hipertrigliceridemia ou do aumento de quilomícrons). Caso o serviço opte por liberar esses resultados, a alteração deve ser sinalizada no laudo, para que o médico solicitante tome conhecimento.

Local da punção

No caso de coleta de gasometrias venosas, quando puncionadas do dorso da mão, pode-se obter amostra mista, elevando-se os parâmetros de PO_2 e a saturação de hemoglobina.

Veias antecubitais

São as escolhidas preferencialmente em ambulatórios. Porém, em pacientes internados, com restrição de acessos, a enfermagem pode coletar de cateteres centrais, fato que pode colaborar para a contaminação de amostras com soluções de infusão. Essa é uma das causas mais comuns de rejeição de amostras provenientes de unidades hospitalares. Para que não haja tal problema, as instruções de coleta devem ser seguidas à risca.

Amostras coletadas após procedimentos com contraste ou dessensibilização para contraste

Sempre que houver opção, o paciente deve ser orientado a não realizar coletas para exames em situações diferentes daquelas do dia a dia. Coletas realizadas após contraste para exames de imagem, como os de ressonância, apresentam redução

acentuada dos níveis de cálcio. Já coletas feitas depois da administração de glicocorticoides, para dessensibilização do paciente, podem apresentar inúmeras alterações, como aumento significativo de glicemia.

Amostras coaguladas ou com presença de microcoágulos

Amostras coaguladas inviabilizam a realização de exames como hemograma, amônia, tempo de protrombina, fibrinogênio, entre outros. Problemas provenientes de microcoágulos também podem prejudicar alguns tipos de equipamentos, causando entupimento, como é o caso de aparelhos de gasometria e contadores de células, sendo capazes de induzir a erros de medidas.

Aliquotagem

Tanto a identificação da amostra como a coleta devem ser acompanhadas de um cuidado ainda maior em sua aliquotagem. Trata-se de uma etapa em que podem ocorrer muitos erros, devendo ser evitada a todo o custo. Trabalhar com o tubo primário é sempre mais seguro.

Atividade física

Pode ter efeito transitório em alguns componentes sanguíneos, pela mobilização da água ou pelas variações das necessidades energéticas, entre outros motivos. Podem ocorrer, por exemplo, aumento do nível de creatinofosfoquinase (CPK) após longo esforço muscular e leucocitose, por neutrofilia, após mobilização do *pool* marginal de neutrófilos.

Transporte de amostras

Em razão da importância do transporte de amostras, foi criada a RDC 20, especialmente para regularizar esse procedimento. Falhas no processo de transporte, alterações de temperatura e tempo de transporte acima ou fora do padrão determinado para produtos biológicos, amostras e hemocomponentes podem incorrer em erro da análise na triagem laboratorial e contaminação ou deterioração de produtos biológicos, além de perda de sua qualidade. Todos os eventos citados interferem negativamente na terapêutica do paciente.

Além disso, por se tratar de material biológico, deve-se considerar:

- O risco de infecção do trabalhador do transporte;
- A possibilidade de contato com pessoas durante o trânsito;
- A contaminação do ambiente em situações de avaria.

Para essa etapa do processo, a gestão da qualidade deve prever um indicador para monitorar as variações de temperatura.

Coletas especiais

Alguns analitos requerem atenção especial no momento da coleta, como não usar álcool na assepsia quando for fazer a dosagem de etanol.

INDICADORES DE ERRO DA FASE PRÉ-ANALÍTICA

Para fazer a gestão da qualidade da fase pré-analítica, deve-se utilizar indicadores de desempenho, que são medições realizadas para acompanhamento de processos. É preciso lembrar que somente somos capazes de melhorar aquilo que podemos medir. Indicadores devem ter metas bem definidas, que agreguem valor ao processo, além de estarem representados em gráficos que demonstrem claramente a realidade encontrada.

Um exemplo de indicador da área de atendimento é demonstrado na Figura 3. A Figura 4 mostra um exemplo de representação gráfica de indicador de recoleta.

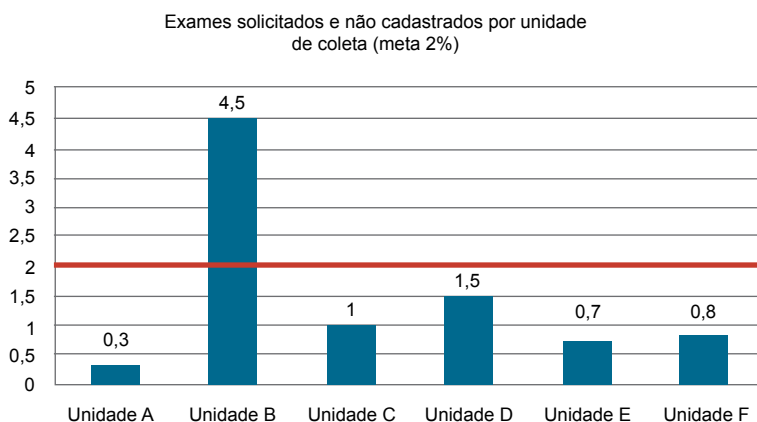


FIGURA 3 Exemplo de indicador da área de atendimento.

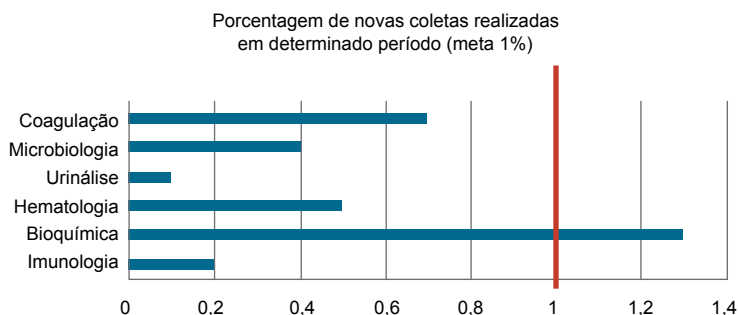


FIGURA 4 Exemplo de representação gráfica de indicador de recoleta.

Como é necessário atuar diretamente nas causas dos problemas, deve-se procurar desenvolver indicadores mais detalhados, como estratificar as novas coletas por:

- Motivo;
- Posto de coleta.

Quanto mais informações detalhadas o indicador fornecer, maior a capacidade de enxergar como o serviço está caminhando e tomar as ações de melhoria necessárias.

Para a segurança do processo, é imprescindível checar a identificação dos pacientes e das amostras, de preferência com dois identificadores. Além disso, a utilização do código de barras para identificação dos tubos reduz enormemente os erros de transcrição de informações. Outros exemplos possíveis de indicadores de fase pré-analítica que auxiliam na gestão da qualidade são:

- Porcentagem de contaminação de hemoculturas;
- Satisfação dos pacientes com a coleta de exames;
- Tempo de atendimento porta *versus* coleta;
- Número de coletas *versus* técnico de coleta (produtividade).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fase pré-analítica é a mais suscetível a erros. Quando o laboratório cumpre todas as etapas predefinidas na gestão de qualidade, as oportunidades de erros na fase pré-analítica reduzem significativamente. Infelizmente, é impossível eliminar todos os erros, mas deve-se almejar a sua redução, de modo a aumentar a segurança do paciente. A análise contínua e adequada dos indicadores da qualidade e das ocorrências documentadas permitirá ao laboratório melhorar seus processos para cumprir seu objetivo: diminuir significativamente os erros.

Como não há consenso acerca dos melhores indicadores para as fases pré-analítica, aconselha-se fazer *benchmarking*, ou seja, um processo contínuo de medidas de produtos, serviços e práticas para comparação com os competidores de mercado ou companhias reconhecidas.

REFERÊNCIAS

1. ABNT AMN ISO/TS 22367:2009. Laboratório clínico. Redução do erro através da gestão de riscos e melhoria contínua (ISO/TS 22367:2008, IDT).
2. GUIMARÃES AC, WOLFART M, BRISOLARA MLL, DANI C. O laboratório clínico e os erros pré-analíticos. Rev HCPA. 2011;31(1):66-72.
3. NORDESTGAARD BG, LANGSTED A, MORA S, KOLOVOU G, BAUM H, BRUCKERT E ET AL.; European Atherosclerosis Society (EAS) and the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory

Medicine (EFLM). Fasting is not routinely required for determination of a lipid profile: clinical and laboratory implications including flagging at desirable concentration cut-points – a joint consensus statement from the European Atherosclerosis Society and European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Eur Heart J*. 2016;37(25):1944-58.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

FORSMAN RW. Why is the laboratory an afterthought for managed care organizations? *Clin Chem*. 1996;42(5):813-6.

LIPPI G, BECAN-McBRIDE K, BEHÚLOVÁ D, BOWEN RA, CHURCH S, DELANGHE J ET AL. Preanalytical quality improvement: in quality we trust. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51(1):229-41.

LIPPI G, GUIDI GC, MATTIUZZI C, PLEBANI M. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(4):358-65.

PLEBANI M. Towards quality specifications in extra analytical phases of laboratory activity. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(6):576-7.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA MEDICINA LABORATORIAL. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso. 2. ed. 2009. Disponível em: <<http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320090814145042>>. Acesso em: 20 set. 2009.

VIEIRA KF, SHITARA ES, MENDES ME, SUMITA NM. A utilidade dos indicadores da qualidade no gerenciamento de laboratórios clínicos. *J Bras Patol Med Lab*. 2011;47(3):201-10.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

GESTÃO DA QUALIDADE ANALÍTICA



Você já imaginou se as ferramentas de controle de qualidade fossem interligadas? Fornecendo dados concisos sobre a qualidade analítica do laboratório.

The image displays three overlapping screenshots of the Controllab software interface. The top-left screenshot shows a 'Control Chart' (Gráfico de Controle) for 'EPO' with a table of data points and control limits. The top-right screenshot shows a 'Specification Management' (Especificações de Qualidade) screen with a table of parameters and their respective limits. The bottom screenshot shows a 'Compliance Report' (Relatório de Conformidade) with a table of results and a bar chart.

Na Gestão da Qualidade Analítica – GQA, as informações sobre o desempenho dos exames estão reunidas, facilitando a análise crítica e a comprovação da excelência dos resultados, da qualidade dos serviços oferecidos e da competência técnica.

Obtenha e monitore metas por meio da Especificação da Qualidade. Conte com indicadores analíticos para simplificar a gestão laboratorial.

SOLUÇÕES COMPLETAS PARA CONTROLE DE QUALIDADE
vide página 48

Serviços disponíveis para múltiplos segmentos. Consulte o catálogo online em www.controllab.com

Controllab
Lado a lado com você

MUITO ALÉM DA TECNOLOGIA.

Melhoria da gestão,
qualidade e conformidade para a
conquista das **principais creditações**
do setor de **Medicina Diagnóstica**.

70% dos nossos clientes
possuem pelo menos
uma **acreditação**

15%

dos exames
realizados no
Brasil

43

milhões
de pacientes
atendidos por ano

20

mil
usuários utilizam
o nosso sistema

3

países
Brasil, Argentina
e Uruguai

Soluções completas em software para laboratórios clínicos.

www.shift.com.br

T (17) 2136 1555 | comercial@shift.com.br

 **Shift**
Tecnologia que pulsa

Gerenciamento Laboratorial
a qualquer hora, em qualquer lugar!

Nosso compromisso é atender com esmero!

A todos os nossos parceiros,
reafirmamos nosso compromisso! A todos os pacientes que
passaram pelos nossos produtos, acreditamos que o nosso
produto final tem o objetivo de atendê-los com zelo.

A todos que nos lêem, conheçam a TM Informática e
nossos produtos! Contate-nos e poderemos ser a sua
melhor escolha em Gestão e Business Intelligence.

LISNET



TMInformática

Você acredita que é plausível ter um sistema de Informática acessível, móvel, maleável e sensacional?

Você acredita que um sistema laboratorial pode facilitar a vida dos seus usuários e gestores?

Você acredita que é possível gerenciar um laboratório mesmo não estando dentro dele?

Seria o laboratório um ambiente que possa ser gerenciado com ciência e consciência do trabalho em saúde?

Você acredita que um sistema pode ter a segurança da Informação como uma de suas premissas?

A verdade é que, como profissionais da saúde, estamos acostumados com as dificuldades que a nova era trouxe, nos desafiando a ficar cada dia mais tecnológicos.

Independente das suas respostas sobre os questionamentos acima, te convido a conhecer a TMinformática/Geslab



TMinformática

A TM Informática criou o *LISNET* sistema de informação de gestão e serviços ao diagnóstico.

Um poderoso LIS (Laboratory Information System), desenvolvido para atender todas as necessidades dos laboratórios de Análises nos mais variados perfis e abrangência.



A riqueza de funcionalidades e a solidez de seus conceitos foram características fundamentais para o sucesso da informatização de diversos serviços públicos e privados, hospitalares e ambulatoriais,

assim como laboratórios de apoio, redes de laboratórios, e bancos de sangue.

A característica principal do *LISNET* é a mobilidade, com seu funcionamento em nuvens (*Cloud-Computing*), o acesso ao sistema é através da internet, instalando o aplicativo em seu computador, sendo portátil ou um desktop em sua casa ou na clínica terá acesso ao sistema com todas as suas funcionalidades 24 horas por dia mesmo fora do laboratório, bastando ter conexão com a internet, sendo ela 3G, Wi-Fi ou banda larga, isso é a TM trabalhando em prol do seu sucesso!



Monitoramento em Real Time

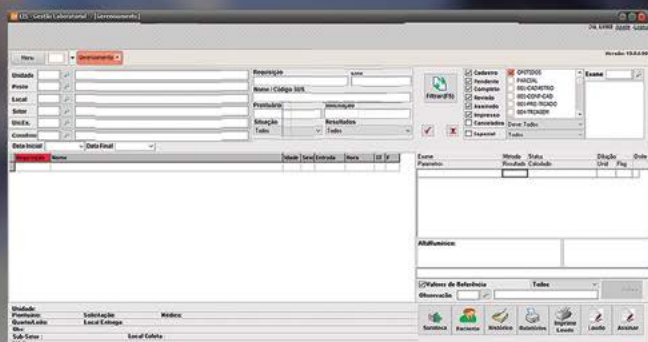
Em qualquer lugar, estando ou não no laboratório é possível acessar o andamento dos processo sendo possível gerenciar; pacientes cadastrados, exames executados no local e urgentes, exames triados por hora, TAT, status dos exames dentre inumeras outras possibilidades.



Gráficos, estatísticas, relatórios, informações do sistema ao seu dispor.
Maiores detalhes entre em contato conosco, teremos o maior prazer em lhe atender.

Gerenciamento de Amostras e Controle de Qualidade

Prático, rápido e fácil



Através da tela de gerenciamento de amostras do LISNET é possível criar inúmeras ferramentas de filtros que permitem ao usuário criar um fluxo de trabalho efetivo e rápido!

Diante dos filtros aplicados, é possível selecionar, ingressar, liberar, laudar, tudo isso sem ser necessário trocar de tela, tornando o processo extremamente ágil e eficaz.

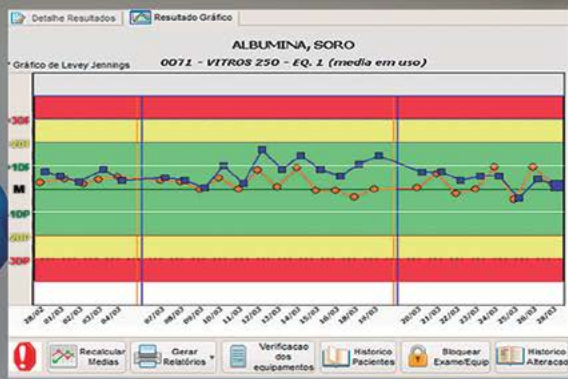
A qualidade ao alcance dos seus olhos!

Conheça o TM Quality!

É a ferramenta de manutenção e gerenciamento dos controles de qualidade internos do laboratório. Com ele é possível cadastrar os controles de cada analito dos equipamentos e conseguir avaliar tendências, processos, garantir a efetiva

liberação dos analitos com ciência e consciência da efetividade do controle de qualidade Interno (CQI)

Ainda com essa ferramenta é possível bloquear os analitos de acordo com os controles, obrigando o usuário a realizar os processos corretivos antes de seguir com a rotina.



INTERDISCIPLINARIDADE

INTEROPERATIVIDADE

IMPLANTAÇÃO

Interdisciplinaridade: Se partimos da premissa de que diferentes áreas de trabalho aproximam pessoas semelhantes, a existência de diferentes áreas de trabalho em um mesmo time nos traz diferentes pontos de visão de um mesmo ponto e, conseqüentemente, um maior número de possibilidades de soluções, idéias e criações.

Interoperatividade: Atualmente, trabalhamos com uma ampla possibilidade de interações entre sistemas! O TM Interface, pode ser um LIS e um HIS, se tornando autônomo e efetivo, em contrapartida, o LISNET tem uma grande capacidade de integração com diversos HIS, o que permite gerenciar o Laboratório de Análises Clínicas com as melhores ferramentas e com as informações oriundas do HIS já estabelecido. Ainda em tempo, vale ressaltar a interação entre os nossos sistemas com laboratórios de apoio! Atualmente, temos um processo muito rápido, prático e fácil de integrar laboratórios; em sua grande maioria, basta cadastrar e triar no LIS e enviar com a etiqueta primária para o apoio e aguardar o retorno dos resultados.

Implantação: Nossa experiente equipe de implantação tem origem nas bancadas de Laboratórios Clínicos! Isso nos traz intimidade com o ambiente e fluxos! A implantação é um momento de novidade, de novos processos e nós, da TMInformática temos orgulho de fazê-las da melhor maneira possível e com o menor impacto possível.

PARA A TM, SEGURANÇA É COISA SÉRIA!

A Segurança é uma das premissas da TM Informática por esse motivo cliente da TM usa Banco de dados Oracle, aquele desejo de ter o melhor agora é possível, tudo incluso no nosso pacote de serviços, caro não, seguro e possível ter sim, fale conosco, teremos o maior prazer em atendê-lo.



- Segurança do banco de dados;
- Backup de link para acesso remoto;
- Sem limite de banda para conexões;
- Atualização Live-Update;
- Backup Automático das informações;
- Banco de dados Cliente-Servidor Oracle;
- Manutenção de banco de dados on-line (não é preciso parar o sistema).

2 Sistematização para estudo de interferentes na avaliação de um método laboratorial bioquímico

INTRODUÇÃO

Na rotina assistencial, os métodos laboratoriais estão sujeitos à interferência de fatores endógenos e exógenos. Entende-se por “interferente” qualquer substância ou processo capaz de interagir e alterar as reações imunoquímicas, falseando os resultados dos exames laboratoriais.

Os mecanismos de interferências são diversos: interferências físicas com a matriz da amostra biológica (alteração da viscosidade e turbidez); reações proteicas ou enzimáticas do tipo competição; inibição ou reações cruzadas; entre outros.

Entende-se por interferentes “endógenos” as substâncias encontradas na amostra biológica, podendo ser naturais ou associadas à saúde do paciente: lipemia, hemólise, coágulo, bilirrubina, proteínas, autoanticorpos, anticorpos heterófilos, entre outras.

Interferentes “exógenos” compreendem substâncias consumidas pelo paciente ou introduzidas na amostra biológica, como medicamentos farmacológicos, polivitamínicos, fitoterápicos, tóxicos, entorpecentes, aditivos e conservantes presentes nos frascos de coleta, substratos reagentes e calibradores, além de processos pré-analíticos relacionados ao transporte, à conservação, à centrifugação e ao preparo (p. ex., lavagem) das amostras biológicas.

O impacto dos interferentes é variável, de desprezível até grave, dependendo da natureza e da amplitude de variação do analito dosado, das condições clínicas e do local de assistência ao paciente e até mesmo do grau de conhecimento técnico-científico dos profissionais envolvidos, sejam eles do laboratório, sejam da assistência direta ao paciente.

Como consequências, a presença de interferentes laboratoriais pode promover solicitações inadequadas de novos exames, erros de diagnóstico e condutas tera-

pêuticas inapropriadas, com riscos à saúde dos pacientes. Portanto, cabe ao laboratório seguir as boas práticas da qualidade para garantir a representatividade da amostra e a confiabilidade de seus resultados.

O avanço tecnológico laboratorial possibilitou não apenas o aumento da produtividade e a redução do tempo de liberação, mas também, e principalmente, confiabilidade e eficiência aos resultados de exames, com melhorias substanciais ao processo analítico. Com a automação laboratorial, as plataformas bioquímicas já são capazes de inspecionar os índices séricos de hemólise, icterícia e lipemia das amostras biológicas, previamente à corrida analítica. Dependendo do índice desses interferentes e do analito a ser dosado, os equipamentos emitem sinais de alerta para a tomada de decisão: dar prosseguimento a dosagem laboratorial ou rejeitar a amostra biológica e recoleta.

ESTUDO DE INTERFERENTES EM BIOQUÍMICA

É importante ressaltar que os estudos de interferentes devem imitar os processos reais, sendo semelhantes às dosagens laboratoriais de rotina. Portanto, antes de qualquer estudo, vale a pena revisar se os processos internos do laboratório estão de acordo com as boas práticas laboratoriais. Na fase pré-analítica, sugere-se rever os processos de identificação, coleta, transporte, armazenamento e centrifugação (quando necessário) da amostra biológica.

A adequação dos processos analíticos também deve ser revista: qualidade da água; limpeza do material; calibração dos aparelhos de manipulação da amostra (pipetas, vidrarias etc.); condições e validade dos materiais utilizados (padrões, calibradores, controles, reagentes e insumos em geral); condições dos equipamentos de análise (informações sobre as manutenções preventivas e corretivas) e informações do método utilizado (linearidade, limite de detecção, cálculos; controle da qualidade; intervalo de referência; limites de decisão clínica; e valores críticos). Intercorrências externas, como rede elétrica, temperatura ambiente e fatores humanos (erros de cálculos, diluições ou operações técnicas), também devem ser revisadas.

O estudo de interferentes pode ser conduzido seguindo as recomendações específicas da literatura, e seu principal objetivo será estimar o erro sistemático causado por algum eventual interferente na amostra biológica.

Procedimento do estudo

- Prepara-se um par de frascos para a análise;
- Em ambos os frascos, adiciona-se o mesmo volume da amostra biológica do paciente que contém o analito a ser dosado;
- No primeiro frasco, adiciona-se determinado volume de solução do material interferente a ser pesquisado;

- No segundo frasco, adiciona-se uma solução de diluição ou um solvente puro, sem o interferente;
- As amostras de ambos os tubos são processadas pelo método de interesse e seus resultados são comparados entre si;
- Se houver diferença entre os resultados acima de um limite definido, pode-se concluir que houve interferência da substância pesquisada no analito dosado.

Observações importantes referentes ao estudo dos interferentes

As soluções de análise podem ser amostras biológicas dos pacientes (recomendado), *pools* de amostras biológicas de pacientes ou soluções-padrão. Quanto à solução interferente, é desejável utilizar uma solução-padrão para materiais solúveis, pela capacidade de revelar melhor a presença do interferente. Nos estudos de lipemia e hemólise, recomenda-se a utilização de amostras biológicas ou *pools* de pacientes.

A concentração do interferente estudado deve ser alta, de preferência próximo da concentração máxima esperada na população. Se foi observada interferência no nível máximo, seria interessante testar concentrações mais baixas para determinar o limite inferior da interferência nos resultados. Quanto ao volume adicionado do interferente, ele deve ser pequeno para minimizar a diluição da amostra biológica a ser testada.

É importante manter exatamente as mesmas diluições para o par de amostras testadas, e os volumes pipetados devem ser iguais no par de amostras avaliado.

Recomenda-se realizar dosagens em duplicata para estimar o erro sistemático pelas diferenças entre os valores médios dos resultados pareados.

Exemplo prático (passo a passo)

A seguir, é apresentado um exemplo de estudo de interferência de determinada concentração de uma substância na dosagem da glicemia de jejum, conduzido em três amostras biológicas distintas: A, B e C. A glicemia foi dosada em duplicata, cujos resultados foram:

- Amostra A (interferente) = 115 e 117 mg/dL; Amostra A (solução de diluição) = 94 e 96 mg/dL;
- Amostra B (interferente) = 97 e 99 mg/dL; Amostra B (solução de diluição) = 82 e 84 mg/dL;
- Amostra C (interferente) = 110 e 108 mg/dL; Amostra C (solução de diluição) = 93 e 91 mg/dL.

1º passo – cálculo da média das duplicatas, cujos resultados foram:

- Amostra A (interferente) = 116 mg/dL; Amostra A (solvente puro) = 95 mg/dL;

- Amostra B (interferente) = 98 mg/dL; Amostra B (solvente puro) = 83 mg/dL;
- Amostra C (interferente) = 109 mg/dL; Amostra C (solvente puro) = 92 mg/dL.

2º passo – cálculo das diferenças entre os resultados pareados:

- Diferença na amostra A = 21 mg/dL;
- Diferença na amostra B = 15 mg/dL;
- Diferença na amostra C = 17 mg/dL.

3º passo – cálculo da média da diferença para todas as amostras biológicas testadas:

- Interferência média = 17,7 mg/dL.

Critérios de interpretação

O estabelecimento de valores limítrofes aceitáveis para os desvios encontrados é importante para conferir o grau de interferência da substância pesquisada nas dosagens laboratoriais de um analito.

Habitualmente, tais critérios baseiam-se na comparação entre o valor da interferência média observada (erro sistemático observado) e o erro permitido para o analito dosado. Na dosagem da glicose, por exemplo, a variação máxima de desempenho analítico aceitável é de 10%, conforme os requerimentos para a qualidade analítica definidos pelo CLIA-88 (Clinical Laboratory Improvement Amendments) (Tabela 1). Tais critérios descrevem a qualidade analítica em termos do Erro Total Máximo que compreende a soma do erro sistemático (inexatidão) e do erro aleatório (imprecisão).

Considerando o limite superior da normalidade (99 mg/dL), o erro máximo permitido seria de 9,9 mg/dL. Portanto, no exemplo dado, como a interferência média observada de 17,7 mg/dL foi maior que o erro máximo permitido, conclui-se que houve interferência da substância testada na dosagem da glicose, cujos resultados não podem ser aceitáveis. Em outras palavras, o interferente falseou significativamente a dosagem do analito.

Além de se comparar o erro sistemático observado com o desempenho analítico aceitável definido pelo CLIA, outros critérios podem ser utilizados pelo laboratório para interpretar o estudo dos interferentes: pode-se calcular pelo teste t pareado se as diferenças entre os resultados das amostras pareadas, com e sem o interferente, são significativas ($p < 0,05$) ou comparar o erro sistemático observado pelo interferente com o coeficiente de variação biológica intraindividual, como especificação do erro total.

O estudo de interferentes também pode ser conduzido comparando as dosagens de um analito processado em metodologias distintas. A vantagem de comparar diferentes métodos é tentar se livrar ou minimizar a ação do interferente investigado.

TABELA 1 Requerimentos para Qualidade Analítica (CLIA-88): desempenho aceitável

Química de rotina	
Analito	Desempenho analítico aceitável
Ácido úrico	Valor-alvo \pm 17%
Alanina aminotransferase (ALT)	Valor-alvo \pm 20%
Albumina	Valor-alvo \pm 10%
Alfa-1 antitripsina	Valor-alvo \pm 3 SD
Alfafetoproteína	Valor-alvo \pm 3 SD
Amilase	Valor-alvo \pm 30%
Aspartato aminotransferase (AST)	Valor-alvo \pm 20%
Bilirrubina total	Valor-alvo \pm 0,4 mg/dL ou \pm 20% (o maior)
Cálcio total	Valor-alvo \pm 1,0 mg/dL
Cloretos	Valor-alvo \pm 5%
Colesterol total	Valor-alvo \pm 10%
Complemento C3	Valor-alvo \pm 3 SD
Complemento C4	Valor-alvo \pm 3 SD
Cortisol	Valor-alvo \pm 25%
Creatinina	Valor-alvo \pm 0,3 mg/dL ou \pm 15% (o maior)
Creatinoquinase	Valor-alvo \pm 30%
Creatinoquinases (isoenzimas)	MB elevada (presente ou ausente) ou valor-alvo \pm 3 SD
Ferro	Valor-alvo \pm 20%
Fosfatase alcalina	Valor-alvo \pm 30%
Glicose	Valor-alvo \pm 6 mg/dL ou \pm 10% (o maior)
Gonadotrofina coriônica humana (HCG)	Valor-alvo \pm 3 SD ou (positivo ou negativo)
HDL-colesterol	Valor-alvo \pm 30%
Lactato desidrogenase (LDH)	Valor-alvo \pm 20%
LDH isoenzimas	LDH ₁ /LDH ₂ (+ ou -) ou valor-alvo \pm 30%
Magnésio	Valor-alvo \pm 25%
pCO ₂ (gasometria)	Valor-alvo \pm 5 mmHg ou \pm 8% (o maior)
pH (gasometria)	Valor-alvo \pm 0,04
pO ₂ (gasometria)	Valor-alvo \pm 3 SD
Potássio	Valor-alvo \pm 0,5 mmol/L
Proteínas totais	Valor-alvo \pm 10%
Sódio	Valor-alvo \pm 4 mmol/L
T ₃ livre	Valor-alvo \pm 3 SD
T ₄ total	Valor-alvo \pm 1,0 mcg/dL ou \pm 20% (o maior)
T ₄ livre	Valor-alvo \pm 3 SD
Triglicerídeos	Valor-alvo \pm 25%
Hormônio estimulante da tireoide (TSH)	Valor-alvo \pm 3 SD
Ureia	Valor-alvo \pm 2 mg/dL ou \pm 9% (o maior)

Fonte: adaptada de Westgard, 1992.¹

Interferentes estudados

Interferências podem depender de métodos ou analisadores. Portanto, recomenda-se avaliar as especificações analíticas do teste. Os manuais dos equipamentos e dos reagentes geralmente incluem declarações sobre estudos de interferência realizados pelo fabricante. Na literatura, também é possível acessar diferentes artigos e *guidelines* relacionados aos interferentes laboratoriais bioquímicos.

Nas boas práticas laboratoriais, recomenda-se testar interferentes comuns, como hemólise, lipemia, bilirrubina, conservantes e anticoagulantes usados na coleta de amostras biológicas.

- Hemólise: pode ser testada removendo-se uma alíquota de uma amostra biológica, que, depois, é hemolisada mecanicamente ou por congelação. Esse tópico será discutido em outro capítulo deste livro com maior detalhamento;
- Lipemia: a interferência lipídica pode ser testada pela adição de emulsões comerciais de gorduras ou amostras biológicas de pacientes com lipemia pré e pós-ultracentrifugação. O mecanismo de interferência resulta da dispersão da luz, causando erros de medição em métodos fotométricos, ou do deslocamento de volume pelo lipídio, resultando na redução da parte hídrica;
- Bilirrubinas (icterícia): as hiperbilirrubinemias séricas ou plasmáticas podem causar interferência espectral em ensaios próximos ao pico de absorvância da bilirrubina de ~ 456 nm. Interferência química, por exemplo, com reações catalisadas por peroxidase também podem ocorrer. O estudo de interferentes pode ser realizado com padrões comerciais de bilirrubina ou com amostras de pacientes;
- Proteínas: a maioria dos interferentes proteicos está associada a paraproteínas (imunoglobulinas monoclonais), predominantemente com IgM e IgG, capazes de interferir em todos os ensaios automatizados: espectrofotométricos, imunoturbidimétricos ou imunonefelométricos;
- Medicamentos: interferências causadas por fármacos nas amostras biológicas nem sempre são pesquisadas no laboratório pela falta de informações sobre quais medicamentos são consumidos pelos pacientes. A interferência de fármacos pode ser: química – o fármaco original, os metabólitos ou os aditivos reagem de forma cruzada; drogas ou aditivos – atuam como aceleradores ou inibidores do ensaio; fotométrico – o fármaco, os metabólitos ou os aditivos têm picos de absorção semelhantes aos do cromógeno medido. Geralmente, recomenda-se dosagem em métodos comparativos, como a cromatografia e a espectrometria de massa. Amostras de voluntários que tomaram o medicamento nas mesmas concentrações suspeitas de estar causando a interferência também podem ser

coletadas para comparação. Em casos de dúvidas, recomenda-se ler as bulas do medicamento ou contatar os fornecedores;

- Componentes dos tubos de coleta: os aditivos dos tubos (anticoagulantes, ativadores de coágulo, conservantes etc.) podem interagir quimicamente nas reações ou por adsorção inespecífica ou ligação inespecífica em imunoensaios, falseando as dosagens laboratoriais. Essas substâncias podem ser estudadas obtendo-se uma amostra de sangue total e, em seguida, distribuindo-se alíquotas dessa amostra para uma série de tubos contendo os diferentes aditivos. Também podem ser utilizadas amostras coletadas em tubos oriundos de diferentes fornecedores para título de comparação. Cabe ressaltar a importância da revisão dos processos pré-analíticos, com a sequência correta de coleta dos tubos, quando se tratar de amostra sanguínea.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante de qualquer possibilidade de interferência nas dosagens analíticas em bioquímica, é essencial a revisão de todos os processos pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos, conforme as recomendações das boas práticas laboratoriais.

Os laboratórios devem desenvolver um sistema de qualidade específico para lidar com essa questão. O estudo de interferentes no laboratório clínico precisa envolver todos os profissionais, tanto da área técnica quanto administrativa, pois isso promove uma oportunidade de investimento em treinamentos teórico-práticos e na atualização da equipe.

Outras consequências positivas relacionadas ao estudo de interferentes refere-se à possibilidade de desenvolvimento ou modificação das instruções de trabalho, revisão dos processos de automação (verificações *delta check*, critérios de liberação automática, critérios de rejeição de amostras) e atualização dos indicadores da qualidade, dos limites de decisão clínica e dos valores de notificação compulsória.

É importante a conscientização dos profissionais do laboratório no momento da assinatura e da liberação dos laudos, principalmente diante de resultados discrepantes. Caso necessário, rever os prontuários, consultar o corpo clínico e buscar informações em literatura científica representam estratégias adequadas da fase pós-analítica, que visam garantir a segurança e a confiabilidade dos resultados liberados.

Por fim, trata-se de um tema estratégico, que, embora tenha sido relatado há várias décadas, ainda continua sendo moderno, pois o constante avanço tecnológico impacta diretamente na sensibilidade analítica dos métodos laboratoriais, aumentando a chance de serem revelados novos interferentes bioquímicos.

REFERÊNCIA

1. WESTGARD J. CLIA Requirements for Analytical Quality. Federal Register. 1992;57(40):7002-186. Disponível em: <<https://www.westgard.com/clia.htm>>. Acesso em: 10 maio 2018.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Interference testing in clinical chemistry; approved guideline. 2. ed. CLSI document EP7-A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.

DIMESKI G. Interference testing. Clin Biochem Rev. 2008;29(Suppl. 1):S43-S48.

LIPPI G, PLEBANI M. The importance of incident reporting in laboratory diagnostics. Scand J Clin Lab Investigation. 2009;69(8):811-4.

OLIVEIRA CA, MENDES ME. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. Rio de Janeiro: Controllab, 2011. v. II. Disponível em: <https://controllab.com/pdf/Gestao-DaFaseAnaliticaDoLaboratorioVOL2_PDF.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2018.

PETERSEN PH, RICÓS C, STÖCKL D, LIBEER JC, BAADENHUIJSEN H, FRASER C ET AL. Proposed guidelines for the internal quality control of analytical results in the medical laboratory. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1996;34:983-99.

WESTGARD JO, QUAM EF. Basic method validation: interference and recovery experiments. 2008. v. 1. Disponível em: <<https://www.westgard.com/lesson27.htm>>. Acesso em: 10 maio 2018.

YOUNG DS. Effects of preanalytical variables on clinical laboratory tests. 2. ed. Washington: AACC Press; 1997.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

CALIBRAÇÃO DE INSTRUMENTOS



Contribui para a confiabilidade dos resultados e reduz custos inerentes aos erros de ensaio. A calibração é hoje requisito de processos de certificação e acreditação.

A **Calibração** é um processo que estabelece, sob condições específicas, a relação entre os valores indicados por um instrumento de medição, sistema de medição ou material de referência, e os valores correspondentes às grandezas estabelecidas por padrões (rastreadáveis a padrões de referência nacionais e/ou internacionais). Visa verificar se a medida obtida por um instrumento é compatível com o esperado e se ele está adequado ao uso.

O Laboratório de Calibração da Controllab realiza os serviços para:

- ✓ balança
- ✓ centrífuga (verificação)
- ✓ condutivímetro
- ✓ dispensador e bureta, mecânico ou digital
- ✓ manômetro de autoclave
- ✓ micropipeta fixa e variável mono e multicanal
- ✓ pHmetro
- ✓ picnômetro
- ✓ termômetro digital e de líquido em vidro
- ✓ tituladores
- ✓ vidraria: pipeta graduada e volumétrica, balão, proveta, bureta

Para as grandezas: volume (micropipetas, dispensadores, picnômetro, tituladores e vidrarias volumétricas); massa (balança) e físico química (pHmetro e condutivímetro), a Controllab é acreditada pela Cgcre/INMETRO ABNT NBR ISO/IEC 17025 (CAL0214).

SOLUÇÕES COMPLETAS PARA
CONTROLE DE QUALIDADE
vide página 48

Serviços disponíveis para múltiplos segmentos. Consulte o catálogo *online* em www.controllab.com

Controllab
Lado a lado com você

[controllab.com](http://www.controllab.com) | +55 21 3891 9900 | contato@controllab.com

[facebook.com/controllab](https://www.facebook.com/controllab) | plus.google.com/controllab | [instagram.com/_controllab](https://www.instagram.com/_controllab)



Analizador cobas c 513

Buscando novas maneiras de fazer grandes contribuições

Atendendo as demandas crescentes de HbA1c a Roche estabelece um novo precedente em eficiência laboratorial com uma solução inovadora, reafirmando a sua liderança no mercado IVD. Com resultados de alta qualidade, o sistema **cobas c 513** realiza de forma dedicada, o teste Roche Tina-quant® HbA1c A1cDx Gen.3¹, padronizado em conformidade com o IFCC e certificado pela NGSP e rastreável pelo DCCT, entregando resultados padronizados de alta qualidade em uma produtividade de 400 resultados por hora com otimização da ocupação do espaço da sua área técnica laboratorial.

Referência:

1 Bula do produto Tina-quant Hemoglobin A1cDx Gen.3

3 Fatores pré-analíticos que interferem no desempenho dos ensaios de proficiência e controle interno da qualidade



INTRODUÇÃO

Diante do cenário atual socioeconômico, da grande competição mercadológica e dos avanços da tecnologia e clientes mais exigentes com relação aos serviços prestados, os laboratórios almejam cada vez mais a satisfação dos médicos e pacientes, que pode ser traduzida, nesse contexto, como qualidade, custo e prazo de entrega dos serviços.

Esse gerenciamento da qualidade independe do tamanho e do segmento do laboratório – hoje, tornou-se um quesito obrigatório para diminuir desperdícios e reinvestir recursos dentro do próprio laboratório, tornando o processo mais eficiente e eficaz.

Pode-se entender a melhoria da qualidade como a soma dos esforços do monitoramento das fases de processo em um laboratório (pré-analítica, analítica, pós-analítica), com o objetivo único de mitigar ao máximo os erros.

Nesse cenário, os laboratórios contam com as ferramentas do controle de qualidade, em especial o ensaio de proficiência (EP) e o controle interno (CI), que funcionam como ferramentas de autoverificação da fase analítica do laboratório. O EP atua no macroambiente, constituindo-se em uma comparação interlaboratorial na qual o objetivo principal é monitorar o erro sistemático do laboratório. Já o CI atua no microambiente (intralaboratorial), monitorando, principalmente, o erro aleatório. A qualidade obtida em um laboratório (grandeza dos erros sistemáticos e aleatórios presentes no processo) deve sempre ser comparada a referenciais, metas definidas internamente (especificação da qualidade). Somente com um alvo a ser alcançado, pode-se perceber se o laboratório está seguindo na direção correta ou se há a necessidade de um novo planejamento.

Cada vez mais, os indicadores de desempenho laboratorial vêm se destacando como mais uma ferramenta da qualidade, atuando, principalmente, no monitoramento das fases extra-analíticas e colaborando com as ferramentas mais tradicionais e difundidas no meio laboratorial.

Apesar de a fase pré-analítica não ser o principal “alvo” de monitoramento do EP e do CI, alguns fatores dessa etapa de execução do exame laboratorial podem acarretar impactos para o processo analítico e pós-analítico do laboratório, tanto na rotina quanto no desempenho do controle de qualidade.

A participação em programas de controle de qualidade somente é efetiva se associada a um gerenciamento dos resultados obtidos, a uma análise crítica e a um acompanhamento contínuo por parte da equipe técnica do laboratório, possibilitando a implantação de ações para eliminar desvios observados no processo. A investigação não deve se limitar apenas a resultados inadequados, no caso do EP, ou rejeitados, o qual considera as regras de controle selecionadas pelo laboratório para monitoramento do controle interno. O emprego preventivo dessas ferramentas tem extrema importância, analisando os resultados adequados a fim de identificar potenciais problemas.

Para a investigação de um erro (desvio do valor verdadeiro que pode causar uma inadequação), recomenda-se, primeiro, uma revisão – um *checklist* de perguntas envolvendo cada uma das fases do processo do laboratório (pré, analítica e pós).

Uma vez completada a revisão dos dados, fica mais fácil tentar categorizar os erros:

- Conforme o momento em que ocorreu:
 - Pré-analítico (p. ex., problemas no preparo do material, rotulagem, transporte);
 - Analítico (p. ex., problemas de metodologia, equipamentos e técnicos);
 - Pós-analítico (p. ex., erro de resultado, erro de submissão);
- Problemas com avaliação do EP;
- Erro grosseiro;
- Sem explicação.

Erros grosseiros são aqueles que impactam apenas no programa de controle de qualidade, sem ser reproduzidos na rotina dos pacientes. Eles devem ser evitados ao máximo a fim de não mascarar a identificação dos reais erros do processo, os objetivos do EP e do CI. Por exemplo: erros de transcrição, reporte incorreto de sistema analítico, unidade diferente da solicitada no programa e troca de informações entre laboratórios.

Conforme dados da literatura,¹ 19 a 24% das inadequações ainda não têm explicação. Nessas situações, recomenda-se, minimamente, a verificação de um possível

impacto nos resultados de pacientes, utilizando algumas das ferramentas alternativas, como, por exemplo, o algoritmo de Bull e o Delta Check, para ensaios quantitativos. Para análises qualitativas associadas a parâmetros como índice ou densidade óptica/*cut-off* (DO/CO), por exemplo anti-HIV e dengue, o impacto no paciente pode se dar mediante a estimativa do erro total diante da análise histórica dos pacientes liberados no período da inadequação, verificando casos em que a grandeza do erro observado conseguiria alterar a interpretação clínica final.

Neste capítulo, serão abordados diversos fatores pré-analíticos capazes de impactar nos resultados do controle de qualidade, pelo emprego de exemplos hipotéticos de como devem ser identificados e sugestões de como evitá-los. Para tal, utilizam-se recursos de gráficos e o entendimento das informações contidas nos relatórios de avaliação.

A seguir, estão listados os principais fatores pré-analíticos que serão discutidos mais detalhadamente ao longo do capítulo:

- Armazenamento;
- Erros de diluição;
- Reconstituição;
- Exposição excessiva;
- Água utilizada para reconstituição;
- Aliquotagem;
- Congelamento e descongelamento;
- Contaminação;
- Troca de amostra ou amostra incorreta;
- Não leitura do procedimento de preparo;
- Transporte.

Alguns desses fatores pré-analíticos estão associados apenas ao desempenho no controle de qualidade, sem impactar nos resultados dos pacientes. Isso acontece porque, em alguns casos, as amostras do provedor do controle de qualidade exigem uma etapa de preparo e procedimentos diferentes do usual com material de paciente. Neste capítulo, os exemplos a seguir serão focados exclusivamente em impactos no controle de qualidade.

Vale destacar que, dependendo do material utilizado no controle de qualidade – líquido ou liofilizado –, alguns fatores podem impactar de forma mais significativa. Por exemplo, o armazenamento e o transporte são mais cruciais quando se trata de material líquido. Já em materiais liofilizados, destacam-se os fatores de reconstituição, a água utilizada e os erros de diluição.

Do mesmo modo, pode-se observar com maior frequência alguns fatores pré-analíticos em determinada ferramenta de controle de qualidade, EP ou CI. Nos exemplos, esses pontos serão destacados. Embora o exemplo possa estar relacionado à ferramenta de EP, é importante que o laboratório verifique, também, sua aplicabilidade no controle interno, e vice-versa.

O tema será desenvolvido com o objetivo de ajudar o leitor a compreender a riqueza de informações passíveis de obter dos resultados do controle de qualidade, tentando entender que cada fator pré-analítico impacta de maneira diferente no desempenho e provoca comportamentos diferenciados, bem como essas observações facilitam a classificação dos desvios identificados.

ALÍQUOTAGEM

Muitos laboratórios adotam a alíquotagem dos materiais de controle em sua rotina visando a uma possível redução de custos por intermédio da ampliação do tempo de uso do material. Essa prática está ligada diretamente com a ferramenta do CI pela característica do uso contínuo para o monitoramento do erro aleatório presente na fase analítica.

Assim como as amostras de pacientes, os materiais de controle estão sujeitos a variações e contaminações. Para aqueles oferecidos na apresentação liofilizada, reconstituí-los diariamente evita a propagação de erros e garante uma estabilidade maior, com menor dependência das condições de armazenagem.

Como exemplo de comportamento de materiais que podem sofrer interferência no processo de alíquotagem, o gráfico da Figura 1, comumente utilizado por laboratórios no monitoramento do controle interno, demonstra o impacto na prática.

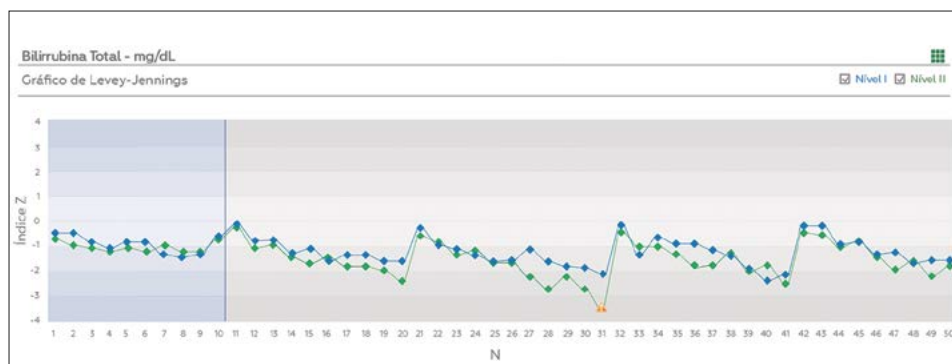


FIGURA 1 Gráfico Levey-Jennings para rotina de controle interno de bilirrubina total.

Fonte: autorizada pela Controllab.

Nesse exemplo, observa-se que a alíquotagem tem sido aplicada pelo usuário desde o período de sua valoração (representada pelo fundo azul), mas, como nesse período o usuário utilizava como referência a faixa da bula de controle interno, em virtude de sua amplitude, tal comportamento não foi observado de maneira significativa nas 10 primeiras dosagens.

Para uma melhor análise quanto ao comportamento do material após a alíquotagem, vale destacar que os pontos 1, 10, 21, 32 e 42 representam as corridas analíticas monitoradas por material de CI recém-reconstituído, enquanto os pontos seguintes a eles se referem a corridas monitoradas com as alíquotas.

Pode-se destacar, ainda, que o laboratório obteve um ponto de violação da regra 1_{3s} (ponto 31) e, partindo da premissa que o laboratório especificou adequadamente as regras de controle e que, ao ter rejeições/alertas, deve interromper a rotina analítica para investigar as causas e os impactos em resultados de pacientes, a estratégia da alíquotagem para redução de custos passa a ser contestável.

Com a análise gráfica, conclui-se, então, que esse laboratório não conseguiu preservar todas as condições de conservação das alíquotas. Nesse caso, recomenda-se, caso o laboratório opte por alíquotar os materiais de controle, garantir a manutenção das suas condições de conservação, com alíquotas livres de interferentes, homogêneas e estáveis, além de ter ciência do tempo máximo de estabilidade de cada parâmetro que compõe o controle – e isso torna o processo um tanto trabalhoso. Não sendo viável, o laboratório deverá adquirir um volume de itens que atenda à sua necessidade de rotina analítica e, assim, evitar que o comportamento dos seus dados seja enviesado pela degradação do material de controle.

CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

A prática de congelar e descongelar o mesmo material de controle múltiplas vezes compreende outro tipo de tratamento que os laboratórios devem evitar. Esse tipo de manipulação pode alterar o material de controle e, conseqüentemente, inviabilizar a análise da qualidade analítica do laboratório. Geralmente, essa prática é realizada pelos laboratórios, buscando maximizar o seu tempo de uso e reduzir os seus custos com controle. Contudo, pode acarretar a alteração de alguns parâmetros; além disso, com o tempo, os seus valores podem sofrer tendências em virtude da degradação do material por mau uso.

RECONSTITUIÇÃO

Extremamente importante, a reconstituição dos materiais de controle representa uma etapa realizada durante a fase pré-analítica. Nesse procedimento, o laboratório precisa se preocupar com dois pontos: primeiro, o tipo de água que deve ser utilizado para a reconstituição; e segundo, o volume indicado pelo provedor. Vale

destacar, ainda, que o instrumento utilizado para esse procedimento de preparo deve estar devidamente calibrado.

É importante comentar que, além de enviar o instrumento para a calibração, o laboratório deve realizar uma análise crítica da situação do instrumento antes de usá-lo novamente. Para isso, os certificados de calibração apresentam a média e a incerteza obtida pelo instrumento e, por meio delas, o laboratório deve verificar se o intervalo de resultados está contido na tolerância.

A questão que deve nortear o laboratório quanto à definição da tolerância sobre o tamanho do erro que o instrumento pode ter, sem impactar negativamente nos resultados, refere-se à comparação da incerteza declarada na calibração com a sua especificação da qualidade analítica, definida para cada um dos ensaios que compõem o material de controle.

A seguir, na Figura 2, há um exemplo de uma especificação rígida proposta pela variação biológica para o exame de cálcio iônico no soro humano. Nele, considera-se o fator Z de 1,96 (95% de confiança) para o erro total permitido.

Selecionar Referência ✕

Cálcio iônico (mmol/L)
Soro Humano

	Erro total permitido (ETp)	Erro aleatório permitido (EAp)	Erro sistemático permitido (ESp)
Variação biológica	Fator Z: 1,96 (2 DP) 95		
<input type="radio"/> Ótimo	1,1%	0,4%	0,5%
<input type="radio"/> Desejável	2,4%	0,9%	0,6%
<input checked="" type="radio"/> Mínimo	3,5%	1,3%	1,0%
Estado da arte	% frente ao ETp: 25,0		% frente ao ETp: 50,0
<input type="radio"/> Controllab	12%	3%	6%
<input type="radio"/> RIBiÁK	>1 e <=2,5: 7,5% >=0,2 e <=1: 14%	>1 e <=2,5: 1,9% >=0,2 e <=1: 3,5%	>1 e <=2,5: 3,8% >=0,2 e <=1: 7%

1 - Valor calculado conforme o Índice Z selecionado no campo superior.
2 - Valor calculado frente ao percentual informado no campo superior, levando em consideração o ETp do provedor.

Ok Cancelar

FIGURA 2 Tabela de referências para especificação da qualidade analítica.

Fonte: autorizada pela Controllab.

Visando ao erro total permitido de 3,5%, conforme a referência da variação biológica, pode-se concluir que, para manter o desempenho do sistema abaixo do percentual máximo permitido, é necessário que o pipetador utilizado para a reconstituição dos materiais de controle tenha uma incerteza consideravelmente baixa e que não interfira nos resultados do controle de qualidade e no não atendimento de sua especificação da qualidade.

Na Figura 3, apresenta-se um exemplo observado no relatório de avaliação do laboratório para o ensaio de antiestreptolisina O (ASO).

Relatório de Avaliação												
Módulo: Imunologia Antiestreptolisina O Quanti										Data: 12/12/2017		
Rodada: 4										Versão: 1		
Ensaio: ASO			KIT: XLY				EQU: ABCD					
Item	GA	Qtd.	Média	DP	CV%	Faixa de Avaliação	Res	ID	Z	Aval	ET%	ES%
O1	75	7	474,73	39,80	8,4	325,0 a 670,0	620,4	0,75	1,83	1A	30,7	
O2	75	7	61,83	7,60	12,3	46,6 a 77,1	96,0	2,24	4,50	1I	55,3	32,9
O3	75	7	423,85	29,76	7,9	318,2 a 654,2	477,6	0,23	0,90	1A	12,7	

FIGURA 3 Relatório de avaliação do ensaio de proficiência de imunologia ASO.

Fonte: autorizada pela Controllab.

No relatório de avaliação, observou-se que, além de todos os itens estarem acima da média, indicando um erro sistemático positivo, o item 2 apresentou para a ASO um valor acima do limite aplicado pelo provedor de EP. Ao analisar o comportamento histórico do laboratório (Figura 4) em “gráfico ID por rodada”, por meio dos seus índices de desvio, observou-se que, ao longo das avaliações, a maior parte dos seus resultados ficou próxima da média e quatro itens se apresentaram mais distantes e significativos ao limite aplicado.

Em outro levantamento ainda na Figura 4, contudo visando ao “gráfico ID (por concentração)”, que levou em consideração as concentrações dos materiais de controle e o índice de desvio do laboratório, observou-se uma maior dispersão dos dados em concentrações mais baixas, exatamente na faixa em que se deram as inadequações do laboratório.

Ao analisar esse comportamento, o certificado de calibração do instrumento utilizado foi revisto, verificando-se que apresentava um erro de aproximadamente 10% em sua pipetagem, o que foi significativo como fator de interferência no EP do laboratório nas concentrações mais baixas.

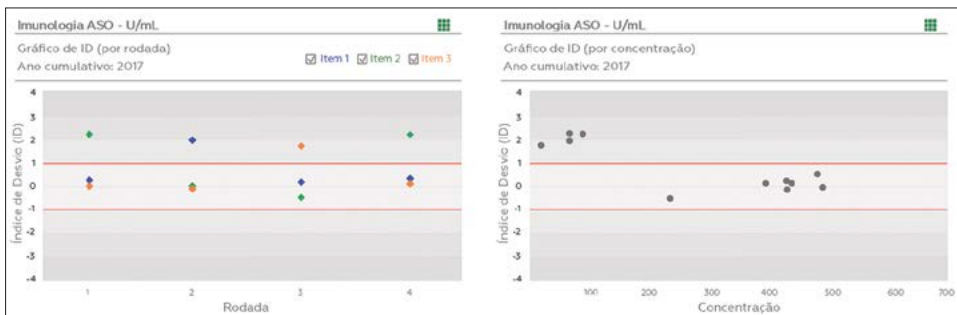


FIGURA 4 Gráficos de acompanhamento da avaliação do laboratório no ensaio de proficiência de imunologia ASO.

Fonte: autorizada pela Controllab.

Além de controlar a calibração dos seus instrumentos utilizados para reconstituição do material, o laboratório deve se atentar ao volume de água recomendado pelo provedor para a reidratação. O exemplo a seguir relata um caso em que o participante de um EP realizou a reconstituição do item 2 com um volume menor que o solicitado pelo provedor, praticamente com a metade do volume necessário, o que ocasionou um erro extremo para todos os ensaios que compõem o controle.

Nota-se que, na Figura 5, o laboratório apresentou uma tendência de resultados acima da média apenas para o item 2 com índices de desvio positivos e próximos de 3,00. Ao se analisar o erro total $[(\text{resultado do laboratório} - \text{média}) / \text{média}] * 100$ de cada um dos itens de ensaios, é possível observar que os resultados apresentados ao item em questão (item 2) ficaram bem próximos entre eles e com um erro de aproximadamente 74%. Esse elevado erro dificilmente está relacionado a um problema analítico, pois índices de desvios altos como esses são considerados erros grosseiros.

Assim como o volume da reidratação dos materiais de controle, o tipo de água utilizado é de suma importância. O próximo tópico visa a discutir a relevância e a exemplificar possíveis impactos relacionados a essa etapa da fase pré-analítica.

Relatório de Avaliação												
Módulo: Imunoproteínas I							Data: 19/1/2018					
Rodada: 4							Versão: 1					
Ensaio: C3			KIT: XYZ				EQU: ABCD					
Item	GA	Qtd.	Média	DP	CV%	Faixa de Avaliação	Res.	ID	Z	Aval.	ET%	ES%
01	75	233	96,47	18,57	19,3	72,3 a 120,7	110,2	0,57	0,74	1A	14,2	
02	75	233	65,82	16,52	25,1	49,3 a 82,4	116,0	3,03	2,00	1I	76,2	30,4
03	75	233	199,33	7,16	3,6	163,4 a 235,3	201,0	0,05	0,23	1A	0,9	
Ensaio: C4			KIT: XYZ				EQU: ABCD					
Item	GA	Qtd.	Média	DP	CV%	Faixa de Avaliação	Res.	ID	Z	Aval.	ET%	ES%
01	75	228	22,81	4,08	17,9	17,1 a 28,6	23,9	0,19	0,27	1A	4,8	
02	75	228	16,30	3,75	23,0	12,2 a 20,5	27,7	2,79	3,04	1I	70,0	25,4
03	75	228	14,77	0,35	2,4	11,6 a 17,9	15,0	0,08	1,06	1A	1,6	
Ensaio: IgG			KIT: XYZ				EQU: ABCD					
Item	GA	Qtd.	Média	DP	CV%	Faixa de Avaliação	Res.	ID	Z	Aval.	ET%	ES%
01	75	249	969,8	137,7	14,2	727 a 1212	951,0	-0,07	-0,14	1A	-1,9	
02	75	250	668,3	123,3	18,4	501 a 835	1168,0	2,99	4,47	1I	74,8	27,3
03	75	250	212,6	14,0	6,6	<300	232,0	-	1,39	1A	9,1	

FIGURA 5 Relatório de avaliação do ensaio de proficiência de imunoproteínas C3, C4 e IgG.

Fonte: autorizada pela Controllab.

ÁGUA UTILIZADA PARA RECONSTITUIÇÃO

A qualidade da água utilizada na reconstituição dos materiais de controle contribui para que os resultados promovidos sejam confiáveis. A água tem inúmeras aplicações no laboratório e a presença de interferentes pode ser prejudicial à rotina do laboratório.

O laboratório é responsável pela seleção do tipo de água adequada aos seus objetivos. A escolha parece ser fácil, porém o laboratório não pode deixar de considerar as análises realizadas e o ciclo da sua rotina. As análises de eletrólitos (cálcio iônico, sódio, potássio, cloretos), por exemplo, requerem o uso de água com baixas concentrações eletrolíticas (baixa condutividade e alta resistividade).

Na Figura 6, tem-se o início do período de valoração de CI no parâmetro de cloretos.

Observa-se nesse exemplo que, durante o período de valoração (área demarcada com azul), não houve nenhum alerta, ou seja, todos os resultados apresentados encontram-se dentro da faixa de referência informada pelo fornecedor do material. No entanto, pode-se observar que todos os resultados ficaram situados acima da média (índice $Z > 0$). Vale ressaltar que esse mesmo comportamento foi verificado no EP do participante.

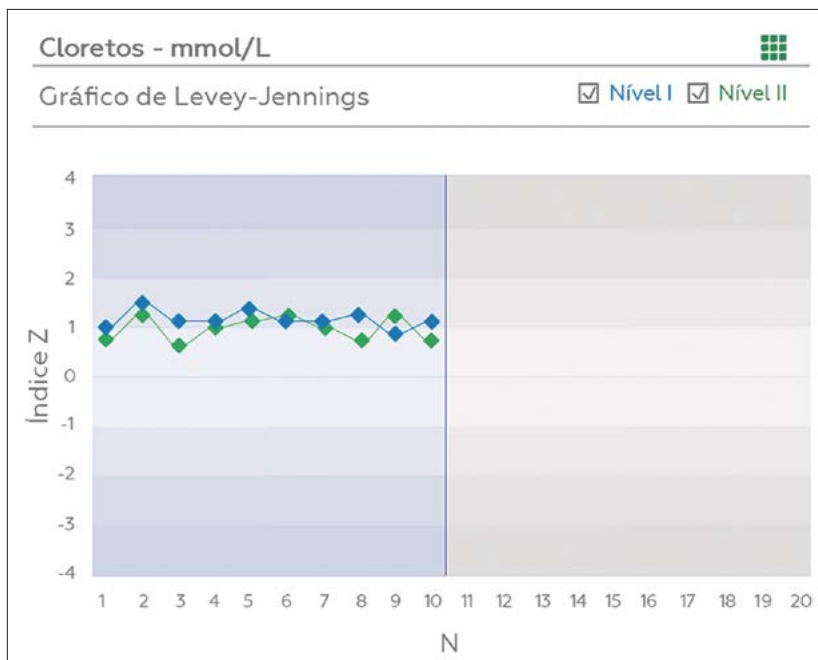


FIGURA 6 Gráfico Levey-Jennings para a rotina de controle interno de cloretos.

Fonte: autorizada pela Controllab.

Como os dados de outros parâmetros (p. ex., cálcio iônico e sódio) apresentaram comportamento similar, indicou-se um possível problema de reconstituição do controle, relacionado à qualidade da água utilizada. Considerada ideal para métodos de análise que exigem mínima interferência e máximas precisão e exatidão, a água ultrapurificada tem se constituído uma opção de muitos laboratórios para a reconstituição de materiais de controle. Esse tipo de água deve ser empregado no momento em que é produzido – ou, no máximo, no mesmo dia da coleta – para evitar que as suas propriedades voltem às condições anteriores às da purificação.

A atenção do laboratório deve ser direcionada não somente aos processos de purificação, mas também ao armazenamento e à distribuição da água no laboratório. Os processos devem garantir que os parâmetros especificados sejam atendidos e mantidos a fim de evitar possíveis transtornos.

NÃO LEITURA DO PROCEDIMENTO DE PREPARO

O objetivo dos provedores de controle de qualidade é enviar para análise dos laboratórios amostras que se assemelhem ao máximo às utilizadas em suas rotinas, com a finalidade de mimetizar por completo o processo. Contudo, algumas exceções podem ser necessárias a fim de garantir uma melhor estabilidade dos materiais, como o processo de liofilização, o uso de matriz diferente da rotina, a extração e a diluição da amostra, entre outros. Por esse motivo, os provedores preocupam-se sempre em atualizar suas instruções de uso dos materiais, destacar qualquer tipo de alteração nesses documentos e orientar a sua leitura antes de realizar qualquer procedimento com o material de controle.

O exemplo a seguir ilustra um caso em que o laboratório começou a apresentar inadequação no EP de rotavírus, por não seguir o procedimento de preparo do material disponibilizado pelo provedor. Nesse caso, ressalta-se que, apesar de o exemplo estar relacionado ao EP, esse tipo de erro pré-analítico também pode ocorrer com o uso do CI.

No caso de uma inadequação para ensaios qualitativos, sugere-se fazer uma tabela similar à apresentada a seguir (Figura 7), que resume as informações principais a serem analisadas pelo laboratório, direcionando-o para uma melhor análise de investigação de causa.

A partir da rodada 2, esse laboratório começou a apresentar resultados falso-negativos em itens confirmadamente “positivos”, conforme resultados do controle de qualidade do provedor e consensos gerais dos itens de ensaio de, no mínimo, 92%. O consenso obtido entre todos os laboratórios que utilizam o mesmo *kit* do laboratório identificado como XYZ também foi satisfatório, com mínimo de 92%. Esses dados são importantes, pois mostram que, a princípio, o

Relatório Histórico de Avaliação					
Módulo: Rotavírus		KIT: XYZ			
Ensaio: Rotavírus		EQU: ABCD		Período: Set_2017 a Mar_2018	
Rodada: Rodada 3			Versão: 1		
Item	Resultado Laboratório	Resultado Provedor	Aval.	Consenso Geral (%)	Consenso Grupo KIT (%)
01	Negativo	Negativo	1A	93,8	96,7
02	Negativo	Positivo	1I	92,4	98,5
03	Negativo	Negativo	1A	97,4	95,9
Rodada: Rodada 2			Versão: 1		
Item	Resultado Laboratório	Resultado Provedor	Aval.	Consenso Geral (%)	Consenso Grupo KIT (%)
01	Negativo	Positivo	1I	97,6	99,8
02	Negativo	Negativo	1A	95,2	98,4
03	Negativo	Positivo	1I	96,8	92,4
Rodada: Rodada 1			Versão: 1		
Item	Resultado Laboratório	Resultado Provedor	Aval.	Consenso Geral (%)	Consenso Grupo KIT (%)
01	Negativo	Negativo	1A	95,3	100,0
02	Positivo	Positivo	1A	96,7	99,6
03	Positivo	Positivo	1A	94,6	98,7

FIGURA 7 Análise histórica de desempenho do laboratório.

Fonte: autorizada pela Controllab.

material de controle não apresentava comportamento atípico, alinhado a dados de homogeneidade e estabilidade do provedor, além de não ter havido efeito matriz e/ou comportamento diferenciado para o *kit* utilizado (amostras não estavam na zona de indeterminação do *kit*), direcionando o laboratório para analisar seu processo interno.

Em contato com o laboratório, constatou-se que, no fim do ano, ocorreu uma mudança da equipe técnica responsável pela análise de rotavírus e a nova equipe não se atentou para o procedimento de uso e as características do material descritas pelo provedor. A suspensão de fezes encaminhada no controle não necessitava de diluição para análise. A realização dessa etapa acabava por diminuir a positividade do material, provocando resultados falso-negativos.

Após implantar a ação corretiva, para a verificação da eficácia, o laboratório solicitou ao provedor as amostras com inadequação para uma nova análise, seguindo, dessa vez, o procedimento recomendado pelo provedor, obtendo êxito. Uma maneira de evitar esse tipo de impacto no controle de qualidade é realizar treinamentos com a equipe, periodicamente, conscientizando-os para a importância de seguir os documentos orientativos do provedor e alertando-os para possíveis exceções diante de materiais de controle de qualidade.

CONTAMINAÇÃO

Pode ocorrer por parte do laboratório entre amostras do controle de qualidade (mistura entre os itens do ensaio) ou contaminação microbiológica; esta última em razão de uma possível má higienização do ambiente em que será realizada a análise, de manuseio das tampas dos frascos de controle sem uso de luvas descartáveis e de uma possível transferência do material de controle para um tubo de coleta reaproveitado e mal higienizado para permitir leitura no equipamento.

A Figura 8 ilustra o impacto de uma contaminação microbiológica no CI de urinálise elementos anormais (urina EA).

O resultado esperado para o lote XYZ (nível 2), conforme bula disponibilizada pelo provedor, era “negativo” para o parâmetro nitrito. Após algum tempo de uso do controle interno, o material começou a apresentar resultados “positivos”. Assim como a glicose, esperavam-se resultados “300 a 1.000 mg/dL”, mas, com o tempo de uso do controle interno, o material passou a apresentar queda em 100 mg/dL.

Situações como essa devem ser inicialmente relatadas ao provedor do controle de qualidade, para que possa ser verificada a estabilidade do controle e se houve relatos de outros laboratórios com esse mesmo comportamento. E, se não forem identificadas por parte do provedor, é importante que o laboratório teste o mesmo material de controle com um novo lote da tira reagente, para eliminar a possibilidade de se tratar de uma tendência desse lote da tira. Se o comportamento se



FIGURA 8 Gráfico de acompanhamento de controle interno para urina EA.

Fonte: autorizada pela Controllab.

mantiver, o laboratório deve analisar a possibilidade de uma contaminação microbiológica do material de controle.

Outra prática recomendada é analisar uma nova unidade do mesmo lote do controle com a máxima atenção aos pontos de vulnerabilidade no processo que podem acarretar em contaminação. Caso o comportamento do material esteja dentro do esperado após alguns dias de uso, consegue-se concluir a possibilidade de contaminação interna do laboratório no frasco utilizado anteriormente.

As bactérias, principalmente as gram-negativas, são capazes de converter nitrato em nitrito, com conseqüente aumento desse analito na amostra analisada. Contudo, quando presentes no meio, consomem a glicose, que, por sua vez, tende a apresentar uma queda nos resultados.

É mais provável haver impacto de uma contaminação microbiológica no CI, já que necessita de um maior intervalo de tempo para que as bactérias cresçam e se proliferem.

TRANSPORTE

A logística de distribuição representa um fator pré-analítico de fundamental importância e de impacto direto para que não haja alteração dos materiais de controle de qualidade. Com relação ao transporte, muitos fatores podem estar relacionados: quebras acidentais; extravios; agitação forte; hemólise do material por elevadas temperaturas; exposição à luz solar; entre outros fatores associados à deterioração.

O provedor deve disponibilizar informações a respeito do transporte dos materiais para que os laboratórios possam monitorá-los, permitindo a verificação no momento de sua chegada, como calendário com o período de envio e condições ambientais às quais os materiais podem ser submetidos.

É importante ressaltar que o provedor deve se atentar aos possíveis comentários dos laboratórios sobre essa etapa do processo pré-analítico, assim como os laboratórios precisam ponderar esse fator pré-analítico em suas investigações de causa.

Após a verificação do material em sua chegada, outro fator pré-analítico bastante importante a que os laboratórios devem se atentar são as condições de armazenamento dos materiais, quando da não realização imediata da análise. Normalmente, essas informações são obtidas nos documentos disponibilizados pelos provedores. No item a seguir, esse assunto será explorado com mais detalhes.

ARMAZENAMENTO

O armazenamento inapropriado pode impactar significativamente nos resultados de um ou mais ensaios que compõem os controles de qualidade interno e externo. Geralmente, esse tipo de erro é observado por tendência e/ou aumento da dispersão nos resultados de controle.

A identificação é mais comumente observada quando o armazenamento inapropriado impacta de maneira significativa nos resultados de controle, ocasionando uma tendência positiva ou negativa dos valores, frente ao dado de referência. Porém, vale destacar que nem sempre esses materiais se degradam de modo proporcional; além disso, a queda e o aumento dos seus valores podem não ser tão significativos, mesmo o erro estando embutido nos resultados. Nesses casos, pode-se observar um aumento na variação (dispersão) dos dados de controle, inclusive quando diferentes itens estão sendo analisados paralelamente ou entre rotinas.

Com a possibilidade de ter um tratamento diferenciado diante das amostras de pacientes, os materiais de controle podem apresentar algumas particularidades quanto ao seu armazenamento. Isso porque os provedores buscam sempre maximizar a sua estabilidade quanto ao transporte e, ao mesmo tempo, disponibilizar ao laboratório uma maior estabilidade para a realização de suas análises. O correto manuseio do laboratório frente às orientações garante que o comportamento observado nos dados de controle esteja relacionado apenas a uma alteração no processo analítico, e não a uma mudança de comportamento do material de controle. Por isso, recomenda-se que esses materiais só devam ser tratados de modo semelhante às amostras de pacientes quando já estão sendo introduzidos na rotina analítica.

Os materiais liofilizados têm uma resistência maior a temperaturas extremas; por isso, as degradações ocasionadas ao armazenamento indevido não são tão comuns de identificar nesse tipo de apresentação. Como nem todos os controles de qualidade podem ser liofilizados, o armazenamento daqueles com apresentação líquida demandam uma maior atenção dos usuários, já que podem se degradar de forma mais rápida e significativamente.

Como cada ensaio tem um tempo de degradação e/ou uma sensibilidade diferente frente ao armazenamento inapropriado do material de controle, pode-se esperar que um ou mais ensaios apresentem alterações mais significativas nos dados, o que pode não ser percebido em outro conjunto de ensaios que também compõem o material de controle. Nesse caso, na investigação de uma possível alteração do material, sugere-se verificar no relatório de avaliação, ou nos dados de controle interno, se os ensaios mais sensíveis ao armazenamento inapropriado sofreram algum tipo de alteração (comportamento atípico) não observada nos ensaios mais resistentes a ambientes extremos.

Para evitar esse tipo de erro, é importante que o laboratório siga sempre as orientações do provedor e que o contate em caso de dúvidas sobre como proceder com relação ao material.

A seguir, destaca-se um exemplo no qual um laboratório mantinha o material de hematologia na geladeira e, após a realização de suas análises, armazenava-o na porta da geladeira, e não na parte mais interna, onde a temperatura é mais estável.

A Figura 9 apresenta o gráfico de acompanhamento dos dados de controle em que a regra 1_{3s} é violada após uma queda progressiva dos dados, conforme a realização das rotinas e o armazenamento diário. Destaca-se que tal comportamento não foi observado nas 10 primeiras dosagens, pois o laboratório a realizou em 5 dias com duas análises diárias.

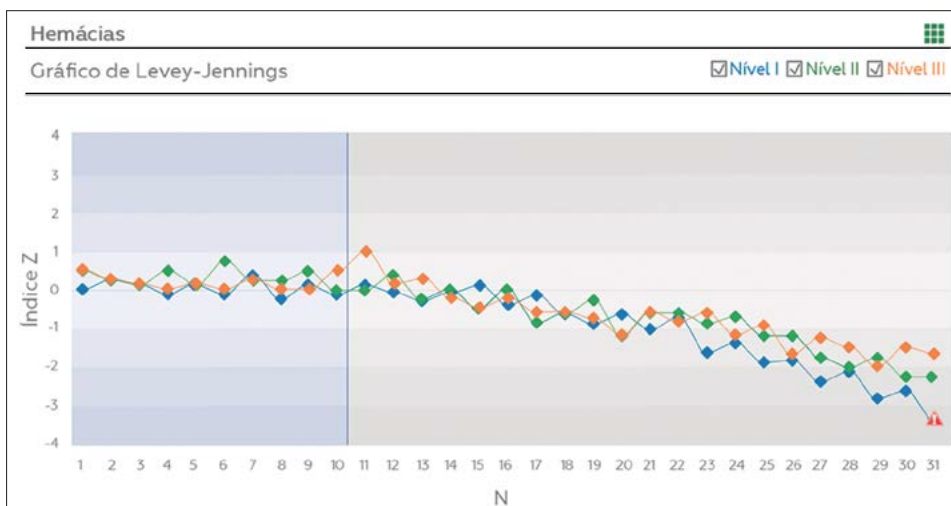


FIGURA 9 Gráfico de controle interno de hemograma (hemácias).

Fonte: autorizada pela Controllab.

Esse mesmo comportamento foi observado para hematócrito, o que reforçou a possibilidade de deterioração do material pelo mau armazenamento na geladeira.

PRÉ-DILUIÇÃO DO MATERIAL

A pré-diluição é realizada nos materiais de ensaio com concentrações acima da faixa de trabalho dos sistemas analíticos. Esse tipo de tratamento é muito comum, por exemplo, nas análises de urinálises, que apresentam valores elevados em alguns parâmetros.

Erros pré-analíticos relacionados à ausência de diluição não são tão comuns de identificar nos materiais de controle, pois esse procedimento já faz parte da rotina dos laboratórios. Mas vale ressaltar que, quando se trata de um processo manual, em que não se realiza o procedimento de diluição pelo sistema analítico de modo automatizado, a análise desse tipo de erro deve ser considerada na investigação de casos com comportamento atípico (erros grosseiros).

EXPOSIÇÃO EXCESSIVA

Trata-se de um dos grandes fatores relacionados às inadequações do laboratório no EP e no CI, visto que, ao manusear o material de controle, é muito comum que o usuário exceda o tempo máximo a que o material pode ficar exposto na bancada do laboratório.

Um dos motivos para a exposição excessiva na bancada consiste no manuseio com os materiais liofilizados, que necessitam ser reidratados pelo operador e ficar em repouso na bancada por certo tempo. Esse tempo de descanso é indicado para que se possa reidratar o material por completo; contudo, há um tempo máximo para que ele fique exposto à temperatura ambiente antes de ser analisado e/ou armazenado (refrigerado) conforme indicado pelo provedor. Ao exceder esse tempo, o usuário corre o risco de inviabilizar o uso desse material em seu controle de qualidade.

Os materiais de controle fornecidos na apresentação líquida e que, por motivo de estabilidade, necessitam estar armazenados em geladeiras/*freezer* geralmente também precisam ficar na bancada para atingir a temperatura ideal para análise – nesse momento, o tempo máximo para exposição à temperatura ambiente também precisa ser respeitado.

É importante acrescentar ainda que alguns usuários costumam deixar os controles expostos na bancada até que seus resultados sejam liberados pelo equipamento. Essa exposição também pode influenciar significativamente nos resultados de controle, em um curto tempo de uso, ou no decorrer das rotinas, conforme a repetição desse manuseio inapropriado.

O aquecimento em banho-maria do material de controle também se faz necessário em alguns momentos, caso no qual é importante destacar que, além de o tempo máximo no banho-maria ser um fator importante para evitar a degradação do material, a temperatura indicada deve ser respeitada.

Por último, como é preciso abrir e fechar as tampas de alguns controles entre as pipetagens, recomenda-se que não excedam o tempo máximo necessário. O tempo de exposição em aberto acarreta a evaporação e a “secagem” do material nas bordas da tampa e do tubo, procedimento que pode alterar os valores do controle de qualidade.

REFERÊNCIA

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). QMS24, Using proficiency testing and alternative assessment to improve medical laboratory quality. 3. ed. Wayne: CLSI; 2016.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

ABNT NBR ISO/IEC 17043, 2011, ITEM 4.6.3.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Farmacopeia Brasileira. 5.ed. Brasília: Anvisa; 2010. v. 1. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeias-virtuais>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

CONTROLLAB. Desmitifique a calibração. Disponível em: <https://controllab.com/pdf/manual_calib_2005.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2018.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA QUALIDADE. Disponível em: <<http://fnq.org.br/informe-se/publicacoes>>. Ebook de Benchmarking. Acesso em: 24 abr. 2018.

OLIVEIRA CA, MENDES ME. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. Rio de Janeiro: Controllab, 2011. v. II. Disponível em: <https://controllab.com/pdf/Gestao-DaFaseAnaliticaDoLaboratorioVOL2_PDF.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL (SBPC/ML). Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial: automação laboratorial: histórico, seleção, implantação e gestão. São Paulo; 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL (SBPC/ML). Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial: coleta e preparo da amostra biológica. São Paulo; 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL (SBPC/ML). Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): realização de exames em urina. São Paulo; 2017.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

CONTROLE DE QUALIDADE?

A CONTROLLAB TEM A SOLUÇÃO COMPLETA PARA OS LABORATÓRIOS

Soluções que atendem às necessidades dos laboratórios, ajudando a prover serviços **precisos, incontestáveis** e colaborando para que se destaquem no **mercado nacional e internacional**.

Serviços abrangentes e gerenciáveis, que contribuem para o ciclo da qualidade analítica do laboratório.

Comparação das práticas e métricas do laboratório com o mercado para maior efetividade na tomada de decisão e melhoria contínua do processo.

Solução que unifica as ferramentas de controle de qualidade para fornecer dados concisos sobre a qualidade analítica do laboratório em tempo real.

Ampla escopo de serviços para a confiabilidade dos resultados e redução de custos inerentes aos erros de ensaio.

VERIFICAÇÃO
E VALIDAÇÃO
DE PROCESSOS

ENSAIO DE
PROFIÊNCIA

CONTROLE
INTERNO

INDICADORES E
BENCHMARKING
LABORATORIAL

GESTÃO DA
QUALIDADE
ANALÍTICA

CALIBRAÇÃO
DE INSTRUMENTOS

EDUCAÇÃO

Encontro online, questionários, trabalhos científicos, livros e muito mais para conhecimento e atualização profissional.

A maior cobertura de ensaios com múltiplos itens e rodadas, que simulam a realidade dos laboratórios com documentos em formato gerencial para tomada de decisão.

Ampla escopo de amostras previamente valoradas por Ensaio de Proficiência ou Interlaboratorial. Acesso ao CI ONLINE - a Gestão Completa dos Controles Internos que simplifica a rotina laboratorial.

Serviços disponíveis para múltiplos segmentos. Consulte o catálogo *online* em www.controllab.com

Controllab
Lado a lado com você

controllab.com | +55 21 3891 9900 | contato@controllab.com

facebook.com/controllab | plus.google.com/controllab | instagram.com/_controllab

4 Flexibilização do jejum para avaliação do perfil lipídico

INTRODUÇÃO

Alguns autores anteciparam que o fim do jejum para o perfil lipídico seria indicado para a rotina laboratorial. Duas publicações em 2016 recomendaram o fim do jejum para o perfil lipídico: o Consenso da European Atherosclerosis Society e da European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine;¹ e outra publicação norte-americana de Driver e colaboradores.² Essa quebra de paradigma permitiu trazer para a rotina o estado metabólico habitual dos pacientes; e, como já está bem sedimentado na literatura, valores aumentados de triglicérides no pós-prandial representam um maior risco para eventos cardiovasculares.

O consenso brasileiro que flexibilizou o jejum para o perfil lipídico foi elaborado pelas Sociedades Brasileiras de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (SBPC/ML), Cardiologia (SBC), Diabetes (SBD), Endocrinologia e Metabologia (SBEM) e Análises Clínicas (SBAC). Esse consenso foi publicado como “Posicionamento sobre a flexibilização do jejum para o perfil lipídico”³ e, também, incluído na *Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose* (2017).⁴

O principal objetivo da flexibilização do jejum foi tornar a coleta de sangue mais segura em diversas situações, prevenindo casos de hipoglicemia por uso de insulina em pacientes com diabetes melito ou por jejum prolongado no caso de gestantes, crianças e idosos, minimizando intercorrências e aumentando a adesão para a realização de exames e o comparecimento às consultas médicas.

As dosagens no estado pós-prandial são mais práticas, viabilizando maior acesso do paciente ao laboratório, com menor perda de dias de trabalho, abandono de consultas médicas por falta de exames e maior acesso à avaliação do risco cardiovascular.

As determinações de colesterol total, HDL-C, não HDL-C e LDL-C não diferem significativamente se realizadas no estado pós-prandial ou de jejum. Há aumento nos níveis de triglicérides (TG) no estado alimentado, embora seja pouco relevante desde que se considere uma refeição usual que não seja sobrecarregada em gordura, havendo a possibilidade de ajustar os valores de referência.

A flexibilidade do jejum para o perfil lipídico tornou possível uma maior amplitude de horários de coleta, reduzindo, assim, o congestionamento nos laboratórios, especialmente no início da manhã, com maior conforto para o paciente.

Os avanços tecnológicos nas metodologias diagnósticas dos principais ensaios disponíveis mitigaram as interferências causadas pela maior turbidez nas amostras, decorrentes de elevadas concentrações de TG. Contudo, há potenciais limitações, especialmente referente ao cálculo da LDL-C, em que estudos de desempenho entre diferentes metodologias têm demonstrado a necessidade de revisão das práticas de utilização das fórmulas adotadas.

A concentração de LDL-C no plasma sanguíneo pode ser estimada pelo cálculo com a fórmula de Friedewald, descrita em 1972, mas apresenta muitas limitações. Na fórmula de Friedewald ($LDL-C = CT - HDL-C - TG/5$), o valor de $TG/5$ é uma estimativa do VLDL-C e todas as concentrações são expressas em mg/dL. Quando o TG está elevado, o cálculo do LDL-C pela fórmula de Friedewald é subestimado e deixa-se de tratar o paciente pela interferência do TG. Algumas condições são exigidas para que os resultados sejam confiáveis e possam ser considerados de exatidão adequada. A concentração dos TG deve ser menor que 400 mg/dL, e valores acima de 100 mg/dL de TG já começam a subestimar os valores de LDL quando comparados à ultracentrifugação. Outra limitação ao uso da fórmula é que as amostras não devem conter beta-VLDL, característica da hiperlipoproteinemia tipo III. Quando uma ou mais das condições citadas não são cumpridas, não se pode utilizar a fórmula.

O estudo de Martin e colaboradores,⁵ com 1.350.908 crianças, adolescentes e adultos, sugere a correção da fórmula de Friedewald, utilizando como referência a ultracentrifugação. Os cálculos estatísticos definiram diferentes divisores para o valor de TG, que permitem estimar com maior fidedignidade os valores de VLDL-C. Para obter esses divisores, depende-se das concentrações do colesterol não HDL (não HDL-C) e do TG da amostra do paciente. Com esse novo divisor (x), aplica-se a fórmula: $LDL-C = CT - HDL-C - TG/x$, em que x varia de 3,1 a 11,9. Isso significa que se pode calcular o LDL-C com valores de TG na amplitude de 7 mg/dL – 13.975 mg/dL com seus respectivos fatores. A correção mostra um benefício importante em situações em que não seja possível usar a fórmula com $TG > 400$ mg/dL, seja na coleta sem jejum, seja com jejum.

Outra maneira de apresentar os valores de LDL-C seria a dosagem direta da fração por meio de ensaios colorimétricos. Contudo, seu grande problema é a enorme variação existente entre os ensaios disponíveis no mercado, que pode chegar a 30% e ainda não é muito bem entendida na literatura. Isso provavelmente decorre das diferentes especificidades de cada ensaio por cada subfração da LDL lipoproteína. Essa variação poderia ser uma condição limitante para a utilização ampla da dosagem direta na prática clínica.

É muito importante incluir no laudo do laboratório o cálculo do não HDL-C junto aos demais resultados do perfil lipídico para adultos, pois os níveis de TG não interferem no seu cálculo e será necessário para aplicar a fórmula de Martin.

Com o processo de flexibilização do jejum na coleta da amostra para avaliar o perfil lipídico, algumas recomendações clínicas e laboratoriais são importantes.

RECOMENDAÇÕES PARA O ATENDIMENTO DO PACIENTE NO LABORATÓRIO CLÍNICO

- Coleta de amostra sem jejum para o perfil lipídico: poderá ser realizado pelo laboratório com a presença da informação do estado de jejum, no momento da coleta da amostra, no laudo laboratorial;
- Solicitação médica sem definição do tempo de jejum e que não contenha outros exames sabidamente requerentes de jejum: recomenda-se incluir o tempo informado de jejum no momento de coleta no laudo laboratorial;
- Presença, na mesma solicitação, de outros exames que necessitam de jejum: o laboratório clínico poderá definir que o perfil lipídico seja coletado com jejum de 12 horas quando os outros exames laboratoriais, solicitados na mesma requisição, também necessitam desse período de jejum. Recomenda-se que o laboratório especifique a necessidade ou não do jejum para cada exame: sem jejum, com jejum de 12 horas ou conforme a definição do laboratório;
- Quando houver a indicação de um tempo específico de jejum na solicitação do médico, o laboratório deverá seguir tal recomendação. Poderá ser utilizado o cálculo de horas de jejum pelo SIL (Sistema de Informação Laboratorial), com base na informação do tempo da última refeição;
- Quando os níveis de TG no estado pós-prandial se encontrarem > 440 mg/dL ou na presença de situações especiais, como em recuperação de pancreatite por hipertrigliceridemia, ou em início de tratamento com medicamentos que causam hipertrigliceridemia grave, será recomendada ao médico solicitante a prescrição de uma nova avaliação de TG com jejum de 12 horas e considerado um novo exame de TG pelo laboratório clínico;
- Quando acontecer a segunda coleta de amostra para TG: ficará a critério de cada laboratório clínico; dependendo de seu sistema e estratégia, utilizar o

mesmo código ou outro específico para o exame de TG sem jejum e TG com jejum de 12 horas.

RECOMENDAÇÕES DE MODELO DO LAUDO LABORATORIAL

O laudo laboratorial é de responsabilidade do laboratório clínico e de seu responsável técnico. Com o intuito de promover o alinhamento e a harmonização entre as instituições, recomenda-se a adoção das seguintes informações no laudo:

- Os valores referenciais e de meta terapêutica do perfil lipídico (adultos > 20 anos), de acordo com a avaliação de risco cardiovascular estimado pelo médico, estão descritos nas Tabelas 1 e 2. Os valores devem ser interpretados pelo médico que solicitou o exame, que estratifica o risco cardiovascular do paciente com base em critérios clínicos (p. ex., idade, diabetes, hipertensão, tabagismo, insuficiência coronariana etc.) e define qual o valor ideal a ser alcançado, especificamente para cada paciente. Essa estratificação pode ser feita por meio da calculadora de risco cardiovascular disponibilizada no site da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) (<<http://departamentos.cardiol.br/sbc-da/2015/CALCULADORAER2017/index.html>>);
- Inserção de observação no laudo, referenciando que os valores de perfil lipídico devem ser interpretados conforme a avaliação e a evolução clínica do paciente. Recomenda-se a seguinte frase: “A interpretação clínica dos resultados deverá levar em consideração o motivo da indicação do exame, o estado metabólico do paciente e a estratificação do risco para estabelecimento das metas terapêuticas”;
- Os valores referenciais desejáveis do perfil lipídico para crianças e adolescentes são indicados na Tabela 3. Não são indicados valores de meta terapêutica de acordo com risco cardiovascular para esse grupo de pacientes;
- Pacientes com diabetes e sem fatores de risco ou sem evidência de aterosclerose subclínica devem manter o LDL-C abaixo de 100 mg/dL. Pacientes com fatores de risco ou doença aterosclerótica subclínica devem manter LDL-C abaixo de 70 mg/dL. Pacientes com história de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico (AVE) ou revascularização coronariana, carotídea ou periférica, ou história de amputação devem manter o LDL-C abaixo de 50 mg/dL;
- Fica a critério do laboratório incluir uma observação específica para o rastreamento da hipercolesterolemia familiar (HF). Recomenda-se o uso da seguinte frase: “Valores de colesterol total \geq 310 mg/dL em adultos ou \geq 230 mg/dL para crianças e adolescentes podem ser indicativos de hipercolesterolemia familiar, se excluídas as dislipidemias secundárias”.

TABELA 1 Valores referenciais desejáveis do perfil lipídico para adultos > 20 anos

Lipídios	Com jejum (mg/dL)	Sem jejum (mg/dL)
Colesterol total	< 190	< 190
HDL-C	> 40	> 40
Triglicerídeos	< 150	< 175

Fonte: Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017.⁴

TABELA 2 Valores de meta terapêutica conforme a avaliação de risco cardiovascular estimado pelo médico solicitante do perfil lipídico para adultos > 20 anos

Lipídios	Risco cardiovascular estimado pelo médico	Meta terapêutica (mg/dL)
	Categoria de risco	Com ou sem jejum
LDL-C	Baixo	< 130
	Intermediário	< 100
	Alto	< 70
	Muito alto	< 50
Não HDL-C	Baixo	< 160
	Intermediário	< 130
	Alto	< 100
	Muito alto	< 80

Fonte: Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017.⁴

TABELA 3 Valores referenciais desejáveis do perfil lipídico para crianças e adolescentes

Lipídios	Com jejum (mg/dL)	Sem jejum (mg/dL)
Colesterol total	< 170	< 170
HDL-C	> 45	> 45
Triglicerídeos (0 a 9 anos)	< 75	< 85
Triglicerídeos (10 a 19 anos)	< 90	< 100
LDL-C	< 110	< 110

Fonte: Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017.⁴

RECOMENDAÇÕES SOBRE FÓRMULAS E A DOSAGEM DIRETA DE LDL-C

A avaliação do LDL-C pode ser realizada por dosagem direta ou estimada por cálculo com base nas fórmulas de Friedewald ou de Martin. Recomenda-se que os laboratórios clínicos adotem as seguintes orientações:

- Observar, na utilização da fórmula de Friedewald, as limitações da falta de jejum e de valores de TG > 400 mg/dL para estimar o LDL-C, podendo, nesses casos, ser aplicada a fórmula de Martin ou utilizada a dosagem direta;
- Na coleta de amostra pós-prandial, pode-se avaliar o LDL-C por dosagem direta ou pela fórmula de Martin;
- Incluir o cálculo do colesterol não HDL (não HDL-C) junto aos demais resultados do perfil lipídico para adultos, mesmo sem jejum, pois os níveis de triglicérides não interferem nesse cálculo. Fica a critério do laboratório reportar ou não o cálculo do VLDL-C;
- É importante observar que em algumas hipertrigliceridemias graves, quando a concentração das lipoproteínas ricas em TG predomina no sangue, e as concentrações de LDL-C e HDL-C estão baixas, a tendência é o cálculo do LDL-C pela fórmula de Martin estar muito baixo ou com o valor negativo. Nessa situação, recomenda-se liberar um valor de LDL-C < 10 mg/dL. Têm-se, no mesmo volume de amostra, muitas partículas grandes de VLDL e poucas de LDL, subestimando a quantidade de LDL circulante.

A principal finalidade do consenso sobre a flexibilização do jejum foi a de padronizar condutas clínicas e laboratoriais, com relação à flexibilidade do jejum na avaliação do perfil lipídico, em todo o território nacional, contribuindo para que os médicos e os laboratórios clínicos tenham segurança em suas tomadas de decisões, com o respaldo de evidências científicas.

CASOS CLÍNICOS

Caso 1

Paciente do sexo masculino, 45 anos e obeso, em busca de prevenção primária procura o clínico para uma avaliação cardiovascular. O paciente tem pai falecido de infarto agudo do miocárdio e já está hipertenso e diabético. Na avaliação, o médico solicitou o seu perfil lipídico e calculou o seu risco cardiovascular na calculadora de risco da SBC. O paciente apresentou risco intermediário. Nesse caso, o paciente deve ter como alvo terapêutico o LDL-C inferior a 100 mg/dL ou o não HDL-C inferior a 130 mg/dL. Na Tabela 4, estão descritos os resultados do perfil lipídico do paciente em questão realizados em cinco diferentes laboratórios. A amostra foi processada em dois ensaios diferentes para o LDL-C, dosados por método direto,

processados por ultracentrifugação e calculados pelas duas fórmulas – a de Friedewald e a de Martin.

TABELA 4 Resultados do perfil lipídico do mesmo paciente em cinco laboratórios diferentes

Variáveis	LAB 1 (mg/dL)	LAB 2 (mg/dL)	LAB 3 (mg/dL)	LAB 4 (mg/dL)	LAB 5 (mg/dL)
Colesterol total	214	210	212	213	211
HDL-C	51	47	45	48	50
Triglicerídeos	300	305	306	299	305
LDL-C Friedewald	103	102	106	105	100
LDL-C Martin	120	119	123	121	118
LDL-C dosado	–	88	–	120	105
LDL-C ultracentrifugação	122	–	–	–	–
Não HDL-C	163	163	167	165	161

Os níveis de colesterol total, TG e HDL-C variam pouco entre os laboratórios. Considerando o valor da dosagem de LDL-C por ultracentrifugação (122 mg/dL) o *gold standard* (padrão de referência) para essa medida, comparam-se os resultados dos diferentes laboratórios. Na metodologia direta, entre fabricantes diferentes, os resultados variam muito entre si (88 a 120 mg/dL). Na avaliação pela fórmula de Friedewald, o valor foi em média de 103 mg/dL e, pela fórmula de Martin, de 120 mg/dL. O valor do LDL-C estimado pela fórmula de Martin é o que fica mais próximo ao valor dosado por ultracentrifugação. Caso o médico avaliasse a dislipidemia desse paciente com os níveis de LDL-C e recebesse no laudo o valor de 103 mg/dL, calculado pela fórmula de Friedewald, provavelmente o paciente não receberia tratamento para dislipidemia, por estar muito próximo ao alvo. Caso o médico recebesse o resultado do LDL-C de 120 mg/dL, calculado pela fórmula de Martin, ou avaliasse o paciente pelo não HDL-C, provavelmente esse profissional iniciaria a terapia hipolipemiante. A padronização pela fórmula de Martin é a mais adequada, pois os valores de LDL-C se aproximam do LDL-C dosado por ultracentrifugação (o método de referência).

Caso 2

Paciente do sexo feminino, 28 anos, em exame periódico realizado em laboratório que já implantou a flexibilização do jejum apresentou os valores de TG de 4.780 mg/dL (realizado sem jejum de 12 horas), colesterol total de 187 mg/dL e

HDL-C de 50 mg/dL. Mesmo aplicando a fórmula de Martin, que permite valores altos de TG, o valor de LDL-C será negativo. O laboratório clínico, nesse caso, pode liberar o resultado como inferior a 10 mg/dL. A paciente praticamente apresenta poucas partículas de lipoproteína LDL e muitas partículas grandes de lipoproteína VLDL na circulação, subestimando a quantidade de LDL circulante. Nesse caso, mesmo dosando por método direto, os valores sempre se apresentam inferiores à sensibilidade analítica do método. O médico pode repetir o exame com o jejum de 12 horas, conforme recomendado pelo consenso, ou, também, iniciar as terapias específicas para redução dos TG e, posteriormente, avaliar a necessidade da repetição do exame para acompanhamento clínico do paciente.

REFERÊNCIAS

1. NORDESTGAARD BG, LANGSTED A, MORA S, KOLOVOU G, BAUM H, BRUCKERT E ET AL.; European Atherosclerosis Society (EAS) and the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). Fasting is not routinely required for determination of a lipid profile: clinical and laboratory implications including flagging at desirable concentration cut-points – a joint consensus statement from the European Atherosclerosis Society and European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Eur Heart J*. 2016;37(25):1944-58.
2. DRIVER SL, MARTIN SS, GLUCKMAN TJ, CLARY JM, BLUMENTHAL RS, STONE NJ. Fasting or non-fasting lipid measurements. it depends on the question. *JACC*. 2016;67(10):1227-34.
3. SCARTEZINI M, FERREIRA CES, IZAR MCO, BERTOLUCI M, VENCIO S, CAMPANA GA ET AL. Posicionamento sobre a flexibilização do jejum para o perfil lipídico. *Arq Bras Cardiol*. 2017;108(3):195-197.
4. FALUDI AA, IZAR MCO, SARAIVA JFK, CHACRA APM, BIANCO HT, AFIUNE NETO A ET AL. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. *Arq Bras Cardiol*. 2017;109(2Supl.1):1-76.
5. MARTIN SS, BLAHA MJ, ELSHAZLY MB, TOTTH PP, KWITEROVICH PO, BLUMENTHAL RS ET AL. Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. *JAMA*. 2013;310(19):2061-8.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- BANSAL S, BURING JE, RIFAI N, MORA S, SACKS FM, RIDKER PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA*. 2007;298:309-16.
- CANNON CP, BLAZING MA, GIUGLIANO RP, MCCAGG A, WHITE JA, THEROUX P ET AL.; IMPROVE-IT Investigators. Ezetimibe Added to statin therapy after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2015;372(25):2387-97.
- CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS' (CTT) COLLABORATORS, KEARNEY PM, BLACKWELL L, COLLINS R, KEECH A, SIMES J ET AL. Efficacy of cholesterol lowering therapy in 18.686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet*. 2008;371:117-25.

COLHOUN HM, BETTERIDGE DJ, DURRINGTON PN, HITMAN GA, NEIL HA, LIVINGSTONE SJ ET AL.; CARDS Investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicenter randomized placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004;364(9435):685-96.

DORAN B, GUO Y, XU J, WEINTRAUB H, MORA S, MARON DJ ET AL. Prognostic value of fasting versus nonfasting low-density lipoprotein cholesterol levels on long-term mortality: insight from the National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES-III). *Circulation*. 2014;13(7):546-53.

EXPERT PANEL ON INTEGRATED GUIDELINES FOR CARDIOVASCULAR H, RISK REDUCTION IN C, ADOLESCENTS, NATIONAL HEART L, BLOOD I. Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. *Pediatrics*. 2011;128(Suppl. 5):S213-56.

FRIEDEWALD WT, LAVY RI, FREDRICKSON DS. Estimation to density lipoprotein without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:499-502.

LANGSTED A, FREIBERG JJ, NORDESTGAARD BG. Fasting and nonfasting lipid levels: influence of normal food intake on lipids, lipoproteins, apolipoproteins, and cardiovascular risk prediction. *Circulation*. 2008;118:2047-56.

LANGSTED A, NORDESTGAARD BG. Nonfasting lipid profiles: The way of the future. *Clin Chem*. 2015;61(9):1123-5.

NORDESTGAARD BG, CHAPMAN MJ, HUMPHRIES SE, GINSBERG HN, MASANA L, DESCAMPS OS ET AL. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus Statement of the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal*. 2013;34(45):3478-90.

NORDESTGAARD BG, VARBO A. Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet*. 2014;384:626-35.

RIFAI N, YOUNG IS, NORDESTGAARD BG, WIERZBICKI AS, VESPER H, MORA S ET AL. Nonfasting sample for the determination of routine lipid profile: is it an idea whose time has come? *Clin Chem*. 2016;62(3):428-35.

SABAKA P, KRZULIAK P, GASPAR L, CAPRND A, BENDZALA M, BALAZ D ET AL. Postprandial changes of lipoprotein profile: effect of abdominal obesity. *Lipids Health Dis*. 2013;12:179.

SCARTEZINI M, FERREIRA C, IZAR MCO, BERTOLUCI M, VENCIO S, CAMPANA GA ET AL. Posicionamento sobre a flexibilização do jejum sobre o perfil lipídico. *Arq Bras Cardiol*. 2017;108:195-7.

SIDHU D, NAUGLER C. Fasting time and lipid levels in a community-based population: a cross-sectional study. *Arch Intern Med*. 2012;172(22):1707-10.

STEINER MJ, SKINNER AC, PERRIN EM. Fasting might not be necessary before lipid screening: A Nationally Representative Cross-sectional Study. *Pediatrics*. 2011;128:463-70.

VIRANI MD. Non-HDL cholesterol as a metric of good quality of care. Opportunities and challenges. *Tex Heart Inst J*. 2011;38(2):160-2.

5 Potenciais interferências do gel separador e novas tecnologias

INTRODUÇÃO

Os primeiros tubos a vácuo foram lançados na década de 1940, a partir de uma solicitação da Cruz Vermelha norte-americana. Com o passar dos anos, tubos a vácuo para diversas aplicações e dispositivos para a coleta de sangue a vácuo passaram a ser desenvolvidos, resultando em um grande avanço ao laboratório clínico. Na década de 1970, chegaram ao mercado os tubos a vácuo com gel separador, quando ainda eram de vidro e o gel separador, à base de silicone. A tecnologia de um separador de gel para os tubos de soro tinha o propósito de endereçar algumas necessidades dos laboratórios, promovendo uma maior eficiência dos processos e aumentando a segurança dos profissionais de saúde.

Na década de 1990, percebeu-se a necessidade de aplicar a mesma tecnologia da barreira de gel dos tubos de soro aos tubos com heparina lítica, geradores de plasma. Então, os laboratórios puderam usufruir dos benefícios do gel separador à rapidez do plasma, pois, desse modo, não era necessário aguardar a retração do coágulo, exigida nos tubos para geração de soro.

Neste capítulo, será possível observar a relação do gel separador com as análises e suas potenciais interferências, além de entender melhor seus benefícios e características.

GEL SEPARADOR

A função do gel é proporcionar uma barreira física e química entre o soro ou o plasma e as células.¹

A utilização da barreira de gel proporcionou muitos benefícios para a coleta, o processamento e o armazenamento das amostras em um tubo primário.¹

Os tubos com gel separador foram bem aceitos pelos laboratórios, principalmente pelas vantagens proporcionadas pela barreira de gel, que facilita a rápida

separação do soro dos constituintes celulares do sangue, reduzindo, assim, o tempo gasto na fase pré-analítica pela equipe laboratorial.²

A barreira separadora é formada pelo modo como o gel reage às forças aplicadas pela centrifugação. Após a coleta da amostra de sangue em um tubo com gel separador, na medida em que a centrifugação se inicia, a força g aplicada no gel causa a diminuição da sua viscosidade, permitindo sua movimentação ou fluidez, conhecidas por características tixotrópicas. Quando a centrifugação cessa, o gel se torna uma barreira imóvel entre o sobrenadante e as células.¹

Inicialmente, os primeiros tubos com separador continham gel de silicone; porém, mostraram-se instáveis após a esterilização e o gel de silicone foi substituído por gel à base de poliéster. Geralmente, o gel é composto por mais de um componente: uma resina e uma mistura estabilizadora, necessária para ajustar a densidade do gel para que ele esteja entre o soro ou o plasma e as células. Em razão da composição natural dos géis, a validade é finita.¹

Propriedades do gel separador

Para exercer sua função, o gel deve apresentar propriedades essenciais:³

- Densidade: deve ser projetada para estar entre o soro/plasma em interface à localização das células;
- Ponto de movimentação: refere-se ao momento em que o gel passa a se mover do estado estático para um móvel, efeito conhecido como tixotrópico;
- Viscosidade: a viscosidade do gel permitirá que haja movimentação entre o coágulo e as células durante a centrifugação;
- Medicções terapêuticas: o índice de adsorção e a estabilidade dos medicamentos em relação ao tipo de gel.

Movimentação do gel separador

Em virtude da propriedade tixotrópica do gel – semissólido sob condições estáticas tornando-se menos viscoso quando se aplica a força g –, sua movimentação durante a centrifugação é possível. Os géis separadores dispõem de uma densidade específica que fica entre a densidade do soro/plasma e coágulo/células, que determinará a localização da interface.

A completa e adequada formação da barreira de gel depende do tempo de centrifugação (principalmente para uma barreira uniforme), da temperatura da centrífuga e da força g.

Uma formação inadequada da barreira de gel nos tubos certamente estará relacionada ao baixo tempo de centrifugação ou à força g insuficiente. A força g deve ser indicada pelo fabricante dos tubos como entre 1.300 a 3.000 g.

Em centrífugas de ângulo móvel, a centrifugação deve ser de 10 minutos; já em centrífugas de ângulo fixo, recomenda-se o tempo de 15 minutos; porém, a formação incompleta da barreira também pode estar relacionada a fatores associados ao paciente.

Durante o processo de centrifugação, a força centrífuga é aplicada no gel do tubo. As centrífugas de ângulo móvel se mostram mais eficientes quando comparadas às de ângulo fixo em razão da maior força axial aplicada no gel.

A qualidade da formação da barreira em centrífugas de rotor fixo depende do ângulo do rotor. Nesses casos, a barreira de gel será mais fina e inclinada, enquanto, em centrífugas de ângulo móvel, a barreira será mais espessa e horizontal.

Em situações de temperaturas muito baixas, nas quais a movimentação do gel pode ser comprometida, indica-se o uso de centrífugas refrigeradas em 25°C.

Fatores que influenciam o desempenho do gel

O tubo com gel separador trouxe muitos benefícios ao laboratório clínico; porém, alguns fatores podem influenciar seu desempenho:

1. Controlados pelos fabricantes:
 - Propriedades físicas do gel;
 - Material do tubo (vidro ou plástico);
 - Posição do gel dentro do tubo.
2. Controlados pelos usuários:
 - Manuseio dos tubos:
 - Volume coletado;
 - Tempo de coagulação;
 - Tipo de centrífuga;
 - Força g;
 - Tempo e temperatura de centrifugação;
 - Armazenamento;
 - Umidade;
 - Validade;
 - Característica do material coletado:
 - Coleta de sangue após o uso de contraste iodado.⁴
3. Não controláveis:
 - Fatores associados ao paciente:
 - Hematócrito baixo;
 - Proteína sérica elevada;⁶
 - IgG sérico elevado;^{5,6}
 - Mieloma múltiplo.⁶

As amostras de pacientes com distúrbios de proteínas alteram a densidade do soro que interfere na adequada formação da barreira de gel, posicionando-se acima do soro/plasma, ou até mesmo não se movimentam.⁶

Em pacientes com mieloma múltiplo, a barreira de gel fica entrelaçada com o soro e os eritrócitos,⁶ o que pode resultar na obstrução dos equipamentos analíticos.

Quando o gel não consegue se movimentar, a análise poderá ser realizada com o soro sobrenadante e, quando o gel se posicionar acima do soro, deverá ser coletada uma nova amostra em tubo sem gel separador.

POTENCIAIS INTERFERÊNCIAS DO GEL SEPARADOR

Estabilidade analítica

A estabilidade analítica das amostras de sangue é comumente definida como “a capacidade da amostra em reter os valores iniciais mensurados com específicos limites e sob condições especiais”.⁷ É importante ressaltar que a estabilidade dos analitos também está associada a outros fatores não relacionados ao gel e que podem causar alteração e/ou deterioração dos analitos. É comum a associação da estabilidade analítica ao gel separador. A verdade é que a maioria dos testes realizados em soro e plasma heparinizado não sofre interferências em razão do gel.⁸

Atualmente, os fabricantes de tubos têm desenvolvido novas fórmulas de gel para minimizar a adsorção de medicamentos e analitos.³ Apesar das constantes evoluções dos tubos de coleta de sangue, as características (estabilidade, resina, viscosidade etc.) do gel são diferentes entre um fabricante e outro, assim como a possibilidade de alteração da estabilidade analítica pela adsorção de medicamentos ou analitos, sendo recomendada a verificação da compatibilidade dos tubos aos futuros testes.

Dosagem de medicações terapêuticas

O uso de tubos com gel separador para o monitoramento de medicações terapêuticas ainda provoca muitas discussões.

Idealmente, os resultados laboratoriais não devem ser afetados pela interação com o gel separador. Porém, alguns relatos revelam efeitos na concentração dos analitos. O volume da amostra, o tempo de armazenamento e o tipo de gel podem influenciar a adsorção de medicamentos ao gel.³ Medicações hidrofóbicas, como fenitoína, fenobarbital, carbamazepina, quinidina e lidocaína, podem adsorver ao gel separador. Essa adsorção pode diminuir a concentração sérica entre 20 e 50% após 24 horas em 4°C.³

Alguns fatores podem influenciar na estabilidade dos analitos para monitoramento de medicações terapêuticas e química especial:

1. Controlados pelos fabricantes:
 - Natureza química da resina;
 - Superfície do gel antes da centrifugação.

2. Controlados pelos usuários:

- Tempo de contato do gel com a amostra antes e após a centrifugação;
- Temperatura de armazenamento;
- Volume de amostra acima do gel;
- Posicionamento do tubo antes da centrifugação;
- Superfície do gel após a centrifugação (centrífugas de ângulo fixo *versus* ângulo móvel).

3. Não controláveis:

- Natureza química do analito ou da medicação;
- Concentração dos analitos: horário da administração do medicamento, metabolismo do paciente etc.

O usuário ou o laboratório têm a maior influência quanto à estabilidade do analito. O tempo em que a amostra permanece em contato com o gel, a temperatura de armazenamento e o posicionamento dos tubos antes da análise podem afetar o índice de recuperação do analito do sobrenadante quando eles não são controlados.

Outros fatores, como a natureza química dos medicamentos, não podem ser controlados. Há medicações hidrofóbicas (repelentes à água) ou hidrofílicas (atraentes à água) e, ainda, a acidez relativa que influenciam sua estabilidade no gel separador dos tubos. Se a medicação é hidrofóbica, tende a migrar fora da fase aquosa da amostra, em direção ao gel.⁹

Na Tabela 1, são apresentadas algumas medicações terapêuticas mais comuns e suas respectivas classificações.

TABELA 1 Medicações terapêuticas mais frequentes e suas respectivas classificações

Medicações hidrofílicas	Medicações hidrofóbicas
Gentamicina	Fenobarbital
Vancomicina	Fenitoína
Teofilina	Carbamazepina
Lítio	Digoxina
Valproato	Imipramina/Desipramina
Quinidina	Antidepressivos tricíclicos

Obstrução de Probes

Frequentemente, os laboratórios clínicos enfrentam desafios em seu setor técnico em virtude dos erros pré-analíticos, responsáveis por mais de 75% do total de erros de um laboratório.¹⁰⁻¹⁴

Entre os erros pré-analíticos, variáveis como presença de fibrinas na amostra, hemólise e tubos com volume insuficientes representam os principais vilões e, muitas vezes, provocam transtornos ao laboratório com retrabalho, recoletas, parada de equipamentos e gastos excessivos.

Quando um equipamento aspira fibrinas em uma amostra de soro ou gel em um tubo de baixo volume, é possível que haja obstrução da agulha de aspiração da amostra. A aparência da substância acumulada na agulha costuma ser viscosa e clara, lembrando a aparência do gel separador (Figura 1).

Certamente, há a possibilidade de aspirar o gel em razão do baixo volume de amostra ou até mesmo pelo posicionamento do gel após a centrifugação (centrifuga de ângulo fixo), substância que poderá se acumular e afetar o funcionamento dos equipamentos. Contudo, a maior parte das obstruções é causada pela aspiração de filetes de fibrina presentes na amostra, que, muitas vezes, são praticamente imperceptíveis visualmente.

Os filetes de fibrina se formam pela má homogeneização dos tubos com ativador de coágulo, pelo volume menor que o recomendado e pela retração do coágulo na horizontal. Quando os tubos com gel separador e ativador de coagulação são centrifugados precocemente, isto é, antes da completa retração do coágulo, haverá a formação de fibrina grosseira, que, muitas vezes, inviabiliza a análise.

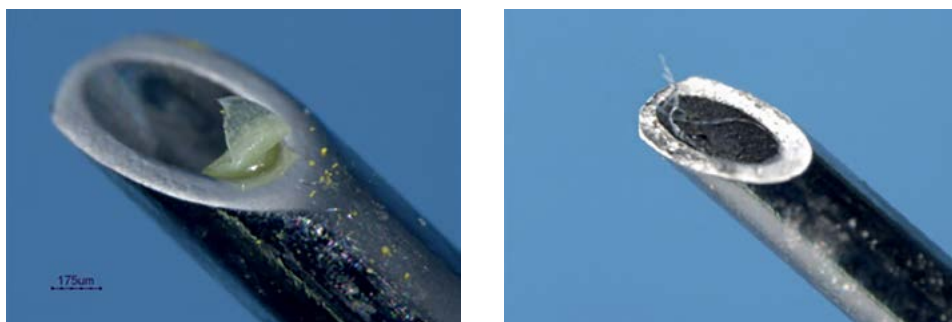


FIGURA 1 Probes com substâncias.

Fonte: autorizada pela BD Life Sciences – Preanalytical Systems.

A única maneira de afirmar qual é a substância presente na agulha de aspiração de amostras dos equipamentos é pela análise FTIR.

A análise FTIR (espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier) avaliará quimicamente os principais ingredientes presentes em uma amostra qualquer,¹⁵ identificando a família química da substância analisada, ou seja, indicará se a substância é um gel, uma fibrina, resíduos de solução de limpeza, entre outras. Abaixo um exemplo de um laudo em FTIR – Figura 2.

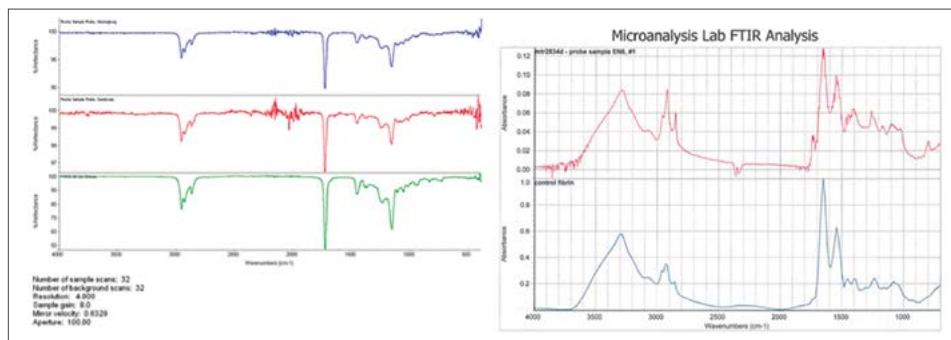


FIGURA 2 Demonstração de laudo da análise FTIR.

Fonte: autorizada pela BD Life Sciences – Preanalytical Systems.

Desafios com o gel

Manchas de gel na parede dos tubos

As manchas de gel ocorrem quando o gel se move para uma posição ligeiramente mais alta que sua posição final da interface entre o soro e coágulo. Durante a centrifugação, o gel se movimentou, mas se “compactou” um pouco abaixo do movimento inicial, promovendo a aparência de mancha ou camada fina depositada na parede do tubo (Figura 3).

Esse efeito visual geralmente aumenta com: o tempo e força de centrifugação; centrífugas com temperatura acima de 25°C; variação de aceleração do rotor da centrífuga; e acionamento do freio da centrífuga.

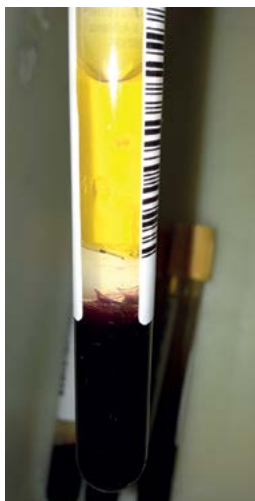


FIGURA 3 Manchas de gel na parede do tubo.

Fonte: autorizada pela BD Life Sciences – Preanalytical Systems.

Glóbulos de gel/gotas de óleo

A presença de glóbulos de gel ou gotas de óleo pode ser resultado de tubos armazenados em temperaturas elevadas no almoxarifado ou centrífugas com temperaturas superiores a 25°C. Nesses casos, é possível observar gotas similares a óleo flutuante no soro ou sobrenadante (Figura 4).

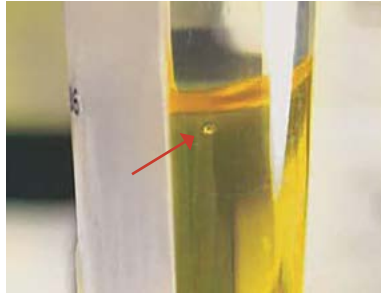


FIGURA 4 Glóbulo de gel.

Fonte: autorizada pela BD Life Sciences – Preanalytical Systems.

Qualidade do soro ou plasma em tubos com gel separador

Células vermelhas suspensas

A presença de células vermelhas suspensas do soro ou plasma pode ser identificada pelo aspecto avermelhado da parede dos tubos, após a centrifugação, ou seja, quando ocorre a adesão das células vermelhas à camada interna do tubo.

Quando a camada de células vermelhas é fina ou em baixo grau, não há comprometimento da amostra; porém, nos casos mais grosseiros ou em grau mais alto, essa camada pode resultar em hemólise (Figura 5).

Tal efeito pode ser reduzido com um revestimento interno de silicone na superfície interna dos tubos feito durante a fabricação dos tubos, atuando como hemorrepelente e evitando, assim, a adesão das células.



FIGURA 5 Células vermelhas suspensas.

Fonte: autorizada pela BD Life Sciences – Preanalytical Systems.

Anel de células

Outro efeito visual percebido nos laboratórios chama-se anel de células – ele se refere à presença de um filete de fibrina com células vermelhas aderidas à parede interna, formando um anel na parte superior do tubo (Figura 6).

Esse efeito é atribuído ao posicionamento dos tubos após a coleta da amostra, e as amostras que formam anéis de células são posicionadas de modo que a retração do coágulo ocorra na parte interna da tampa do tubo, podendo ou não se separar da rolha.

Os anéis de células, dependendo da quantidade, podem promover somente um efeito visual, como, também, desprender-se da parede, e, quando flutuantes, ser aspirados pela agulha de aspiração dos equipamentos analíticos.



FIGURA 6 Anel de células vermelhas.

Fonte: autorizada pela BD Life Sciences – Preanalytical Systems.

Fibrina

A fibrina consiste em uma rede tridimensional de fios de proteínas que podem se prender aos glóbulos vermelhos, aos glóbulos brancos ou às plaquetas.

A presença de fibrina ou massa de fibrina indica que a retração de coágulo pode não ter sido completa antes da centrifugação, reduzindo, então, o rendimento sérico da amostra. Em virtude do tempo insuficiente de retração do coágulo, ainda pode ser formada fibrina latente, isto é, sua formação continuou durante ou após a centrifugação. Esse fenômeno também ocorre pela falta ou homogeneização insuficiente e pelo volume de coleta abaixo do volume nominal.

A aspiração de filetes de fibrinas (Figura 7) pelas agulhas de aspiração pode resultar na obstrução física e na variação do volume de amostra aspirado pelo equipamento. Além disso, quando aspirado, poderia ser depositado dentro do equipamento, com a possibilidade de formação de fibrina latente dentro do equipamento.

O impacto provocado pela fibrina e pelos filetes de fibrina é alto, altera a eficiência laboratorial, atrasa os resultados, causa a inatividade dos equipamentos e, ainda, coloca em risco a qualidade dos resultados.

As orientações pré-analíticas e a educação dos flebotomistas são fundamentais para prevenir essas variáveis.

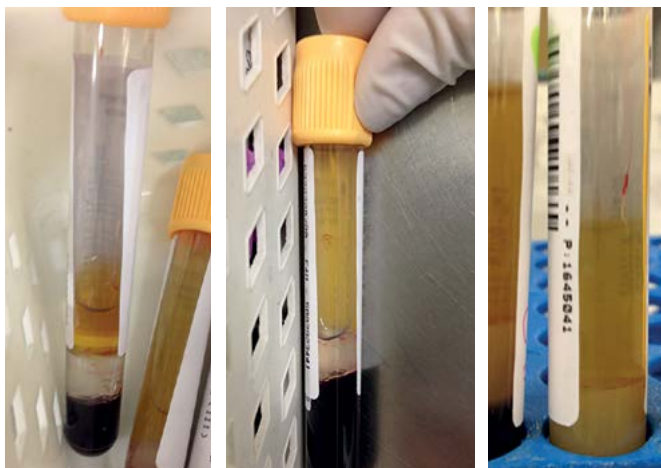


FIGURA 7 Filetes de fibrina.

Fonte: autorizada pela BD Life Sciences – Preanalytical Systems.

EVOLUÇÃO DO GEL

Após, praticamente, quatro décadas utilizando tubos com gel separador, mesmo diante das evoluções e melhorias desenvolvidas para proporcionar maior estabilidade analítica e maior estabilidade do gel separador frente às variáveis pré-analíticas, responsáveis por impactar o laboratório clínico e sua eficiência pelos transtornos aos equipamentos analíticos, ainda encontram-se desafios quanto à utilização de amostras de soro ou plasma em gel separador.

Buscando a modernização das práticas laboratoriais para prover maior eficiência e resultados clínicos mais acurados, novas tecnologias com separadores mecânicos estão disponíveis e poderão sanar diversos desafios enfrentados com relação ao gel separador.

O princípio de um separador mecânico é o de formar uma barreira inerte entre o plasma e as células, a qual, por sua composição, não interferirá nos analitos em razão da adsorção ou de outras interações. Diferentemente dos géis disponíveis no mercado, o separador mecânico não sofre interferências capazes de obstruir equipamentos.

Em razão do princípio de flutuação diferencial, o separador mecânico se deslocará durante a centrifugação para o correto posicionamento na interface entre plasma e células. Essa tecnologia proporciona, ainda, um plasma mais puro quando comparado ao plasma de um tubo com gel separador, pois permite que a sedimentação das células ocorra durante todo o tempo de centrifugação. Nesse momento, o separador retorna ao seu formato original, formando uma barreira robusta e estável entre o plasma e as células (Figura 8).⁹

Separador mecânico é lançado durante a centrifugação e proporciona um plasma de alta qualidade.

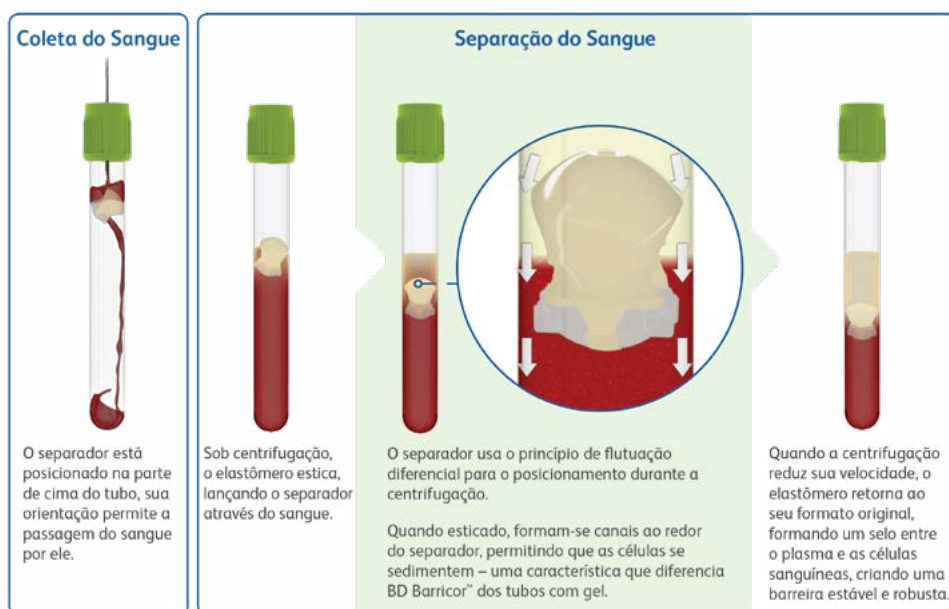


FIGURA 8 BD Vacutainer® Barricor™ Plasma.

Fonte: autorizada pela BD Life Sciences – Preanalytical Systems.

REFERÊNCIAS

1. BD DIAGNOSTICS – PREANALYTICAL SYSTEMS. Lab Notes: The Evolution of Evacuated Blood Collection Tubes. 2008;19(1).
2. DASGUPTA A, DEAN R, SALDANA S, KINNAMAN G, MCLAWHON RW. Absorption of therapeutic drugs by barrier gels in serum separator blood collection tubes. Volume- and time-dependent reduction in total and free drug concentrations. Am J Clin Pathol. 1994;10(4):456-61.
3. BOWEN RA, HORTIN GL, CSAKO G, OTAÑEZ OH, REMALEY AT. Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays. Clinical Biochem. 2010;43(1-2):4-25.

4. SPIRITUS T, ZAMAN Z, DESMET W. Iodinated contrast media interfere with gel barrier formation in plasma and serum separator tubes. *Clinical Chem.* 2003;49(7).
5. WILLIAMS J, GOODWIN F, BANATWALA N. Poor performance of serum separator. *Ann Clin Biochem.* 1995;32:232-4.
6. VAN DEN OUWELAND JM, CHURCH S. High total protein impairs appropriate gel barrier formation in BD Vacutainer® blood collection tubes. *Clin Chem.* 2007;53(2):364-5.
7. NIELSEN BK, FREDERIKSEN T, FRIIS-HANSEN L, LARSEN PB. Post-analytical stability of 23 common chemistry and immunochemistry analytes in incurred samples. *Clin Biochem.* 2017;50(18):1175-82.
8. BORAI A, BAHJRI S, LIVINGSTONE C, NAWAJHA M, BAWAZEER A, BAARMAH Z ET AL. Assessment of becton dickinson plain and serum separator tubes in measurement of 25-hydroxyvitamin D3 (25OHD3) by HPLC and immunoassay methods. *J Clin Lab Anal.* 2016;30(1):32-5.
9. BECTON DICKINSON AND COMPANY. 2016. Disponível em: <<http://barricor.bd.com/>>. Acesso em: 20 abr. 2018.
10. GOLDSCHMIDT HMJ, LENT RW. Gross errors and work flow analysis in the clinical laboratory. *Klin Biochem Metab.* 1995;3:131-40.
11. NUTTING PA, MAIN DS, FISCHER PM, STULL TM, PONTIOUS M, SEIFERT M ET AL. Problems in laboratory testing in primary care. *J Am Med Assoc.* 1996;275:635-9.
12. CARRARO P, PLEBANI M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. *Clin Chem.* 2007;53:1338-42.
13. STAHL M, LUND ED, BRANDSLUND I. Reasons for a laboratory's inability to report results for requested analytical tests. *Clin Chem.* 1998;44:2195-7.
14. HOFGÄRTNER WT, TAIT JF. Frequency of problems during clinical molecular-genetic testing. *Am J Clin Pathol.* 1999;112:14-21.
15. AVO MEEN – ANALYTICAL SERVICES. Infrared spectroscopy: FT-IR testing & analysis. Disponível em: <<https://www.avomeen.com/about-us/methods/infrared-spectroscopy/>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BECTON DICKINSON AND COMPANY. Joseph Kleiner and the origins of the Vacutainer™. *The Echo*. Franklin Lakes, NJ: Becton Dickinson and Company; 1991 (Spring), 11:3-5; 1991 (September), 11:5-7; 1996 (December), 16:1.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

BD Vacutainer®

Sistema de coleta
de sangue a vácuo



Líder global em
tecnologia médica,
a BD se dedica a
melhorar a saúde das
pessoas no mundo todo.

A BD produz mais de 4 bilhões de tubos de
coleta de sangue por ano com os mais altos
padrões de qualidade.



Escalpe BD Vacutainer®
Push Button Ultra Touch™



Tubos
BD Vacutainer®



Agulha
BD Vacutainer®Eclipse™



6 Hemólise



INTRODUÇÃO

A prevenção de erros médicos representa um objetivo primário dos sistemas de saúde. Até 70% das decisões médicas se baseiam em resultados de laboratório. A fase pré-analítica do laboratório clínico continua sendo a área em que a maior parte dos erros de laboratório ocorre, sendo a hemólise uma das principais causas de interferência na exatidão dos resultados.

A palavra *hemólise* deriva do grego *hemo* (*sangue*) e *lyse*¹ (*ruptura*), referindo-se à liberação dos componentes intracelulares de eritrócitos no líquido extracelular (plasma ou soro). Esta é visível após a centrifugação da amostra, quando surge uma coloração vermelha no plasma ou no soro pela presença de hemoglobina.²

A hemólise pode decorrer de processos pré-analíticos incorretos, tornando-se evidente que a capacitação adequada do pessoal responsável por obter amostras de sangue no laboratório clínico é fundamental para reduzir os erros pré-analíticos. Assim, o profissional que tem a responsabilidade de coletar as amostras para o laboratório deve estar ciente da importância do seu desempenho em todo o processo de realização dos exames de laboratório.

TIPOS DE HEMÓLISE: *IN VIVO* VERSUS *IN VITRO*

A hemólise no laboratório clínico pode se originar principalmente de duas causas: uma é a hemólise *in vivo*, própria de doenças sanguíneas (tanto congênicas quanto adquiridas) e que pode conduzir o paciente a diferentes graus de anemias; a outra é a hemólise *in vitro*, que se dá durante a fase pré-analítica como resultado do manuseio inadequado das amostras sanguíneas (coleta, manipulação e transporte da amostra sanguínea), podendo causar erros nos resultados laboratoriais e impactando seriamente na saúde do paciente.

A hemólise *in vitro* representa a causa mais frequente de erros na fase pré-analítica do laboratório. Suas causas são múltiplas, bem como as consequências que o fenômeno produz em diversos testes de laboratório. Os resultados de todas as disciplinas do laboratório podem ser afetados pela hemólise, especialmente os da química clínica. A liberação de componentes intracelulares ao líquido extracelular pode promover interferências nas medições ou incrementar ou diminuir as concentrações dos analitos que se deseja quantificar.

Hemólise *in vivo*

Geralmente, menos de 2% do total das amostras com hemólise detectável ocorrem por causa de hemólise *in vivo*.³ Com frequência, a hemólise *in vivo* independe da técnica de coleta da amostra, sendo praticamente inevitável.⁴

Essa condição clínica pode ter mais de 50 causas, incluídas as condições hereditárias, adquiridas e iatrogênicas.

Os fenômenos que conduzem à hemólise *in vivo* podem ser categorizados tomando como base o local de destruição dos glóbulos vermelhos em hemólise extravascular ou intravascular.⁵ A primeira é a que ocorre por causas inerentes ao eritrócito, enquanto a segunda é a que se produz por causas independentes do eritrócito. Na Tabela 1, são descritas as possíveis causas da hemólise *in vivo*.

TABELA 1 Possíveis causas da hemólise *in vivo*

Hemólise extravascular
Deficiências de enzimas (deficiência de glicose 6P-desidrogenase, piruvato quinase)
Hemoglobinopatias (talassemia, drepanocitose)
Defeitos da membrana de eritrócitos (esferocitose hereditária)
Infecção (<i>Bartonella</i> , <i>Babesia</i> , malária, <i>Clostridium</i>)
Anemia hemolítica autoimune
Outros (hiperesplenismo, doença hepática)
Hemólise intravascular
Danos mecânicos (válvula cardíaca, prostética, PTT, SUH, CID, HELLP)
Reação por transfusão
Infecção
Hemoglobinúria paroxística noturna
Hemoglobinúria paroxística ao frio

CID: coagulação intravascular disseminada; HELLP: hemólise, enzimas hepáticas elevadas e plaquetas baixas; PTT: púrpura trombocitopênica trombótica; SUH: síndrome hemolítico-urêmica.

Distinguir a hemólise *in vivo* da *in vitro* tem importância crítica para a segurança e o manejo do paciente.⁶

A detecção da hemólise *in vivo* não é somente importante do ponto de vista clínico, mas também porque as concentrações plasmáticas dos analitos no tubo espelham as concentrações no plasma do paciente e, portanto, são importantes e devem ser relatadas. A hemólise pode resultar em alterações de magnitudes específicas para a amostra em análise; ocorrendo a liberação de constituintes das células sanguíneas *in vivo*, deve ser considerada um fator biológico que influencia o resultado do exame laboratorial.⁷

Caso não exista uma causa subjacente de hemólise *in vivo* que possa ser identificada em uma amostra hemolisada, deve-se considerar a hipótese de hemólise *in vitro*.

Hemólise *in vitro*

Conforme mencionado no início do capítulo, a hemólise *in vitro* ocorre durante a fase pré-analítica, podendo provocar sérios erros nos resultados laboratoriais. A ruptura celular por manipulação, acondicionamento ou transporte inadequados da amostra pode resultar não apenas na ruptura dos glóbulos vermelhos, mas também dos leucócitos e trombócitos. Trata-se da primeira causa da rejeição de uma amostra, como demonstrado no estudo *Chemistry Specimen Acceptance Q-Probes* do College of American Pathologists (CAP).⁸

A prevalência de amostras hemolisadas pode chegar a 3,3% do total das amostras de rotina, o que representa até 40 a 70% de todas as amostras inadequadas identificadas e quase cinco vezes maior que outras causas, como amostras insuficientes, incorretas e coaguladas.¹

A seguir, estão descritas as causas e os momentos pelos quais se pode obter uma amostra hemolisada que não é apta para o seu processamento.

Causas da hemólise durante a coleta da amostra⁹

- Calibre da veia e trauma: a punção de veias de pequeno calibre, veias frágeis ou “pescar” às cegas a veia com uma agulha pode produzir hemólise. Se a veia for traumatizada durante a punção, o primeiro tubo obtido pode apresentar hemólise, enquanto os seguintes costumam ser adequados;
- Local de punção: a retirada da amostra da fossa antecubital se associa à diminuição representativa dos percentuais de hemólise em relação à retirada de amostras de locais anatômicos mais distais;¹⁰
- Preparação da área com álcool: a agulha pode transferir traços de álcool da pele à amostra sanguínea e causar hemólise;

- Utilização de um calibre inadequado de agulha: usar uma agulha de grosso calibre (inferior a 21G) pode produzir hemólise ao permitir que uma grande quantidade de sangue entre repentinamente no tubo com uma grande força. De maneira semelhante, o uso de agulhas muito finas pode causar hemólise ao forçar o fluxo de sangue com grande força por meio de uma abertura muito estreita. A membrana celular dos glóbulos se rompe na agulha à medida que são drenados para o tubo de coleta a vácuo;
- Conexões soltas: as conexões soltas dos componentes de flebotomia, como a conexão entre um equipamento de coleta de sangue e o adaptador Luer, entre a seringa e a agulha, ou entre o cateter e o adaptador Luer, podem introduzir ar no sistema, produzindo espuma, que pode causar a hemólise;
- Enchimento incompleto de tubos: alguns aditivos em alta concentração, como o fluoreto de sódio, podem causar graus variáveis de hemólise;
- Coleta com seringas: retrair excessivamente o êmbolo de uma seringa pode causar suficiente pressão para hemolisar a amostra. A pressão pode ser maior que em um tubo de vácuo padronizado. O sangue pode começar a coagular e hemolisar enquanto se aspira em uma seringa de grande volume. A transferência para um tubo empurrando o êmbolo da seringa para forçar a entrada do sangue em um tubo pode causar hemólise;
- Um estudo levado a cabo para avaliar o efeito sobre a qualidade da amostra usando seringas contra o uso de tubos a vácuo demonstra que a hemólise visualmente detectada nos espécimes obtidos com seringas superou significativamente aquelas obtidas com tubos a vácuo;
- Coleta por cateter periférico: alguns estudos demonstram que a causa principal de hemólise nas salas de urgências é o uso de cateteres periféricos para obter as amostras para o laboratório. A retirada das amostras por venopunção direta se associa à diminuição substancial dos percentuais de hemólise em relação à retirada de amostras por cateteres periféricos intravenosos.¹⁰ Um desses estudos demonstrou que as amostras obtidas pelo pessoal de enfermagem a partir de um cateter intravenoso tinham três vezes mais probabilidade de apresentar hemólise que aquelas obtidas por venopunção;¹¹
- Pressão excessiva sobre o local de punção capilar, que induz uma pressão hidráulica extrema nos capilares, também poderia causar hemólise.

Causas de hemólise posterior à extração sanguínea

- Homogeneização da amostra: a agitação vigorosa dos tubos pode ser uma causa de hemólise por ruptura mecânica das membranas celulares;
- Métodos de transporte: os sistemas de transporte pneumático ou outras condições de transporte que produzam turbulência e trauma das hemácias dentro dos

tubos também são causas de hemólise. Estudos demonstram que foram encontrados menos percentuais de hemólise nas amostras transportadas por meios convencionais *versus* as amostras transportadas por tubos pneumáticos;¹²

- Temperatura: temperaturas de transporte, centrifugação e conservação muito altas ou demasiado baixas podem romper as membranas celulares;
- Centrifugação: velocidades de centrifugação excessivas podem ser causas de ruptura celular. Desvios na centrifugação, como a recentrifugação de tubos com gel e a demora na separação do soro ou plasma, associam-se também à hemólise *in vitro*;¹⁰
- Armazenamento de sangue total durante vários dias à temperatura ambiente.

O profissional do laboratório deve registrar e identificar as causas da hemólise *in vitro* para reduzir a frequência, garantindo a obtenção de amostras de qualidade que provocam resultados confiáveis.

MÉTODOS DE DETECÇÃO DE HEMÓLISE

Tradicionalmente, detecta-se a hemólise pela análise visual das amostras após a centrifugação. O uso de cartões (gabaritos) que comparam a cor das amostras com concentrações elevadas de hemoglobina livre permite a comparação direta. A hemólise *in vivo* ou *in vitro* é visível em amostras não ictericas. Uma coloração vermelha no soro ou no plasma é observada visualmente se a concentração de hemoglobina livre é superior a 200 mg/L.¹³

Contudo, esse procedimento é pouco confiável para detectar e quantificar baixos níveis de hemólise nos espécimes, que, mesmo em muito baixas quantidades, podem afetar a determinação de variáveis mais propensas a sofrer interferências, além da dificuldade inerente para sua padronização.¹⁴ Embora não se recomende abandonar a prática de inspeção visual das amostras ao serem recepcionadas no laboratório para a análise, recomenda-se utilizar sistemas automatizados que permitam detectar e quantificar o grau de hemólise.⁵ Recomenda-se fortemente esse procedimento em laboratórios automatizados ou que buscam uma alta produtividade.

O método de referência para a determinação de hemoglobina baseia-se no uso da cianometá-hemoglobina (HiCN). Existe um padrão internacional de HiCN recomendado para avaliar métodos alternativos. Atualmente, a maioria dos analisadores utiliza métodos sem cianeto e o espectro de absorção da hemoglobina para sua quantificação pelo método da espectrofotometria direta. Com base nessas técnicas, a maioria dos autoanalisadores bioquímicos dispõe de sistemas para estimar a concentração de hemoglobina na amostra a partir de medições em distintos comprimentos de onda.

Índices séricos de hemólise

O termo “índices séricos” inclui distintos sistemas patenteados para detectar a presença de hemólise, icterícia ou turvação na amostra. Os índices séricos oferecem uma informação qualitativa ou semiquantitativa a partir da medição de uma alíquota da amostra diluída. Particularmente, o índice de hemólise compreende um cálculo baseado em medidas de absorbância realizadas sobre o soro ou o plasma para diferentes comprimentos de onda, o que dá uma estimativa semiquantitativa da hemólise detectada na amostra (Clinical Laboratory Standards Institute – CLSI, 2005). As amostras se classificam em categorias numéricas correspondentes a um intervalo de concentração de hemoglobina estimada que, em geral, cobre uma faixa de 0,25 a 10 g/L.⁵ Apesar de as plataformas analíticas disporem de dispositivos para determinar os índices séricos, estes deverão ser estabelecidos de acordo com a liberação de analitos intracelulares, considerando que esses analitos se encontram em diferentes concentrações no plasma.¹⁵

MECANISMOS DE INTERFERÊNCIA²

Nas amostras hemolisadas, decorrentes do rompimento da membrana plasmática, é liberado um conjunto de substâncias do interior das células para o líquido extracelular. Em alguns casos, as referidas substâncias não têm um efeito interferente conhecido, contudo sua concentração se altera significativamente no plasma. Um exemplo é o potássio, que não mostra interferência quanto à sua detecção, nem a produz nas determinações analíticas de outras variáveis. No entanto, em outros casos, essas substâncias se comportam como interferentes em grande número de determinações. Particularmente, a hemoglobina liberada durante a hemólise pode produzir interferência química ou espectrofotométrica em muitas determinações.⁵ Ainda mais, os mecanismos de interferência da hemólise não apenas afetam os métodos espectrofotométricos, mas também interferem nos imunoenaios, nos testes de coagulação e nos métodos de biologia molecular baseados na reação da polimerase.¹⁴

Em geral, as interferências pela hemólise *in vitro* sobre os testes de laboratório podem ser causadas por:

1. Alteração da concentração de analitos no líquido extracelular por liberação de componentes intracelulares no fluido circundante:

Pode-se produzir falsas elevações de algumas variáveis ou efeitos de diluição:

- Para as variáveis ALT, AST, DHL, Mg, P e K, os mecanismos de interferência são atribuíveis às grandes diferenças entre as concentrações intracelulares e extracelulares dessas variáveis (p. ex., o DHL apresenta uma proporção

160 vezes maior no interior dos eritrócitos que em plasma; o potássio em uma proporção de 22 vezes maior e o AST 15 vezes maior);¹⁴

- Baixos valores de glicose, Na e Cl são causados por efeitos de diluição.
2. Interferências químicas pela liberação de conteúdos eritrocitários:
- As proteases intracelulares liberadas dos eritrócitos nas amostras hemolisadas podem degradar troponina T liberada após um dano cardíaco, causando uma diminuição significativa nesse marcador;
 - A liberação de componentes intracelulares e substâncias tromboplásticas liberadas das células danificadas que afetam a confiabilidade dos testes de coagulação;¹⁶
 - A interferência da hemólise na determinação de CK foi atribuída à enzima adenilato cinase intracelular, que não é completamente inibida sob condições de operação;
 - Para fosfatase alcalina, ferro, lipase e GGT, a interferência por hemólise é provavelmente causada pela reação química entre o que foi hemolisado e os componentes da reação e por uma sobreposição espectral;¹⁷
 - As reações químicas que podem ter o grupo heme, ou seus átomos de ferro, causam interferência em diferentes componentes dos reagentes frequentemente usados nas determinações, ou com a mesma variável podendo produzir vieses positivos ou negativos nos ensaios. Um exemplo dessa interferência é o efeito da atividade peroxidase dos átomos de ferro, que causa interferência nas reações que usam peróxido de hidrogênio, e sua reatividade química de oxidação-redução pode afetar outros ensaios (p. ex., o método de determinação de bilirrubina baseado no fundamento de Malloy-Evelyn).
3. Interferências espectrofotométricas dependentes da concentração de hemoglobina:
- Essas interferências afetam as determinações por um incremento na absorbância óptica ou por uma mudança no valor do alvo. As propriedades espectrais da hemoglobina com um pico máximo de absorbância de 420 nm aproximadamente e de absorção ainda entre 340 e 440 nm e entre 540 e 580 nm podem causar interferências espectrofotométricas naqueles ensaios baseados em medidas nesses comprimentos de onda, especialmente nas medidas realizadas em 415, 540 e 570 nm, em que a hemoglobina mostra a maior absorbância;
 - A concentração de hemoglobina intraeritrocitária é um parâmetro variável na população. A mesma quantidade de hemoglobina liberada pode acompanhar-se de uma concentração variável de outros componentes. As hemácias de um paciente com anemia macrocítica contêm menor proporção de hemoglobina em comparação ao resto dos constituinte.⁵

IMPACTO DA HEMÓLISE NOS TESTES DE LABORATÓRIO

A interferência por hemólise representa uma das razões mais frequentes de rejeição, pois afeta a determinação de vários analitos; contudo, outros testes não sofrem interferência significativa.¹⁸ O laboratório deve definir, para cada analito, a diferença em relação ao valor real na qual considera um erro significativo. A definição de erro significativo pode variar entre os laboratórios e dependerá das especificações da qualidade que o próprio laboratório define com relação à imprecisão, ao erro sistemático ou ao erro total.⁵

De acordo com o CLSI,² o efeito da hemólise é considerado clinicamente significativo quando causa uma mudança de 10% na medição do resultado da amostra sem interferente. Contudo, esse critério é mais permissivo nas magnitudes com uma pequena variabilidade biológica e pode ser menos naquelas com elevada variabilidade biológica intraindividual ou interindividual. A maioria dos estudos publicados acerca da significação da hemólise utiliza critérios de erro sistemático ou imprecisão desejável, com base em estudos de variabilidade biológica.¹⁹ Com fundamento nesses conceitos, uma interferência clínica significativa é um resultado que, na presença do interferente, difere do resultado sem o interferente em mais de $1.96 \cdot (CV_A^2 + CV_w^2)^{1/2}$, em que CV_A é o CV analítico do ensaio e CV_w é a variação biológica dentro dos sujeitos da variável.¹⁴

A respeito das magnitudes afetadas pela hemólise, muitas vezes a interferência dependerá do método analítico utilizado. Recomenda-se que cada laboratório verifique a informação que os fornecedores disponibilizam a respeito das interferências por hemólise nas condições reais de trabalho.²⁰

Em um trabalho do Dr. Saldaña do Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, EsSalud, Lima, no Peru, demonstrou-se a interferência em diferentes concentrações de hemoglobina de 25 analitos em plasma medidos em um autoanalisador ADVIA 1800 – os analitos mais afetados a uma concentração de 2 g/L de hemoglobina foram: DHL (elevação de 112%); AST (elevação de 33%); CK total (elevação de 20,7%); potássio (elevação de 18%); e fosfatase alcalina (diminuição de 11%).²¹

COMO DIFERENCIAR A HEMÓLISE *IN VIVO* DA HEMÓLISE *IN VITRO*

Ao receber uma amostra hemolisada, ela não deve ser simplesmente rejeitada. O laboratório deverá alertar o médico-assistente com a finalidade de avaliar uma possível hemólise *in vivo*. Apesar de a hemólise *in vitro* ser mais frequente que a *in vivo*, esta última tem uma importância clínica maior em razão de sua origem patológica e de os parâmetros, sob influência da hemólise, serem importantes para o diagnóstico, o seguimento e o monitoramento terapêutico dessas doenças. Por essa razão, é importante efetuar uma diferenciação do tipo de hemólise.

Durante uma hemólise *in vivo*, somente estão presentes no plasma os componentes de elevada massa molecular (hemoglobina, DHL). Na hemólise *in vitro*, o total do conteúdo intraeritrocitário se dilui no plasma da amostra.

A hemoglobina liberada *in vivo* está unida à haptoglobina e é transportada para o sistema reticuloendotelial. A hemoglobina livre somente pode ser mensurada no plasma caso exceda a capacidade de transporte da haptoglobina. É necessário considerar que a haptoglobina compreende uma proteína de fase aguda, podendo ser medida nessas situações ou em pacientes com hiperesplenismo. Em pacientes com plasmocitoma, foi relatado aumento de haptoglobina e hemoglobina livre.

Na hemólise intravascular, produzem-se aumento de hemoglobina no sangue e na urina, bilirrubina livre, LDH, aumento de hemossiderina na urina e diminuição de haptoglobina. Na hemólise extravascular, não se observam bilirrubina, hemoglobina e hemossiderina na urina⁴ (Tabela 2).

TABELA 2 Presença de analitos na hemólise intra e extravascular

Plasma ou soro	Intravascular	Extravascular
Bilirrubina indireta	Aumentada	Aumentada
Haptoglobina	Ausente	Diminuída
Hemoglobina	Aumentada	Normal-aumentada
Desidrogenase láctica	Aumentada	Aumentada
Urina		
Bilirrubina	—	—
Hemossiderina	Presente	—
Haptoglobina	Presente	—

Diferentemente, na hemólise *in vitro* se observa um aumento em paralelo das concentrações de hemoglobina (coloração vermelha do plasma/soro), íon potássio, DHL e AST; contudo, as concentrações de haptoglobina e de reticulócitos se mantêm dentro dos intervalos fisiológicos.

Também existem métodos imunológicos que permitem distinguir os complexos hemoglobina-haptoglobina da haptoglobina livre. Levando em consideração que a haptoglobina é um reagente de fase aguda, deve-se descartar exatamente a hemólise. Existe um método imunonefelométrico que torna possível determinar a concentração de hemoglobina livre, com precisão muito boa e alta correlação com o método de referência de hemoglobina, a HiCN ($R = 0,984$), e um intervalo de medição de 9 a 2.300 g/L da hemoglobina livre.

É importante citar que pode se observar um aumento inesperado de potássio, desidrogenase láctica e fosfatase alcalina na ausência de uma coloração vermelha visível no soro. Isso pode decorrer de um quadro de trombocitólise. Na Tabela 3, estão resumidas as diferenças entre a hemólise *in vivo* e *in vitro*.

TABELA 3 Diferenciação entre a hemólise *in vivo* e *in vitro*

Hemólise <i>in vivo</i>	Coloração vermelha do plasma/soro: <ul style="list-style-type: none">• Aumento da hemoglobina e DHL sem aumento de potássio• Diminuição da concentração de haptoglobina• Aumento da bilirrubina livre• Aumento do índice de reticulócitos
Hemólise <i>in vitro</i>	Coloração vermelha do plasma/soro: <ul style="list-style-type: none">• Aumento em paralelo de hemoglobina, potássio, DHL e AST• Haptoglobina e índice de reticulócitos normais

COMO PREVENIR A HEMÓLISE *IN VITRO*

As causas principais da hemólise são a obtenção e o manejo inadequados de uma amostra. Em consequência, treinamento e educação apropriados podem reduzir significativamente o número de amostras hemolisadas recebidas no laboratório:⁹

- Calibre da agulha e veia: o calibre das agulhas para punção venosa vai de 19G a 25G, sendo o ideal 21G. Eleja uma veia e utilize o equipamento de flebotomia apropriado para o calibre dessa veia. Se a veia for frágil, não utilize tubos de grande volume. Evite puncionar áreas onde existam hematomas;
- Desinfecção da área a puncionar: desinfete a área a puncionar segundo o procedimento descrito em sua instituição; deixe a área secar;
- Conexões soltas: assegure-se de que todas as conexões dos componentes de flebotomia estejam ajustadas, como a conexão entre um equipamento de coleta de sangue e o adaptador Luer, entre a seringa e a agulha ou entre o cateter e o adaptador Luer;
- Enchimento incompleto de tubos: colete um volume de sangue na capacidade indicada no tubo para assegurar a proporção adequada entre o sangue e o aditivo;
- Coleta com seringa e agulha (modo aberto): as retiradas inadequadas com seringa e agulha são causas notórias de hemólise. Deve-se evitar o modo aberto para a retirada da amostra sanguínea sempre que possível, substituindo-o pelo uso do sistema de tubos a vácuo. Caso seja preciso usar uma seringa, as seguin-

tes recomendações devem ser levadas em consideração para reduzir a incidência de hemólise:

- Bombeie o êmbolo da seringa duas ou três vezes antes de extrair a amostra, para afrouxá-lo;
- Segure com firmeza a agulha com a seringa;
- Use seringas de 3 a 10 mL. Evite, na medida do possível, o emprego de seringas maiores;
- Assegure-se de que a velocidade de aspiração não exceda 1 mL/s durante a coleta da amostra. A força excessiva de aspiração constitui causa frequente de hemólise;
- Transfira o sangue para o tubo imediatamente;
- Use um dispositivo especial para a transferência da amostra da seringa para o tubo. Esse dispositivo aumenta a segurança e melhora a qualidade da amostra;
- Deixe que o tubo seja enchido apenas pelo vácuo. Nunca pressione o êmbolo para transferir a amostra da seringa para o tubo, pois isso aumenta a força do fluxo e provoca traumatismo das hemácias. Além disso, é muito importante levar em conta que a pressão positiva que isso causa no tubo possa provocar a expulsão de sua tampa;
- Incline a seringa e o tubo de modo que o sangue deslize pela parede do tubo, evitando, assim, que as células sanguíneas batam com força no fundo do tubo, reduzindo o trauma às hemácias.

Cuidados após a retirada da amostra sanguínea

- Homogeneização da amostra: a mistura do sangue com os aditivos do tubo deve ser feita mediante inversões suaves e completas. Os tubos que contenham amostras não devem agitar-se vigorosamente;
- Métodos de transporte: se possível, a distribuição das amostras deve ser manual. Os espécimes precisam ser mantidos em posição vertical (tampa para cima) antes e após sua centrifugação;
- “Descolar” coágulos: não se deve usar aplicadores de madeira para “beirar” ou “descolar” os coágulos, pois podem alisar os glóbulos vermelhos. Com a disponibilidade de tubos a vácuo para a obtenção de soros, cobertos em suas paredes internas por material hemorrepeleante, “beirar” os coágulos é desnecessário;
- Temperatura: as amostras devem ser armazenadas e transportadas em condições controladas de temperatura. Também é preciso controlar a temperatura das centrífugas. É importante observar as recomendações emitidas pelo laboratório quanto às temperaturas de armazenamento e transporte para diferentes analitos.

AMOSTRAS DE QUALIDADE, RESULTADOS DE QUALIDADE

As técnicas para a obtenção e o manejo apropriado das amostras são críticas para produzir resultados de qualidade nos testes de laboratório. Mesmo que ocasionalmente haja outras fontes de hemólise fora do controle do flebotomista, a observação das recomendações anteriores deverá reduzir de maneira substancial a incidência de amostras hemolisadas no laboratório.

Amostras de qualidade são resultado do treinamento e conhecimento dos fatores capazes de influir nos resultados de laboratório. O fundamento é obter resultados confiáveis nos testes de laboratório que reflitam fielmente o estado do paciente. Para assegurar que isso aconteça, as organizações e instituições devem estabelecer procedimentos normalizados de operação para a obtenção de amostras e assegurar-se de que todo o pessoal que for realizar flebotomias tenha o treinamento e a experiência necessários.

SISTEMA MISTO: UM PROBLEMA LATENTE

Se for analisada a frequência das rejeições de amostras nos laboratórios, poder-se-á observar que uma de suas principais causas é a hemólise. A causa desse erro pré-analítico nem sempre está na complexidade da punção ou no transporte para o laboratório, pois, em muitas situações, é atribuível ao sistema de coleta utilizado. Atualmente, ainda se observa uma prática institucionalizada e que promove uma grande parte dessas rejeições: o uso de um sistema misto de coleta de amostras que utiliza o sistema a vácuo (tubos) e um sistema de coleta aberta com seringa e agulha. Um exemplo dessa condição é a obtenção de amostras sanguíneas com seringas de grande volume (10 mL ou mais) e sua distribuição em tubos por meio da perfuração da tampa dos tubos a vácuo. Além de atentar contra a biossegurança do profissional da saúde, essa prática induz a lise dos glóbulos vermelhos no bisel da agulha, pela pressão e sucção que o tubo exerce sobre as hemácias *versus* a pressão exercida pelo êmbolo da seringa.

Qual a magnitude do impacto do uso do sistema misto de coleta na qualidade das amostras e como se comportará a taxa de rejeição ao utilizar um sistema misto ou a vácuo? Essas duas perguntas encontram resposta ao se analisarem as taxas de rejeição de amostras obtidas na Clínica Dávila na cidade de Santiago, no Chile, que controla a qualidade das amostras pelo monitoramento mensal iniciado no ano de 2005, por meio de um indicador global de rejeição de amostras, para cada serviço clínico da instituição. Esse relatório é divulgado em tempo real, por e-mail dirigido à coordenadora da unidade envolvida. Ao revisar os dados obtidos pelo laboratório da Clínica Dávila, observa-se que a hemólise aparece como uma das principais causas das rejeições, conforme demonstrado na Figura 1.

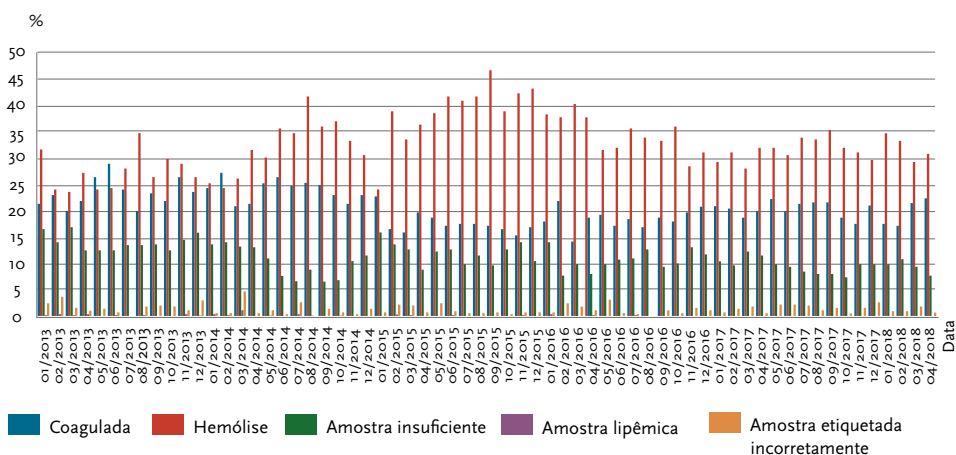


FIGURA 1 Percentual do tipo de rejeições sobre o total de incidentes registrados em amostras recebidas pelo laboratório da Clínica Dávila, cidade de Santiago no Chile no período entre 2013 e abril de 2018.

REFERÊNCIAS

1. LIPPI G, BLANCKAERT N, BONINI P, GREEN S, KITCHEN S, PALICKA V ET AL. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(6):764-72.
2. CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Hemolysis, icterus, and lipemia/turbidity indices as indicators of interference in clinical. *Laboratory Analysis; Approved Guideline*. CLSI document C56-A. Wayne: CLSI; 2012.
3. CARRARO P, SERVIDIO G, PLEBANI M. Hemolyzed specimens: a reason for rejection or a clinical challenge? *Clin Chem*. 2000;46:306-7.
4. ROTHER RP, BELL L, HILLMEN P, GLADWIN MT. The clinical sequel of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *J Am Med Assoc*. 2005;293:1653-62.
5. RIOJA RRG, KIRCHNER MJA, FUNES VA, MESEGUER NB, RIUS MC, DÍAZ MAL, BRU CM. Hemólisis en las muestras para diagnóstico. *Rev Lab Clin*. 2009;2(4):185-95.
6. LIZARRAGA AR, GAMBRA D, MARAÑÓN A, OROZCO C, DÍAZ E. Factores relacionados con la hemólisis en la extracción de muestras sanguíneas. *Anales Sis San Navarra*. 2008;31(2).
7. KIRSCHBAUMWEG T. Hemolisis como influencia y factor de interferencia. *JIFCC*. 2002;13(4):107-13.
8. JONES BA, CALAM RR, HOWANITZ PJ. Chemistry specimen acceptability: a College of American Pathologists Q-Probe study of 453 labs. *Arch Pathol Lab Med*. 1997;121:19-26.
9. LATIN AMERICAN SCIENTIFIC COMMITTEE (LASC). Hemólisis ex-vivo. *Boletín Notas Pre-Analíticas* 2014. Volumen 3. Disponível em: <http://www.specimencare.com/pdfs/boletim_vol3.pdf>. Acesso em: 07 junho 2018.

10. HEYERA NJ, DERZON JH, WINGES L, SHAW C, MASS D, SNYDER S. Effectiveness of practices to reduce blood sample hemolysis in EDs: A laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis. *Clin Biochem*. 2012;45(0):1012-32.
11. BD WHITE PAPER VS5391. Evaluation of sample quality and analytic results between specimens collected in BD Vacutainer™ tubes and current syringe collections (available upon request from BD). Disponível em: <<http://paswhitepapers.bd.com>>. Acesso em: 07 junho 2018.
12. MCCAUGHEY EJ, VECCELLIO E, LAKE R, LI L, BURNETT L, CHESHER D ET AL. Key factors influencing the incidence of hemolysis: A critical appraisal of current evidence. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2017;54(1):59-72.
13. DUGAN L, LEECH L, SPERONI KG, CORRIHER J. Factors affecting hemolysis rates in blood samples drawn from newly placed iv sites in the emergency department. *Journal of Emergency Nursing*. 2005;31(4):338-45.
14. DOLCI A, PANTEHHINI M. Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? *Clin Chim Acta*. 2014;432:38-43.
15. GOYZL T, SCHMOTZER CL. Validation of hemolysis index thresholds optimizes detection of clinically significant hemolysis. *Am J Clin Pathol*. 2015;143:579-583.
16. LIPPI G, MONTAGNANA M, SALVAGNO GL, GUIDI GC. Interference of blood cell lysis on routine coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130:181-4.
17. LIPPI G, SALVAGNO GL, MONTAGNANA M, BROCCO G, GUIDI GC. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(3):311-6.
18. ATAY A, DEMIR L, CUHADAR S, SAGLAM G, UNAL H, AKSUN S ET AL. Clinical biochemistry laboratory rejection rates due to various types of preanalytical errors. *Biochemica Medica*. 2014;24(3):376-82.
19. LIPPI G, BANFI G, BUTTARELLO M, CERIOTTI F, DAVES M, DOLCI A ET AL. Recommendations for detection and management of unsuitable samples in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(6):728-36.
20. GUDER WG, NARAYANAN S, WISSER H, ZAWTA B. *Samples: from the patient to the laboratory*. 3.ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2003.
21. SALDAÑA IM. Interferencia causada por hemólisis en la determinación de 25 constituyentes bioquímicos en el autoanalizador ADVIA 1800. *An Fac Med*. 2015;76(4).

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

A qualidade da fase pré-analítica impacta no diagnóstico clínico.

O BD Pre Analytical Quality Check possibilita identificar e monitorar as possíveis causas dos erros pre-analíticos, proporcionando informações fundamentais para o dia a dia do laboratório.

- Índices de rejeição / recoletas
- Segurança do profissional da saúde
- Erros de identificação do paciente
- Técnica de punção
- Fluxo laboratorial e tempo de resultado
- Controle de infecção
- Requerimentos para acreditação.

Acompanhamento da fase pré-analítica



Armazenamento

Coleta de
Sangue

Transporte



Preparo da
Amostra

Qualidade da
Amostra

Análise



Hemólise

HemoCue® Plasma/Low Hb

Controle de qualidade com precisão

Exatidão nos resultados

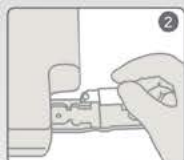
Único TLR do mercado que quantifica a hemoglobina livre sem necessidade de cálculos. Possibilita a medição do grau de hemólise de forma precisa sem necessidade da diluição da amostra. Otimiza o tempo necessário para a avaliação dos concentrados de hemácias e controle de qualidade dos produtos do sangue.



Teste em três etapas simples



Encha a microcuveta



Coloque no Plasma



Verifique o resultado

- Método de precisão laboratorial: Azidemetahemoglobina modificada
- 20 µl de plasma, soro e soluções aquosas ou suspensões de eritrócitos armazenados
- Resultados em até 60 segundos
- Dispensa manutenção preventiva e calibrações posteriores
- Registro ANVISA: 10033120880

BIODINA
BRASIL

7 Índice sérico: contribuição para a qualidade e a confiabilidade dos resultados laboratoriais

INTRODUÇÃO

Os resultados dos testes laboratoriais são responsáveis por 65 a 70% das informações relevantes para a tomada de decisão médica.

As decisões clínicas adequadas podem ser tomadas se baseadas em testes laboratoriais obtidos, identificados e realizados em processos bem definidos e controlados.

Como consequência, é necessário levar em consideração na definição e no controle dos processos todos os elementos que possam interferir nesse cenário.

O erro analítico total consiste na soma de três fatores: a imprecisão ou a veracidade; o desvio específico do método; e o desvio específico da amostra. Em geral, os procedimentos de medição estimam apenas os dois primeiros. Entre as possíveis causas do desvio específico da amostra, estão as interferências, frequentemente observadas como problemas isolados em amostras específicas, em vez de uma característica quantificável do processo.

Do ponto de vista da avaliação, a suscetibilidade às causas de interferências, sistemáticas ou aleatórias, deve ser quantificada como componente do erro analítico total.

As interferências por substâncias exógenas ou endógenas em ensaios para analitos clinicamente úteis consistem em um problema comum na medicina laboratorial.

A importância da interferência nas análises realizadas no laboratório clínico pode ser estimada pela sua frequência ou pelo seu impacto no atendimento ao paciente.

Segundo Plebani e Carraro,¹ 13,3% do total de erros do laboratório se dão no estágio analítico, percentual no qual as interferências analíticas são as maiores (8,5%).

Existem duas definições mais comumente usadas para o termo “interferência analítica”: a primeira a refere como o erro sistemático de medição causado por componentes da amostra, o que, por si só, não produz sinal no sistema de

medição; a segunda definição a relaciona como o efeito de uma substância presente na amostra que altera o valor correto de um resultado, geralmente expresso em concentração ou atividade de um analito.

As interferências podem ser causadas por substâncias endógenas ou exógenas.

Com relação às interferências analíticas exógenas, as mais comuns são as medicinais.

Já as principais endógenas são a hemoglobina, a bilirrubina, os lipídios e as paraproteínas.

Acredita-se que a definição mais aplicável é a segunda, uma vez que as causas mais frequentes de interferências endógenas não seriam incluídas na primeira definição.

A seguir, discorrer-se-á brevemente acerca de cada um desses interferentes.

HEMÓLISE

É a mais frequente das interferências analíticas endógenas e, portanto, uma das mais estudadas. Na literatura, a hemólise aparece como causa de interferência endógena em mais de 50% dos casos. Isso porque a hemólise pode ocorrer durante a coleta de sangue, o transporte, o armazenamento e a centrifugação, enquanto a lipemia ou a icterícia estão associadas à condição do paciente, de modo que não podem ser solucionadas com uma nova coleta de sangue.

Nos anos 1990, o College of American Pathologists conduziu um estudo com 453 laboratórios a fim de determinar a frequência e as causas de rejeição de amostras relacionadas à análise de química clínica.

Nessa análise, obteve-se uma frequência de rejeição de 0,35%, cuja principal causa foi a hemólise, cinco vezes mais frequente que a segunda causa relatada.

A hemólise compreende a liberação dos componentes do glóbulo vermelho no fluido extracelular com múltiplas causas. Pode ser produzido *in vivo* ou *in vitro*, sendo o último o mais frequente.

A hemólise *in vitro* depende essencialmente do modo como se extrai e trata a amostra, em particular de como o sangue passa através de uma agulha muito fina com demasiada pressão (seja na extração, seja no enchimento do tubo), da extração realizada com agulha e seringa ou sistema a vácuo, no modo de homogeneização da amostra, da conservação ou do transporte em condições inadequadas ou da centrifugação da amostra antes da formação completa do coágulo. Em um estudo de Bonini e Plebani,² a hemólise *in vitro* representou a causa de 3,3% de rejeição de amostras no laboratório, não sendo observadas diferenças entre as amostras oriundas de serviços de medicina ou cirurgia (3,1%), unidade de terapia intensiva (3,5%) ou departamento de emergência (3,3%).

Existem vários mecanismos pelos quais a hemólise interfere nas determinações laboratoriais.

A hemólise tem um efeito direto em várias determinações. A diferença na concentração de alguns analitos entre o espaço intra e extracelular faz com que, ao ocorrer o extravasamento do conteúdo intracelular, a concentração sérica ou plasmática de alguns elementos se eleve em maior ou menor grau, como potássio, AST, DHL, entre outros.

INTERFERÊNCIA NO PROCESSO ANALÍTICO

O conteúdo intracelular que extravasa para o plasma pode interferir diretamente nas reações analíticas. A hemoglobina já apresenta absorção de luz em um nível de comprimento de onda de 340 nm; assim, as técnicas que envolvem a medição do aumento ou a diminuição de NADH ou NADPH serão afetadas. Do mesmo modo, pode ocorrer uma inibição da diazoformação na dosagem de bilirrubina pelo método de Jendrassik pela atividade da pseudoperoxidase de hemoglobina.

INTERFERÊNCIA ÓPTICA

Pode ocorrer também uma interferência óptica pela presença da hemoglobina, uma vez que, por se tratar de uma substância colorida, pode ocorrer aumento na absorção em determinado comprimento de onda, bem como como uma modificação do valor do branco nas medições espectrofotométricas.

BILIRRUBINA

O aumento na concentração de bilirrubina compreende uma fonte frequente de interferência endógena. Essa elevação pode decorrer de doença hepática aguda ou crônica, cirrose, resposta ao consumo de medicamentos terapêuticos, entre outras.

A bilirrubina plasmática circula ligada fracamente à albumina, havendo também conjugados hidrossolúveis das formas mono e diglucuronida da bilirrubina. A maioria dos estudos de interferência de bilirrubina analítica foi feita com a contribuição de bilirrubina não conjugada ou ditaurobilirubina (hidrossolúvel), o que pode conduzir a diferentes resultados, tanto qualitativas quanto quantitativas.

O aumento de bilirrubina produz interferência nas reações fundamentalmente por dois mecanismos:

- Interferência espectral: a absorção de luz pela bilirrubina entre 340 e 500 nm e a alta absorbância de fundo podem se tornar um fator limitante para a faixa de linearidade dos métodos espectrofotométricos nesses comprimentos de onda, afetando, também, as reações que utilizam o comprimento de onda de 340 nm para a leitura principal da reação;
- Interferência química: em vários métodos, como aqueles baseados em reações de oxidase/peroxidase (reação de Trinder), o H_2O_2 formado pode ser usado pela

bilirrubina proporcionalmente à sua concentração, o que causaria uma diminuição sistemática nos resultados. Isso pode acontecer na dosagem de analitos comuns, como glicose, colesterol e triglicerídeos.

O pH da reação pode também interferir quando a concentração de bilirrubinas está elevada. No método de Jaffé, em meio alcalino, a bilirrubina representa uma das interferências analíticas mais importantes.

Em um meio fortemente ácido, pode ocorrer uma alteração na bilirrubina conjugada no nível do espectro UV, produzindo uma interferência na determinação de fosfato pelo método do fosfomolibdato.

A proporção de bilirrubina conjugada e não conjugada no soro ou plasma não seria um fator de interferência significativo.

LIPÍDIOS

A causa mais frequente de hiperlipidemia é o aumento na concentração de triglicerídeos no soro ou no plasma, o que pode decorrer de uma ingesta alimentar, um distúrbio do metabolismo das lipoproteínas, infusão de lipídios em nutrição parenteral, diabetes melito, consumo de álcool, insuficiência renal crônica ou pancreatite.

Após a absorção intestinal, os triglicerídeos estão presentes na circulação na forma de quilomícrons e seus produtos metabólicos duram aproximadamente de 6 a 12 horas.

A turbidez causada pelas alterações metabólicas que provocam a hipertrigliceridemia não pode ser diferenciada da infusão de lipídios para fins nutricionais, aglutininas frias ou imunoglobulinas monoclonais.

Os quilomícrons são partículas grandes que produzem turbidez, dispersão da luz e deslocamento de volume, sendo esses os mecanismos de interferência dos lipídios.

INTERFERÊNCIA ESPECTRAL

A interferência espectral causada pela lipemia é diferente daquela promovida pela hemólise e pela bilirrubina. A interferência da lipemia se dá pela dispersão da luz, prejudicando a sua transmissão pela cubeta de reação. O grau de dispersão da luz depende do número, do tamanho e do índice de refração das partículas lipídicas em suspensão. Considerando que as amostras de soro são uma mistura de partículas de vários tamanhos, sua aparência é esbranquiçada porque a luz se espalha por todos os ângulos. Quando a turbidez é muito alta, a medição não será possível, uma vez que excede os limites de linearidade das técnicas espectrofotométricas.

A dispersão da luz causada por partículas lipídicas tem efeitos profundos nos métodos baseados na dispersão da luz, como a nefelometria.

DESLOCAMENTO VOLUMÉTRICO

O volume ocupado pelas lipoproteínas pode reduzir a concentração aparente do analito pela redução da água disponível no volume da amostra, uma vez que o volume ocupado pelos lipídios inclui-se no cálculo da concentração do analito.

Esta é a causa que explica as baixas concentrações de sódio e potássio quando medidas por fotometria de chama, mas a concentração é normal quando medida com eletrodos íons seletivos.

EFEITOS FÍSICO-QUÍMICOS

Um analito que se solubiliza com lipídios pode não reagir com o reagente aquoso por causa de sua maior afinidade com os lipídios, resultando em uma medição possivelmente diminuída. Do mesmo modo, as técnicas de eletroforese e cromatografia podem ser afetadas.

PARAPROTEÍNAS

Concentrações elevadas de proteínas causam interferência em alguns ensaios. Os componentes monoclonais que se desenvolvem, por exemplo, no mieloma múltiplo podem aumentar a viscosidade do soro e interferir na medida do volume da amostra.

A interferência analítica das paraproteínas compreende um método específico, sendo capaz, por exemplo, de ocorrer na dosagem da ureia pelo método de oftalaldeído, mas não no de urease. Uma interferência negativa pode se dar na dosagem de tiroxina por RIA, e uma interferência positiva quando determinado por ELISA de duplo anticorpo.

Recentemente, se um resultado anormal fosse obtido, a amostra era inspecionada quanto a possíveis interferências visíveis. Esse procedimento de verificação era realizado após o ensaio e consumia muito tempo. No entanto, havia dúvidas com relação às amostras com resultados normais que também poderiam ter sofrido algum tipo de interferência.

Todas essas interferências analíticas podem ser quantificadas medindo-se os índices séricos, o que exclui a possibilidade de erro humano e economiza tempo do operador, além de determinar uma potencial causa de interferência para um resultado anormal, evitando repetições e, como consequência, redução de custos.

ÍNDICES SÉRICOS

Definição

Os índices séricos são cálculos de medidas de absorbância que fornecem uma representação semiquantitativa dos níveis de icterícia, hemólise ou lipemia presentes nas amostras de pacientes.

Para medir os índices séricos, os analisadores pipetam uma alíquota da amostra do paciente e a diluem em NaCl a 0,9%; em seguida, medem a absorvância em três ou três pares de comprimentos de onda, dependendo da plataforma utilizada. A medida do índice sérico para lipemia utiliza comprimentos de onda próximos de 700 nm, visto que esse intervalo está livre da interferência pela hemólise e pela icterícia. Para o índice de hemólise, a faixa de comprimentos de onda é próximo a 570 nm e, para icterícia, a 480 nm.

Após a realização da medição, o analisador compara o resultado com o valor-limite de leitura preestabelecido para hemólise, icterícia e lipemia para cada ensaio específico a fim de avaliar se essa amostra é adequada ou não para obtenção de um resultado confiável. Embora os níveis séricos de hemólise e icterícia tenham uma boa correlação com as concentrações de hemoglobina e bilirrubina do paciente, respectivamente, o índice de lipemia está associado ao grau de turbidez na amostra, e não diretamente à concentração de triglicerídeos presentes nela.

Como já dito, os índices séricos são úteis para monitorar o grau de interferência de hemólise, icterícia e lipemia, e, por conseguinte, melhorar a qualidade dos resultados emitidos.

De acordo com um estudo de Vermeer e colaboradores,³ após a implantação da determinação dos índices séricos automatizados houve um incremento na detecção de hemólise e icterícia, ainda que sem uma conclusão com relação à lipemia.

As vantagens dos índices séricos automatizados são:

1. Reduzir o tempo de resposta, considerando que a revisão manual das amostras na fase pré-analítica ou das amostras que exibiram resultados anormais (fase pós-analítica) exige um gasto de tempo adicional e configura atraso na liberação dos resultados;
2. Reduzir os custos no laboratório por evitar a repetição desnecessária do exame.

Um fluxo de trabalho proposto por vários autores encontra-se esquematizado na Figura 1.

Esse fluxo de trabalho proposto baseia-se na análise conjunta da amostra com cada parâmetro dos índices séricos. O resultado e o valor dos índices serão avaliados simultaneamente e, de acordo com os valores de corte, um alarme será disparado pelo sistema para alertar o analista.

Os valores de corte dos índices séricos para cada analito e para cada metodologia podem ser fornecidos pelo fabricante ou determinados por cada laboratório. Eles são inseridos no programa do computador ou no sistema do laboratório para a geração dos alarmes.

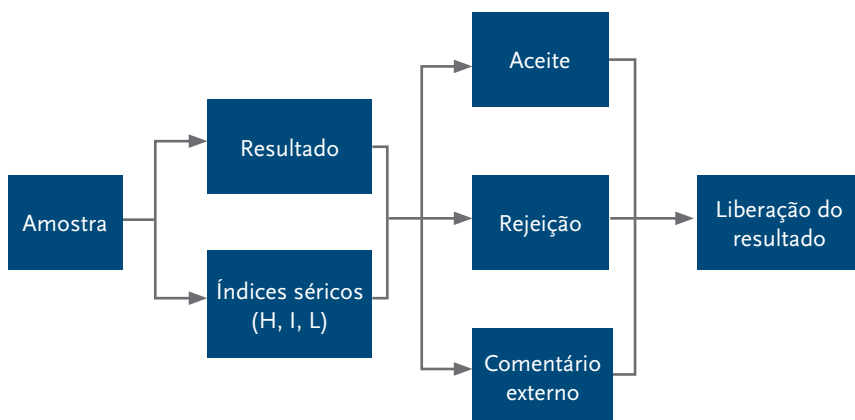


FIGURA 1 Fluxo de trabalho utilizando os índices séricos automatizados.

H: hemólise; I: icterícia; L: lipemia.

Cada laboratório precisa estabelecer o seu valor crítico de índice sérico no qual a qualidade da amostra avaliada não permite o relato desse resultado.

Existem várias opções de conduta de acordo com o valor do índice sérico:

1. O resultado poderá ser liberado se o índice estiver normal;
2. Se o índice for ligeiramente aumentado, o resultado poderá ser liberado com um comentário;
3. Se o índice exceder o valor crítico atribuído, o resultado não será liberado e um comentário sobre a qualidade da amostra deverá ser reportado.

A qualidade da amostra ainda é considerada a pedra angular da qualidade total no diagnóstico laboratorial e sua avaliação deve compreender uma rotina inevitável.

Para isso, os índices séricos auxiliam de maneira importante, diminuindo os tempos de resposta e os custos, além de aumentar a qualidade do produto ofertado.

REFERÊNCIAS

1. PLEBANI M, CARRARO P. Mistakes in stat laboratory: types and frequency. Clin Chem. 1997;43(8):1347-51.
2. BONINI P, PLEBANI M. Errors in laboratory medicine. Clin Chem. 2002;48(5):691-8.
3. VERMEER H, THOMASSEN E, DE JONGE N. Automated processing of serum indices used for interferences detection by a Laboratory Information System. Clin Chem. 2005;51(1):244-7.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

CARRARO P, SERVIDIO G, PLEBANI M. Hemolyzed specimens: a reason for rejection or a clinical challenge? *Clin Chem*. 2000;46:306-8.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). EP7 A2. Interference testing in clinical chemistry. Approved Guideline. 2. ed. Wayne: CLSI; 2005.

GUDER WG, FONSECA-WOLLHEIM F, HEIL W, SCHMITT YM, TÖPFER G, WISSER H, ZAWTA B. The haemolytic, icteric and lipemic sample recommendations regarding their recognition and prevention of clinically relevant interferences. *J Lab Med*. 2000;24(8):357-64.

Ji JZ, MENG QH. Evaluation of interference of hemoglobin, bilirubin, and lipids on Roche Cobas 6000 assays. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412:1550-3.

JONES BA, CALAM RR, HOWANITZ PJ. Chemistry specimen acceptability: a College of American Pathologists Q-Probes study of 453 laboratories. *Arch Pathol Lab Med*. 1997;121(1):19-26.

KOCAK FE, MERAL A, KOCAK H. Assessment of serum indices implementation on Roche Cobas 6000 analyzer. *Eur J Med Sci*. 2014;1(2):43-52.

KROLL M, ELIN R. Interference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem*. 1994;40(11):1996-2005.

LIPPI G, CADAMURO J, VON MEYER A, SIMUNDIC AM; EUROPEAN FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE (EFLM) WORKING GROUP FOR PREANALYTICAL PHASE (WG-PRE). Practical recommendations for managing hemolyzed samples in clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(5):718-27.

ROBERT MP, SANDALINAS S, GALÁN EF, DE LA PRESA BG, CHESA JLB. Verificación e implantación en un laboratorio de urgencias de un sistema de medición de los índices séricos (hemólisis, ictericia y lipemia) en un Dimension® EXLTM. *Rev Lab Clin*. 2016;9(4):166-72.

ROCHE DIAGNOSTICS. Índices séricos: Reducción de los errores clínicos en medicina de laboratorio. 2012.

SBPC/ML. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso. 2. ed. Barueri: Minha Editora; 2010.

WESTGARD JO, DARCY T. The truth about quality: medical usefulness and analytical reliability of laboratory test. *Clin Chim Acta*. 2004;346(1):3-11.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).



TENHA O
**GERENCIAMENTO
LABORATORIAL**
EM SUAS MÃOS!

softeasy 

SISTEMAS PARA GESTÃO LABORATORIAL

8 O impacto da temperatura no armazenamento e no transporte para estabilidade das amostras

IMPORTÂNCIA DO ASSUNTO

Os exames laboratoriais têm um impacto crítico e definem aproximadamente 70% das decisões médicas.¹

No ciclo que se inicia com a solicitação do médico-assistente e termina com a interpretação dos resultados, podem ocorrer erros em qualquer estágio.

Entre os diferentes riscos e problemas relacionados à segurança dos pacientes, recentemente, constatou-se que aqueles associados aos testes diagnósticos representam 2,75% dos efeitos adversos, 84,2% dos quais poderiam ter sido evitados.²

Para detectar as reais alterações patológicas nos pacientes, as variações pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas devem ser reduzidas a níveis aceitáveis para que não haja um impacto na interpretação dos resultados.

Cada uma dessas fases tem sua própria variabilidade e, ainda que alguns dos erros não afetem diretamente o paciente, outros implicam a repetição da análise, resultando em aumento de custos, um diagnóstico incorreto ou um tratamento inadequado que afete a saúde do paciente.³

À medida que a variação analítica diminui com o desenvolvimento de novas tecnologias, a variabilidade pré-analítica se torna o problema dominante para a melhoria dos resultados.

A fase pré-analítica apresenta diversas fontes de variabilidade em conjunto com os processos extralaboratoriais e intralaboratórios (Figura 1), que contribuem potencialmente para a ocorrência do maior percentual de erros (48 a 68%).^{3,4}

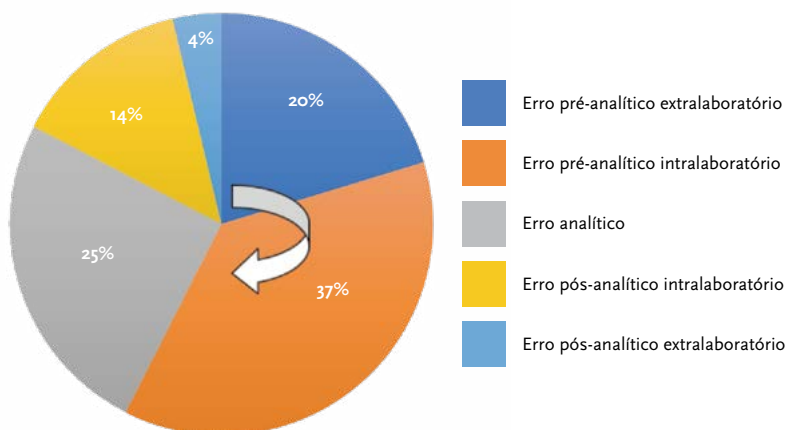


FIGURA 1 Percentual de erro nas etapas extra e intralaboratórias.

Fonte: adaptada de Guder et al., 2003.⁵

Na fase pré-analítica, um aspecto de interesse fundamental é a garantia da estabilidade das amostras biológicas.

A estabilidade da amostra, de acordo com Guder,⁵ refere-se à capacidade de manter os valores e as propriedades biológicas da amostra dentro dos limites preestabelecidos sob condições específicas.

Diferentes estudos documentaram os aspectos inerentes à manipulação e ao processamento das amostras sanguíneas que podem afetar a estabilidade.

Os aspectos específicos fundamentais se referem a:

1. Tempo de contato do soro ou plasma com as células sanguíneas;
2. Temperatura de armazenamento e manuseio da amostra;
3. Transporte das amostras.

O conhecimento e o controle dessas variáveis podem contribuir para a otimização e a utilidade clínica dos resultados da análise laboratorial.

TEMPO DE CONTATO DO SORO OU PLASMA COM AS CÉLULAS SANGUÍNEAS

Na maioria das análises laboratoriais, utilizam-se o plasma ou o soro dos pacientes.

O uso de plasma é de particular interesse nos laboratórios de emergência por contribuir para diminuir o tempo de resposta.

As amostras de soro e plasma apresentam algumas diferenças em relação aos seus valores; além disso, existem diferentes tubos de separação, aceleradores etc., que podem afetar a conservação das amostras. Esses tópicos serão discutidos mais adiante.

O contato prolongado do soro com o coágulo pode causar variações importantes em alguns analitos, os quais serão afetados em uma relação próxima com as variáveis tempo e temperatura.

O período ótimo entre a coleta da amostra de sangue e a separação do soro deve ser suficiente para possibilitar a retração do coágulo, mas inferior ao tempo em que alterações significativas induzidas pelo contato com o coágulo possam ocorrer.

O tempo mínimo para a retração do coágulo é de 20 a 30 minutos, de acordo com Burtis e Ashwood,⁶ e pode ser maior em pacientes anticoagulados.

A atividade biológica dos elementos presentes no sangue, como a difusão transmembrana nas células, pode induzir mudanças nas concentrações de certos analitos se houver um período prolongado de contato do soro com o coágulo.

O soro ou o plasma devem ser fisicamente separados das células tão rapidamente quanto possível, a menos que haja evidência conclusiva de que o contato prolongado não seja uma fonte de erro.

Segundo as Recomendações do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS),⁷ indica-se um intervalo de 1 hora entre a coleta da amostra e a separação do soro ou plasma e um tempo máximo de 2 horas.

Em alguns casos em particular, o tempo de separação recomendado deve ser inferior a 2 horas:

- ACTH, cortisol, catecolaminas, lactato, homocisteína e cálcio iônico em amostras à temperatura ambiente (estável por 96 horas a 4°C).

Tempo de separação do soro dentro de 2 horas à temperatura ambiente:

- Glicose, potássio, fósforo, DHL.

Tempo de separação do soro dentro de 6 horas à temperatura ambiente:^{7,8}

- Albumina, bicarbonato, cloro, peptídeo C, HDL-colesterol, LDL-colesterol, ferro, proteínas totais.

De acordo com o estudo de Zhang e colaboradores,⁹ os seguintes analitos se mantêm estáveis no intervalo de até 24 horas à temperatura ambiente (18 a 25°C), mesmo sem a separação do soro (Figura 2): ALT, AST, fosfatase alcalina, aldosterono-

na, amilase, bilirrubina, cálcio, creatinina, ceruloplasmina, CK, CK-MB, cortisol, estradiol, ferritina, folato, gama glutamiltransferase, HCG, haptoglobina, IgA, IgE, IgG, IgM, prolactina, sódio, tiroxina, transferrina, testosterona, ureia, ácido úrico, vitaminas A e B₁₂.

Se razões de distância ou limitações técnicas não permitirem o transporte nos tempos recomendados para a separação correta do soro ou plasma, recomenda-se não transportar a amostra de sangue, mas separá-la previamente.

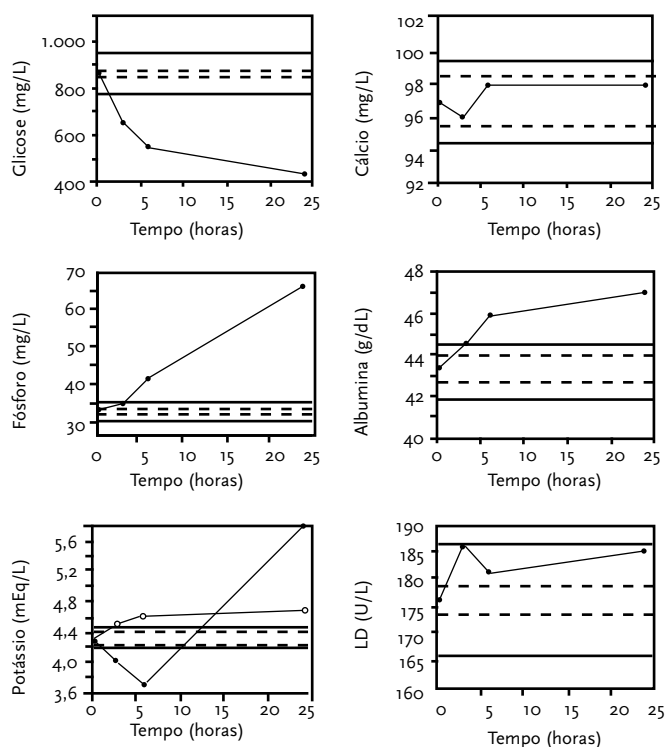


FIGURA 2 Efeito do tempo (horas) de contato do soro com coágulo para analitos selecionados.

(- - -) Limites aceitáveis de acordo com a variação analítica.

(—) Limites aceitáveis de acordo com a combinação de imprecisão e variação clínica.

(•) Incubação a 32°C.

(°) Incubação a 24°C.

Fonte: adaptada de Zhang et al., 1998.⁹

Analitos afetados pelo tempo de separação e pela temperatura de armazenamento

Potássio (K^+)

A liberação de K^+ dos eritrócitos é mínima à temperatura ambiente em razão da atividade dependente da temperatura da bomba Na^+ , K^+ ATPase.

O frio inibe a glicólise que fornece a energia necessária para o bombeamento de K^+ para o interior da célula. Sem essa energia, o K^+ não é transportado para o interior das células resultando em uma falsa elevação do K^+ .

Em altas temperaturas, observa-se um elevado índice energético com grande atividade da bomba que induz, em princípio, um aumento na captação de K^+ e diminuição transitória da sua concentração no sangue. Esse comportamento é verificado 4 horas após a coleta à temperatura de 35°C. Na sequência, uma diminuição na glicose pode ocorrer pelo consumo celular e pela diminuição da atividade da bomba, e o K^+ é liberado da célula elevando a concentração no sangue (ver Figura 2).

Glicose

A concentração de glicose diminui com o aumento da temperatura e, também, pela celularidade. Em uma amostra de sangue total armazenada por 2 horas a 23°C, a concentração de glicose diminui ao redor de 10%.

Fósforo

O efeito inverso da glicose ocorre com o fósforo inorgânico, porque a atividade das fosfatases no soro e nas células da série vermelha se eleva.

Conforme demonstrado na Figura 2, o tempo de armazenamento em determinadas temperaturas representa um fator de variabilidade para esses analitos.

É necessário ter em mente que as amostras patológicas podem apresentar desvios no seu comportamento, habitualmente observados nos analitos, em razão do tempo de separação e da temperatura.

A hiperleucocitose pode causar uma queda acentuada da glicose no sangue total, bem como a pseudo-hipoxemia em amostras de sangue arterial na análise dos gases sanguíneos.

Além disso, pode ser observado um aumento da amônia em amostras com atividade elevada da gama glutamiltransferase ou uma alteração das células hematológicas decorrente do efeito da temperatura na presença de anticorpos frios.

Uso de aditivos ou conservantes

A coleta da amostra com o agente antiglicolítico fluoreto de sódio estabiliza o nível da glicose na presença de células de sangue durante mais de 24 horas à temperatura ambiente ou 48 horas sob refrigeração (2 a 8°C).

Tubos primários com separadores ou aceleradores da coagulação

No mercado, existem diferentes tipos de tubos primários, sendo os mais comuns os tubos de polimetilmetacrilato, os tubos a vácuo com grânulos que aceleram o processo de coagulação e os tubos com gel separador.

Após a centrifugação, o soro ou plasma pode ser mantido em contato com o gel de separador por um tempo limitado. É importante consultar as referências do produto em uso e realizar os testes de validação pelo laboratório, pois a estabilidade dos analitos varia de acordo com os aceleradores e separadores utilizados.¹⁰

Em geral, o soro pode ser preservado em um tubo com gel separador por 48 horas a 4°C.

Amostras obtidas em tubo com gel separador nunca devem ser recentrifugadas.⁷

TEMPERATURA DE CONSERVAÇÃO, TRANSPORTE E MANUSEIO DAS AMOSTRAS⁷

Amostras armazenadas à temperatura ambiente

Como mencionado anteriormente, para a maioria dos analitos, recomenda-se uma temperatura ambiente (18 a 25°C) para conservação, transporte e centrifugação das amostras.

Temperaturas acima de 35°C devem ser evitadas, pois aceleram a deterioração das células sanguíneas.

Amostras refrigerados (2 a 8°C)

O resfriamento de uma amostra inibe o metabolismo das células sanguíneas e estabiliza os componentes termolábeis.

As amostras de sangue total não devem ser refrigeradas, exceto nos casos em que é particularmente recomendado.

Contraindica-se a refrigeração de uma amostra por períodos superiores a 2 horas quando se realiza a análise de potássio (ver Figura 2).

As amostras coletadas para a análise de eletrólitos não devem ser refrigeradas previamente à centrifugação e à análise.

São analitos que exigem armazenamento a frio: catecolaminas, amônia, lactato, gastrina, PTH, gasometria e cálcio iônico.

Para esses casos, as condições de temperatura e transporte necessitam ser muito bem controladas. Em algumas situações específicas, as análises são realizadas no próprio local onde é realizada a coleta da amostra (p. ex., análise de gases sanguíneos).

Temperatura de centrifugação

Os laboratórios devem disponibilizar centrífugas com controle de temperatura. Alguns analitos termolábeis específicos devem ser centrifugados a 4°C (p. ex., ACTH) e outros a 37°C (vide item “Temperatura em amostras especiais”).

Excetuando-se os casos em que as recomendações estabelecem temperaturas específicas de centrifugação, as amostras de sangue para obtenção de soro ou plasma são centrifugadas a uma temperatura entre 20 e 22°C.

Os tubos não devem ser recentrifugados após a separação do plasma ou soro.

A recentrifugação pode provocar uma alteração na relação água do plasma/volume das células, o que pode causar alterações no valor dos analitos.

Soro ou plasma após centrifugação

As amostras separadas de soro ou plasma não devem permanecer por mais de 8 horas à temperatura ambiente, antes da análise.

Se o processamento não puder ser realizado dentro desse período, eles devem ser refrigerados (2 a 8°C).

Se o processamento das amostras não for feito dentro de 48 horas, recomenda-se mantê-las em um freezer a -20°C.

Descongelamento das amostras

Uma fonte muito comum de erro é a homogeneização inadequada das amostras após descongelamento. Durante o processo de descongelamento, produzem-se gradientes de concentração que determinam que as soluções primeiro derretam e, em seguida, deslizem para a superfície dos tubos.

As amostras de soro ou plasma não devem ser congeladas e descongeladas, pois podem sofrer deterioração. Não é recomendado descongelar as amostras mais de uma vez.

As amostras, uma vez analisadas, devem ser armazenadas para eventual confirmação de resultados, para realizar estudos adicionais e por razões médicas ou legais. A temperatura e o tempo de conservação dessas amostras variam de acordo com o analito e as recomendações específicas.

Temperatura de conservação das amostras em estudos de coagulação¹¹

A estabilidade dos fatores da coagulação depende de o paciente estar recebendo ou não tratamento com heparina, de acordo com Heil e colaboradores.¹²

- **Tempo de protrombina (TP):** as amostras não centrifugadas ou centrifugadas sem a separação do plasma, em tubo fechado à temperatura de 18 a 24°C, devem ser analisadas dentro de 24 horas após a coleta.
O armazenamento sob refrigeração (2 a 4°C) pode induzir a ativação do fator VII, resultando em uma alteração do resultado de TP.
- **Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA):** nos pacientes que não estão fazendo uso de heparina, as amostras não centrifugadas, ou centrifugadas sem separação do plasma em um tubo fechado e mantido à temperatura entre

2 e 8°C ou 18 e 24°C, devem ser analisadas dentro de 4 horas após a coleta do sangue.

As amostras contendo heparina não fracionada e mantidas sob temperatura entre 2 e 8°C ou 18 e 24°C devem ser centrifugadas dentro de 1 hora a partir da coleta e o plasma analisado dentro de 4 horas após a coleta da amostra.

Quando há um risco de agitação da amostra antes da centrifugação (p. ex., durante o transporte), o plasma deveria ser separado dentro de 1 hora após a coleta e analisado dentro de 4 horas após a coleta.

As amostras para outros ensaios (p. ex., tempo de trombina, proteína C, fatores V e VIII) mantidas entre 2 e 8°C ou 18 e 24°C devem ser centrifugadas e analisadas em até 4 horas após a coleta da amostra.

Se a análise do TP não puder ser realizada dentro de 24 horas e o TTPA e outras análises dentro de 4 horas, o plasma deve ser separado e mantido em freezer a 20°C por 2 semanas e freezer de -70°C por 6 meses.

As amostras congeladas devem ser rapidamente descongeladas a 37°C e analisadas de imediato.

Se não puderem ser analisadas imediatamente, as amostras podem ser mantidas, no máximo, por 2 horas a 4°C antes da análise.

O resultado do TTPA pode ser afetado em amostras previamente congeladas.

Temperatura de conservação e transporte de amostras de urina¹³

Recomenda-se processar a amostra de urina dentro de 2 horas após a coleta e evitar o uso de conservantes, tanto quanto possível.

Se o processamento atrasar, a amostra deve ser refrigerada (2 a 8°C) e mantida protegida da luz. Nessas condições, pode ser mantida por um período de 12 horas.

No caso da urina refrigerada, recomenda-se que a amostra atinja a temperatura ambiente para iniciar o processamento e realizar previamente uma correta homogeneização da amostra.

Na urina resfriada, pode haver precipitação de cristais urato amorfos e fosfato.

A urina nunca deve ser congelada, uma vez que deteriora os elementos celulares e falseia os parâmetros bioquímicos.

Para o estudo de diferentes analitos, a amostra deve ser aliquoteada com homogeneização prévia e conservada de acordo com as análises a serem realizadas.

O tempo de conservação sob diferentes condições de temperatura ou conservantes depende dos constituintes específicos da urina.

LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR) | TEMPERATURA DE CONSERVAÇÃO E TRANSPORTE⁵

O LCR deve ser transportado para o laboratório imediatamente após a coleta.

Pode ser armazenado em meio refrigerado (2 a 8°C) por no máximo 3 horas.

Para o estudo da celularidade, quando o tempo de transporte for prolongado, recomenda-se realizar a centrifugação. As lâminas permanecem estáveis por 4 a 6 dias à temperatura ambiente.

Após a centrifugação, o LCR deve ser armazenado em um *freezer* a -70°C em recipientes de vidro ou polipropileno hermeticamente fechados.

Recomenda-se o *freezer* a -70°C em vez de -20°C , já que as proteínas das bandas oligoclonais desaparecem quando conservadas por mais de 6 meses a -20°C .

Conservação de amostras para hemograma⁵

Recomenda-se processar a amostra em EDTA no prazo de 6 horas após a coleta.

Em alguns casos, esse tempo é excessivo para garantir a exatidão dos resultados.

Apenas o valor da hemoglobina e a contagem de plaquetas são estáveis durante esse período.

Recomenda-se a realização de um esfregaço de sangue dentro de 2 horas depois da coleta da amostra. Não se indica o armazenamento do esfregaço por mais de 24 horas.

Temperatura em amostras especiais¹⁴

No caso das crioglobulinas, a coleta e o processamento de amostras devem ser realizados sob condições controladas de temperatura, pois algumas delas precipitam rapidamente em temperaturas abaixo de 37°C .

Todo material de coleta (seringas, tubos com gel separador sem anticoagulante) deve ser pré-aquecido a 37°C .

Durante o transporte até o laboratório, as amostras devem permanecer em um recipiente isotérmico com água, garantindo que a temperatura esteja entre 37 e 40°C .

No laboratório, os tubos devem ser mantidos a 37°C em banho-maria por 1 hora até a retração do coágulo e centrifugados a 37°C . Caso o laboratório não disponha de uma centrífuga a 37°C , a separação do soro pode ser realizada após 1 hora a 37°C , sem centrifugação e com o auxílio de uma pipeta Pasteur, evitando a aspiração de hemácias ou resíduos de fibrina.

TRANSPORTE DE AMOSTRAS

Normalmente, os tempos de transporte são curtos quando o laboratório está próximo às áreas clínicas e não representam um problema.

O transporte das amostras biológicas para o laboratório pode ser realizado por meio de mensageiros ou tubos pneumáticos e mesmo pelo serviço de correios a distâncias variáveis do laboratório que processará a amostra.

O laboratório processante deve dispor de um protocolo que descreva a correta conservação e o transporte das amostras, desde o momento em que são coletadas até a recepção no laboratório.

As pessoas responsáveis pelo transporte devem seguir as instruções para preservar as características originais das amostras, o que depende do tipo de amostra, do analito e de sua concentração.

As amostras diagnósticas deveriam ser transportadas em conformidade com os regulamentos vigentes, seja pelos seus próprios meios, seja por subcontratados.

Se uma amostra externa não puder ser enviada para o laboratório dentro dos prazos recomendados, deve ser centrifugada separando o soro ou plasma das células e armazenada em condições adequadas até ser transportada para o laboratório processador.

Recomendações gerais para o transporte de amostras⁷

- Tempo: o mais rápido possível, mas depende do analito a ser examinado;
- Temperatura: deve ser assegurada a temperatura de armazenamento das amostras. Todas as amostras precisam ser transportadas à temperatura ambiente (18 a 25°C), exceto quando a amostra requer refrigeração ou congelamento. Nos casos em que é necessário transportar uma amostra congelada (-18°C), deve-se garantir a disponibilidade de congeladores. A faixa de temperatura necessária precisa ser especificada em casos específicos;
- Pressão: no caso de transporte aéreo, as amostras devem estar preparadas para suportar possíveis mudanças de pressão;
- Posição vertical: minimiza o balanceamento, evita o derramamento da amostra e facilita a formação do coágulo;
- Exposição à luz: a exposição à luz natural ou artificial afeta principalmente os seguintes analitos – bilirrubinas, vitaminas A e B₆, betacaroteno e porfirinas. **Nesses casos, recomenda-se o transporte em tubos âmbar ou cobertos com folha de alumínio;**
- Recipientes fechados: para evitar evaporação, perdas, contaminação. As agulhas sempre devem ser removidas no transporte de amostras de sangue;
- Agitação e hemólise: o manuseio e o transporte das amostras exigem cuidados para minimizar danos dos eritrócitos. Amostras hemolisadas podem causar interferência significativa;
- Analitos seriamente afetados por hemólise: DHL, AST, potássio;
- Analitos moderadamente afetados: ferro, ALT, T4;
- Analitos levemente afetados: fósforo, proteínas totais, albumina, magnésio, cálcio e fosfatase ácida.

Tubos pneumáticos

Compreendem sistemas automatizados amplamente utilizados para o envio de amostras ao laboratório.

Diferentes reportes indicam que não há qualquer alteração ao se transportar a amostra por sistemas de tubos pneumáticos para os seguintes analitos:⁵

- Albumina, fosfatase alcalina, AST, cloro, creatinina, glicose, sódio, bilirrubina, proteína total, ureia, ácido úrico, leucocitose e tempo de trombina.

Seu uso não é apropriado nas amostras que devem ser mantidas à temperatura corporal, como no caso das crioglobulinas.

Transporte a distância

Quando as amostras de sangue ou outros fluidos corporais são enviados para laboratórios distantes, uma série de normas deve ser cumprida para garantir a integridade das amostras e a segurança daqueles que transportam ou estão em contato com esses materiais.¹⁴

As amostras devem ser acondicionadas para garantir a integridade, de modo a resistir a vazamentos ou fugas, impactos ou mudanças de pressão ou outras condições que possam causar incidentes durante o transporte.

O pessoal que despacha as amostras deve assegurar que os conteúdos enviados cheguem ao local de destino de maneira adequada e sem alterações.

O registro de incidentes é importante: qualquer incidente que surja durante o transporte deve ser documentado em uma planilha e entregue no momento da chegada na recepção do laboratório.

Para o transporte de amostras biológicas, a caixa a ser transportada deve estar em conformidade com os requisitos de embalagem, rotulagem e sinalização na dependência do tipo de transporte (via terrestre ou aéreo).

Os regulamentos relativos ao transporte de amostras consistem em normas nacionais e internacionais. As amostras com substâncias infecciosas (categoria A) devem ser tratadas de modo diferente das amostras diagnosticadas com baixo risco para infecção (categoria B), como demonstrado na Figura 3.

As embalagens destinadas às amostras biológicas para fins diagnósticos devem apresentar as seguintes especificações:^{14,15}

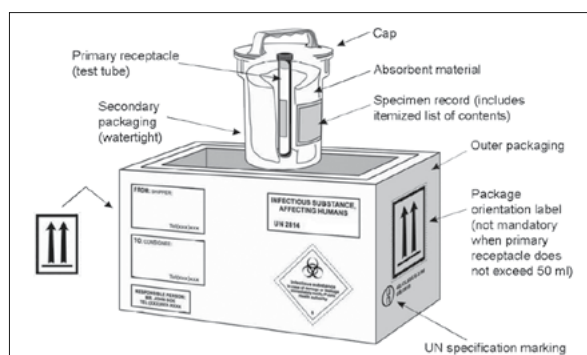
- Frasco ou recipiente interno contendo a amostra: polipropileno ou polietileno são os mais apropriados para a maioria das aplicações. O vidro não é recomendado pelo risco de quebra. Devem ser projetados para evitar derramamentos. Amostras preparadas em vidro (lâminas) precisam ser colocadas em recipientes especialmente projetados. O recipiente primário deve ser corretamente identificado;
- Material absorvente entre o recipiente interno e o secundário;
- Frasco ou recipiente secundário: deve estar completamente fechado. Caso não se utilize o recipiente terciário, este deve conter o pedido e o formulário do laboratório;



FIGURA 3 Sinalização para embalagem de substâncias infecciosas categorias B (esquerda) e A (direita)

Fonte: WHO, 2017/2018.¹⁵

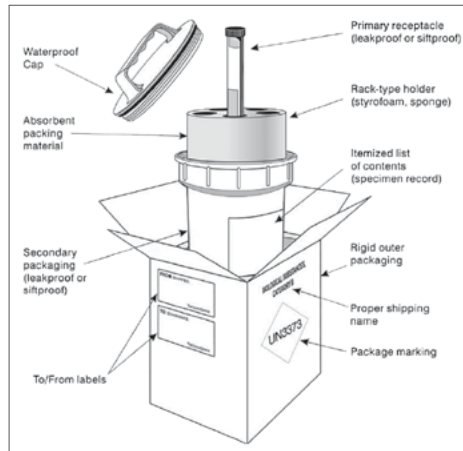
- Recipiente terciário: deve ser resistente a quebras e choques. Seu uso se dará em razão das exigências normativas de cada tipo de transporte (terrestre, aéreo etc.). Deverá ser afixada uma etiqueta com o endereço do remetente e do laboratório destinatário, bem como a frase “amostra para diagnóstico”. Sendo uma caixa, serão necessárias duas etiquetas de orientação, colocadas nos lados opostos, indicando sua posição correta;
- Um rótulo especificando a temperatura de armazenamento também é necessário, caso não seja à temperatura ambiente (Figura 4).



Embalagem Categoria A

FIGURA 4 Embalagem e rotulagem para o transporte de substâncias infecciosas categorias A e B. *(continua)*

Fonte: IATA (Montreal, Canadá), citada por WHO, 2017/2018.^{15,16}



Embalagem Categoria B

FIGURA 4 Embalagem e rotulagem para o transporte de substâncias infecciosas categorias A e B. (*continuação*)

Fonte: lata (Montreal, Canadá), citada por WHO, 2017/2018.^{15,16}

REFERÊNCIAS

1. LUNDBERG GD. How clinicians should use the diagnostic laboratory in a changing medical world. *Clinica Chimica Acta*. 1999;280(1-2):3-11.
2. ENEAS. Estudio nacional sobre los efectos adversos ligados a la hospitalización. ENEAS 2005. Informe. Febrero 2006.
3. PLEBANI M, CARRARO P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. *Clin Chem*. 1997;43(8 Pt 1):1348-51.
4. PLEBANI M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(6):750-9.
5. GUDER WG, NARAYANAN S, WISSER HT, ZAWTA B. Samples: from the patient to the laboratory. The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results. 3. ed. Darmstadt: Git Verlag GMBH; 2003.
6. BURTIS CA, ASHWOOD ER, EDS. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders; 1994.
7. NCCLS/CLSI. Procedure for the handling and processing of blood specimens; approved Guideline 3. ed. Wayne: CLSI; 2004. 24(38).
8. TANNER M, KENT N, SMITH B, FLETCHER S, LEWER M. Stability of common biochemical analytes in serum gel tubes subjected to various storage temperatures and times pre-centrifugation. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2008;45:375-9.
9. ZHANG DJ, ELSWICK RK, MILLER WG, BAILEY JL. Effect of serum-clot contact time on clinical chemistry laboratory results. *Clinical Chemistry*. 1998;44:6:1325-33.

10. CARACCILO MB, MUZIETTI SD, PANDOLFO MS, NEGRI GA, BUSTOS DN. Estabilidad de muestras conservadas en tubo primario: un estudio de 25 analitos de química clínica. *Acta Bioquim Latinoam*. 2007;41(3):353-8.
11. NCCLS/CLSI. Collection, transport and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays; Approved Guideline. 4. ed. Wayne: CLSI; 2003. 23(35).
12. HEIL W, GRUNEWALD R, AMEND M, HEINS M. Influence of time and temperature on coagulation analytes in stored plasma. *Clin Chem Lab Med*. 1998;36:459-62.
13. CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Urinalysis; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document GP16-A3. Wayne: CLSI; 2009.
14. GONZÁLEZ TR, JIMÉNEZ JJ; SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA Y PATOLOGÍA MOLECULAR (SEQC). Crioglobulinas: características y metodología de estudio. Recomendación; 2014.
15. WHO. Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances 2017-2018. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254788/WHO-WHE-CPI-2017.8-eng.pdf;jsessionid=709C7619978CED0750584B8CD16E351A?sequence=1>>. Acesso em: 21 maio 2018.
16. INTERNATIONAL AIR TRANSPORT ASSOCIATION (IATA). Packing instructions-Class6-Toxic and infectious substances. Packing instruction 650. Disponível em: <<http://www.iata.org/whatwedo/cargo/dgr/Pages/index.aspx>>. Acesso em: 11 junho 2018.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).



EASYLAB

**SEGURANÇA E
EFICIÊNCIA NOS
PROCESSOS DE SEU
LABORATÓRIO**

**O MAIS COMPLETO SISTEMA
DE GESTÃO LABORATORIAL**

ATENDIMENTO

Software totalmente intuitivo.
Cadastro de prontuário com várias formas de busca e histórico de atendimento.
Possibilidade de determinar prazos diferenciados para exames.
Impressão de etiquetas de código de barras.

FATURAMENTO

Impressão da guia TISS.
Geração de arquivo XML para o TISS.
Cadastro de convênios e planos com valores especiais e exames não cobertos.

EXAMES

Inclusão de novos exames e gráficos/figuras de resultados.

RASTREABILIDADE

Todos os processos são registrados com data/hora/computador.



+258
clientes

softeasy 

9 Interferentes em imunoenaios: aspectos históricos e evolução dos métodos

INTRODUÇÃO

Embora se trate de um importante problema no imunodiagnóstico (ID) por envolver reações antígeno-anticorpo, a interferência em imunoensaio (IE) sempre foi subestimada. Resumidamente, foi definida por Kroll e Elin (1994) como o “efeito de uma substância presente na amostra que altera o valor correto de um resultado, usualmente expresso em concentração ou atividade, para um analito”, ao que seria mais abrangente acrescentando “[...] e outros fatores que alteram [...]”¹

A história remete a 1897, quando o pesquisador austríaco Rudolf Kraus² desenvolveu a primeira reação de ID ao misturar sobrenadante de cultura bacteriana com soro de animal imunizado, observando a formação de um precipitado, dando origem, assim, às reações de precipitação. Pode-se, então, afirmar com absoluta certeza que, naquele momento, surgiram também os primeiros processos de interferência nas reações da imunologia laboratorial.

O trabalho de Sgouris³ foi um dos primeiros a comprovar 80% de resultados falso-reativos em virtude da presença de interferentes em IE para pesquisa de antígeno (Ag) de hepatite B. Desde então, a literatura laboratorial tem sido vasta quanto à abordagem da interferência no ID.

Objetivando alertar para a importância e a gravidade dos interferentes, Kricka⁴ alertou para o caso de uma paciente com septicemia por *Escherichia coli* que apresentava valores elevados para troponina I, TSH, hCG, alfafetoproteína e CA-125, sem nenhuma correlação clínica com esses resultados.

Wild, em 2001,⁵ já ressaltava os grandes avanços nos IE e a imensa sensibilidade obtida no nível subpicomolar (10^{-12}), em que, segundo ele, “um analito jogado no mar junto à sua casa na Inglaterra conseguiria ser detectado na Austrália”. Porém, no mesmo trabalho, o autor também assinala as dificuldades causadas pelas subs-

tâncias interferentes nesses conjuntos reativos com altas sensibilidades e suas repercussões na interpretação e na conduta clínica.

A capacidade de ligação do anticorpo (AC), a estrutura molecular do Ag, a matriz da amostra, a composição dos reagentes, o formato do ensaio, entre vários outros são essenciais na determinação da especificidade do IE.

Observa-se que, independentemente da concentração do analito, a interferência poderá ser analito-independente (amostra hemolisada, ictérica, lipêmica, presença de anticoagulantes, estocagem da amostra etc.) ou analito-dependente causada por interação entre componentes da amostra com um ou mais AC reagentes (AC heterofílicos, AC humanos antianticorpos de animais, autoanticorpos antianalito, fator reumatoide – FR – etc.).

Verifica-se também que a interferência poderá causar resultados falsamente elevados (interferência positiva) e falsamente diminuídos (interferência negativa) na dependência direta do(s) AC envolvido(s) e do desenho do ensaio.

Embora não haja a obrigatoriedade de ser diretamente proporcional, a magnitude da interferência geralmente depende da concentração do(s) interferente(s).

As consequências das interferências nos IEs poderão provocar graves condutas clínicas com investigações e tratamentos desnecessários.

Embora não seja objetivo deste capítulo, para o bom entendimento dos mecanismos de interferência nas reações antígeno-anticorpo (Ag-AC), é sempre importante compreender importantes tópicos relacionados à imunologia básica, laboratorial e clínica, como antígeno, anticorpo, reação Ag-AC, cinética da formação de complexo Ag-AC, constante de associação e dissociação, sensibilização de superfícies, metodologias homogêneas/heterogêneas e competitivas/não competitivas, desenhos das metodologias de IE, componentes do ensaio (soro controle, soro padrão, calibrador, tampão, enzimas, sistemas reveladores, AC e Ag reagentes, solução *stop* etc.), sistemas de leitura, automação em imunodiagnóstico, controle de qualidade, entre outros.

Considerando-se que, em capítulos posteriores, alguns mecanismos de interferência serão abordados mais detalhadamente, um dos objetivos deste é apenas fornecer resumidamente alguns aspectos e exemplos de interferências em IE, sem uma abordagem mais profunda.

NATUREZA DOS INTERFERENTES – EFEITO MATRIX

Amostras de indivíduos sadios e doentes poderão também apresentar substâncias endógenas interferentes. Cada indivíduo apresenta uma amostra com propriedades únicas. Essas substâncias poderão interferir ao interagirem em uma ou mais etapas do IE, influenciando na ligação do(s) AC e, conseqüentemente, na concentração do analito.

Anticorpos exógenos administrados em uma terapia poderão competir com os AC antianalito do ensaio, alterando a reação Ag-AC do IE.

Interferências exógenas representam aquelas causadas pela introdução de fatores ou condições externas, *in vivo* ou *in vitro*, que normalmente não estão presentes nas amostras coletadas: hemólise, lipemia, icterícia, aditivos nos tubos coletores, medicamentos, suplementos nutricionais, transporte e estocagem das amostras, entre outros.

Componentes naturais das amostras (proteínas, carboidratos, lipídeos, sais e pequenas moléculas) poderão, em conjunto, interferir nos IE, causando o chamado “efeito Matrix”.

REAÇÕES CRUZADAS

Nos IE, as reações cruzadas representam a interferência mais frequente, principalmente nas metodologias competitivas. Trata-se de uma forma de alteração inespecífica nos ensaios, causada por substâncias cujas estruturas íntegras ou catabólitos relembram as do analito, podendo apresentar epítomos iguais ou semelhantes, competindo pela ligação com o AC, resultando em uma sub ou superestimação da concentração ou detecção do analito.

Reações cruzadas com medicamentos e seus metabólitos podem representar um grave problema nos IE, como na dosagem do cortisol em indivíduos administrando fludrocortisona, fornecendo resultados falsamente elevados.

Em metodologias competitivas, determinados medicamentos ou seus metabólitos poderão interferir em ensaios para fármacos de abuso, por apresentarem estruturas químicas semelhantes.

Sabidamente, substâncias análogas à digoxina, que frequentemente surgem em quadros hepáticos, falência renal e hipertensão, apresentam reação cruzada nos IE para a quantificação desses fármacos. Essas substâncias presentes no sangue poderão ocasionar falsos resultados, quando na etapa de lavagem ou separação apresentarem coeficiente de dissociação maior que a digoxina.

Ressalta-se a importância do estudo da especificidade do IE para uma melhor compreensão das reações cruzadas.

INTERFERÊNCIAS PRÉ-ANALÍTICAS

Tubos de coleta

Vários trabalhos demonstram as interferências causadas nos IE por diversos aspectos relacionados aos tubos de coleta: vidro ou plástico; tampa de borracha; surfactantes; anticoagulantes; gel separador; e ativadores da coagulação. Tubos de plástico têm se mostrado mais convenientes para as dosagens hormonais e de medicamentos; porém, podem interferir nas dosagens de substâncias de baixo peso molecular.

Silicone e lipídios presentes em alguns tubos de coleta poderão dificultar a formação do complexo Ag-AC. Polímeros de silicone solúveis em água que revestem os tubos poderão interferir negativamente nos ensaios que utilizam o sistema biotina-avidina (p. ex., tireotropina, prolactina e hCG) e positivamente em determinados ensaios para dosagem de proteína C-reativa, com a qual se complexam.

Coleta e transporte da amostra

Um levantamento realizado por Rose e colaboradores⁶ com quase 8 milhões de coletas, entre outros aspectos técnicos, demonstrou a presença de coágulo em 64,8% das amostras, o que poderia interferir significativamente no correto volume aspirado pelas sondas dos equipamentos automatizados de IE.

Keffer⁷ demonstrou que o aumento aproximado de 5% de proteínas séricas na amostra coletada com o uso prolongado do torniquete ampliará o número de prováveis substâncias ligantes no IE, podendo resultar em uma má interpretação do resultado.

O momento da coleta é crítico para a dosagem de vários analitos, como medicações terapêuticas, cortisol, renina, aldosterona, corticotropina, entre outros.

Trabalhos têm demonstrado que, nas dosagens de alguns pequenos hormônios peptídeos (p. ex., ACTH, renina e gastrina), as amostras devem ser transportadas em gelo para evitar a desnaturação molecular e a alteração das propriedades antigênicas.

Nas dosagens de vitamina D, recomenda-se o transporte das amostras protegidas da luz para que não haja fotodegradação do analito.

No caso de amostras coletadas em locais distantes, o ideal, para os exames de IE, é que o soro ou plasma estejam congelados durante o transporte.

Recomenda-se que, na realização dos IE, as amostras (sangue total, soro ou plasma) sejam centrifugadas na dependência do tipo de tubo de coleta (vidro ou plástico/com ou sem gel separador/com ou sem anticoagulante/tipo de anticoagulante) por um tempo que poderá variar de 4 a 15 minutos e com velocidades de 1.000 a 3.000 g, separando o soro ou o plasma até 2 horas após a centrifugação, conforme orientação do *Manual de Coleta Sanguínea H18-A3* do CLSI e das *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso*.^{8,9}

Tipos de amostra

Na maioria dos IE, o soro é o material biológico de escolha, embora o plasma seja também bastante utilizado e com a vantagem de eliminar o tempo de espera para a formação do coágulo. No ato da coleta, completar com sangue até a marca do tubo para tal é fundamental, pois, desse modo, não haverá sobra de anticoagulante, a qual poderá afetar a formação dos complexos Ag-AC.

Recomenda-se sempre que os tubos destinados aos exames imunológicos sejam os primeiros a serem preenchidos, evitando-se, assim, contaminação cruzada entre os diferentes aditivos que poderão interferir nos IE (p. ex., heparina lítica, EDTA, oxalato de potássio, fluoreto de sódio). Tubos sem anticoagulante também poderão interferir nas dosagens de troponina e determinados hormônios.

Havendo necessidade de usar plasma, torna-se essencial a escolha do anticoagulante, visto que alguns deles poderão interferir na formação do complexo (p. ex., heparina), enquanto outros atuam inibindo a atividade enzimática do ensaio (p. ex., fluoretos).

Amostras hemolíticas, lipêmicas e ictericas

A maioria dos IE não é afetada por amostras hemolisadas ou ictericas. Entretanto, IE para analitos lábeis, como calcitonina, paratormônio, insulina, glucagon, gastrina e ACTH, poderão sofrer interferências em amostras hemolisadas, pela sua degradação por enzimas proteolíticas liberadas pelos eritrócitos. É importante assinalar que a hemólise na dependência do desenho de alguns ensaios poderá influenciar na geração do sinal, principalmente os IE com leitura na mesma faixa da hemoglobina, entre 340 e 560 nm (pico em 541 nm). Acrescenta-se o fato de a hemoglobina apresentar propriedades fotométricas, fluorométrica e quimioluminescente capazes de interferir no sinal do ensaio. Portanto, torna-se mais seguro evitar o uso dessas amostras.

Quanto a amostras lipêmicas, está bem definida sua contraindicação nas metodologias de turbidimetria e nefelometria. Nos ensaios tipo ELISA, amostras com altas concentrações de triglicerídeos e colesterol poderão causar resultados alterados por interferirem na ligação do antígeno com o anticorpo adsorvido. Vários autores demonstraram a grande interferência que os ácidos graxos não esterificados causam nas dosagens de tiroxina e esteróis. Recomenda-se guardar as amostras lipêmicas na geladeira por uma noite e utilizá-las no dia seguinte, objetivando amenizar as ações dos lipídios. Ultracentrifugação também poderá ser empregada para remoção do excesso de lipídios, assim como o pré-tratamento das amostras com lipase. Nunca diluir a amostra com a finalidade de remover o excesso de lipídios. Micelas lipídicas são capazes de absorver e desviar a luz do sinal do ensaio.

Soros ictericos poderão também causar alterações nos resultados de vários IE em razão da presença da bilirrubina, principalmente as metodologias que utilizam faixa de leitura próxima dela, cujo ótimo de absorção é 450 a 460 nm. A bilirrubina também apresenta propriedades fotométricas e fluorométricas capazes de interferir na leitura do ensaio, bem como nas concentrações séricas de medicações livres *versus* complexadas, alterando suas distribuições nos diferentes espaços corporais.

Estabilidade e estocagem das amostras

Embora a maioria dos analitos se mantenha estável, quando conservados nos tubos primários a 4°C, o processamento e a estocagem das amostras inadequadamente poderão interferir em suas propriedades e, conseqüentemente, nos resultados dos IE. O congelamento e o resfriamento são práticas comuns de armazenamento das amostras. No caso de analitos como gastrina, insulina, ACTH, peptídeo C e vitamina D, é essencial o transporte da amostra congelada ou estocada a -20°C.

Algumas proteínas presentes nas amostras se desnaturam, agregam ou perdem a antigenicidade após repetidos congelamentos e descongelamentos.

Amostras coletadas com EDTA se mostram mais estáveis que soro e plasma heparinizado, pela ação quelante sobre o cálcio e o magnésio. Porém, em caso de sobra de EDTA, quando da coleta de amostra não proporcional (pouca) à de quelante, este poderá interferir na atividade de enzimas, como a fosfatase alcalina empregada nos ensaios de quimioluminescência (QUIMIO), para a qual a presença do Mg⁺⁺ é essencial.

Indica-se a adição de substâncias inibidoras das proteases aos tubos de coleta para dosagens de analitos como ACTH, gastrina e glucagon, pelo fato de serem rapidamente catabolizados por essas enzimas presentes no sangue.

SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

Proteínas ligantes com hormônios

As concentrações dos hormônios podem ser modificadas por suas ligações com globulinas e, principalmente, com a albumina, encontrada em alta concentração sérica. Outras globulinas, como a globulina ligadora aos hormônios sexuais (SHBG), a globulina ligadora da tireoide e a globulina ligadora do cortisol, representam outros exemplos.

Na quantificação total de determinado hormônio, o ideal é separá-lo das substâncias endógenas ligadas, bem como prevenir a união do hormônio reativo marcado a essas substâncias. Tal separação poderá ser obtida pelo uso de solvente de extração, desnaturação dessas substâncias ligantes, adição de agentes bloqueadores ou extração por imunoafinidade.

Autoanticorpos

Alguns autores têm demonstrado a interferência de autoanticorpos na quantificação de vários analitos por IE, como prolactina, testosterona, insulina, tireoglobulina, hormônios tireoidianos nas formas livre e total, entre outros.

Observa-se que, na dependência da distribuição dos complexos autoanticorpo-analito livre *versus* conjugado, a interferência poderá ser positiva ou negativa.

Quadros clínicos de câncer de tireoide, bócio, hipertireoidismo pós-tratamento, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto e doenças autoimunes não tireoidianas podem apresentar anticorpos anti-T4 e anti-T3 que interferirão nas dosagens de T4 total, T4 livre, T3 total e T3 livre. Dependendo da metodologia utilizada, a prevalência desses anticorpos variará, podendo chegar a 10% em pacientes autoimunes. Ressalta-se a importância em observar a possível discrepância entre resultados de T4 livre e TSH na presença de tais autoanticorpos.

Pacientes com câncer de tireoide diferenciado (25%) e mesmo indivíduos saudáveis (10%) poderão apresentar anticorpos antitireoglobulina, que, por sua vez, poderão causar uma significativa interferência nas dosagens desse analito.

A presença de anticorpos antiprolactina poderá induzir a graves condutas médicas, clínicas ou cirúrgicas. Isso pelo fato de esse anticorpo estar no soro sob a forma de macroprolactina (macro-PRL), podendo-se observar uma macroprolactinemia com prolactina (PRL) normal. A macro-PRL é uma macromolécula na qual a PRL está complexada a uma IgG direcionada a determinado epítipo específico do hormônio; além disso, não apresenta atividade biológica por sua biodisponibilidade muito baixa (alto peso molecular). A literatura cita uma incidência acima de 26% de macro-PRL em todos os casos de hiperprolactinemia, na dependência da metodologia do IE utilizado. Todos os soros com hiperprolactinemia devem ser tratados por cromatografia por filtração em gel ou pré-tratamento com polietileno glicol (PEG 6000), objetivando-se pesquisar a presença de macro-PRL.

Anticorpos heterófilos

Define-se o anticorpo heterófilo (AcH) como aquele produzido em resposta a um antígeno e que reage com outro molecularmente diferente. Alguns autores chegam a afirmar que os AcH estão presentes em 30 a 40% das amostras. Esses anticorpos podem reagir com diferentes antígenos, bem como com a região variável (AC anti-idiotipo) e fragmento Fc (AC anti-isotipo) de outros anticorpos. Em geral, apresentam baixa afinidade e, conseqüentemente, fraca ligação (alto coeficiente de dissociação).

Sabe-se que o fator reumatoide (FR) representa o AcH que mais frequentemente interfere nos IE. Trata-se de anticorpos voltados contra o fragmento Fc de outros anticorpos, sendo, respectivamente, os mais frequentes IgM e IgG, podendo interferir positiva ou negativamente nas mais variadas reações quantitativas ou qualitativas.

Excesso de anticorpo não humano nos tampões do ensaio reduz a possibilidade de essas substâncias interferirem junto aos anticorpos de captura ou de detecção. Quanto aos agentes bloqueadores normalmente adicionados pelos fabricantes aos ensaios, nem sempre são capazes de evitar a interferência dos AcH, principalmente se esses forem do tipo anti-idiotipo.

Alguns trabalhos demonstram que é muito frequente a presença de AcH em trabalhadores de fazendas e *pet shops* que mantêm constante contato com animais e/ou produtos de origem animal. Recomenda-se, quando da coleta, questionar o paciente quanto ao tipo de atividade profissional que exerce.

Anticorpos humanos anti-AC animal

Imunoglobulina animal administrada em humanos geralmente para tratamentos de células-alvo em neoplasias, anticorpos marcados empregados em imagem e soroterapias poderão estimular a formação de altos títulos de anticorpos policlonais de alta afinidade anti-imunoglobulina animal (HAAA – *human anti-animal antibodies*). Os HAAA podem ser de todos os tipos: G, M, A e E.

Os HAAA competem cruzadamente com o antígeno do teste (analito) pelo anticorpo da mesma espécie constituinte do ensaio, produzindo falsos resultados.

Entre os HAAA mais comuns, são os produzidos contra o AC de camundongo (HAMA); porém, a espécie humana também pode ser estimulada por AC de cabra, coelho, cavalo, porco, rato, carneiro, entre outros.

Imunoensaios empregados no diagnóstico laboratorial ou no monitoramento terapêutico de inúmeras patologias estão sujeitos à interferência dos HAAA.

Os IE do tipo *sandwich* são os mais suscetíveis à interferência dos HAAA, que podem reagir com os AC da mesma espécie constituintes do ensaio.

Dependendo do desenho do IE qualitativo ou quantitativo, os HAAA poderão ocasionar diferentes falsos resultados.

Sistema biotina-avidina

A biotina, presente em diversos alimentos, também denominada vitaminas B₇ e B₈, H e coenzima R, responsável pelo transporte de CO₂ como cofator da enzima piruvato carboxilase, entre outras carboxilases, tem alta afinidade de ligação não covalente com a avidina; portanto, com baixo poder de dissociação. A avidina é uma glicoproteína homotetramérica derivada da clara de ovo, com a característica de conseguir se fixar a vários tipos de suportes, além de se ligar a outras substâncias da matriz sérica.

Em virtude dessa capacidade da avidina de ligação a substâncias da matriz da amostra, pesquisadores passaram a utilizar estreptavidina, derivada do *Streptomyces avidinii*, que, por apresentar menos aminoácidos básicos e resíduos de carboidratos, tem menor poder de ligação com outras substâncias séricas e, conseqüentemente, menor interferência no IE.

O complexo biotina-estreptavidina tem uma afinidade não covalente em torno de 1.000 vezes maior que os complexos Ag-AC.

Pelo fato de a avidina se ligar a superfícies e a biotina a substâncias como antígenos e anticorpos, esse complexo passou, então, a ser empregado nos IE.

Metodologias foram desenvolvidas, nas quais a estreptavidina adsorvida a uma superfície se ligará a antígenos ou anticorpos biotinilados em uma etapa do processo analítico.

O importante mecanismo de interferência se deve ao fato de a biotina ser uma substância presente em inúmeros medicamentos e produtos de consumo, como suplementos de biotina, polivitamínicos, suplementos nutricionais com foco no mercado masculino e de crianças, *shampoos*, enxaguantes bucais, barras nutritivas, linhas de cosméticos etc., levando o indivíduo a poder apresentar altas concentrações séricas de biotina.

Quando submetidas a IE que utilizam o sistema biotina-avidina, amostras desses pacientes poderão sofrer significativas interferências pelo fato de a biotina sérica em altas doses competir com o anticorpo ou antígeno-biotinilado do ensaio pelos quatro sítios de ligação da avidina e causar falsos resultados, dependendo do desenho do ensaio.

Esse tipo de interferência nos IE que empregam o sistema biotina-avidina representa, atualmente, uma das mais frequentes na área do imunodiagnóstico.

Objetivando-se evitar essa interferência metodológica, deve-se perguntar, antes da coleta, se o paciente está em uso de algum produto contendo biotina. Caso esteja, uma nova coleta deverá ser realizada após 72 horas sem o uso dessa substância, embora alguns autores sugiram menos tempo.

Torna-se necessária atenção especial aos pacientes renais que retêm grandes quantidades de biotina sérica, bem como em algumas patologias neurológicas (p. ex., esclerose múltipla), nas quais se indica a administração de altas doses desse fármaco.

Trabalhos também demonstraram a presença de anticorpos antiestreptavidina em alguns indivíduos que, ao se ligarem à estreptavidina, impedem a ligação dos anticorpos e/ou antígenos biotinilados, do mesmo modo que a biotina exógena.

Sugere-se também informar ao médico-assistente que a metodologia empregada no IE utiliza biotina-estreptavidina, bem como dos seus riscos com o uso de produtos contendo biotina pelo paciente.

Efeito Hook: alta concentração do analito

Observa-se o efeito Hook nos IE quando altas concentrações do analito saturam simultaneamente os anticorpos de captura e os de detecção. Ensaios imunométricos do tipo *sandwich* de uma etapa são os mais suscetíveis a esse tipo de interferência, provocando valores muito abaixo do correto.

Analitos com possíveis altas concentrações séricas são os mais propensos a desenvolver o efeito Hook: hCG, prolactina, hormônio do crescimento, ferritina, tireoglobulina, marcadores tumorais (PSA, CA 19-9, CA 125), entre outros.

Esse efeito poderá ser evitado por diluição da amostra, por aumento dos anticorpos reagentes ou por diminuição do volume da amostra para análise.

O ideal será sempre que o desenho do IE assegure concentrações de anticorpo de captura e de revelação suficientes para atender aos níveis do analito relativo a cada patologia.

Na prática, é comum a repetição do ensaio com várias diluições da amostra objetivando validar o resultado.

Outras substâncias

Albumina, troponina, fosfatase alcalina (FAL), variantes genéticas de analitos, marcadores tumorais, complemento, fibrinogênio, lisozima e paraproteínas são algumas das substâncias que podem interferir nos IE.

Altas concentrações de albumina podem interferir na fase analítica de formação dos complexos.

Embora, na fase inicial da lesão isquêmica do miocárdio, a troponina I sérica esteja presente sob a forma livre, logo depois observa-se que, entre suas possíveis isoformas, a mais predominante é capaz de se complexar com as troponinas C e T. Esses complexos interferirão direta e diferentemente nos IE, dependendo de seus desenhos, causando resultados mais elevados ou diminuídos.

Formas séricas inativas de hormônios, pró-hormônios (ACTH), fragmentos (PTH e ACTH), subunidades e “big” formas (prolactina e gastrina) interferem diretamente na mensuração desses analitos, visto que o ideal é a dosagem da molécula inteira ativa.

Dados demonstram que, nos IE enzimáticos que utilizam a fosfatase alcalina, as amostras que apresentam concentrações séricas dessa enzima acima de 332 UI/mL poderão ter seus resultados alterados pela participação da FAL do paciente. Nesses casos, deve-se optar por outro desenho que não utilize essa enzima.

Variante genéticas de alguns analitos dificultam significativamente a ligação com anticorpos monoclonais. Os indivíduos poderão apresentar geneticamente moléculas de alfa 1-antitripsina com diferentes pontos isoeletrônicos, o que causa uma menor afinidade na ligação Ag-AC. É possível também encontrar a haptoglobina sérica em diferentes graus de polimerização, alterando a configuração do epítipo desse analito, o que dificulta a formação do complexo com o parátipo do anticorpo. Existe uma configuração molecular de hormônio luteinizante incapaz de se ligar aos anticorpos monoclonais.

Marcadores tumorais representam um complicado grupo de analitos, pois, além de poderem apresentar um polimorfismo antigênico, os seus epítipos podem ficar

encobertos por um processo de glicosilação pelo ácido siálico, dificultando, em ambos os casos, a ligação com o anticorpo monoclonal. A curva de calibração para esses marcadores também está sujeita a interferências e será abordada posteriormente (ver “Calibradores”).

A ligação do analito ao anticorpo específico poderá ser dificultada pela presença de complemento, que tem a capacidade de se ligar ao fragmento Fc das imunoglobulinas. A ação do complemento pode ser minimizada inativando-se o soro ou adicionando-se uma substância quelante (atentar-se para o fato de que algumas enzimas empregadas nos IE necessitam de íons divalentes para sua ação catalítica, p. ex., Mg^{++} para a FAL).

Pelo fato de as imunoglobulinas e a lisozima apresentarem baixo ponto isoelétrico, observa-se que essa enzima tem a capacidade de se ligar diretamente à IgG detectora, adsorvida à fase sólida.

A paraproteína cadeia kappa de IgG é capaz de se ligar ao anticorpo anti-TSH adsorvido e impedir que o TSH se complexa a esse anticorpo, causando um falso baixo valor de TSH.

INTERFERÊNCIA PELOS REAGENTES E COMPONENTES DO ENSAIO

Água reagente

Embora, atualmente, grande parte dos ensaios forneça reativos pronto para uso, a qualidade da água reagente naqueles em que se torna necessária é fundamental para a estabilidade dos complexos Ag-AC cuja ligação é tênue, mesmo com alta especificidade, visto não se tratar de covalência, e sim de cargas elétricas envolvidas (forças hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, força de Coulomb e força de van der Waals). A condutividade da água representa um dos fatores que poderão interferir diretamente nessa estabilidade. Mesmo com a possibilidade técnica do uso de água tipo 2, recomenda-se, dentro do possível, o emprego de água tipo 1 (menor condutividade) (Tabela 1).

TABELA 1 Especificações da água reagente no momento de sua produção segundo o NCCLS

	TIPO 1	TIPO 2
Bactérias heterotróficas (UFC/mL)	< 10	< 1.000
Resistividade ($M\Omega/cm$ a 25°C)	> 10	> 1
Condutividade ($mScm$ a 25°C)	< 0,1	< 1
Silicatos (mg/L)	< 0,05	< 0,1
Carbono orgânico total (TOC) ng/g (ppb)	—	—
Partículas (micra)	< 0,22 mc	—

Estabilidade e estocagem do conjunto reagente

Vários componentes dos conjuntos reagentes são instáveis (p. ex., anticorpo e antígeno reagentes, controles, calibradores, enzima, substrato, entre outros), tornando-se essencial a correta estocagem desse material conforme orientação do fabricante, objetivando manter a sua estabilidade e o melhor desempenho analítico para que não haja interferências nos resultados obtidos.

Transporte em condições de temperaturas inadequadas agrava as condições ideais de emprego dos conjuntos reagentes, principalmente em um país continental e tropical como o Brasil.

É fundamental, quando do recebimento do conjunto reativo, exigir o certificado de fabricação para cada lote, o que permitirá a correta análise das condições dos reagentes, comparando-se principalmente a(s) leitura(s) obtida(s) no laboratório do(s) controle(s) não reativo(s) com a(s) assinalada(s) no certificado, quando da validação do lote pelo fabricante.

Cabe ressaltar que a sensibilidade de um conjunto reagente de metodologia heterogênea, entre outros importantes fatores, está também diretamente relacionada à qualidade do processo de sensibilização das superfícies.

Calibradores

Alguns autores têm demonstrado a grande dificuldade de obter, para determinados analitos (p. ex., marcadores tumorais), uma curva ideal de calibração pelo fato de as substâncias calibradoras serem obtidas em muitos casos a partir de tecido, onde comprovadamente esses analitos poderão apresentar uma conformação molecular espacial diferente da observada no ambiente sérico e, conseqüentemente, formar complexos Ag-AC com diferentes coeficientes de dissociação, que poderão causar alterações nos resultados nas metodologias heterogêneas.

Tampões reagentes

A adsorção de substâncias inespecíficas à parede do ambiente da reação poderá prejudicar significativamente o IE, levando-o a um falso resultado. Essa adsorção inadequada poderá ser evitada com o emprego de tampões com pH e força iônica corretos, adicionados com detergentes. Concentrações elevadas de detergentes poderão desnaturar proteínas e desorganizar os anticorpos analíticos adsorvidos, bem como conter peróxidos que inibem as reações Ag-AC. A presença de azidas e mercuriais nos tampões para prevenir crescimento bacteriano poderá inibir a ação da peroxidase. O uso de bloqueadores em tampões é também viável, apenas com atenção ao fato de que eles são capazes de alterar características de ligação de alguns anticorpos, principalmente os de baixa afinidade.

Substâncias endógenas que geram sinal de detecção

Algumas substâncias endógenas conseguem gerar um sinal de detecção, podendo interferir na leitura final do equipamento. Radioisótopos empregados no diagnóstico e em tratamentos podem alterar ensaios de radioimunoensaio. A metodologia DELPHIA (*time-resolved fluorescence*) sofre a ação direta de *europium* endógeno. Substâncias fluorescentes endógenas, drogas fluorescentes e fluoresceína utilizada em angiografia de retina poderão também interferir na leitura dos ensaios fluorescentes.

Inibidores e ativadores das enzimas componentes do ensaio

Substâncias que inibem ou ativam as enzimas componentes dos enzimaímuoensaios (EIA) poderão interferir significativamente em seus resultados. Autores têm citado a presença de anticorpos antiperoxidase e antifosfatase alcalina como inibidores dessas enzimas integrantes de muitos EIA. Igualmente, a azida, preservativo usado em alguns soros controles, inibe a atividade enzimática da peroxidase. Fluoreto de sódio empregado na coleta sanguínea também poderá inibir a ação de várias enzimas.

Validação dos lotes

É fundamental a validação de cada lote dos conjuntos reagentes antes de sua utilização, pois uma simples mudança de um dos seus componentes representará um novo lote e será suficiente para poder alterar a especificidade ou a sensibilidade do teste, com interferência direta sobre os resultados obtidos. Vários procedimentos de validação são sugeridos, não sendo o propósito deste capítulo discuti-los.

INTERFERÊNCIA ANALÍTICA DO EQUIPAMENTO

Carreamento

Os equipamentos específicos para IE, assim como aqueles empregados em conjunto com a química clínica, são muito suscetíveis a apresentar carreamento entre amostras.

No imunodiagnóstico automatizado, o carreamento representa um risco inerente de todo processo analítico.

Dependendo do desenho do ensaio, valores observados poderão ser super ou subestimados por lavagens inadequadas ou falhas na detecção de coágulos durante a análise.

Amostra com alta concentração do analito poderá contaminar outra a seguir, pela lavagem inadequada da probe do instrumento, elevando a concentração deste nesta segunda, o que altera o resultado obtido.

Efeito lavagem

As reações Ag-AC se constituem um processo dinâmico, seja *in vivo*, seja *in vitro*, no qual os complexos se associam e dissociam com maior ou menor facilidade em cada sentido, dependendo do grau de afinidade. Nas metodologias heterogêneas, em que Ag e/ou AC estão adsorvidos a uma superfície e com os quais os complexos são formados, as pressões de lavagens das lavadoras devem estar adequadamente reguladas para que não ocorra grande perda por dissociação desses complexos específicos formados (pressão acima do ideal) ou não se consiga eliminar os complexos inespecíficos (pressão abaixo do ideal). Esse problema se agrava quando de anticorpos de menor afinidade na amostra (p. ex., AC de primoestimulação). Nos IE heterogêneos, os complexos formados de maneira inespecífica apresentam geralmente baixa afinidade e são, em sua maioria, dissociados pelos processos de lavagens e eliminados do ensaio, ainda que outros possam se manter íntegros, ligados ao suporte.

Sondas dos equipamentos automatizados

Sondas que utilizam ondas eletromagnéticas sofrem graves interferências daquelas produzidas por outros dispositivos próximos aos equipamentos automatizados, como o celular, principalmente no momento em que ele recebe chamadas. Essa interferência poderá fazer com que a sonda não aspire a amostra ou os reagentes. Dessa maneira, é imperativo que telefones celulares nunca fiquem próximos a esses equipamentos.

As sondas que trabalham sob pressão, assim como as eletromagnéticas, podem interferir nos resultados quando microcoágulos nas amostras aspiram volumes incorretos, bem como reativos.

Independentemente do tipo de sonda utilizada, recomenda-se que, na realização dos IE, as amostras (sangue total, soro ou plasma) sejam centrifugadas conforme o tipo de tubo de coleta (vidro ou plástico/com ou sem gel separador/com ou sem anticoagulante/tipo de anticoagulante) por um tempo que poderá variar de 4 a 15 minutos e com velocidades de 1.000 a 3.000 g, separando o soro ou o plasma até 2 horas após a centrifugação, conforme orientação do *Manual de Coleta Sanguínea H18-A3* do CLSI e das *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso*.^{8,9}

INCIDÊNCIA DE INTERFERÊNCIA EM IMUNOENSAIOS

Nos IE, a prevalência de interferentes é baixa, variando significativamente de acordo com a metodologia empregada. Autores citam de 0,5 a 6% o percentual de interferências causadas por anticorpos heterófilos e HAAA. Ward e colaboradores¹⁰ identificaram 7 entre 21 mil amostras (0,03%) que apresentaram interferência pela presença de anticorpos heterófilos e HAAA.

Marks,¹¹ em um importante trabalho multicêntrico, realizado com 10 amostras de doadores com FR reativo, esclerose múltipla e lúpus, testadas em IE para 74 diferentes analitos em 66 laboratórios de 7 países, demonstrou que aproximadamente 6% dos resultados foram falsamente elevados, com grande potencial de interpretação clínica incorreta. Destes, 1,8% (n = 65) foi causado pela presença de anticorpos heterófilos, enquanto em 4,2% (n = 146) envolvendo 17 analitos não se conseguiu caracterizar a origem da interferência, visto que, nessas amostras, o agente bloqueador de anticorpos heterófilos não conseguiu alterar os resultados. Os ensaios mais afetados foram estradiol, cortisol, FSH, LH e mioglobina.

Levinson e Miller¹² assinalaram que, nos IE de duas etapas, o grau de interferência é muito baixo, na ordem de 10 para 20 mil amostras analisadas (0,005%).

TÉCNICAS PARA DIMINUIR A INTERFERÊNCIA DE ANTICORPOS NOS IMUNOENSAIOS

Na Tabela 2, conforme os trabalhos de Selby¹³ e Tate e Ward,¹⁴ estão descritos os métodos empregados para uma possível redução das interferências causadas pelos anticorpos heterólogos e HAAA, por meio de sua remoção ou seu bloqueio.

A extração do analito da amostra antes do ensaio compreende a melhor forma de remover os interferentes. Cromatografia em gel tem sido efetiva nessa remoção. O emprego de anticorpos monoclonais de rato ou proteína G imobilizada em pérolas de Sepharose tem sido muito eficiente na extração dos HAAA, assim como a precipitação com a utilização de polietileno glicol (PEG) 6000. O aquecimento (70 a 90°C) da amostra apresenta limitações pelo fato de poucos analitos serem estáveis a essas temperaturas, com desnaturação dos anticorpos e consequente comprometimento na formação dos complexos.

Uma alternativa objetivando a neutralização ou a inibição de interferentes é a adição ao ensaio de imunoglobulinas e soro em baixa concentração da mesma espécie do anticorpo reagente. Insere-se, também, um agente bloqueador no diluente do ensaio ou no pré-tratamento da amostra. Pode-se usar como agentes bloqueadores Ig policlonal, IgG polimerizada, soro não imune, anticorpo monoclonal não imune de camundongo e fragmentos de imunoglobulinas [Fc, Fab, F(ab')₂], ressaltando-se o fato de, possivelmente, serem insuficientes para prevenir a interferência, por não haver como calcular a quantidade ideal de bloqueador a ser empregada. Os diferentes graus de reatividades individuais a anticorpos animais e a síntese de anticorpos heterófilos dificultam também significativamente esse cálculo. Vários agentes bloqueadores são comercializados.

HAAA com especificidade para a porção Fc do anticorpo do ensaio poderão ser eliminados do soro com o emprego de fragmentos Fc e F(ab')₂ de imunoglobulinas

ou anticorpos quiméricos, em que o fragmento Fab dos anticorpos humanos é substituído por fragmentos semelhantes de anticorpos não humanos.

TABELA 2 Métodos para redução de interferência de anticorpos heterofílicos e anticorpos humanos antianticorpo de animal

Remoção de anticorpos interferentes
Extração do analito da amostra
Imunoextração por adição de soro animal imobilizado em pérolas de Sepharose ou proteína A
Precipitação com polietileno glicol (PEG 6000)
Aquecimento a 70 a 90°C para analitos estáveis
Adição de agente bloqueador da mesma espécie do anticorpo do ensaio
Inclusão de um ou mais agentes bloqueadores nos reativos de imunoenaios manufaturados podem ser insuficientes para superar a interferência
Soro não imune, IgG policlonal espécie-específica, IgG antianticorpo humano ou IgG de camundongo polimerizada
Anticorpos monoclonais de camundongo não imunes
Fragmentos espécie-específicos de IgG (Fc, Fab)
Reagentes bloqueadores de anticorpos heterofílicos (HBR), reagentes inibidores de imunoglobulinas (HIR) ou tubos bloqueadores de anticorpos
Novo desenho dos ensaios
Uso de fragmentos de Fab ou F(ab') ₂
Uso de anticorpos monoclonais quiméricos

Fonte: Selby, 1999; Tate e Ward, 2004.^{13,14}

DETECTAR INTERFERÊNCIA EM AMOSTRAS SUSPEITAS

Alguns procedimentos poderão ser utilizados quando se suspeita da presença de interferentes na amostra.

Além da não concordância clínico-laboratorial de um resultado, a utilização do Delta Check, em que resultados atuais são comparados com anteriores e associados à análise dos valores críticos, torna-se, em muitos casos, um instrumento fácil de realizar tal detecção.

Deve-se observar se há ou não concordância de resultados empregando outra plataforma de IE com anticorpo do teste diferente do inicial. Havendo concordância dos resultados, não se exclui a probabilidade da presença de interferentes, de

acordo com a padronização e os limites dos valores dos testes envolvidos. Marks¹¹ assinalou a importância de nem sempre ser possível considerar supostamente corretos os resultados concordantes na maioria dos métodos, conforme ocorreu com a amostra de uma mulher pós-menopausada, 72 anos, FR positiva, na qual 9 dos 11 métodos testados na quantificação de LH e FSH forneceram resultados falsamente baixos.

Quando se comparam, no mesmo ensaio, os resultados obtidos com amostra sem o uso de agente bloqueador e a tratada com esse agente antes do ensaio, poderá se observar a presença de discrepância ou não dos resultados em razão dos interferentes. A literatura assinala que discordâncias entre as amostras tratadas e não tratadas no valor de 3 a 5 SD denotam possível interferência por anticorpos heterófilos, e maior que 5 SD é indicativo da presença desses anticorpos na amostra, embora 20 a 30% das amostras com anticorpos interferentes podem fornecer resultados semelhantes após um tratamento com anticorpos bloqueadores.

Um teste simples que caracteriza aproximadamente 60% das amostras com interferente consiste em realizar diluições seriadas com o diluente do fabricante contendo imunoglobulinas não imunes e observar se a linearidade e o paralelismo se mantêm ou não nos resultados.

Quase 90% das amostras suspeitas com interferente(s) são detectadas pelo emprego dos procedimentos citados.

CONCLUSÕES

Embora tenha consequências clínicas, a interferência em imunoenaios, como já assinalado, é subestimada, compreendendo um importante problema a ser solucionado, visto ainda não existir nenhum procedimento que a elimine totalmente.

Como resolver? Soluções definitivas não existem; porém, algumas ações devem ser realizadas.

O diálogo entre o laboratório e o médico-assistente deve estar sempre presente e estimulado, objetivando evitar que intervenções clínicas desnecessárias. É preciso atualizar o médico sobre características das novas metodologias e suas limitações, bem como as discrepâncias entre a clínica e o resultado encontrado.

Devem ser desenvolvidos programas que levem maiores conhecimentos aos pacientes (p. ex., pacientes que lidam com animais) sobre as limitações dos IE, bem como encorajá-los a conversar com seus médicos-assistentes sobre o tema.

Sempre que houver discordância entre o resultado observado e a clínica do paciente, deve-se pensar em interferentes e pesquisá-los por uma ou mais técnicas já citadas anteriormente.

Caberá ao laboratório reportar ao médico-assistente que o ensaio realizado foi inconclusivo e a interferência não foi detectada, não liberando, então, o resultado e solicitando uma nova amostra.

O laboratório tem a responsabilidade de se certificar das possibilidades de interferências em seus imunoenaios e suas consequências para os pacientes, bem como de eventuais interpretações clínicas errôneas.

Aos fabricantes de conjuntos reativos, recai a responsabilidade de estabelecer orientações sobre interferentes relacionados aos seus testes e pesquisar novas substâncias causadoras de interferências, além de sempre buscar a melhora da especificidade e da sensibilidade dos imunoenaios.

REFERÊNCIAS

1. KROLL MH, ELIN RJ. Interference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem.* 1994;40:1996-2005.
2. KRAUS R. Über spezifische Reaktionen in keimfreien filtraten aus cholera, typhus and pestbouillonkulturen, erzeugt durch homologues serum. *Wien Klin Wochschr.* 1897;10:736-8.
3. SGOURIS JT. Limitations of the radioimmunoassay for hepatitis B antigen. *N Engl J Med.* 1973;288:160-1.
4. KRICKA LJ. Interferences in immunoassay – still a threat. *Clin Chem.* 2000;46(8):1037.
5. WILD D. *The immunoassay handbook.* London: Nature Publishing Group; 2001.
6. ROSE NR, HAMILTON RG, DETRICK B. *Manual of clinical laboratory immunology.* Washington: American Society of Microbiology; 1997.
7. KEFFER JH. Preanalytical considerations in thyroid function testing. *Clin Chem.* 1996;42:125-34.
8. CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). *Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests; Approved Guideline - Fourth Edition.* CLSI document H18-A4. Wayne: CLSI; 2010.
9. SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA (SBPC). *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso.* 2. ed. Barueri: Minha Editora; 2010.
10. WARD G, MCKINNON L, BADRICK T, HICKMAN PE. Heterophilic antibodies remain a problem for the immunoassay laboratory. *Am J Clin Pathol.* 1997;108:417-21.
11. MARKS V. False-positive immunoassay results: a multicenter survey of erroneous immunoassay results from assays of 74 analytes in 10 donors from 66 laboratories in seven countries. *Clin Chem.* 2002;48:2008-16.
12. LEVINSON SS, MILLER JJ. Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays. *Clin Chem Acta.* 2002;325:1-15.
13. SELBY C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 1999;36:704-21.
14. TATE J, WARD G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev.* 2004;25(2):105-20.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.
- ALGECIRAS-SCHIMNICH A, BRUNS DE, BOYD JC, BRYANT SC, LA FORTUNE KA, GREBE SK. Failure of current laboratory protocols to detect lot-to-lot reagent differences: findings and possible solutions. *Clin Chem*. 2013;59:8:1187-94.
- ARMBRUSTER DA. Sample to sample carryover: a source of analytical laboratory error and its relevance to integrated clinical chemistry/immunoassay systems. *Clin Chem Acta*. 2006;373:37-43.
- BERTH M. Rheumatoid factor interference in the determination of carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9). *Clin Chem Lab Med*. 2006;44:1137-9.
- BERTHOD C. Enormous cross-reactivity of hydrocortisone hemisuccinate in the RIANEN RIA kit for cortisol determination. *Clin Chem*. 1988;34:1358.
- BJERNER J, NUSTAD K, NORUM LE, OLSEN KH, BØRMER OP. Immunometric assay interference: incidence and prevention. *Clin Chem*. 2002;48:613-21.
- BOERMAN OC, SEGERS MF, POELS LG, KENEMANS P, THOMAS CM. Heterophilic antibodies in human sera causing falsely increased results in the CA 125 immunofluorometric assay. *Clin Chem*. 1990;36:888-91.
- BOSCATO LM. Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin Chem*. 1986;32:1491-5.
- CHANG CY. Interference caused by the contents of serum separator tubes in the Vitros CRP assay. *Ann Clin Biochem*. 2003;40:249-51.
- COLE LA, SHAHABI S, BUTLER SA, MITCHELL H, NEWLANDS ES, BEHRMAN HR, VERRILL HL. Utility of commonly used commercial human chorionic gonadotropin immunoassay in the diagnosis and management of trophoblastic diseases. *Clin Chem*. 2001;47:308-15.
- COVINSKY M, LATERZA O, PFEIFER JD, FARKAS-SZALLASI T, SCOTT MG. An IgM lambda antibody to *Escherichia coli* produces false-positive results in multiple immunometric assays. *Clin Chem*. 2000;46:1157-61.
- CROWTHER JR. *The ELISA guidebook*. Totowa: Humana Press Inc.; 2001.
- DATTA P, EJJILEMELE AA, PETERSEN JR. *Immunoassay interference*. Washington: AACC Press; 2013.
- DAVIES C. Concepts. In: Wild D. *The immunoassay handbook*. 3. ed. United Kingdom: Elsevier; 2005.
- DE SCHEPPER J, SCHIETTECATTE J, VELKENIERS B, BLUMENFELD Z, SHTEINBERG M, DEVROEY P ET AL. Clinical and biological characterization of macroprolactinemia with and without prolactin-Ig complex. *Eur J Endocrinol*. 2003;149:201-7.
- DESPRÉS N. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. *Clin Chem*. 1998;44:440-54.
- DIAMANDIS EP, CHRISTOPOULOS TK. *Immunoassay*. San Diego: Academic Press; 1996.
- EMERSON JF. Screening for interference in immunoassay. *Clin Chem*. 2003;49:1163-9.
- EVANS MJ, LIVESSEY JH, ELLIS MJ, YANDLE TG. Effect of anticoagulants and storage temperatures on stability in human whole blood. *Clin Biochem*. 2001;34:107-12.

FAHIE-WILSON MN. Macroprolactinaemia: contribution to hyperprolactinaemia in a district general hospital and evaluation of a screening test based on precipitation with polyethylene glycol. *Ann Clin Biochem.* 1997;34:252-8.

FAHIE-WILSON MN. Hyperprolactinaemia due to macroprolactins: some progress but still a problem. *Clin Endocrinol.* 2003;58:683-5.

FERNANDO SA. Studies on the hook effect in the one-step immunoassay. *J Immunol Methods.* 1992;151:46-47.

FROST SJ, HINE KR, FIRTH GB, WHEATLEY T. Falsely lowered FT4 and raised TSH concentrations in a patient with hyperthyroidism and human anti-mouse monoclonal antibodies. *Ann Clin Biochem.* 1998;35:317-20.

GLENDENNING P, MUSK AA, TARANTO M, VASIKARAN SD. Preanalytical factors in the measurement of intact parathyroid hormone with the DPC IMMULITE assay. *Clin Chem.* 2002;48:566-7.

HURSTING MJ. Drug-specific Fab therapy in drug overdose. *Arch Pathol Lab Med.* 1987;111:693-7.

ISMAIL AAA. A radical approach is needed to eliminate interference from endogenous antibodies in immunoassays. *Clin Chem.* 2005;51:25-6.

ISMAIL AAA. Interference from endogenous antibodies in automated immunoassays: what laboratorians need to know. *J Clin Pathol.* 2009;62:673-9.

ISMAIL AAA, WALKER PL, CAWOOD ML, BARTH JH. Interference in immunoassay is an underestimated problem. *Ann Clin Biochem.* 2002;39:366-73.

KAPLAN IV. When is a heterophile antibody not a heterophile antibody? When it is an antibody against a specific immunogen. *Clin Chem.* 1999;45:616-8.

KRICKA LJ. Human anti-animal antibody interference in immunological assays. *Clin Chem.* 1999;45:942-56.

KUWAHARA A, KAMADA M, IRAHARA M, NAKA O, YAMASHITA T, AONO T. Autoantibody against testosterone in a woman with hypergonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:14-6.

LEWIS JH, DUSCI L, HACKETT P, POTTER JM. Drugs of abuse: analytical and clinical perspective in the 1990s. *Clin Biochem Rev.* 1998;19:18-52.

LUZZI VI. Negative thyrotropin assay interference associated with an IgGk paraprotein. *Clin Chem.* 2003;49:709-10

MARTEL J, DESPRÉS N, AHNADI CE, LACHANCE JF, MONTICELLO JE, FINK G ET AL. Comparative multicenter study of a panel of thyroid tests using different automated immunoassay platforms and specimens at high risk of antibody interference. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38:785-93.

MASTERS AM. Investigation of sex-hormone binding globulin interference in direct radioimmunoassay for testosterone and estradiol. *Clin Chem.* 1989;35:979-84.

PIKETTY M, POLAK M, FLECHTNER I, GONZALES-BRICEÑO L, SOUBERBIELLE JC. False Biochemical diagnosis of hyperthyroidism in streptavidin-biotin-based immunoassays: the problem of biotin intake and related interferences. *Clin Chem Lab Med.* 2016:606-7.

PREISSNER CM, O'KANE DJ, SINGH RJ, MORRIS JC, GREBE SK. Phantoms in the assay tube: heterophile antibody interferences in serum thyroglobulin assay. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:3069-74.

- PRICE CP, NEWMAN DJ. Principles and practice of immunoassay. New York: Stockton Press; 1997.
- RULANDER NJ, CARDAMONE D, SENIOR M, SNYDER PJ, MASTER SR. Interference from streptavidin antibody. Arch Pathol Lab Med. 2013;137:1141-6.
- SAPIN R. Anti-insulin antibodies in insulin immunometric assays: a still possible pitfall. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1997;35:365-7.
- SCHIETTECATTE J, VAN OPDENBOSCH A, ANCKAERT E, DE SCHEPPER J, POPPE K, VELKENIERS B, SMITZ J. Immunoprecipitation for rapid detection of macroprolactin in the forma prolactin-immunoglobulin complex. Clin Chem. 2005;51:1746-8.
- SCHOEFF LE, WILLIAMS RH. Principles of laboratory instruments. St. Louis: Mosby-Year Book; 1993.
- SHEEHAN C. Clinical immunology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997.
- SLAATS EH. Interference of sex-hormone binding globulin in the “Coat-A-Count” testosterone no-extraction radioimmunoassay. Clin Chem. 1987;33:300-2.
- SMITH TP, SULIMAN AM, FAHIE-WILSON MN, MCKENNA TJ. Gross variability in the detection of prolactin in sera containing big big prolactin (macroprolactin) by commercial immunoassays. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87:5410-25.
- SPENCER CA, TAKEUCHI M, KAZAROSYAN M, WANG CC, GUTTLE RB, SINGER PA ET AL. Serum thyroglobulin autoantibodies: prevalence, influence on serum thyroglobulin measurement, and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83:1121-7.
- SYMONS RG. Interference with the laboratory assessment of thyroid function. Clin Biochem Rev. 1989;10:44-9.
- THOMAS CMG. Discordant results for coriogonadotropin: a problem caused by beta-subunit interference? Clin Chem. 1985;31:159.
- VALDES JR. Unexpected suppression of immunoassay results by cross-reactivity: now a demonstrated cause for concern. Clin Chem. 2002;48:405-6.
- VANBESIEN J, SCHIETTECATTE J, ANCKAERT E, SMITZ J, VELKENIERS B, DE SCHEPPER J. Circulating anti-prolactin auto-antibodies must be considered in the differential diagnosis of hyperprolactinaemia in adolescents. Eur J Pediatr. 2002;161:373-6.
- WEBER TH. Endogenous interference in immunoassays in clinical chemistry. A review. Scand J Clin Lab Invest. 1990;50(Suppl. 201):77-82.
- WHITE GH. Heterophilic antibody interference with CARDIAC T quantitative rapid assay. Clin Chem. 2002;48:201-3.
- WICKUS GG. Interference in the Allégro immunoassay system when blood is collected in silicone-coated tubes. Clin Chem. 1992;38:2347-8.
- WILDE C. Subject preparation, sample collection and handling. In: Wild D. The Immunoassay Handbook. 3. ed. United Kingdom: Elsevier; 2005.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

ENSAIO DE PROFICIÊNCIA

A maior cobertura de ensaios com múltiplos itens e rodadas, que simulam a realidade dos laboratórios com documentos em formato gerencial para tomada de decisão.

Também conhecido como Controle Externo da Qualidade (CEQ), é eficaz para determinação do desempenho analítico do laboratório e requisito necessário para os processos de creditações laboratoriais e órgãos regulamentadores. Além de uma forma de garantir e demonstrar a confiabilidade dos resultados gerados pelo laboratório, conduzindo à melhoria contínua.

A Controllab é acreditada Cgcre/INMETRO como provedor de ensaio de proficiência conforme a ABNT NBR ISO/IEC 17043 (PEP003), o que garante a qualidade dos serviços e competência no desenvolvimento e operação de programas de Ensaios de Proficiência.

CONHEÇA AS ÁREAS DISPONÍVEIS

- ✓ Análises Clínicas
- ✓ Hemoterapia
- ✓ Anatomia Patológica
- ✓ Citopatologia
- ✓ Drogas de Abuso
- ✓ Toxicologia Ocupacional
- ✓ *Point of Care* (POCT)
- ✓ Leite Humano
- ✓ Veterinária
- ✓ Alimentos
- ✓ Medicamentos
- ✓ Genética e Biologia Molecular
- ✓ Citometria Fluxo
- ✓ Análise de Água
- ✓ Histocompatibilidade



Mais de 2000 ensaios disponíveis para o Controle de Qualidade. Essa diversidade de exames visa suprir as demandas dos laboratórios e crescente inovação tecnológica dos segmentos.

SOLUÇÕES COMPLETAS PARA
CONTROLE DE QUALIDADE
vide página 48

Serviços disponíveis para múltiplos segmentos. Consulte o catálogo online em www.controllab.com

Controllab
Lado a lado com você

controllab.com | +55 21 3891 9900 | contato@controllab.com

facebook.com/controllab | plus.google.com/controllab | instagram.com/_controllab

Interferência da Biotina nos Testes

Reconhecer o potencial é minimizar o risco



A existência de interferentes em imunoensaios não é novidade. Entender o potencial de interferência de uma substância e tomar medidas como seguir as instruções da bula, promover educação médica e comunicação com o paciente ajudam a minimizar os riscos.

1. No caso da biotina, a dose é importante:



30-60 mcg

Um multivitamínico típico contém menos que 100 mcg de Biotina

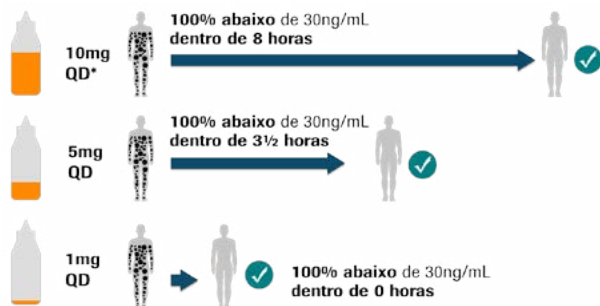
Ingestão normal de biotina como parte de um multivitamínico diário **não oferece risco de interferência**

5000 mcg

Altíssimas doses de Biotina são >5.000 mcg por dia. Essas doses têm potencial de interferir no teste

5.000 mcg de Biotina = 100 cápsulas de um multivitamínico típico por dia

2. Impacto do consumo da biotina nos ensaios Roche:



O estudo farmacocinético da Roche comprovou que dentro de 8 horas, 100% dos pacientes estavam com os níveis plasmáticos de biotina abaixo da faixa de interferência nos testes.¹

©2018 Roche - Junho/2018 - ARDL1300
Roche Diagnóstica Brasil Ltda
São Paulo - SP 05321-010 - Brasil
www.roche.com.br



FINANCIALLAB

SOLUÇÃO EM
GESTÃO **FINANCEIRA**
E ESTOQUE

**AGILIDADE, RASTREABILIDADE,
PERFORMANCE E SEGURANÇA PARA
GESTÃO FINANCEIRA LABORATORIAL**

- Controle financeiro: emissão de boletos, relatórios por centro de custo e plano de contas.
- Informativos gráficos e relatórios.
- Integração com o sistema Easylab.
- Controle de estoque: solicitação do material.
- Cadastro de funcionários.
- Pannel de aviso: contas a pagar e receber.



**+2,5 mil
operadores**

softeasy 

10 Interferência da biotina nos imunoenaios

BIOTINA

Também denominada B₇ ou H, a biotina é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B.¹⁻³ Apresenta molécula pequena (244,31 Da) e fórmula C₁₀H₁₆N₂O₃S (Figura 1). Atua como importante cofator ou coenzima de 5 carboxilases no organismo: acetilcoenzima A (CoA) carboxilase 1 e 2; propionil-CoA carboxilase; 3-metilcrotonil-CoA carboxilase; e piruvato carboxilase. A biotina liga-se às apocarboxilases pela ação da holocarboxilase sintetase, convertendo-as em holocarboxilases, que, por sua vez, promovem a transferência de CO₂ e a incorporação de bicarbonato a ácidos orgânicos. As carboxilases participam da síntese e da oxidação de ácidos graxos, do metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina, valina, metionina, treonina), da cadeia lateral do colesterol e dos ácidos graxos de cadeia ímpar e da regulação da gliconeogênese. Estudos mais recentes sugerem que a biotina também se liga às histonas, contribuindo para a estabilidade da cromatina e auxiliando na sinalização intracelular e regulação epigenética.

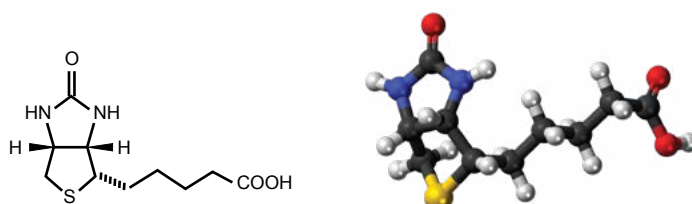


FIGURA 1 Estrutura química da biotina.

Fonte: <<https://commons.wikimedia.org/wiki/User:Jynto>>.

A biotina está amplamente distribuída nos alimentos, sendo encontrada em maiores quantidades na gema de ovo, no fígado, em alguns vegetais e no leite de vaca.^{2,3} Segundo o Institute of Medicine e o Food and Nutrition Board of the National Research Council (Estados Unidos), a ingestão adequada de biotina é de 5 mcg/dia em recém-nascidos, aumentando gradativamente até 25 mcg/dia aos 18 anos. Em adultos, essa ingestão é de 30 mcg/dia em homens, gestantes e não gestantes e de 35 mcg/dia em lactantes. A ingestão dietética em países ocidentais varia de 30 a 75 mcg/dia (143 a 287 nmol/dia).

Nos alimentos, a biotina encontra-se ligada a proteínas por meio de interações covalentes entre o grupo carboxil da biotina e o grupo ϵ -amino da lisina.¹⁻³ A biotina é liberada no tubo digestivo pela ação de proteases e peptidases gastrointestinais e da biotinidase (necessária para quebrar a ligação entre biotina e lisina) presentes em secreções pancreáticas e intestinais, sendo, então, absorvida pela membrana de borda em escova do intestino delgado pelo transportador multivitamínico dependente de sódio. Em situações de excesso de biotina, ocorre também difusão passiva pela membrana intestinal, de modo que praticamente toda a vitamina ingerida é absorvida e se torna biodisponível. Outra fonte de biotina advém da degradação de carboxilases endógenas biotiniladas pela ação da biotinidase, promovendo a reciclagem da biotina no organismo. No sangue, a biotina circula sob a forma livre (81%) ou ligada à biotinidase ou a outras proteínas plasmáticas. Acumula-se principalmente no fígado e é excretada predominantemente pelos rins como molécula intacta (> 50%) ou metabólitos, sendo os principais a bisnorbiotina e a biotina-sulfóxido.

O estado nutricional da biotina pode ser avaliado pela medida urinária direta da biotina e seus metabólitos (teste mais sensível que a determinação sérica) e por métodos indiretos.¹⁻³ Os ensaios para dosagem de biotina incluem: (i) ensaios microbiológicos, que se baseiam no crescimento de microrganismos em resposta à biotina e/ou aos metabólitos; (ii) ensaios de ligação com avidina/estreptavidina, que se baseiam ou na competição entre a biotina da amostra e a biotina radioativa pela ligação à avidina/estreptavidina ou então na ligação da biotina da amostra com um conjugado estreptavidina-rutênio (ensaio eletroquimioluminescente de pesquisa desenvolvido pela Roche Diagnóstica);⁴ (iii) ensaios espectrofotométricos, que se baseiam na absorvância de luz a 500 nm após reação da avidina com ácido 4'-hidroxiazobenzeno-2-carboxílico na presença ou ausência da biotina; (iv) cromatografia líquida (C18) seguida de espectrometria de massas (*electrospray* em modo positivo) (LC-MS/MS), permitindo quantificar separadamente a biotina e seus metabólitos.⁵ Os níveis de biotina também podem ser avaliados por métodos indiretos: (i) medida da atividade das carboxilases dependentes de biotina em linfócitos incubados com e sem biotina; (ii) dosagem urinária do ácido 3-hidroxicinvalérico, que aumenta quando o catabolismo da leucina diminui em decorrência da menor atividade da

3-metilcrotonil-CoA carboxilase; (iii) medida do lactato, que se acumula na deficiência grave de biotina pela menor atividade da piruvato carboxilase.

Em indivíduos normais, as concentrações séricas/plasmáticas de biotina são baixas, variando desde < 0,1 até 0,8 ng/mL.^{1,2,4,6} Após a ingestão oral da biotina, níveis de pico são detectados em 1 a 2 horas; o ritmo de decaimento é variável, sendo calculado em 1,8 hora após doses de 0,6 a 0,9 mg ou 7,8 a 18,8 horas após 100 a 300 mg. Durante o uso crônico de biotina, o estado de equilíbrio é atingido após 3 dias, não havendo acúmulo no sangue. Os níveis sanguíneos atingidos após diferentes doses de biotina são: $8,5 \pm 1,9$ ng/mL (média \pm DP) após 1 mg; 41 ng/mL (mediana, com intervalo de 10 a 73) após 5 mg; 91 ng/mL (mediana, com intervalo de 53 a 141) após 10 mg; 184 ng/mL (mediana, com intervalo de 80 a 355) após 20 mg; $494,9 \pm 161,0$ ng/mL (média \pm DP) após 100 mg; $823,8 \pm 303,1$ ng/mL (média \pm DP) após 300 mg.⁵⁻⁷

A deficiência clássica da biotina foi descrita em pacientes com mutações congênitas no gene da biotinidase ou holocarboxilase sintetase, defeito congênito no sistema transportador intestinal da biotina, desnutrição grave ou ingestão de grandes quantidades de clara de ovo cru (em razão da ligação da avidina do ovo à biotina). Deficiências mais leves podem ocorrer em gestantes e lactantes (pelo maior catabolismo da biotina) e em pacientes recebendo nutrição parenteral ou tomando anticonvulsivantes (principalmente primidona e carbamazepina) ou ácido lipoico.¹⁻³ As manifestações clássicas de deficiência incluem dermatite periorifical, conjuntivite, alopecia (cabelos mais finos e descolorados), ataxia, hipotonia, cetoacidose láctica/acidúria orgânica, infecções cutâneas, convulsões e retardo do desenvolvimento neuropsicomotor em crianças.

O tratamento com biotina está indicado na deficiência da biotinidase, na deficiência da holocarboxilase sintetase ou do transportador da biotina (5 a 20 mg/dia), na doença de gânglios da base responsiva a biotina-tiamina, na acidemia propiônica e em alguns distúrbios do metabolismo energético mitocondrial (5 a 10 mg/kg/dia). A biotina também tem sido administrada a pacientes com esclerose múltipla progressiva (100 a 300 mg/dia, ou seja, 2.000 a 6.000 vezes maior que a ingestão dietética habitual), doenças desmielinizantes, síndrome de má-absorção e naqueles submetidos à hemodiálise ou nutrição parenteral.⁶⁻⁸ Mesmo em altas doses, a biotina é bem tolerada, existindo apenas dois relatos de potenciais efeitos tóxicos (diarreia transitória e derrame pleuropericárdico eosinofílico).⁶ O principal uso da biotina, no entanto, está em suas indicações não médicas, já que essa vitamina tem sido cada vez mais utilizada por leigos para queda de cabelos, fortalecimento de unhas e ganho de energia. Nos Estados Unidos, estima-se que 15 a 20% da população consuma suplementos dietéticos contendo biotina. Em farmácias, essa vitamina está disponível em comprimidos de 0,6 até 100 mg, sendo comercializada sem prescrição médica.⁹

SISTEMA BIOTINA-(ESTREPT)AVIDINA

É utilizado em mais de 50% dos imunoenaios atuais para fixar na fase sólida imunocomplexos formados pela reação antígeno-anticorpo, promovendo a separação entre reagentes livres e ligados.¹⁰ Por se tratar de uma molécula pequena, a biotina pode ser acoplada por meio de ligações covalentes a proteínas, polipeptídeos e antígenos de baixo peso molecular, sem alterar significativamente suas propriedades biológicas, enzimáticas ou imunorreativas. O segundo componente do sistema, a (estrept)avidina, é constituído por duas proteínas: a avidina, uma glicoproteína básica (pI 10) com 67 kDa, presente na clara do ovo; e a estreptavidina, uma proteína com 66 kDa, desprovida de carboidratos e discretamente ácida (pI 5-6), produzida pelo *Streptomyces avidinii*. Ambas apresentam quatro sítios de ligação, interagindo com a biotina por meio de ligações não covalentes de alta especificidade e afinidade. A constante de associação dessa reação é muito elevada, ao redor de 10^{15} L.mol⁻¹, ou seja, 10^3 a 10^6 maior que a de uma ligação antígeno-anticorpo, sendo considerada a mais forte ligação não covalente entre uma proteína e seu ligante. Por isso, uma vez formado, o complexo não é afetado por alterações de pH, interferentes ou lavagens sucessivas do tubo de reação. Como a avidina tem maior índice de reações não específicas em razão de seu alto pI e da presença de carboidratos na molécula, ela foi substituída pela estreptavidina na maioria dos imunoenaios.

Na estratégia mais frequentemente empregada em imunoenaios, a estreptavidina é fixada na fase sólida (em geral, micropartículas paramagnéticas ou suporte plástico) durante a confecção do *kit* pelo fabricante.⁹ Nesse caso, antígenos ou anticorpos biotinizados reagem com a amostra e o traçador no momento do ensaio, formando imunocomplexos que se fixam na fase sólida pela interação biotina-estreptavidina. Outra estratégia menos utilizada consiste em se acoplar, durante a fabricação do *kit*, tanto a estreptavidina à fase sólida quanto o antígeno/anticorpo biotinizado à estreptavidina, de modo que a interação biotina-estreptavidina ocorra antes da incubação com a amostra. Na primeira estratégia (mais comum), substâncias presentes na amostra, como a biotina exógena, podem inibir a fixação dos imunocomplexos na fase sólida, ao passo que, na segunda estratégia, essa interferência não acontece. Existem também raros ensaios em que a estreptavidina é substituída por anticorpos antibiotina, sendo suscetíveis ao mesmo tipo de interferência da biotina exógena, dependendo do formato do ensaio.

INTERFERÊNCIA DA BIOTINA EM IMUNOENSAIOS

A biotina exógena pode interferir nos imunoenaios que utilizam o sistema biotina-estreptavidina, por inibir a fixação de imunocomplexos biotinizados à fase sólida.^{9,11} Esses complexos permanecem livres e são eventualmente eliminados no processo de lavagem do tubo de reação, necessário para separar reagentes livres

dos ligados em ensaios heterogêneos. Com isso, uma parte do antígeno ou anticorpo conjugado ao traçador é perdida, com consequente diminuição do sinal gerado no final da reação.

A Figura 2A ilustra a interferência da biotina exógena em ensaios competitivos, como o do estradiol. No tubo de reação revestido com estreptavidina, são pipetados a amostra, o análogo do estradiol conjugado ao traçador e o anticorpo anti-estradiol biotinizado. Durante a incubação desses reagentes, o estradiol da amostra compete com o traçador pelos mesmos sítios de ligação do anticorpo; assim, quanto maior a concentração do estradiol da amostra, maior sua ligação ao anticorpo e, consequentemente, menor a ligação do traçador. Os imunocomplexos formados ligam-se, então, à fase sólida pela interação biotina-estreptavidina; entretanto, na presença de biotina exógena em excesso, essas moléculas ocupam os sítios de ligação da estreptavidina, inibindo a fixação dos imunocomplexos biotinizados. Durante a lavagem do tubo de reação, os imunocomplexos livres são eliminados, ocasionando um menor sinal gerado. Como em ensaios competitivos o sinal gerado é inversamente proporcional à concentração do analito, o menor sinal resulta em um valor falsamente aumentado de estradiol.

A Figura 2B mostra como a biotina exógena interfere em ensaios imunométricos, como o do TSH. No tubo de reação revestido com estreptavidina, são pipetados a amostra, o anticorpo anti-TSH biotinizado (captura) e o anticorpo anti-TSH conjugado ao traçador (sinal). Durante a incubação desses reagentes, forma-se o complexo sanduíche, constituído pelo TSH da amostra ligado aos anticorpos de captura e sinal por meio de diferentes epítomos; quanto maior a concentração do TSH, maior a formação dos complexos sanduíche. A presença de biotina exógena em excesso inibe a fixação dos complexos sanduíche biotinizados à estreptavidina; estes são eliminados durante a lavagem do tubo de reação, resultando em um menor sinal gerado. Como em ensaios imunométricos o sinal gerado é diretamente proporcional à concentração do analito, o menor sinal leva a um valor falsamente diminuído de TSH.

Qualquer imunoenensaio que utilize o sistema biotina-estreptavidina, independentemente do fabricante, está sujeito à interferência da biotina, dependendo da dose ingerida e do formato e da suscetibilidade do método.^{9,11} Na maioria dos ensaios, a interferência ocorre porque o antígeno/anticorpo biotinizado é incubado com a amostra no tubo de reação contendo a estreptavidina. Em ensaios em que o reagente biotinizado é incubado com a estreptavidina antes da adição da amostra, essa interferência não acontece.

O potencial de interferência da biotina é grande, já que os imunoenaios têm sido amplamente utilizados nos laboratórios clínicos para dosar uma série de analitos, como hormônios, marcadores cardíacos ou tumorais, biomarcadores

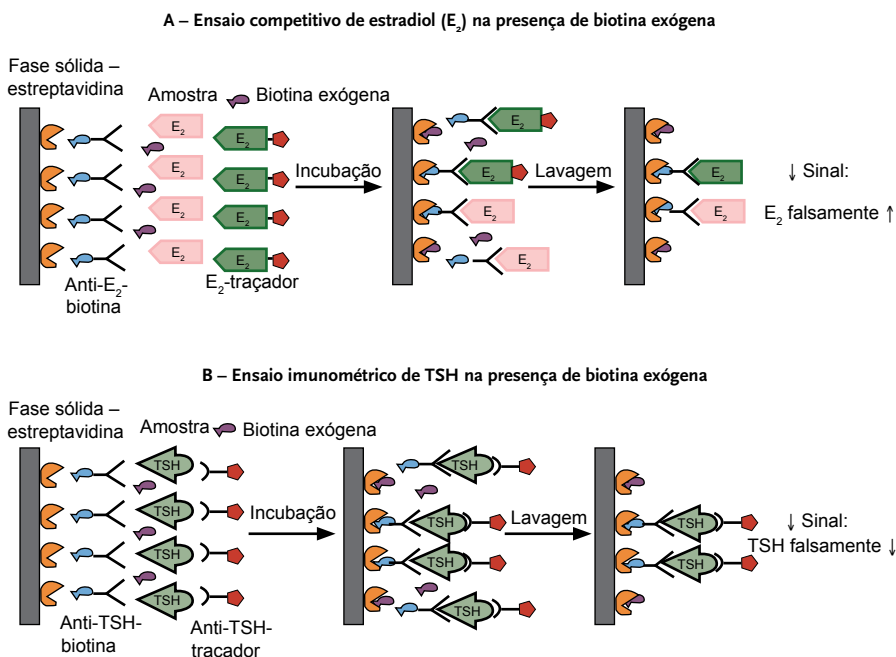


FIGURA 2 Esquema da interferência da biotina em ensaios competitivos (A, ensaio de estradiol) e imunométricos (B, ensaio de TSH).

Fonte: elaborada pelo autor.

de anemia ou doenças autoimunes, imunossupressores e, também, sorologia de doenças infecciosas.^{9,11,12} Por isso, fabricantes de *kits* devem testar e relatar, na bula do ensaio, o limiar de interferência do método, ou seja, o nível de biotina que, se ultrapassado na amostra, pode promover um resultado falsamente alterado (geralmente definido como uma diferença maior que $\pm 10\%$ do valor real). Em junho de 2016, Holmes et al. revisaram as bulas de 374 *kits* das oito plataformas mais populares nos Estados Unidos; 221 ensaios utilizavam o sistema biotina-estreptavidina, mas 15 não relatavam a biotina como um possível interferente e/ou não disponibilizavam o limiar de interferência do método em suas bulas.¹³ Nos outros 206 ensaios, 82 apresentavam limiar < 51 ng/mL, níveis que podem ser encontrados em indivíduos da população geral tomando biotina 5 a 10 mg/dia. Segundo os autores, esses 82 ensaios apresentavam alto risco de interferência da biotina, incluindo 44 de 66 ensaios Roche, 28/30 ensaios Ortho, 6/15 ensaios Beckman-Coulter, 7/23 ensaios Centaur/Siemens, 6/60 ensaios Immulite/Siemens e 6/23 ensaios Dimension Vista/Siemens. Apenas 4/47 ensaios Abbott (nenhum considerado de alto risco) e nenhum dos 36 ensaios Liaison XL (Diasorin) empregavam o sistema biotina-estreptavidina.

Vários trabalhos avaliaram a suscetibilidade dos imunoenaios à biotina, testando amostras de soro às quais foram adicionados padrões com concentrações crescentes de biotina.¹⁴⁻¹⁷ No estudo mais completo desse tipo,¹⁴ Trambas e colaboradores avaliaram 32 ensaios Roche (13 competitivos e 19 imunométricos). Em curvas dose-resposta, níveis crescentes de biotina (4 a 1.000 ng/mL) induziram valores progressivamente maiores ou menores em todos os ensaios competitivos ou imunométricos, respectivamente. Houve, no entanto, uma grande variação entre os ensaios, tanto na concentração de biotina necessária para provocar interferência quanto no efeito máximo observado. Em concentrações de biotina, frequentemente encontradas em indivíduos tomando 5 a 10 mg/dia (15,6 e 31,3 ng/mL, inferida pelos autores com base em estudos anteriores de farmacocinética), os pesquisadores encontraram interferência mínima (< 5%) na maioria dos ensaios. Entretanto, nos ensaios dos anticorpos antirreceptor de TSH (TRAb), antiperoxidase (TPO) e antitireoglobulina, houve bias positivo de 80 e 600%, 60 e 100% e 10 e 50% em amostras com níveis de biotina de 15,6 e 31,3 ng/mL, respectivamente; nas mesmas concentrações de biotina, os ensaios de TSH e troponina T apresentaram bias negativo de 10 e 25% ou 10 e 20%, respectivamente. Em níveis de biotina de 500 ng/mL (comumente observados em pacientes tomando biotina 100 mg), todos os ensaios apresentaram bias maior que 90%, com exceção do CA19-9 e CA15-3 (bias negativo de 40 e 25%, respectivamente); os ensaios mais afetados foram a digoxina e os três anticorpos antitireoidianos, com resultados falsamente aumentados 15 a 50 vezes. Em ensaios competitivos, o bias positivo também foi influenciado pela concentração do analito, sendo a interferência da biotina mais acentuada em amostras com níveis mais baixos do analito.

Dois trabalhos com formato semelhante ao anterior, porém mais limitados, avaliaram os efeitos da biotina em outras plataformas. Interferências analíticas foram detectadas nos ensaios Vitros (Ortho) em amostras com níveis de biotina a partir de 5 ng/mL (troponina I, FSH e prolactina), 12,5 ng/mL (TSH, LH e β hCG), 25 ng/mL (progesterona e estradiol) ou 50 ng/mL (testosterona, ferritina e CEA).¹⁶ Na plataforma Dimension Vista (Siemens), observaram-se interferências em amostras com concentrações de biotina a partir de 300 ng/mL (troponina I e T_3 livre) ou 400 ng/mL (digoxina, NT-pro-BNP, T_4 livre, TSH, progesterona e estradiol); entretanto, não houve alterações nos ensaios de β hCG, LH, ferritina, mioglobina, CA15-3, CA19-9, PSA total e livre, mesmo em concentrações de biotina até 1.000 ng/mL.¹⁷ Portanto, em comparação aos ensaios Roche, os da Ortho parecem mais suscetíveis e os do Dimension Vista/Siemens menos suscetíveis à interferência da biotina.

Vários estudos em voluntários normais avaliaram o perfil das alterações hormonais após ingestão de biotina. Em dois deles, a interferência máxima ocorreu em 2 a 3 horas após dose única de 10 ou 30 mg; os efeitos sobre o TSH, T_4 livre e T_3

desapareceram em 24 horas após a ingestão de 10 mg, ao passo que, no voluntário que tomou 30 mg, persistiram por até 5 horas nos ensaios de DHEAS, estradiol, testosterona e ferritina e por até 25 horas no caso do T_4/T_3 livre e tireoglobulina.^{18,19} No estudo mais completo em voluntários normais, seis adultos tomaram biotina 10 mg/dia durante 7 dias; 11 analitos foram medidos em quatro plataformas diferentes e os resultados basais comparados aos obtidos no 7º dia (2 horas após ingestão da biotina) e 14º dia (7 dias após a suspensão da biotina).²⁰ Resultados falsamente aumentados foram detectados nos ensaios competitivos de T_4 livre, T_3 livre, T_3 total e 25-hidroxivitamina D do Cobas e602 (Roche) e no T_3 livre do Dimension Vista (Siemens). Por outro lado, valores falsamente diminuídos foram observados nos ensaios imunométricos de TSH do Cobas e602 (Roche) e no TSH, PTH e NT-pro-BNP do Vitros (Ortho). Nenhum dos outros ensaios avaliados (T_4 total, prolactina, ferritina e PSA de diferentes fabricantes) apresentou qualquer alteração. Cabe salientar que, na maioria dos estudos descritos, a biotina foi administrada a indivíduos normais, presumidamente com função renal preservada, em dose única ou em curtos períodos de até 7 dias. Conforme demonstrado por Piketty e colaboradores,⁵ pacientes tomando 300 mg/dia durante meses apresentaram níveis mais baixos de biotina e mais elevados dos metabólitos bisnorbiotina e biotina-sulfóxido que indivíduos-controle após ingestão de 300 mg em dose única. Esses metabólitos ligam-se à estreptavidina com menor afinidade que a biotina; por isso, sua interferência analítica é provavelmente menor. Também é possível que pacientes em uso crônico de biotina desenvolvam compostos endógenos biotinilados, que, em teoria, poderiam prolongar a interferência analítica da biotina. Portanto, o tipo de administração (aguda ou crônica), o tempo de coleta após ingestão e, provavelmente, a função renal são fatores determinantes dos níveis séricos de biotina e, conseqüentemente, da interferência provocada nos imunoensaios.

IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

De modo geral, as quantidades de biotina presentes na dieta normal (35 a 70 mcg/dia) e na maior parte dos polivitamínicos (30 a 60 mcg/comprimido) não interferem nos imunoensaios.⁹ Apenas doses supra-fisiológicas ≥ 1 mg parecem provocar alterações laboratoriais, conforme descrito em diversos relatos de caso e duas séries recém-publicadas com pacientes de várias idades, incluindo recém-nascidos até adultos de 74 anos (Tabela 1). A maioria estava tomando biotina em altas doses para tratamento de doenças metabólicas hereditárias (2 a 15 mg/kg/dia ou 10 a 40 mg/dia), adrenoleucodistrofia ou esclerose múltipla (300 mg/dia).^{5,19,21-28} Em apenas dois trabalhos, a interferência da biotina foi detectada em pacientes tomando 10 mg/dia, dose comumente utilizada por leigos para queda de cabelos/fortaleci-

mento de unhas, estendendo o risco dessa interferência para a população geral.^{29,30} A maioria dos pacientes apresentava alterações laboratoriais típicas de hipertireoidismo, com TSH diminuído ou suprimido e T₄ e/ou T₃ livre e/ou total aumentado, sem quadro clínico franco de tireotoxicose;^{5,22-28} em 10 casos, o TRAb também era positivo e elevado.^{23-25,29,30} As exceções a esse perfil laboratorial incluíam três pacientes em uma série de nove adultos com esclerose múltipla; dois tinham testes tireoidianos todos normais e em um paciente apenas o TSH estava diminuído, provavelmente porque as amostras foram coletadas muito tempo depois (11 a 13 horas) da última dose de biotina.

TABELA 1 Condições clínicas simuladas pela biotina relatadas na literatura

Condição clínica	Alterações laboratoriais	Biotina	Ensaio	Referências
Hipertireoidismo (autoimune)	TSH ↓	10 mg 100 mg 300 mg 2-15 mg/kg	Roche	5 22-30
	T ₄ /T ₃ livre ou total ↑		Ortho	
	TRAb ↑		Beckman-Coulter	
	Tireoglobulina ↓		Boehringer	
			Mannheim	
Tumor ovariano secretor de estrógeno	E2 ↑ FSH/LH ↓	10 mg	Ortho	29
Intoxicação por vitamina D	25OHD ↑ PTH ↓	300 mg	Roche	5
Doença óssea adinâmica na insuficiência renal crônica	PTH ↓↓ + Ca ↑	1,5 mg	Roche	31, 32
		10 mg	Siemens/Centaur	
Hipoparatiroidismo pós-paratiroidectomia	PTH ↓↓ + Ca nl	5 mg	Roche Siemens/Centaur	32

Em outros dois relatos, duas crianças apresentavam testes inconsistentes, com TSH normal e T₄ e/ou T₃ livre aumentados ou TSH diminuído ou suprimido e T₄ e/ou T₃ livre normais; porém, as dosagens normais foram obtidas em ensaios que não utilizavam o sistema biotina-estreptavidina.^{19,21} Portanto, a biotina pode simular perfeitamente o quadro laboratorial de hipertireoidismo autoimune (doença de Basedow-Graves), inclusive alguns pacientes foram submetidos a exames subsequentes desnecessários, como ultrassonografia e captação/cintilografia

da tireoide com iodo radioativo, ou encaminhados para tratamento equivocado com medicações antitireoidianas, tireoidectomia ou radioiodoterapia. A interferência foi detectada em ensaios de diferentes fabricantes, incluindo a antiga Boehringer Mannheim, Roche, Ortho e Beckman Coulter. Resultados falsamente diminuídos de tireoglobulina e anticorpos antitireoglobulina também foram relatados em dois pacientes, o que, em teoria, poderia gerar problemas em pacientes tireoidectomizados por câncer de tireoide, sendo monitorados com medidas seriadas de tireoglobulina.^{19,23} Em todos os pacientes, as dosagens laboratoriais se normalizaram após a suspensão da biotina ou repetição das dosagens em ensaios que não utilizam o sistema biotina-estreptavidina.

Outras alterações induzidas pela biotina incluem estradiol elevado associado a FSH e LH baixos em uma mulher na pós-menopausa tomando biotina 10 mg/dia, sugestivos de tumor ovariano secretor de estrógeno.²⁹ Vários pacientes em uso de biotina 300 mg/dia apresentaram também 25-hidroxivitamina D aumentada associada a PTH baixo, sugestivos de intoxicação por vitamina D.⁵ Duas mulheres com insuficiência renal crônica e hipercalcemia, em uso de biotina 1,5 e 10 mg/dia e com provável clareamento renal diminuído desse suplemento, apresentaram PTH falsamente baixo, levando ao diagnóstico incorreto de doença óssea adinâmica.^{31,32} Em outra paciente com hiperparatireoidismo primário submetida a paratireoidectomia subtotal, em uso de biotina 5 mg/dia, níveis séricos falsamente suprimidos de PTH indicaram incorretamente o diagnóstico de hipoparatiroidismo pós-cirúrgico.³² Um caso de morte foi relatado pelo Food and Drug Administration (Estados Unidos) no final de 2017, em um paciente com infarto agudo do miocárdio com troponina falsamente baixa (<www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm586641.htm>). Outras alterações detectadas principalmente em pacientes em uso de biotina 300 mg/dia, mas também com doses de 10 mg, incluem peptídeo C, ferritina e PSA falsamente diminuídos e progesterona, testosterona, cortisol, de-hidroepiandrosterona-sulfato, ácido fólico e vitamina B₁₂ falsamente aumentados.^{5,24,29,33}

ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAR A INTERFERÊNCIA ANALÍTICA DA BIOTINA

Medidas simples que podem ser adotadas pelos laboratórios clínicos para minimizar a interferência da biotina incluem:

- Inserir informações sobre a biotina nas instruções de preparo dos exames suscetíveis a esse interferente e questionar pacientes especificamente sobre o uso da biotina na recepção do laboratório;

- Se possível, recomendar a suspensão da biotina antes da coleta de exames suscetíveis a esse interferente. Nos estudos de farmacocinética da Roche Diagnóstica, todos os 54 indivíduos avaliados apresentaram níveis séricos inferiores a 30 ng/mL em 3½ ou 8 horas após ingestão de 5 ou 10 mg de biotina, respectivamente.⁴ Como esse é o menor limiar de interferência dos ensaios Roche (segundo o fabricante), a recomendação da empresa, inserida em todas as bulas dos *kits*, é de que “amostras não devem ser coletadas em pacientes em tratamento com doses elevadas de biotina (isto é, > 5 mg/dia) até no mínimo 8 horas após a última administração de biotina”. Entretanto, a recomendação mais prudente e conservadora, relatada em todos os trabalhos publicados, é que pacientes tomando doses até 20 mg/dia suspendam a biotina por 2 a 3 dias antes das dosagens; naqueles em uso de doses maiores ou que tenham função renal comprometida, é melhor descontinuar a biotina por pelo menos 1 a 2 semanas;^{5,9}
- Alertar médicos sobre a potencial interferência analítica da biotina em reuniões clínicas ou notas explicativas em laudos de exames suscetíveis a esse interferente;
- Manter diálogo constante com o corpo clínico, estimulando o reporte de resultados incompatíveis com o quadro clínico e investigando exaustivamente a presença de interferentes. Se necessário, questionar novamente o paciente sobre o uso de biotina, pois, como é comumente considerada uma vitamina, e não um medicamento, frequentemente não é reportada ao médico ou ao laboratório.

Em amostras já coletadas e processadas que apresentem resultados suspeitos, o laboratório pode repetir as dosagens em ensaios que não utilizam o sistema biotina-estreptavidina. Outra possibilidade é dosar os níveis de biotina na amostra suspeita para verificar se ultrapassam o limiar de interferência relatado pelo fabricante dos *kits*. Infelizmente, a dosagem de biotina não faz parte da lista de exames da maioria dos laboratórios, mesmo dos grandes centros de apoio ou referência. Por último, o laboratório pode neutralizar o efeito da biotina incubando amostras em solução de micropartículas paramagnéticas revestidas com estreptavidina.^{5,34,35} Essa solução faz parte dos *kits* de imunoenensaio da Roche (concentração 0,72 mg/mL); como é disponibilizada em excesso, é possível recuperar vários mililitros de cada *kit* depois de o analisador identificar o reagente como “vazio”, misturar os volumes obtidos de vários *kits* e, então, armazenar o *pool* a 4°C para uso posterior. Um reagente semelhante também é comercializado pela Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA, ref: 11641778001). Na hora do ensaio, as micropartículas são centrifugadas ou imobilizadas com o auxílio de um magneto, o sobrenadante descartado e a amostra incubada com as micropartículas; estas são novamente centrifugadas ou imobilizadas e o sobrenadante separado para ser dosado. As amostras preparadas dessa maneira ficam presumivelmente livres de biotina, não havendo perda

significativa do analito durante o procedimento. De acordo com Trambas e colaboradores, esse método permite não apenas identificar a presença de biotina, mas também remover a interferência analítica mesmo em amostras de pacientes tomando altas doses do suplemento (300 mg/dia), sem reduzir significativamente a precisão e a acurácia da maioria dos ensaios; portanto, os resultados obtidos após a depleção da biotina podem, em geral, ser reportados pelo laboratório.³⁵

RESUMO

Laboratoristas e médicos devem ter muito cuidado com a biotina, pois ela pode simular uma série de doenças, como hipertireoidismo, tumor ovariano secretor de estrógeno, intoxicação por vitamina D, doença óssea adinâmica na insuficiência renal crônica, hipoparatiroidismo pós-cirúrgico e outros potenciais artefatos. Qualquer imunoenensaio que utilize o sistema biotina-estreptavidina, independentemente do fabricante, está sujeito à interferência da biotina, dependendo da dose ingerida e do formato e da suscetibilidade do método. A interferência é maior em pacientes tomando biotina em altas doses para tratamento de doenças metabólicas hereditárias (2 a 15 mg/kg/dia) ou esclerose múltipla (100 a 300 mg/dia). Entretanto, ela também pode ocorrer em alguns ensaios com doses menores (5 a 20 mg/dia) utilizadas para queda de cabelos ou fortalecimento de unhas, estendendo o problema à população geral. Em ensaios competitivos, a biotina ocasiona resultados falsamente elevados, enquanto, nos imunométricos, os valores são falsamente baixos. Para minimizar a interferência da biotina, os laboratórios clínicos devem alertar pacientes sobre esse possível interferente no agendamento e/ou recepção do laboratório, recomendando sua suspensão antes da coleta de testes suscetíveis. Médicos também devem ser informados sobre a biotina em reuniões clínicas, simpósios ou notas explicativas em laudos de exames suscetíveis. Em amostras já processadas com resultados suspeitos, os laboratórios podem repetir as dosagens em ensaios que não utilizam o sistema biotina-estreptavidina, dosar os níveis de biotina para verificar se ultrapassam o limiar de suscetibilidade dos ensaios ou neutralizar os efeitos da biotina incubando as amostras com partículas paramagnéticas revestidas com estreptavidina.

REFERÊNCIAS

1. ZEMPLIEN J, MOCK DM. Biotin biochemistry and human requirements. *J Nutr Biochem.* 1999;10:128-38.
2. ZEMPLIEN J. Biotin. *Biofactors.* 2009;35:36-46.
3. ZEMPLIEN J. Biotin. *Adv Nutr.* 2012;3:213-4.
4. GRIMSEY P, FREY N, BENDIG G, ZITZLER J, LORENZ O, KASAPIC, ZAUGG CE. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. *Int J Pharmacokinet.* 2017 (Epub ahead of print).

5. PIKETTY ML, PRIE D, SEDEL F, BERNARD D, HERCEND C, CHANSON P ET AL. High-dose biotin therapy leading to false biochemical endocrine profiles: validation of a simple method to overcome biotin interference. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55:817-25.
6. PEYRO SAINT PAUL L, DEBRUYNE D, BERNARD D, MOCK DM, DEFER GL. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of MD1003 (high-dose biotin) in the treatment of progressive multiple sclerosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2016;12:327-44.
7. MARDACH R, ZEMPLENI J, WOLF B, CANNON MJ, JENNINGS ML, CRESS S ET AL. Biotin dependency due to a defect in biotin transport. *J Clin Invest.* 2002;109:1617-23.
8. SEDEL F, PAPEIX C, BELLANGER A, TOUITOU V, LEBRUN-FRENAY C, GALANAUD D ET AL. High doses of biotin in chronic progressive multiple sclerosis: a pilot study. *Mult Scler Relat Disord.* 2015;4:159-69.
9. SAMARASINGHE S, MEAH F, SINGH V, HOLMES E. Biotin interference with routine immunoassays: understand the causes and mitigate the risks. *Endocr Pract.* 2017;23:989-98.
10. DIAMANDIS EP, CHRISTOPOULOS TK. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem.* 1991;37:625-36.
11. PIKETTY ML, POLAK M, FLECHTNER I, GONZALES-BRICEÑO L, SOUBERBIELLE JC. False biochemical diagnosis of hyperthyroidism in streptavidin-biotin-based immunoassays: the problem of biotin intake and related interferences. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55:780-8.
12. SEABORG E. Thyroid month: Beware of biotin. *Endocrine Society Endocrine News*, January 2016. Disponível em: <<https://endocrinenews.endocrine.org/january-2016-thyroid-month-beware-of-biotin/>>. Acesso em: 21 abr. 2018.
13. HOLMES EW, SAMARASINGHE S, EMANUELE MA. Biotin interference in clinical immunoassays: a cause of concern. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141:1459-60.
14. TRAMBAS C, LU Z, YEN T, SIKARIS K. Characterization of the scope and magnitude of biotin interference in susceptible Roche Elecsys competitive and sandwich immunoassays. *Ann Clin Biochem.* 2018;55:205-15.
15. KATZMAN BM, ROSEMARK C, HENDRIX BK, BLOCK DR, BAUMANN NA. Investigation of biotin interference in common thyroid function tests using the Roche Elecsys® immunoassay system. *Clin Chem.* 2016;62(Suppl.10):A-260.
16. PERJAR I, GEARHART M, HAMMETT-STABLER C. Identification of biotin interference with selected VITROS® biotin-streptavidin-based immunoassays in individuals taking supplements. *Clin Chem.* 2016;62(Suppl.10):A-272.
17. WILLEMAN T, CASEZ O, FAURE P, GAUCHEZ AS. Evaluation of biotin interference on immunoassays: new data for troponin I, digoxin, NT-Pro-BNP and progesterone. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55:e226-9.
18. BISCOLLA RPM, CHIAMOLERA MI, KANASHIRO I, MACIEL RMB, VIEIRA JGH. A single 10 mg oral dose of biotin interferes with thyroid function tests. *Thyroid.* 2017;27:1099-100.
19. WIJERATNE NG, DOERY JCG, LU ZX. Positive and negative interference in immunoassays following biotin ingestion: a pharmacokinetic study. *Pathology.* 2012;44:674-5.

20. LI D, RADULESCU A, SHRESTHA RT, ROOT M, KARGER AB, KILLEEN AA ET AL. Association of biotin ingestion with performance of hormone and nonhormone assays in healthy adults. *JAMA*. 2017;318:1150-60.
21. KWOK JS, CHAN IH, CHAN MH. Biotin interference on TSH and free thyroid hormone measurement. *Pathology*. 2012;44:278-80.
22. HENRY JG, SOBKI S, ARAFAT N. Interference by biotin therapy on measurement of TSH and FT4 by enzymeimmunoassay on Boehringer Mannheim ES700 analyser. *Ann Clin Biochem*. 1996;33:162-3.
23. BARBESINO G. Misdiagnosis of Graves' Disease with apparent severe hyperthyroidism in a patient taking biotin megadoses. *Thyroid*. 2016;26:860-3.
24. ELSTON MS, SEHGAL S, DU TOIT S, YARNDLEY T, CONAGLEN JV. Factitious Graves' disease due to biotin immunoassay interference – A case and review of the literature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:3251-5.
25. KUMMER S, HERMSEN D, DISTELMAIER F. Biotin treatment mimicking Graves' disease. *N Engl J Med*. 2016;375:704-6.
26. TRAMBAS CM, SIKARIS KA, LU ZX. A caution regarding high-dose biotin therapy: misdiagnosis of hyperthyroidism in euthyroid patients. *Med J Aust*. 2016;205:192.
27. MINKOVSKY A, LEE MN, DOWLATSHAHI M, ANGELL TE, MAHROKHIAN LS, PETRIDES AK ET AL. High-dose biotin treatment for secondary progressive multiple sclerosis may interfere with thyroid assays. *AACE Clin Case Rep*. 2016;2:e370-3.
28. SIMÓ-GUERRERO O, GIMÉNEZ-PÉREZ G, RECASENS-GRACIA A, VILLÀ-BLASCO C, CASTELLS-FUSTÉ I. False overt hyperthyroidism by interference in immunoassay. *Endocrinol Nutr*. 2016;63:431-2.
29. BATISTA MC, FERREIRA CES, FAULHABER ACL, HIDAL JT, LOTTENBERG SA, MANGUEIRA CLP. Biotin interference in immunoassays mimicking subclinical Graves' disease and hyperestrogenism: a case series. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:e99-103.
30. SHARMA A, BAUMANN NA, SHAH P. Biotin-induced biochemical Graves disease. A Teachable Moment. *JAMA*. 2017;177:571-2.
31. MEANY DL, JAN DE BEUR SM, BILL MJ, SOKOLL LJ. A case of renal osteodystrophy with unexpected serum intact parathyroid hormone concentrations. *Clin Chem*. 2009;55:1737-41.
32. WAGHRAY A, MILAS M, NYALAKONDA K, SIPERSTEIN AE. Falsely low parathyroid hormone secondary to biotin interference: a case series. *Endocr Pract*. 2013;19:451-5.
33. TRAMBAS CM, SIKARIS KA, LU ZX. More on biotin treatment mimicking Graves' disease. *N Engl J Med*. 2016;375:1698.
34. LAM L, KYLE CV. A simple method to detect biotin interference on immunoassays. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:e104-6.
35. TRAMBAS C, LU Z, YEN T, SIKARIS K. Depletion of biotin using streptavidin-coated microparticles: a validated solution to the problem of biotin interference in streptavidin-biotin immunoassays. *Ann Clin Biochem*. 2018;55:216-26.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

FDA ALERTA, BIOTINA PODE CAUSAR INTERFERÊNCIA EM TESTES LABORATORIAIS. TENHA CONFIANÇA COM ABBOTT.

EM 28 DE NOVEMBRO DE 2017, O FDA PUBLICOU UM COMUNICADO DE SEGURANÇA ALERTANDO SOBRE A POSSÍVEL INTERFERÊNCIA DE BIOTINA EM TESTES LABORATORIAIS¹.

Biotina, em amostras de pacientes que ingerem altos níveis de biotina em suplementos alimentares pode causar erros clínicos significativos em resultados de testes. O FDA presenciou um aumento no número de eventos adversos reportados, inclusive um óbito, relacionados à biotina¹. Isso é consistente com diversos artigos de revisão incluindo em CAP Today e no Endocrine News.

Você precisa ter certeza para cuidar de seus pacientes.
 Você depende de resultados de testes precisos para o diagnóstico e tratamento.
 Nem todos os métodos de testes são iguais.
 Felizmente, você tem uma opção.

Rx Patient Name: _____
 Address: _____

ESCOLHA CONFIANÇA

Signature: _____
 Date: _____

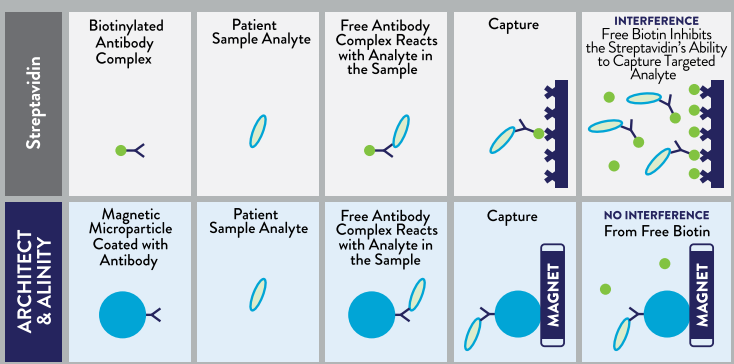
A biotina, pode interferir em testes laboratoriais que usam o método de captura de biotina-estreptavidina como o cerne de seus projetos de ensaios. Essa não é apenas mais uma interferência sem consequências, uma vez que resultados de testes incorretos podem levar ao erro no diagnóstico, tratamento inadequado e até mesmo ao óbito.

O seu laboratório pode optar pela tecnologia Abbott que reveste micropartículas com anticorpos e antígenos específicos para capturar o alvo. Isso garante que a qualidade do teste não seja comprometida pela biotina.

Os ensaios de química clínica e imunoenaios Abbott ARCHITECT e Alinity NÃO são impactados pela biotina.

SUA ESCOLHA DE DIAGNÓSTICO TEM CONSEQUÊNCIAS

Testes laboratoriais que usam o método de captura de biotina-estreptavidina podem ser afetados pela biotina. Os ensaios Abbott são projetados para não apresentar interferência de biotina e não são impactados pela biotina livre nas amostras.



POR QUE A BIOTINA PREOCUPA AGORA?

O uso de suplementação com biotina continua ganhando popularidade com suplementos alimentares para beneficiar cabelos, pele e unhas. Os médicos podem também recomendar altos níveis de biotina para pacientes com certas condições como diabetes ou esclerose múltipla.

Dados de mercado indicam que vendas de suplementos com biotina em lojas aumentaram 52% entre 2014 e 2017, segundo pesquisa realizada por Nielsen. Não estão incluídos nos dados Nielsen as vendas online de varejistas como a Amazon, que lista 3 dos 5 principais suplementos com biotina, com dosagem de 10.000 mcg, como o suplemento mais vendido².

NÃO HÁ ESPERA COM INSTRUMENTOS E ENSAIOS ABBOTT

A recomendação dos laboratórios que usam testes afetados pela interferência de biotina é educar seus profissionais da saúde sobre o potencial de interferências em testes, deixando que a responsabilidade de identificar pacientes que fazem uso de biotina recaia sobre eles.

Os profissionais de saúde devem:

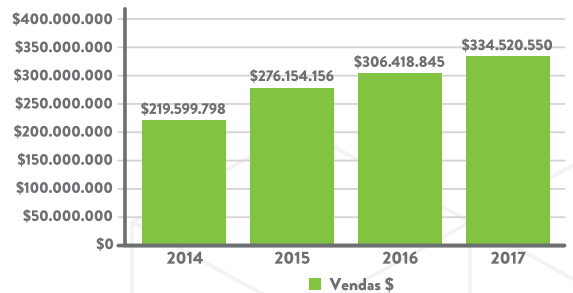
- Identificar pacientes que tomam suplementos de biotina no momento da coleta de amostra
 - Pacientes talvez não tenham conhecimento
- Atrasar a coleta de sangue por um período
 - O FDA declara que os dados atuais são insuficientes para dar suporte a recomendações
 - Estudos demonstraram que a interferência de biotina ainda estava presente 25 horas após tomar uma única dose de 30 mg³ e, em alguns estudos, com duração de até sete dias⁴.

Se seu laboratório usa testes afetados pela biotina, o processo recomendado é complexo, demorado e inconveniente para você e seus pacientes.

Enviar os pacientes para casa ou atrasar coletas não é viável em casos de atendimento de urgência e, no final, a biotina pode ainda estar no organismo do paciente durante o reteste.

Você pode escolher fazer tudo isso **OU** evitar todas as discussões adicionais porque você usa tecnologia Abbott que não sofre impacto da biotina. Você e seus pacientes não precisam se preocupar com a interferência da biotina.

AUMENTO DE 52% NA VENDA DE BIOTINA EM 4 ANOS



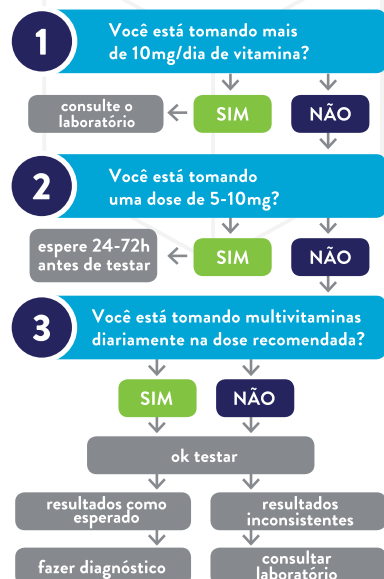
Patient Name: _____
Address: _____

O que você escolheria?

ESPERAR

NÃO ESPERAR

Signature: _____
Date: _____



A SEGURANÇA DO PACIENTE GUIA TUDO O QUE FAZEMOS. SABEMOS QUE TAMBÉM É ASSIM PARA VOCÊ.

Com ARCHITECT e Alinity da Abbott, resultados imprecisos devido à interferência de biotina não são uma preocupação para nós, para você ou para o paciente.

Tenha confiança com a Abbott.

 Patient Name: _____
Address: _____

ESCOLHA CONFIANÇA

Signature: _____
Date: _____

1. Print reference accessed on 2.27.18
<https://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/ucm586505.htm>
2. Abbott Nielsen Data
3. Wijeratne N, et al. Positive and negative interference in immunoassays following biotin ingestion: A pharmacokinetic study. Pathology. 2012 Dec;44(7):674-5.
4. Kummer S, et al. Biotin treatment mimicking graves' disease. NEJM. 2016 Aug 18;375(7):704-6.

CHOOSE TRANSFORMATION

ABBOTTDIAGNOSTICS.COM/ALINITY

Alinity e Choose Transformation são marcas comerciais da Abbott Laboratories em várias jurisdições.

© 2018 Abbott Laboratories. ADD-00063704
MP12JUL2018A - Exp. Date: 11 de Julho de 2020

Para mais informações, visite-nos no Estande #01 e 02

 **Abbott**

Shift.

TECNOLOGIA QUE PULSA

Os avanços da medicina não se restringem às descobertas científicas que resultam em novos tratamentos para melhorar a vida das pessoas. Nos últimos anos, a tecnologia da informação passou a ganhar importância ao revolucionar a gestão da saúde, especialmente na área laboratorial, com softwares poderosos e inteligentes, capazes de entregar diagnósticos de maneira mais rápida, precisa e muito menos sujeita a erros.

E no centro desta revolução está a Shift, fundada em 1992 e especializada em soluções em tecnologia da informação para medicina diagnóstica e preventiva, é responsável hoje por uma fatia considerável dos exames realizados no Brasil – 12% de todas as análises clínicas feitas no País são processadas pelos sistemas desenvolvidos pela Shift.

Em 2017, a empresa processou por meio de suas soluções análises clínicas de um total de **43 milhões de pacientes** espalhados por **22 estados brasileiros**. A esses números incluem-se as operações na **Argentina e no Uruguai** - nos países vizinhos, mais de **4,5 milhões de análises clínicas** foram processadas só no ano passado.

Esse valor expressivo de share e de exames processados em 2017 impactou no faturamento da empresa, que registrou um crescimento de **20% pelo sexto ano consecutivo**.



Analistas de negócios, desenvolvedores, biomédicos, consultores, entre outros profissionais, formam a equipe multidisciplinar da Shift responsável por criar e administrar os sistemas de informação que melhoram a inteligência dos processos dos laboratórios, desde o atendimento e a gestão administrativa até o processamento e a entrega dos resultados dos exames.

São cerca de 130 colaboradores que atendem uma expressiva carteira de clientes, dos quais 70% possuem ao menos uma certificação de qualidade, reflexo do perfil de exigência do grupo de laboratórios que contam com soluções da empresa.

“As diretrizes estratégicas que norteiam nosso trabalho são a vanguarda tecnológica e a inteligência empreendedora”, define o CEO e fundador da Shift, Marcelo Lorencin, que no início da década de 1990 estudava Ciência da Computação nos EUA e desenvolveu seu primeiro sistema para laboratórios aos 22 anos.

Entendemos que nossos serviços impactam diretamente na saúde de milhões de pessoas, por isso nossa tecnologia é pensada para que os laboratórios alcancem a excelência na gestão de seus processos. Nos preocupamos tanto com o bem-estar das pessoas quanto com a saúde empresarial de nossos clientes.

**MARCELO
LORENCIN**

www.shift.com.br

T (17) 2136 1555

comercial@shift.com.br

INTERFACE

SISTEMA DE INTERFACEAMENTO DE RESULTADOS

O INTERFACEAMENTO É A
ESCOLHA CERTA PARA O
LABORATÓRIO QUE DESEJA
CRESCER COM SEGURANÇA

Processe seus exames com
maior precisão e reduza
o tempo de liberação

- Rastreabilidade.
- Cores diferenciadas para as diversas situações dos status das amostras.
- Exame com faixas desejadas.
- Automatização: menos trabalho manual.



+8,2 milhões
exames/mês

softeasy

11 Interferência da biotina nos imunoenaios: caso clínico-laboratorial

Mulher, 56 anos, em tratamento para distúrbio de humor autorreferido como ansiedade e insônia. Em acompanhamento com médico psiquiatra, foi-lhe prescrito recentemente (há 3 meses) bromazepam 3 mg/dia. Hipertensa há 8 anos, faz uso de losartana 50 mg/dia. Relata queda de cabelo e enfraquecimento de unhas das mãos nos últimos 2 meses. Para esse último quadro, iniciou, por conta própria, suplementação com biotina na dose de 250 mg/dia. Na sua última avaliação ginecológica, em razão do quadro de ansiedade, foram solicitados exames da função tireoidiana, que, inicialmente, foram solicitados por seu ginecologista e, depois, por seu médico clínico. Os resultados e os respectivos intervalos de referência estão dispostos na Tabela 1 a seguir. Todos os testes foram executados no equipamento Cobas e601 (Roche, Diagnostics GmbH, Munique, Alemanha) em um período de 7 dias.

TABELA 1 Resultados dos exames e intervalos de referência

Primeira execução		
	Resultado	Intervalo de referência
TSH (mcUI/mL)	< 0,01	0,27-4,20
T ₄ livre (ng/dL) ^a	6,8	0,93-1,70
Segunda execução (após 7 dias da primeira execução)		
TSH (mcUI/mL)	< 0,01	0,27-4,20
T ₄ livre (ng/dL) ^a	7,2	0,93-1,70
T ₃ Livre (pg/mL) ^b	18,1	2,0-4,4
TRAb (UI/L) ^c	32,3	< 1,75

^ang/dL × 12,872 = pmol/L

^bpg/mL × 1,536 = pmol/L

^cTRAb = anticorpo antirreceptor de TSH

Ao exame físico, a paciente apresentava-se normotensa com a frequência cardíaca de 88 batimentos/minuto. Tireoide palpável, móvel e indolor, consistência e tamanho usuais. Ausência de sinais objetivos de orbitopatia tireoidiana. Ausência de tremor de extremidades. Exames do aparelho cardiovascular, abdome e tórax considerados normais.

A clara incompatibilidade dos achados do exame físico com o perfil laboratorial de hipertireoidismo, possível doença de Basedow-Graves, resultou na possibilidade de interferência analítica nos ensaios da função tireoidiana. Entre os medicamentos envolvidos, a biotina seria potencialmente o interferente associado. Foi solicitada a suspensão da biotina e novos exames foram realizados 1 semana depois (Tabela 2).

TABELA 2 Resultados dos exames e intervalos de referência 1 semana depois

	Resultado	Intervalo de referência
TSH (mcUI/mL)	1,26	0,27-4,20
T ₄ livre (ng/dL) ^a	1,11	0,93-1,70
T ₃ Livre (pg/mL) ^b	2,83	2,0-4,4
TRAb (UI/L) ^c	0,6	< 1,75

^ang/dL × 12,872 = pmol/L

^bpg/mL × 1,536 = pmol/L

^cTRAb = anticorpo antirreceptor de TSH

O retorno aos níveis normais da função tireoidiana, dessa vez corroborando o quadro clínico, confirmou a interferência da biotina nos ensaios da função tireoidiana.

A biotina é uma vitamina do complexo B envolvida em uma grande variedade de atividades metabólicas no ser humano. São conhecidas suas ações como coenzima para as carboxilases, bem como seus papéis mais recentes como sinalizador celular e na regulação epigenética dos genes e da estrutura da cromatina.

Encontra-se o complexo estreptavidina/biotina em alguns imunoenaios destinados à avaliação da função tireoidiana. A presença da biotina na amostra do paciente, em concentrações elevadas, levaria à interferência no ensaio competindo pelos sítios de ligação com a estreptavidina do complexo anticorpo, antígeno e anticorpo biotilado (no caso dos ensaios diretos) ou da ligação antígeno biotilado e anticorpo marcado (ensaios de competição). No presente caso, a interferência no ensaio direto (TSH) produziu concentrações inesperadamente baixas. Os demais ensaios, de desenho competitivo, tiveram resultados elevados tão somente secundários à biotina. O perfil laboratorial foi consistente com o quadro de hiper-

tireoidismo, inclusive com a elevação do TRAb sugerindo a possibilidade de esse hipertireoidismo ser secundário à doença de Basedow-Graves.

A utilização crescente de complexos vitamínicos (no caso, a biotina) possibilita o achado de interferências cada vez mais frequentes nos imunoenaios que utilizam o sistema estreptavidina/biotina. A biotina tem sido mais amplamente empregada em quadros dermatológicos que envolvem queda de cabelo e fraqueza das unhas, notadamente em pacientes do sexo feminino. Esse fato, somado à inespecificidade de alguns sinais e sintomas relacionados à disfunção tireoidiana, possibilita o eventual achado da interferência da biotina em ensaios bioquímicos para avaliação da tireoide.

O efeito da biotina tem sido descrito como dose-dependente. A dose capaz de causar a alteração em cada um dos ensaios é ainda alvo de debate. Contudo, a suplementação tem sido realizada em doses muitas vezes superiores à recomendada de 30 mcg/dia. Doses elevadas de suplementação entre 5 e 300 mg têm sido relatadas e não são raras de encontrar no dia a dia. A recomendação inicial compreende suspender a suplementação para realização de novo teste (esse tempo varia de 8 horas a 48 horas, usualmente) ou a execução dos testes de função tireoidiana por imunoenaios que não utilizem o sistema estreptavidina/biotina ou método analítico distinto (p. ex., espectrometria de massas).

O caso descrito ilustra a importância da correlação clínico-laboratorial para identificar potenciais interferências analíticas. A ausência de sinais objetivos no exame físico foi fundamental para a conclusão do caso e a correta identificação da biotina como interferente nos ensaios da função tireoidiana.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BISCOLLA RPM, CHIAMOLERA MI, KANASHIRO I, MACIEL RMB, VIEIRA JGH. A single 10 mg oral dose of biotin interferes with thyroid function tests. *Thyroid*. 2017;27:1099-100.

SAMARASINGHE S, MEAH F, SINGH V, BASIT A, EMANUELLE N, EMANUELLE MA ET AL. Biotin interference with routine clinical immunoassays: understand the causes and mitigate the risks. *Endocrine Practice*. 2017;23:989-98.

ZEMPLINI J, WIJERATNE SSK, HASSAN YI. Biotin. *Biofactors*. 2009;35:36-46.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

Alinity

ci-series



Alinity ci-series

Uma nova maneira de entregar valor ao sistema de saúde



UNIFORMIDADE por todo o laboratório



FLEXIBILIDADE para se adaptar às mudanças do cenário



PRODUTIVIDADE OPERACIONAL para melhorar desempenho e fluxo de trabalho



CONFIANÇA nos sistemas e desempenho

CHOOSE TRANSFORMATION™



Módulo cobas e 801

A solução inteligente e sustentável para laboratórios e pacientes

O módulo **cobas e 801** é o mais novo membro da série de analisadores modulares **cobas**[®] 8000, que utilizam a tecnologia de Eletroquimioluminescência.

Capaz de dobrar a capacidade dos testes de imunoquímica disponibilizados atualmente, o **cobas e 801** pode ser configurado com até quatro módulos em série, oferecendo até 1.200 testes por hora e 192 posições de reagentes.

O módulo **cobas e 801** oferece mais de 95 imunoensaios e requer um baixo volume de amostra, oferecendo carga contínua de reagentes e consumíveis, além de baixo tempo de rotação, com 18 minutos para os testes de rotina e 9 minutos para os testes de emergência. Essas características beneficiam pacientes e profissionais de saúde, fornecendo resultados precisos e necessários para suportar a melhor decisão de tratamento.

Roche Diagnóstica Brasil Ltda - © 2017- Junho/2017 - Cód. ERDL933
Av. Engenheiro Billings, 1729 - Jaguaré - SP - 05321-010
Nº de Registro ANVISA: 10287411196.
0800 77 20295 - www.roche.com.br



PORTAL DE EXAMES

SOLUÇÃO EM GESTÃO
DE **LAUDOS**
VIA **INTERNET**

O MAIS COMPLETO SISTEMA DE ENVIO DE RESULTADOS VIA INTERNET

AUTOMATIZAÇÃO

Entrega de laudos pela internet.

ECONOMIA

A disponibilidade dos exames no portal proporciona economia de impressão e postagem via correio.

FIDELIZAÇÃO

O paciente e o médico podem acessar os resultados de qualquer local e consultar o histórico dos resultados anteriores, fidelizando o paciente ao laboratório.



+12
anos de mercado

softeasy

12 Sorologia de doenças infecciosas

Assim como em todas as demais áreas do laboratório clínico, o setor que se ocupa dos testes envolvendo a pesquisa de anticorpos contra agentes infecciosos também se vê diariamente diante de questões que remetem à interferência de várias naturezas.

Particularmente nessa área, além dos costumeiros problemas pré-analíticos e pós-analíticos, existem algumas peculiaridades ligadas à gênese da resposta imune, bem como à natureza dos agentes infectantes, que fazem com que a avaliação dos resultados obtidos demande um cuidado especial, para que se evitem erros ou conclusões precipitadas.

Sem querer de modo algum esgotar a questão, recordar-se-ão aqui apenas as etapas e os princípios gerais da gênese da resposta imune contra os agentes infecciosos de maneira mais ampla, para que fiquem mais claros alguns dos problemas envolvendo os interferentes reportados a seguir.

Nas primeiras horas após o contato com um agente infeccioso, a resposta imune começa a se organizar no sentido de dar o primeiro combate. Essa resposta inicial envolve a imunidade inata, isto é, ainda não é específica contra um ou outro agente infectante. As primeiras células a estabelecerem essa resposta são os macrófagos e as células dendríticas que farão a fagocitose desse agente ou de partes deles e gerarão a produção de interferon. Essa é uma grande classe de produtos, de pelo menos três categorias diferentes que não apenas inibirão etapas metabólicas do ciclo de vida dos agentes infectantes, como também atuarão como sinalizadores a outras células do sistema imune humano de que está havendo uma “invasão” por parte de agentes estranhos.

Entre as células que serão sinalizadas e, portanto, informadas de que um processo infeccioso está em curso, incluem-se os linfócitos B, que atuarão não apenas

como apresentadores desses antígenos a outras células do sistema imune, como também darão início à produção de anticorpos específicos; portanto, dando início também à resposta imune adquirida, uma vez que já se trata de um processo dirigido a determinado agente.

Esse processo de geração de anticorpos deve se iniciar ao redor de 2 a 3 dias após o primeiro encontro com o agente infeccioso, mas, até atingir um nível sérico identificável pela maior parte dos testes atualmente em uso, costuma passar a ser identificado após 5 a 6 dias. Os primeiros anticorpos a serem produzidos compreendem os das classes imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina A (IgA); após 2 a 3 dias mais frequentemente, haverá o chamado “switch” de classe e essas células passarão a produzir mais intensamente moléculas da classe IgG, inicialmente de baixa avididade, a seguir (2 a 3 meses), os de alta avididade, muito embora saiba-se atualmente que a produção de IgM e IgA não venha a cessar de modo definitiva.

Claramente, existem diferenças relevantes, não apenas ao se considerarem as distintas metodologias empregadas, mas também os detalhes que envolvem o próprio ciclo biológico de determinados agentes.

Assim, torna-se difícil comparar um resultado obtido a partir de uma técnica de imunodifusão radial, com, por exemplo, um teste quimiluminométrico. Do mesmo modo, a infecção pelo vírus Epstein-Barr, pelo fato de ter como célula-alvo o próprio linfócito B, exatamente a célula produtora de anticorpos, pode, de certa maneira, “nocautear” essa célula e fazer com que os anticorpos da classe IgM sejam produzidos um pouco mais tardiamente em relação a outros agente (7 a 10 dias contra 5 a 6 dias de outras infecções).

Assim, como regra, pode-se pensar que, ao final da 1ª semana, após o contato inicial com o patógeno, ou durante a 2ª semana, passe a ser possível a identificação da produção de anticorpos das classes IgM ou IgA e, logo a seguir, a produção de IgG.

Nessa característica da gênese de anticorpos, é importantíssimo lembrar que esses anticorpos da classe IgM são produzidos com a finalidade de tornar mais difícil o acesso dos agentes infectantes aos seus locais principais de infecção ou de atingir seus receptores celulares, quando houver, e mesmo de ligar-se aos componentes do complemento, sistema proteico que faz parte da amplificação de que a Biologia dotou o ser humano para tornar sua resposta imune mais eficaz. Esse processo é bastante complexo e rápido, sem se preocupar inicialmente com a “especificidade”, contrariamente aos anticorpos da classe IgG, sobretudo os de alta avididade, que tendem a ser mais específicos na sua ligação com os antígenos.

A resultante desse processo é que os anticorpos da classe IgM (embora menos, os da classe IgA também) tendem a ser mais inespecíficos em relação aos da classe IgG; portanto, é muito mais frequente ter resultados de “reatividade cruzada” nos testes de detecção de IgM/IgA que nos testes para detecção de IgG.

Entre os problemas de inespecificidade da resposta imune mais frequentes nos testes sorológicos das doenças infecciosas na rotina diagnóstica dos laboratórios de patologia clínica, chamam a atenção os cruzamentos observados nos testes para vírus Epstein-Barr, com citomegalovírus e toxoplasmose. Eventualmente, isso ocorre em parte porque se trata de agentes que estimulam muito os linfócitos B e fazem com que sejam gerados mais anticorpos “inespecíficos”. Não por outra razão, durante muitos anos empregou-se exatamente essa característica na reação de Paul-Bunnell-Davidsohn, que usa esse efeito para fazer o diagnóstico de mononucleose infecciosa empregando hemácias de cavalos ou de carneiros ou de bois e rim de cobaia, para torná-la mais específica.

Outra reatividade cruzada observada recentemente com muita frequência é aquela decorrente de antígenos comuns presentes em vírus da mesma família, como dengue, zika e febre amarela (doença ou vacinal). A elucidação desses casos representa um desafio constante para o laboratório clínico.

Tornam-se muito importantes para ajudar nesse esclarecimento: checar o histórico de exames do(a) paciente; ver exames presentes na mesma coleta ou em coletas temporalmente próximas; ou, ainda, tentar relacionar outros exames, como hemograma, provas bioquímicas de enzimas hepáticas, entre outros.

Além disso, nada substitui uma conversa com o clínico solicitante do paciente para obter dados clínicos e/ou epidemiológicos que podem oferecer dados suficientes para concluir melhor o diagnóstico sorológico final.

Outro cuidado muito importante na avaliação de resultados aparentemente discrepantes, e que também envolve uma conversa com o clínico solicitante, refere-se a anticorpos alheios aos pacientes, mas presentes na amostra clínica. Eventualmente, pacientes mais graves ou com situações clínicas que requeiram a administração de gamaglobulina podem tê-la feito entre duas coletas de amostras enviadas com finalidade diagnóstica.

Supõe-se que um paciente tem suspeita de infecção pelo *T. gondii*: resultado do teste foi negativo para IgM e IgG. Entretanto, como não conseguiu “fechar” um diagnóstico, o clínico solicita a repetição desse teste após 1 semana. Mas, entre a coleta da primeira e da segunda amostra, houve necessidade, por qualquer razão, de fazer uma transfusão de um hemoderivado ou mesmo de gamaglobulina, que continha anticorpos da classe IgG contra *T. gondii*. Desse modo, o paciente passou de uma fase de IgG negativa, para uma IgG positiva, sem passar pela fase de IgM, em um espaço de tempo muito curto, em que isso não teria sido possível. Seria um “erro laboratorial”? Claro que não, pois esse anticorpo detectado na segunda amostra não era próprio do paciente, mas apenas decorrente de uma transfusão de anticorpos a partir do doador desse material biológico.

A conversa com o clínico solicitante pode esclarecer rapidamente essa questão.

Outro fator com potencial de interferência nesses sorológicos, ainda que muito mais raramente, é a presença de biotina no soro/plasma do material clínico a ser avaliado.

Atualmente, é relativamente comum que pacientes façam uso dessa vitamina do complexo B (vitamina B₇ ou biotina) com a finalidade de obter benefícios, estéticos ou não, em unha, cabelo e pele em geral, uma vez que ela atua em processos metabólicos de pele e fâneros. Essa vitamina pode fazer parte de um composto cuja real formulação o próprio paciente desconhece; contudo, mesmo usada em concentrações baixas, como 10 mg por dia, pode impactar testes sorológicos que façam uso de marcadores contendo avidina-biotina ou seus derivados. Dependendo do desenho desses testes (antiglobulínicos, competitivos ou testes diretos), esses resultados podem afetar com índices supervalorizados ou subvalorizados e promover interpretações incorretas.

Recomenda-se que os pacientes e médicos sejam alertados da importância de interromper o uso de qualquer tipo de “medicação” por pelo menos 3 a 4 dias antes de coletar o material para o teste sorológico.

Uma última lembrança com relação a interferentes nos testes sorológicos na sorologia fica por conta, mais uma vez, de fatores pré-analíticos e que comprometem muitos outros testes de várias áreas da patologia clínica. Aqui, faz-se referência à presença de microfibrina na amostra, por problemas de coleta ou separação de material para obter o soro, por vezes em quantidades pequenas, pouco perceptíveis, mas suficientes para afetar alguns tipos de exames sorológicos.

Do mesmo modo, a presença de bolhas e microbolhas pode comprometer determinados equipamentos e afetar a boa análise de resultados.

Nesses casos, uma nova centrifugação da amostra pode ajudar a resolver a questão, embora isso nem sempre ocorra e a única alternativa seja mesmo uma nova coleta de material clínico.

Alguns equipamentos usados no laboratório clínico atualmente exigem um “espaço morto” relevante. Isso faz com que, embora o volume real necessário para que se faça a dosagem não seja realmente grande, o volume necessário para preencher o volume morto do equipamento seja muito maior, por vezes 2 a 3 mL. Isso pode impactar os exames, especialmente de crianças, nos quais o volume coletado costuma ser pequeno e para os quais pode haver necessidade de acrescentar outros marcadores ao longo do esclarecimento diagnóstico, o que pode acarretar “material insuficiente”, promovendo dissabores e frustrações para todos.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AKL P, BLICK KE. A case of false-positive test results in a pregnant woman of unknown HIV status at delivery. *Lab Med.* 2014;45(3):259-63.

BERTH M, BOSMANS E. Acute parvovirus B19 infection frequently causes false-positive results in Epstein-Barr virus- and herpes simplex virus-specific immunoglobulin M determinations done on the Liaison platform. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(3):372-5.

BONETTI A, MONICA C, BONAGURI C, GNOCCHI C, RUSSO A, BATTISTELLI L ET AL. Interference by heterophilic antibodies in immunoassays: wrong increase of myoglobin values. *Acta Biomed.* 2008;79(2):140-3.

PAPA A, GAVANA E, DETSIS M, TERZAKI E, VENETI L, PERVANIDOU D ET AL. Laboratory and surveillance studies following a suspected Dengue case in Greece. *Int J Infect Dis.* 2015;30:150-3.

PITTMAN PR, LIU CT, CANNON TL, MANGIAFICO JA, GIBBS PH. Immune interference after sequential alphavirus vaccine vaccinations. *Vaccine.* 2009;27(36):4879-82.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

SOLUÇÕES EFICAZES

EM GERENCIAMENTO LABORATORIAL



INTERFACE

Sistema de interfaceamento de resultados.



PORTAL DE EXAMES

Solução em gestão de laudos via internet.



ENVIO DE SMS

Solução para envio de SMS para pacientes.



EASYVET

Solução em gestão laboratorial veterinária.



LABORATÓRIOS DE APOIO

Solução para comunicação com apoio laboratorial.



FILAS DE ATENDIMENTO

Solução para filas da recepção.



FINANCIAL

Solução em gestão financeira e estoque.



EASYCLINIC

Solução em gestão de clínicas médicas.

NO GERENCIAMENTO, ENCONTRE
A SOLUÇÃO IDEAL.
FALE COM A GENTE!



(11) 2094-4117



comercial@softeasy.com.br



(11) 97686-2187

softeasy

WWW.SOFTEASY.COM.BR

13 Anticorpos antinucleares

INTRODUÇÃO

Autoanticorpos podem ser definidos como imunoglobulinas que reconhecem antígenos do próprio organismo. A primeira descrição conhecida de um autoanticorpo data de 1948, por Hargraves, que relatou o fenômeno da célula LE, associando o achado ao diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico (LES). Embora, classicamente, a literatura médica tenha associado a presença de autoanticorpos à ocorrência de enfermidades e síndromes clínicas de natureza autoimune, com frequência, a simples existência do autoanticorpo não é suficiente para causar doença; em outras palavras, nem todos os autoanticorpos detectáveis por meios laboratoriais e associados estatisticamente a doenças autoimunes desempenham um papel patológico claro nessas mesmas doenças. Nesse contexto, fenômenos autoimunes, antes de estarem associados a eventos patológicos, podem representar apenas uma resposta fisiológica normal, já que indivíduos saudáveis podem exibir reatividade de uma parte significativa de suas imunoglobulinas contra constituintes próprios. Com frequência, tais anticorpos autorreativos fisiológicos são denominados “autoanticorpos naturais”, em geral da classe IgM, têm baixa afinidade por seus antígenos (avidez baixa) e baixos títulos. Contudo, autoanticorpos patológicos são considerados, na maior parte das situações clínicas, fundamentais para o diagnóstico de doenças reumáticas autoimunes. Essa importância faz com que laboratórios clínicos de referência precisem dominar diversos métodos laboratoriais que possibilitem a caracterização de autoanticorpos, auxiliando o clínico na árdua tarefa de diagnosticar síndromes e doenças autoimunes com precisão.

A pesquisa de anticorpos antinucleares (ANA, em inglês) ou, como popularmente conhecido no Brasil, o fator antinuclear (FAN) consiste em um exame la-

laboratorial auxiliar na triagem, no diagnóstico e na avaliação de doenças autoimunes. Autoanticorpos presentes no soro do paciente podem se ligar a diversos alvos antigênicos celulares durante uma reação de imunofluorescência indireta, promovendo o aparecimento de cerca de 30 padrões característicos. Tais padrões de fluorescência podem estar relacionados com algumas doenças autoimunes e quase sempre necessitam de estudos diagnósticos laboratoriais complementares para serem esclarecidos. À luz do quadro clínico e da história do paciente, o médico poderá, então, ampliar a investigação dos autoanticorpos sugeridos, solicitando exames mais específicos. É o caso, por exemplo, do padrão nuclear homogêneo, cuja identificação sugere a pesquisa específica de autoanticorpos anti-dsDNA (anti-DNA de fita dupla), anticromatina (antinucleossomo) e/ou anti-histona.

Utilizam-se diversos métodos de detecção de autoanticorpos rotineiramente nos laboratórios clínicos e de pesquisa; as metodologias mais difundidas em laboratórios clínicos são a imunofluorescência indireta e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

A imunofluorescência indireta (IFI) em células HEp-2 compreende o método laboratorial preferencialmente utilizado para a pesquisa de FAN. A utilização de células HEp-2, linhagem epitelial originada de carcinoma laríngeo humano, conferiu grande sensibilidade ao método. Resumidamente, o processo compreende uma primeira incubação, na qual o soro diluído do paciente entra em contato com o substrato celular antigênico, possibilitando a formação do complexo antígeno-anticorpo. Após uma etapa de lavagem da lâmina, uma segunda incubação torna possível que o conjugado fluorescente (imunoglobulina anti-humana marcada com fluoresceína) reaja com o complexo. Dá-se uma nova etapa de lavagem da lâmina, e, por fim, a montagem com glicerina e lamínula, para posterior leitura em microscópio de imunofluorescência. Inicialmente, o soro do paciente é testado na diluição de triagem, convencionalmente definida como 1:80 e, quando de reação positiva, o título final será estabelecido e informado em laudo.

Pela elevada sensibilidade diagnóstica, a IFI utilizando células HEp-2 como substrato é considerada o método de referência padrão para a pesquisa do FAN.

FATORES PRÉ-ANALÍTICOS

Para o exame laboratorial alcançar seu objetivo, contribuindo para a investigação ou o monitoramento clínico do paciente, todo o processo compreendido entre as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica deverá ser controlado adequadamente. Entre as três fases, a pré-analítica é a mais vulnerável, concentrando o maior número de erros.

Indicação do exame

A indicação da solicitação médica da pesquisa de FAN deveria ter como objetivo, primordialmente, o diagnóstico de doenças autoimunes, especialmente LES. FAN reagente representa um dos critérios de classificação do LES, pelo American College of Rheumatology (ACR).

Atualmente, no Brasil, os estudos demonstram que de 10 a 25% dos indivíduos saudáveis podem apresentar FAN HEp-2 positivo, em título de 1:80. O teste tem pouca especificidade, o que dificulta a interpretação de resultados positivos em um contexto clínico com baixa probabilidade pré-teste de doença autoimune.

A recomendação Choosing Wisely® da Foundation American Board of Internal Medicine (ABIM), dos Estados Unidos, em conjunto com o American College of Rheumatology e a Canadian Rheumatology Association é de não solicitar a pesquisa de autoanticorpos específicos sem FAN positivo ou sem suspeita clínica de doença autoimune, já que as pesquisas dos principais autoanticorpos (anti-dsDNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-SS-B/La e anti-Scl-70) são geralmente negativas quando de FAN negativo. Uma notável exceção pode ser a ocorrência de anti-SS-A/Ro positivo por método específico em indivíduos com FAN negativo.

Recomenda-se solicitar a pesquisa de autoanticorpos específicos de acordo com a história clínica e o exame físico do paciente.

Infecções virais

Pacientes com infecções virais podem ter um FAN positivo, embora por um período curto, como infecção pelo vírus da hepatite B. É sempre importante excluir a possibilidade de qualquer doença infecciosa diante de um resultado positivo para FAN com baixos títulos. Frequentemente, processos infecciosos estão associados a padrões citoplasmáticos.

Outras doenças associadas ao FAN

Indivíduos portadores de várias outras doenças autoimunes além do LES, para as quais o teste tem menor importância diagnóstica, podem apresentar resultados positivos no teste (Tabela 1). Resultados positivos também podem ocorrer no contexto de doenças infecciosas, neoplásicas ou mesmo em indivíduos sem evidência clínico-laboratorial de doença autoimune. As doenças neoplásicas podem cursar com padrão misto do tipo CENP-F.

Gestação

Na gravidez, os títulos de FAN podem aumentar de modo não específico.

TABELA 1 Prevalência de FAN positivo em várias condições clínicas

Doenças	Prevalência FAN
Lúpus eritematoso sistêmico	98 a 100%
Esclerodermia	90%
Artrite reumatoide	45%
Síndrome de Sjögren	60%
Polimiosite/dermatomiosite	35%
Artrite idiopática juvenil	15 a 40%
LE induzido por drogas	80 a 95%
Tireoidite de Hashimoto	50%
Doença de Graves	50%
Hepatite autoimune	70%
Cirrose biliar primária	50 a 70%
Doenças virais: EBV, HIV, HCV, parvovírus	*
Doenças linfoproliferativas	*
Síndromes paraneoplásicas	*
Doença inflamatória intestinal	*
Fibrose pulmonar	*

* Embora a pesquisa para FAN positiva seja relatada nessas doenças com mais frequência que em pacientes saudáveis, as estimativas não são precisas.

Fonte: Reichlin, 2008.¹

Idade

A prevalência de FAN positivo em indivíduos saudáveis com mais de 60 anos é de 20% e, em crianças, de 2 a 6%. Esperam-se resultados negativos na população normal com menos de 50 anos.

Gênero

Em geral, os títulos de FAN são significativamente maiores em mulheres que em homens, proporção que se mantém em pacientes com doenças autoimunes.

História familiar

Pacientes saudáveis com familiares de primeiro grau com LES têm maior probabilidade de apresentar FAN positivo.

Medicamentos em uso

É importante registrar as medicações em uso na requisição laboratorial do paciente, já que algumas delas podem causar resultados falso-positivos de FAN: bloqueadores beta-adrenérgicos, carbamazepina, metildopa, nitrofurantoína sódica e penicilamina.

Resultados falso-negativos podem ser causados por terapia medicamentosa com corticosteroides.

Tratamento com o imunobiológico infliximabe pode ocasionar reatividade com o padrão nuclear homogêneo. O uso de ribavirina e interferon-alfa pode ocasionar reatividade com o padrão citoplasmático do tipo “anéis e bastões” (*rods and rings*).

Tipo de amostra

O soro é a amostra preferida para a pesquisa de FAN, coletado em tubo seco com ou sem sistema separador, com o volume de aproximadamente 5 mL de sangue. Outras amostras biológicas, como plasma, líquido pleural, líquido pericárdico e líquido sinovial, podem ser utilizadas, mas não foram padronizadas com a maioria dos conjuntos diagnósticos e não têm valores de referência definidos.

Condições de armazenamento

A amostra poderá ser armazenada de 2 a 3 dias a 4°C ou a -20°C, ou por períodos maiores, até a execução do exame.

Outras variáveis pré-coleta

Outras variáveis, como exercícios físicos, dieta, tabagismo, estresse, horário da coleta ou postura, não estão descritas na literatura como relevantes para a pesquisa do FAN.

INTERFERENTES DA FASE ANALÍTICA

Amostras com contaminação bacteriana deverão ser evitadas, pois enzimas proteolíticas poderão digerir o substrato celular HEP-2; entretanto, não há contraindicação formal quanto à realização de pesquisa de FAN em pacientes infectados.

Hemólise macroscópica pode interferir em ensaios imunológicos de modo geral, alterando as características da leitura.

Amostras altamente lipêmicas, formando uma camada lipídica na superfície do soro, produzirão uma camada sobre o substrato celular, interferindo na leitura da lâmina.

Características antigênicas importantes podem ser afetadas durante o processo de fabricação das lâminas comerciais para a pesquisa de FAN. Por exemplo, na fase de fixação do substrato celular à lâmina, podem ser usados diferentes fixadores, de diferentes fabricantes. Vários padrões de fluorescência mais raros, como o padrão citoplasmático do tipo “anéis e bastões” ou o padrão nuclear pleomórfico, podem não ser corretamente identificados em lâminas de alguns fabricantes específicos.

O desempenho dos microscópios, particularmente a intensidade de luminosidade da lâmpada, pode constituir um fator crítico para o estabelecimento correto do título final de fluorescência ou mesmo para a diferenciação entre positivos e negativos em pacientes com baixos títulos de autoanticorpos. Do mesmo modo, fatores humanos, relacionados com o treinamento dos profissionais que fazem a leitura microscópica das lâminas de fluorescência, podem promover erros diagnósticos, produzindo resultados falso-positivos ou falso-negativos.

REFERÊNCIA

1. REICHLIN M. Measurement and clinical significance of antinuclear antibodies. Disponível em: <<https://somepomed.org/articulos/contents/mobipreview.htm?16/53/17232/abstract/8>>. Acesso em: 21 abr. 2018.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AVERY TY, VAN DE CRUYS M, DAMOISEAUX JGMC. Anticorpos anti-nucleares na prática clínica diária: prevalência no cuidado primário, secundário e terciário. *Journal of Immunology Research*. 2014;401739.

BRITO F DE A, SANTOS SME, FERREIRA GA, PEDROSA W, GRADISSE J ET AL. Detecção de anticorpos antinucleares por imunofluorescência indireta em células HEp-2: definindo a diluição de triagem adequada para o diagnóstico das doenças reumáticas autoimunes. *Rev Bras Reumatol*. 2014;54(1):13-20.

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). *Quality Assurance of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens: (1) Indirect Fluorescence Assay for Microscopy and (2) Microtiter Enzyme Immunoassay Methods; Approved Guideline – Second Edition*. CLSI document I/LA02-A2. Wayne: CLSI; 2006.

DELLAVANCE A, GABRIEL JÚNIOR A, CINTRA AFU, XIMENES AC, NUCCITELLI B, VON MÜHLEN CA ET AL. I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN HEp-2. *J Bras Patol Med Lab*. 2002;38(3):207-16.

FRANCESCANTONIO PLC, ANDRADE LEC, CRUVINEL WM, ARAÚJO FI, DELLAVANCE A, GABRIEL JÚNIOR A ET AL. III Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em Células HEp-2: perspectiva histórica, controle de qualidade e associações clínicas. *J Bras Patol Med Lab*. 2009;45(3):185-99.

FRANCESCANTONIO PLC, CRUVINEL WM, DELLAVANCE A, ANDRADE LEC, TALIBERTID BH, VON MÜHLEN CA ET AL. IV Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2. *Rev Bras Reumatol*. 2014;54:44-50.

FRITZLER MJ. Choosing wisely: Review and commentary on anti-nuclear antibody (ANA) testing. *Autoimmun Rev*. 2016 Mar;15(3):272-80.

GUDER WG, NARAYANAN S, WISSER H, ZAWTA B. *Samples: from the patient to the laboratory. The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results*. 2. ed. Darmstadt: Cit Verlag; 2003.

KAVANAUGH A, SOLOMON DH, HOMBURGER HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jan;124(1):71-81.

MARIZ HA, DELLAVANCE A, ANDRADE LE. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 2011 May;63(5):1468.

SBPC/ML. *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): coleta e preparo da amostra biológica*. Barueri: Minha Editora; 2014.

14 Anticorpos antinucleares: caso clínico-laboratorial

Paciente do sexo feminino, 22 anos, há 1 semana com poliartralgia simétrica acometendo pequenas articulações de mãos, punhos, cotovelos e tornozelos, acompanhada de *rash* inicialmente em região malar, com subsequente extensão para tronco e membros. Nega úlcera orais, sintomas constitucionais, alopecia, fenômeno de Raynaud, sintomas respiratórios, dor torácica, alterações dos hábitos intestinais e urinários.

Ao exame, apresenta edema e calor em articulações interfalangianas proximais de mãos, metacarpofalangianas, punhos e tornozelos, com limitação dolorosa da amplitude dos movimentos. Ainda, lesão eritematosa malar e eritema reticulado em tronco, membros superiores e inferiores. Demais órgãos e sistemas sem alterações.

Exames laboratoriais (VR = valor de referência):

- Hemácias: 4,5 milhões/mm³ (VR: 4 a 5,2 milhões/mm³); hematócrito: 41,5% (VR: 36 a 46%); hemoglobina: 12,8 g/dL (VR: 12 a 16 g/dL);
- Leucócitos: 3.100/mm³ (VR: 4.000 a 11.000/mm³). Segmentados: 60%; linfócitos: 30%; monócitos: 10%;
- Plaquetas: 160.000/mm³ (VR: 150.000 a 450.000/mm³);
- Exame de urina rotina: sem alterações;
- Velocidade de hemossedimentação: 30 mm (VR: 0 a 20 mm);
- Proteína C-reativa: 5 mg/L (VR: < 10 mg/L);
- Creatinina: 0,6 mg/dL (VR: 0,60 a 1,20 mg/dL). AST: 30 UI/L (VR: até 35 UI/L). ALT: 25 UI/L (VR: até 35 UI/L);
- CH50: 46 u/CAE (VR: > 60 u/CAE);

- Fator antinuclear (FAN): reagente, título 160, padrão nuclear homogêneo (VR: não reagente; imunofluorescência indireta em células HEp-2);
- Anti-DNA: reagente, título 20 (VR: < 10; imunofluorescência indireta *Crithidia luciliae*);
- Fator reumatoide: 14 UI/mL (VR: < 20 UI/mL);
- Parvovírus B19, anticorpos IgM e IgG (ELISA): reagentes (VR: não reagente).

Prescrito anti-inflamatório não esteroide, com redução significativa da dor e sinais de artrite. Paciente evolui com resolução dos sintomas em 2 meses; FAN HEp-2 e anti-DNA converteram-se a não reagentes em 4 meses.

COMENTÁRIOS

1. Parvovírus B19: DNA vírus de fita simples, transmitido predominantemente por via respiratória, de maneira esporádica ou durante surtos. A parvovirose é mais prevalente em crianças em idade escolar, podendo ser assintomática ou se manifestar como cinco síndromes: eritema infeccioso; artropatia; aplasia medular transitória em pacientes com anemia hemolítica crônica; aplasia pura de série vermelha em pacientes imunossuprimidos; e infecção fetal. Anticorpos da classe IgM podem ser detectados 7 a 10 dias após a exposição viral, período que coincide com a infecção sintomática. Imunoensaios para a detecção de anticorpos IgM antiparvovírus constituem o método de escolha para o diagnóstico de infecção ativa em pacientes imunocompetentes.
2. Parvovírus B19 e lúpus eritematoso sistêmico (LES): 25% dos pacientes com parvovirose, geralmente adultos do sexo feminino, apresentam quadro de artralgia e/ou artrite transitória, com padrão reumatoide-símile. Cerca de 35 a 50% desses pacientes também desenvolvem *rash* envolvendo região malar, tronco e extremidades. Autoanticorpos transitórios, incluindo FAN, fator reumatoide e anticorpos antifosfolípidos, são detectados em 25 a 68% dos pacientes com parvovirose, enquanto alterações hematológicas, como anemia, neutropenia e trombocitopenia, e hipocomplementemia ocorrem em 60% dos casos. Portanto, quadro clínico e laboratorial autolimitado semelhante ao do LES pode ser uma das formas de apresentação da infecção por parvovírus B19 (síndrome lúpus-like). Algumas manifestações de LES, como serosite, úlceras orais, anemia hemolítica, lúpus discoide, alopecia e persistência de altos títulos de autoanticorpos, raramente ou nunca são observados no contexto da parvovirose.
3. Parvovírus B19 e FAN: uma parcela expressiva dos pacientes com infecção por parvovírus B19 apresenta autoanticorpos circulantes, entre os quais FAN. Geralmente, infecção viral induz baixos títulos de FAN. FAN associado a parvovirose desaparece em 3 a 6 meses, embora seja relatada persistência prolongada do autoanticorpo após a resolução da infecção.

4. Uma das características mais marcantes da infecção por parvovírus B19 consiste na indução de vários autoanticorpos, incluindo anti-DNA e anti-Sm, considerados marcadores específicos do LES e parte dos critérios de classificação da doença. Mímica molecular é o mecanismo proposto para a geração de autoanticorpos contra DNA e ribonucleoproteínas, no contexto da parvovirose.

- No indivíduo adulto imunocompetente, infecção por parvovírus B19 pode ser assintomática ou se manifestar como artropatia ou síndrome lúpus-like transitória;
- FAN e autoanticorpos específicos, incluindo anti-DNA e anti-Sm, são observados no contexto da infecção por parvovírus B19;
- A resposta sorológica autoimune induzida por parvovírus B19 se caracteriza por FAN reagente em baixos títulos, bem como a presença de autoanticorpos específicos, detectáveis por até 3 a 6 meses após a infecção;
- Início recente de sintomas articulares, cutâneos ou hematológicos associados a FAN reagente, e ausência de algumas características clínicas, como serosite, lesão discoide etc., devem suscitar a possibilidade de infecção por parvovírus B19 ou outros agentes, como diagnóstico diferencial;
- Apesar de preencher os critérios de classificação de LES do American College of Rheumatology (1997) e do Systemic Lupus Collaborating Clinics (2012), o quadro clínico da paciente foi inespecífico e de início muito recente. Mesmo na presença de FAN, anti-DNA e anti-Sm reagente, agentes infecciosos, principalmente parvovírus B19, devem ser avaliados como potencial etiologia de cenário clínico semelhante;
- FAN reagente ocorre não apenas no âmbito das doenças reumáticas autoimunes, como também em várias infecções agudas e crônicas. O uso indiscriminado do exame, muito sensível e pouco específico, para avaliação de pacientes com sinais e sintomas inespecíficos aumenta a probabilidade de detecção de resultados reagentes associados à infecção;
- No contexto clínico e epidemiológico apropriado, teste confirmatório para parvovírus B19 ou outras infecções bacterianas e virais deve ser considerado para todo paciente com FAN reagente e sintomas de início recente (inferior a 6 semanas), especialmente na ausência de quadro clínico inequívoco de doença reumática autoimune.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

COORAY M, MANOLAKOS JJ, WRIGHT DS, HAIDER S, PATEL A. Parvovirus infection mimicking systemic lupus erythematosus. *CMAJ*. 2013;185(15):1342-4.

HOCHBERG MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997 Sep;40(9):1725.

LITWIN CM, BINDER SR. ANA testing in the presence of acute and chronic infections. *J Immunoassay Immunochem.* 2016;37(5):439-52.

PETRI M, ORBAI AM, ALARCON GS, GORDON C, MERRILL JT, FORTIN PR ET AL. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012;64:2677-86.

SÈVE P, FERRY T, KOENIG M, CATHEBRAS P, ROUSSET H, BROUSSOLLE C. Lupus-like presentation of parvovirus B19 infection. *Semin Arthritis Rheum.* 2005 Feb;34(4):642-8.

15 Interferência dos anticorpos humanos circulantes reativos contra proteínas animais (anticorpos antianimais) – *human anti-animal antibody (HAAA)*

INTRODUÇÃO

A perfeição é algo inalcançável, o que também se aplica aos procedimentos de diagnóstico médico, como os testes laboratoriais. Apesar dos cuidadosos esforços dos desenvolvedores e fabricantes de ensaios laboratoriais e da vigilância das equipes de laboratórios clínicos que realizam as análises, todos os exames laboratoriais estão, em algum momento, sujeitos a interferências que provocam resultados falso-positivos ou falso-negativos. Para garantir a qualidade no laboratório clínico, as boas práticas exigem a validação de ensaios em relação a possíveis interferências.

Os efeitos da hemólise, da lipemia e da bilirrubinemia em métodos laboratoriais são bem conhecidos, cada um deles podendo afetar a medida analítica porque produzem alterações espectrofotométricas mensuráveis nas amostras (de soro ou plasma). Os analisadores químicos automatizados detectam rotineiramente esses potenciais interferentes por meio do índice sérico. Desse modo, as amostras para análises bioquímicas são avaliadas prospectivamente quanto a essas potenciais interferências.^{1,2}

A interferência no imunoensaio representa um fator que contribui para a incerteza dos exames laboratoriais imunoquímicos, mas esse tipo de dosagem está sujeito a outros tipos de interferência em comparação às dosagens bioquímicas. As interações antígeno-anticorpo são a sua base e os compostos ou as condições que alteram essas interações podem interferir na medição. Anticorpos endógenos podem se ligar e bloquear os sítios de ligação na captura e sinalização de anticorpos, promovendo resultados falsamente altos ou falsamente baixos.^{3,4}

O imunoensaio continua sendo o método de escolha no laboratório clínico para análise de muitos analitos, particularmente moléculas heterogêneas complexas. Isso não surpreende, uma vez que os imunoenaios envolvem a reação

de reagentes biológicos complexos (geralmente anticorpos) com outros reagentes biológicos complexos (o analito) em uma matriz biológica variável (frequentemente soro ou plasma), aqueles com os quais tal interferência ocorre. Embora geralmente robustos, os imunoenaios permanecem vulneráveis a erros analíticos ocasionais que podem ter sérias implicações para o atendimento do paciente, incluindo aqueles em decorrência do mau funcionamento do equipamento e da falha não detectada no controle de qualidade. Erros esporádicos resultam das propriedades da amostra e são particularmente difíceis de detectar. Podem decorrer da presença de substâncias de reação cruzada, de anticorpos antianálitos ou de anticorpos antireagentes, os quais podem causar resultados erroneamente altos ou baixos. Resultados baixos podem ser observados para marcadores tumorais, em virtude do efeito Hook. Resultados errôneos podem ocorrer inesperadamente com qualquer amostra e não há meios práticos para identificar espécimes capazes de causar problemas em imunoenaios.⁵

A possibilidade de interferência deve sempre ser considerada quando os resultados não parecem estar de acordo com o quadro clínico. Erros podem ocorrer mesmo nos laboratórios mais bem gerenciados e sua investigação inicial é sempre desejável. Se houver qualquer dúvida sobre um resultado, a equipe clínica deve ser incentivada a entrar em contato com o laboratório.⁶

Os profissionais de laboratório devem estar conscientes do potencial de interferência nos imunoenaios, pela possibilidade de resultados errôneos que afetam adversamente o atendimento do paciente. Erros clínicos sérios são mais prováveis quando as decisões sobre o manejo do paciente estão diretamente ligadas aos resultados laboratoriais, meios alternativos de corroborar esses resultados não estão prontamente disponíveis e a dosagem do analito não faz parte de um painel (frequentemente o caso dos marcadores tumorais).

A conscientização dos laboratórios sobre os tipos de interferências mais prováveis de se encontrar em testes e análises específicos, aliada a uma comunicação excelente e proativa com a equipe clínica, é essencial para aumentar a probabilidade de detectar tais erros a tempo de evitar-se um tratamento clínico inadequado ou ineficiente. A decisão deve ser do clínico assistente se os riscos de esperar pela confirmação de um resultado superam os de agir imediatamente.

Erros exógenos, não associados às propriedades da amostra individual e que podem refletir falhas do sistema (p. ex., um pipetador bloqueado em um analisador automático), diferem dos erros decorrentes de interferências endógenas, geralmente dependentes da amostra e muito mais difíceis de detectar.⁵ As causas de ambos os tipos de erro são citadas neste capítulo, mas o foco principal é orientado para a investigação de suspeitas de interferências endógenas e para minimizar o risco de elas afetarem negativamente o manejo clínico.

“Resultado falso-positivo” é um termo geralmente usado para indicar um teste que sugere a presença de doença quando não há nenhuma, ou vice-versa, para dados falso-negativos. Isso pode resultar da prática comum de estabelecer um intervalo de “normalidade” ou “referência estatística” para um analito individual. O intervalo de referência citado para cada teste (incluindo imunoenaios) é obtido usando pontos de corte (95% da população) de continuidade obtidos de indivíduos “normais”. Esse truncamento estatístico provoca alguns dados calculáveis falso-positivos ou falso-negativos, expressos como taxas preditivas falso-positivas e falso-negativas usando a tabela de contingência bem estabelecida. Os termos “falso-positivo” e “falso-negativo” são adicionalmente utilizados em um contexto diferente, sobretudo quando os anticorpos endógenos de imunoglobulinas em alguns doentes imprevisivelmente interferem em imunoenaios, causando resultados analíticos falsos.⁷

Há três tipos de anticorpos endógenos conhecidos por causar interferências em imunoenaios: heterófilos, antianimal e autoanticorpos.

Anticorpos heterófilos são produzidos sem exposição a imunógenos específicos e, portanto, considerados naturais.⁸ Geralmente, os anticorpos heterófilos têm baixa avidéz, mas reagem em várias espécies com a capacidade de se ligar a múltiplos antígenos. Esse tipo de anticorpo pode reagir com avidéz variável a espécies distintas. Além disso, a reatividade a diferentes espécies pode persistir por diferentes períodos no mesmo paciente.⁹⁻¹¹

Anticorpos humanos circulantes reativos contra proteínas animais (anticorpos antianimais) são uma fonte de interferência não reconhecida e, muitas vezes, não reconhecida nem suspeitada em ensaios, em particular imunoenaios de dois locais (sanduíche). Embora muitos HAAA possam ser detectáveis, o laboratório está principalmente preocupado com anticorpos de título e afinidade suficientes para ter um efeito analiticamente significativo.¹²

Os HAAA surgem como resultado da exposição aguda ou crônica a um antígeno-específico (p. ex., agente terapêutico de anticorpo monoclonal de camundongo) e são espécies-específicas.¹³ Em outros casos, os antígenos que deram origem aos anticorpos antianimais são mal definidos.¹⁴

Anticorpos antianimais podem ser suspeitados nos casos em que há uma história de administração de preparações animais, terapêutica ou diagnosticamente, mas não há consenso sobre a incidência nesse grupo de pacientes ou na população em geral.¹⁵

Muitas vezes, anticorpos antianimais passam despercebidos, em detrimento do atendimento ao paciente. Felizmente, há uma crescente conscientização por parte do profissional de laboratório e dos médicos sobre os problemas causados por esse tipo de interferência. É desejável que o pessoal do laboratório e os clínicos mante-

nham-se conscientes sobre os problemas causados por esse tipo de interferência em testes de rotina de imunoensaio. Esforços estão sendo feitos para identificar e eliminar esse tipo de interferência analítica.

Os autoanticorpos também podem interferir nos imunoensaios. Os exemplos incluem anticorpos antitiroglobulina que afetam os imunoensaios de tireoglobulina e os anticorpos anti-insulina que interferem nos imunoensaios para insulina ou peptídeo C.¹⁶ Elevados títulos de anticorpos potencialmente interferentes podem ocorrer em pacientes com infecções recentes, imunizações e transfusões.

Conhecer a incidência, os mecanismos de interferências de imunoensaios e os métodos para a resolução de problemas recomendados é crucial para garantir a qualidade dos resultados dos imunoensaios.¹⁷ Por isso, é importante que haja procedimentos padronizados e sistematizados para identificar os interferentes sempre que possível.¹⁵

NATUREZA DOS INTERFERENTES

Os imunoensaios são suscetíveis a interferências analíticas, incluindo anticorpos endógenos de imunoglobulina a uma taxa de 0,4 a 7%. Centenas de milhões de testes de imunoensaio são realizados anualmente em todo o mundo para medidas de proteínas, hormônios, marcadores tumorais, fator reumatoide, troponina, pequenos peptídeos, esteroides, vitaminas e drogas.

Substâncias endógenas interferentes se dão em pacientes saudáveis e em patologias como propriedades da amostra biológica. As propriedades da amostra são exclusivas dos resultados do paciente e da interferência de uma interação com uma ou mais etapas no procedimento de imunoensaio, de tal modo que a concentração mensurável do analito na amostra ou na ligação do anticorpo é alterada (Tabela 1).

As interferências que alteram a concentração de uma amostra podem ser proteínas (globulinas) ligadas a hormônios e fatores pré-analíticos (p. ex., anticoagulantes, armazenamento das amostras).

As interferências que alteram a ligação com o anticorpo podem ser decorrentes de anticorpos heterofílicos, HAAA ou altas doses do efeito Hook.

Outras proteínas de ligação não suspeitadas no indivíduo também podem causar interferência no imunoensaio interferindo na reação entre os anticorpos do analito e do ensaio.

DEFINIÇÃO

Os HAAA são anticorpos policlonais específicos de alta afinidade, gerados após contato com a imunoglobulina animal. Eles mostram ligação forte e são produzidos em um título alto. Eles podem pertencer às classes IgG, IgA, IgM ou, raramente, IgE.¹⁹

TABELA 1 Métodos para a redução da interferência heterofílica e antianimal em imunoenaios

Remoção dos anticorpos interferentes	Adição de agente bloqueante da mesma espécie como anticorpo reagente	Redesenho do ensaio
Extração do analito a partir da amostra	Inclusão de um ou mais bloqueantes, porque os reagentes dos fabricantes de imunoenaios podem ser insuficientes para superar a interferência	Uso de fragmentos Fab ou Fab'2
Imunoextração	Anticorpos monoclonais de camundongos não imunes	Uso de anticorpos monoclonais quiméricos
Polietileno glicol 6000	Fragmentos de IgG espécie específicos (Fab, Fc)	
Aquecimento para analitos termoestáveis	Reagentes bloqueadores hidrofílicos (HBR) Reagentes inibidores de imunoglobulinas (IIR) Tubos com bloqueadores de anticorpos	

Fonte: adaptada de Selby, 1999.¹⁸

MECANISMO DE AÇÃO

Eles competem com o antígeno do teste em reação cruzada com anticorpo reagente da mesma espécie para produzir um sinal falso.

TIPOS DE HAAA

Esses anticorpos incluem anticorpos contra imunoglobulinas animais (p. ex., anticorpos antimurinos, albuminas animais e glicoproteínas de insetos).²⁰

Anticorpos antianimais devem ser distinguidos dos anticorpos heterófilos de baixa afinidade, um termo originalmente usado para descrever anticorpos IgM associados à mononucleose que aglutinam células vermelhas de ovelha e que têm reatividade mais ampla [p. ex., anticorpos contra proteínas de células vermelhas de diferentes espécies (rato, ovelha, cavalo, coelho, porquinho-da-índia e vaca)], como o anticorpo Paul-Bunnell (uma aglutinina eritrocitária de ovelha que também reage com eritrócitos de cavalo, bovino e caprino).

Os anticorpos antimurinos detectados em humanos (HAMA) constituem um subconjunto de HAAA e são os mais comuns desse tipo de anticorpo, mas também podem ocorrer anticorpos contra cobaias, coelhos, cabras, ovelhas, vacas, porcos e cavalos.²⁰

Os anticorpos endógenos devem ser chamados de HAAA específicos quando há uma história de tratamento médico com imunoglobulina animal e imunoglobulina

da mesma espécie usada no imunoensaio.⁹ A nomenclatura torna-se confusa quando o imunogênio não é conhecido e um anticorpo heterofílico é reconhecido em imunoenaios de camundongo ou outros imunoenaios específicos para animais.

ANTICORPOS DO TIPO ANTICORPOS ANTIMURINOS DETECTADOS EM HUMANOS (*HUMAN ANTI-MOUSE ANTIBODY – HAMA*)

Os HAMA são especialmente prevalentes no soro de trabalhadores que atuam junto a animais e em pacientes com anticorpo monoclonal de camundongo para terapia ou geração de imagens.

A prevalência de interferência por HAMA varia conforme o tipo de ensaio e o analito (0,5 a 60%).

A interferência de HAMA tem sido relatada para inúmeros analitos, incluindo ensaios de marcadores cardíacos,²¹ testes de função da tireoide,²² drogas e marcadores tumorais. Os imunoenaios de dois locais (sanduíche) são mais propensos à interferência de anticorpos para IgG animal no soro e podem reagir de forma cruzada com anticorpos reagentes, especialmente da mesma espécie.

Os HAMA interferem interligando a captura de imunoglobulina e os anticorpos de detecção de imunoglobulina, promovendo resultados falso-positivos.²³

Resultados falso-negativos pela interferência de HAMA também são possíveis em ensaios de dois anticorpos,²⁴ quando o HAMA reage com um dos anticorpos que impedem a reação com o analito.^{15,19} Métodos que usam apenas um anticorpo monoclonal de camundongo em ensaios IMA são menos propensos à interferência do HAMA.

A interferência causada por anticorpos antianimais pode ser eliminada pelo pré-tratamento das amostras ou pelo redesenho do ensaio.

TÉCNICAS PARA DETECTAR ANTICORPOS INTERFERENTES^{25,26}

Elas existem para detectar os anticorpos interferentes de dois tipos de abordagens: retroativa e proativa.¹⁷ A retroativa refere-se aos casos em que o resultado laboratorial é questionado porque não consistente com os achados clínicos ou excede os limites extremos do analito. O enfoque retroativo tem falhas óbvias. Por exemplo, resultados quantitativos, que estão muito além dos valores esperados, serão prontamente sinalizados para certos testes, como estudos de tireoide; no entanto, esse não é o caso da maioria dos testes de marcadores tumorais. As concentrações do hormônio estimulante da tiroide (TSH), característico da doença da tireoide, por exemplo, variam muito menos que as concentrações de gonadotrofina coriônica humana (hCG) na gravidez ou na mola hidatiforme. Portanto, limiares baseados em resultados fisiológicos não são razoáveis para alertar a equipe do laboratório sobre uma possível interferência e não são prá-

ticos em todos os imunoenaios. Casos em que os resultados são erroneamente normais, ou anormais, mas não plausíveis, são mais difíceis de detectar.

Geralmente, a detecção retroativa de resultados falso-positivos ou falso-negativos exige o conhecimento do quadro clínico. Os laboratórios normalmente não recebem informações clínicas suficientes para determinar se o resultado do laboratório é consistente com a condição do paciente. Além disso, o quadro clínico, muitas vezes, é complexo, tornando a interpretação do resultado no contexto clínico além do escopo do pessoal responsável pela revisão e pela liberação dos resultados do teste. Assim, a detecção retrospectiva de interferências de imunoenensaio depende muito dos profissionais de saúde, que podem ter uma percepção limitada do potencial de interferência do imunoenensaio.

Ismail et al. sugeriram um algoritmo que compara os resultados do imunoenensaio com a prevalência da doença.²⁷ Nessa abordagem, resultados positivos para uma doença de baixa prevalência ou negativos para uma doença de alta prevalência são considerados suspeitos.

Uma abordagem proativa introduziria um mecanismo ou procedimento que detectaria a presença de anticorpos interferentes antes de obter ou relatar o resultado. Outro tratamento proativo prévio seria solicitar uma história pertinente do paciente, com preparações de anticorpos monoclonais ou uma história de resultados laboratoriais errôneos. Essa abordagem seria difícil de implantar e provavelmente consistiria em uma estratégia ineficaz, pois não se sabem quantos casos de interferência poderiam ser previstos com esse tipo de informação.

Emerson et al. investigaram a utilidade geral de algumas dessas abordagens e concluíram que a introdução de um protocolo para pré-seleção de todas as amostras quanto à presença de anticorpos interferentes endógenos não se justifica, porque as abordagens foram associadas a uma taxa de eventos muito baixa para fundamentar a implementação de rotina ou com uma prevalência, além de serem inespecíficas demais para serem úteis.²⁶

Vários métodos têm sido propostos para alertar os laboratoristas sobre a presença ou para bloquear os efeitos dessas substâncias interferentes. Alguns autores sugerem abordagens que incluem procurar discrepâncias entre métodos alternativos de medida^{17,28} e explorar os efeitos não lineares do anticorpo interferente, incorporando diluições seriadas em ensaios de rotina, rastreando HAMA com o ensaio Tandem ICON® ImmunoConcentration hCG,²⁹ ou pré-tratamento de amostras com reagentes bloqueadores.^{30,31}

Para detectar a presença de interferentes na amostra, recomenda-se seguir estes procedimentos:

- Repetir a análise com um imunoenensaio alternativo, preferencialmente com anticorpo de espécie diferente ou usando tecnologia alternativa, como cromatografia líquida ou espectrometria de massa em *tandem*;
- Medir o analito antes e depois da adição de agente bloqueador;
- Medir o analito com diluições seriadas da amostra com diluente do fabricante que não contenha imunoglobulinas;
- Em alguns casos, dependendo do analito e da metodologia, aguardar um tempo de intervalo e voltar a medir porque pode se tratar de uma alteração transitória.

TÉCNICAS PARA MINIMIZAR INTERFERÊNCIAS DE ANTICORPOS NOS IMUNOENSAIOS

Métodos para a redução da interferência heterofílica e antianimal em imunoenaios estão resumidos na Tabela 1, incluindo maneiras de remover ou bloquear o anticorpo interferente.

REMOÇÃO DOS ANTICORPOS INTERFERENTES^{18,25,32}

A extração prévia do analito da amostra pode remover a interferência.

A extração prévia do analito da amostra com a técnica de cromatografia em gel pode ser eficaz para remover interferentes.

A imunoextração utilizando anticorpo monoclonal murino ou proteína G imobilizada em esferas de Sepharose tem sido efetivamente utilizada para remover interferências de HAMA.

A interferência antianimal também pode ser removida por precipitação com polietileno (PEG) 6000.³³ O tratamento térmico (70 a 90°C) das amostras tem utilidade limitada porque poucos analitos são estáveis ao calor, não sobrevivendo, portanto, a essas condições de oxidação do anticorpo.

A adição de baixas concentrações de soro ou imunoglobulina da mesma espécie que os reagentes de anticorpos na mistura de reação pode impedir a interferência em algumas amostras, neutralizando ou inibindo a interferência.

ADIÇÃO DE AGENTE BLOQUEANTE DA MESMA ESPÉCIE COMO ANTICORPO REAGENTE

A adição de agente bloqueador nas amostras com HAMA pode ser por:

- Soro não imune, espécie-específica com IgG policlonal, anti-IgG humana ou IgG de camundongo polimerizada;
- Monoclonais de camundongo não imune;
- Fragmentos de IgG [Fc, Fab, F(ab')₂];
- Tubos com anticorpos bloqueadores;
- Reagentes heterofílicos bloqueantes (HBR) ou reagente inibidor de imunoglobulina (IIR).

O agente bloqueador pode ser incluído no diluente do ensaio ou a amostra pode ser pré-tratada antes do ensaio. Soro não imune, IgG policlonal, IgG polimerizada, monoclonal de camundongo não imune ou fragmentos de IgG [Fc, Fab, F(ab')₂] da mesma espécie, usada para aumentar os anticorpos reagentes, são comumente usados como agentes bloqueadores. No entanto, em alguns casos, a adição de um ou mais desses agentes de bloqueio em reagentes de imunoensaio é insuficiente ou não é bem-sucedida na prevenção de interferências.³⁴

A determinação da quantidade exata de bloqueador, suficiente para eliminar a interferência em todas as amostras de pacientes, é difícil de determinar na prática, pois a resposta imune a anticorpos interferentes varia bastante entre os indivíduos. A eficácia do agente bloqueador adicional depende da espécie e da subclasse do bloqueador.^{25,31}

Outro procedimento para detectar e identificar um anticorpo interferente suspeito é o uso de anticorpos bloqueadores comercialmente disponíveis.²⁶ Resultados estatisticamente discrepantes antes e depois da incubação com agente bloqueador seriam indicativos de interferência. Uma diferença entre o valor inicial e o valor tratado de 3 a 5 desvios-padrão (SD) sugere possível interferência heterofílica; > 5 SD indica interferência heterofílica definida.³⁵ No entanto, 20 a 30% das amostras com anticorpos interferentes podem produzir resultados semelhantes após o tratamento com os anticorpos bloqueadores. Vários reagentes de bloqueio estão disponíveis comercialmente: reagente bloqueador heterofílico (HBR; Scantibodies™); reagente inibidor de imunoglobulina (IIR; Bioreclamation™); HeteroBlock® (Omega Biologicals™); MAB33; e Poly MAB 33 (Roche Diagnostics™).³⁶

Outra solução para o problema de interferências de HAAA, refere-se ao uso de fragmentos Fab ou F(ab')₂ em vez da imunoglobulina intacta, como anticorpos de captura ou detector em ensaio de dois locais, eliminando a interferência de HAAA com especificidade para o Fc porção de um anticorpo IgG.³⁷

Outra estratégia é usar anticorpos quiméricos, anticorpos humanos em que as regiões variáveis são substituídas pela parte correspondente de um anticorpo não humano (cobaias ou rato). Interferências por anticorpos anticobaias ou outros animais são eliminadas. Estes últimos são agora utilizados em alguns imunoensaios da Roche™ (Elecsys TSH, CEA, troponina T) como anticorpo de captura ou detector.

Outro teste consiste em fazer diluições seriadas da amostra usando o diluente do fabricante, desde que ele contenha globulina não imune. Isso poderia identificar cerca de 60% das amostras com interferência em que a linearidade e o paralelismo estão ausentes.³⁸

O uso desses testes pode identificar interferência em quase 90% das amostras suspeitas.³⁹

Como a triagem proativa para interferência em todas as amostras não é garantida ou recomendada, torna-se fundamental manter uma comunicação confiável com outros profissionais de saúde para detectar e minimizar o impacto de resultados laboratoriais errôneos.

PAPÉIS E RESPONSABILIDADES NA PROTEÇÃO CONTRA OS EFEITOS ADVERSOS DAS INTERFERÊNCIAS ANALÍTICAS CAUSADAS PELOS ANTICORPOS CIRCULANTES ANTIANIMAIS^{4,15}

Cada membro da equipe de saúde tem um papel a desempenhar na proteção contra os efeitos analíticos adversos dos anticorpos antianimais.

Cabe ao paciente informar o médico sobre qualquer exposição prévia a terapêuticas baseadas em animais ou agentes de diagnóstico (p. ex., agentes de imagiologia).

O médico-assistente deve perguntar ao paciente sobre a exposição prévia a terapias ou tratamentos com agentes de diagnóstico ou exposição a animais (animais de estimação ou manejo). Os médicos devem garantir que pacientes conhecidos por terem tais anticorpos ou em risco de desenvolvê-los em razão da administração de agentes derivados de animais sejam claramente identificados para o laboratório. Esses profissionais também devem estar cientes de que, se os resultados dos testes de imunoenaios de dois sítios, particularmente os marcadores tumorais e os testes hormonais, não se encaixam no quadro clínico, pode se tratar de uma indicação de uma interferência de anticorpos humanos contra animais.

Os fabricantes de conjuntos diagnósticos para imunoensaio de dois locais devem tomar medidas para minimizar as interferências do ensaio; alguns já responderam por reformulação de ensaios, incluindo avisos sobre interferências de HAMA nas bulas.

Os imunoenaios resultantes de pacientes sabidamente expostos a agentes de origem animal devem ser sinalizados no laboratório com sinais de alerta. A equipe do laboratório clínico deve proporcionar um acompanhamento ao corpo clínico sobre a significância das possíveis interferências e estratégias para identificá-las, confirmá-las e superá-las. A área técnica deve investigar e confirmar interferências antianimais, adicionando agentes de bloqueio para amostras e novo teste. Pode, ainda, executar estudos seriados de diluição para testes com a presença de anticorpos antianimais e testar novamente com outro método analítico (com anticorpos de outra espécie animal). A reanálise de amostras após incubação com proteína animal (p. ex., IgG de camundongo) ou soro animal também pode ajudar a confirmar uma interferência. Outra estratégia para proteger contra resultados falso-positivos e falso-negativos atribuíveis a anticorpos antianimais consiste em testar todas as amostras quanto à ocorrência desses anticorpos. Contudo, por se tratar

de uma conduta cara, atualmente está reservada apenas a amostras suspeitas para identificar a presença de um HAAA.

QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS HAMA

Muitos laboratórios de referência conseguem medir o HAMA. Se houver suspeita de interferência do HAMA, a medida quantitativa da concentração de HAMA no soro pode ser útil; no entanto, não existe nenhum imunoenensaio capaz de medir igualmente bem todos os tipos de HAMA encontrados entre os pacientes,⁴⁰ pois vários ensaios diferem nos tipos de HAMA detectados.¹⁵

Estão disponíveis ensaios do tipo *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), utilizando técnica sanduíche com dois sítios com anticorpos selecionados e cegos para HAMA. Neles, após o período de incubação, o HAMA se liga à IgG murina nas paredes do poço da microplaca e as proteínas não ligadas são levadas após enxague. Então, uma peroxidase HRP murina marcada é adicionada e, em cada poço da microplaca, forma-se um complexo envolvendo IgG murina – HAMA – peroxidase HRP marcada. A HRP não ligada é removida após a lavagem. Para a detecção do imunocomplexo, há uma incubação, seguida da leitura espectrofotométrica. A quantidade de imunocomplexo ligado ao HAMA na amostra na parede do poço da microplaca será proporcional à quantidade de HAMA na amostra. Os níveis de *cut-off* devem ser estabelecidos pelos laboratórios clínicos. No ensaio HAMA ELISA, produzido pela empresa Eagle Biosciences™, o nível de *cut-off* é de 25 ng/mL.

Os ensaios disponíveis no mercado têm sensibilidade oscilando de 2 a 5 ng/mL e linearidade de até 1.500 ng/mL. Trabalham com soro ou plasma em pequenos volumes (50 a 100 mL) e o tempo de incubação é variável (1,5 a 2 horas). Seu alvo são HAMA IgG/IgM.

BUSCA DE SOLUÇÕES PARA OS PROBLEMAS DE INTERFERÊNCIAS

O laboratório clínico deve estabelecer uma política para enfrentar essas situações, nas quais se suspeita da interferência, porque tem a capacidade de investigação por meio de uma série de técnicas. Uma abordagem multifacetada para a investigação é preferível a uma estratégia envolvendo apenas uma opção, que pode não resolver definitivamente a discrepância entre os achados clínicos e laboratoriais.

A obtenção do histórico do paciente com relação às eventuais terapias com a preparação de anticorpos monoclonais, à exposição a animais ou às transfusões pode ser útil nesse processo investigatório.

Um método para minimizar o desenvolvimento de HAMA tem sido tratar os pacientes com imunossuppressores, como ciclosporina A, azatioprina, deoxispergualina ou ciclofosfamida antes, durante e após a administração de agentes com HAMA.^{41,42}

A linearidade do ensaio para a amostra em questão pode ser medida, tomando o cuidado de empregar diluentes apropriados. No entanto, a linearidade ainda pode ser observada mesmo na presença de anticorpos interferentes.⁴³

A amostra pode ser enviada para outro laboratório para novo teste usando um método alternativo, como um imunoensaio que emprega uma tecnologia diferente (homogênea *versus* heterogênea; competitiva *versus* não competitiva) e uma fonte diferente de reagente de anticorpo que o imunoensaio original suspeito de exibir a interferência ou um método não imunométrico.

Uma amostra pode ser pré-incubada com reagentes bloqueadores comercialmente disponíveis (alguns envolvem o bloqueio de anticorpos imobilizados na superfície interna de um tubo de ensaio).

Certos analitos podem também aparecer na urina. Como os anticorpos endógenos geralmente não estão presentes na urina, uma discrepância entre as concentrações de urina e soro pode sugerir interferência.

A comparação dos resultados, presumivelmente com a presença de interferentes com aqueles dos valores de analitos relacionados, como no perfil cardíaco, permite analisar conjuntamente CK-MB massa, troponina I e troponina T.

A quantificação dos anticorpos do tipo HAMA em laboratórios de referência pode ser uma boa prática.

CASO CLÍNICO

Paciente do sexo masculino, branco, 64 anos, casado, biólogo exercendo atividade profissional em um biotério. Ao realizar exames laboratoriais para avaliação do estado de saúde, evidenciou-se nível de antígeno prostático específico (PSA) total 4,4 ng/mL. No ano anterior, o resultado observado foi de 3,8 ng/mL. Ambos os ensaios foram realizados por método de imunoensaio, com sensibilidade analítica de 0,05 ng/mL. Portador de hipertensão arterial controlada. O irmão mais velho faleceu de câncer de próstata metastático. Negou uso de biotina. O exame de toque retal digital realizado pelo urologista foi considerado normal. No entanto, a biópsia prostática demonstrou adenocarcinoma de próstata e estadiamento Gleason 3+3. Foi submetido à prostatectomia por cirurgia laparoscópica e o estudo anatomopatológico classificou como de estadiamento Gleason 6 (pT2cNXMX) em 10% da glândula. Houve uma margem positiva focal no ápice esquerdo, mas sem extensão extracapsular. A dosagem do PSA total 2 semanas após a cirurgia foi de 2,25 ng/mL. A repetição do exame resultou em valor de PSA total de 2,17 ng/mL. A dosagem de PSA total realizada 4 meses após a cirurgia manteve nível semelhante ao das dosagens pregressas, com concentração sérica de PSA total de 2,46 ng/mL e PSA livre de 2,71 ng/mL. A presença de interferente foi aventada em razão do PSA livre apresentar valor maior que o PSA total.

Exames de imagem detectaram lesões compatíveis com a doença de Paget no osso do quadril no nível do íleo esquerdo. O exame de cintilografia óssea evidenciou imagens focalmente positivas na região supraclavicular esquerda. A tomografia de tórax não demonstrou presença de linfadenopatia ou tumores. Após 2 anos da primeira dosagem, o PSA total apresentou valor de 0,57 ng/mL e o PSA livre de 2,11 ng/mL. O laboratório optou por realizar análises em diferentes diluições da amostra, na tentativa de minimizar o efeito do interferente e obteve os seguintes resultados:

- Diluição 1:2: PSA livre 2,20 ng/mL e PSA total 0,35 ng/mL;
- Diluição 1:4: PSA livre 2,12 ng/mL e PSA total 0,24 ng/mL.

Com relação às três primeiras amostras coletadas após a cirurgia que ainda estavam armazenadas, a assessoria científica do fabricante do conjunto diagnóstico sugeriu um pré-tratamento adicionando bloqueadores de HAMA às amostras. Os reagentes bloqueadores são antígenos de camundongos que adsorvem o HAMA. Os resultados de PSA total observados antes e após adição do bloqueador foram respectivamente:

- Amostra 1: 2,25 e 0,25 ng/mL;
- Amostra 2: 2,17 e 0,96 ng/mL;
- Amostra 3: 2,46 e 1,03 ng/mL.

A interferência do anticorpo antimurino heterófilo humano foi finalmente confirmada por meio da medição direta do HAMA utilizando um imunoenensaio enzimático (*Human Anti-Mouse IgG Abs EIA*, Specialty Laboratories, Santa Monica, CA, Estados Unidos). A concentração do HAMA na amostra avaliada foi de 440 ng/mL, sendo o limite superior da normalidade, segundo a bula do fabricante do teste, de até 74 ng/mL.

Finalmente, as três amostras de soro coletadas após a cirurgia foram enviadas para outro laboratório que dispunha de reagente bloqueador. O resultado do PSA total foi de 0,05 ng/mL nas três amostras avaliadas, confirmando a interferência do HAMA.

COMENTÁRIO

O valor do PSA total pós-operatório maior que 2 ng/mL não era consistente com a condição clínica do paciente e resultou na necessidade de diversos outros estudos, por meio de exames de imagem para excluir a possibilidade de metástase, em razão da dificuldade do médico-assistente em estabelecer a correlação clínico-laboratorial.

Após suspeita da presença de interferente, determinou-se a presença do HAMA na amostra avaliada, o qual seria o fator que estava induzindo resultados de PSA total e livre falsamente elevados, inclusive com valor de PSA livre maior que o PSA total. Esse fenômeno ocorre pela ligação intrínseca do antígeno ao anticorpo murino que faz parte da composição do reagente em ensaios imunométricos.⁴⁴ Essa situação pode induzir resultados falso-positivos, mesmo na ausência do analito em questão, e se dar para diversos outros marcadores tão diversos quanto a hCG, os marcadores tumorais, a troponina I, entre outros.

Embora o HAMA conduza a uma falsa elevação nos resultados, um valor falsamente inferior também ocorre se o anticorpo interferente bloqueia o local de ligação do detector. Em um estudo, Preissner et al. observaram que a incidência de HAMA variou de 0,2 a 3,7%, com uma incidência de 1 a 1,2% para as dosagens de PSA.⁴⁵

Na averiguação da rastreabilidade, observou-se uma variação lote a lote nas amostras com HAMA positivo, porque diferenças na afinidade do anticorpo e avides com relação ao HAMA podem ocorrer entre lotes diferentes de preparações monoclonais e, especialmente, do anticorpo policlonal. Assim, alguns reagentes são mais afetados que outros.⁴⁶

Finalmente, relatou-se que a diluição seriada da amostra seria capaz de minimizar a interferência. No entanto, essa situação não foi observada nesse caso. Nesse paciente, em particular, a diluição seriada da amostra ajudou a levantar a suspeita da interferência do HAMA, pois observou-se um nível de PSA livre maior que o PSA total. As diferenças no “desenho” dos ensaios para cada fabricante nos testes de PSA livre e PSA total, bem como as diferenças no grau de afinidade do anticorpo entre os lotes de reagentes, ajudam a explicar a estabilidade do valor do PSA livre e uma grande variação no PSA total. Não se observou variação proporcional dos valores de PSA livre em diferentes graus de diluição, pois o resultado esperado seria uma queda proporcional na concentração em razão da maior diluição da amostra. Aproximadamente 50% das amostras contendo HAMA apresentam resultados proporcionais aos da diluição seriada.⁴⁷

O fato de o paciente trabalhar em um biotério, manipulando animais para realização de testes de qualidade em produtos farmacêuticos, induziu o aparecimento do HAMA no sangue, posteriormente confirmado pela dosagem específica desse anticorpo.

Uma das características da prostatectomia em relação à radioterapia é que o PSA pós-operatório resulta em um nível indetectável após o procedimento cirúrgico. Esse caso ilustra que, enquanto se espera tal resultado na maioria dos pacientes prostatectomizados, são possíveis elevações artificiais de PSA.

Em resumo, quando o valor do PSA não consiste com o quadro clínico, deve-se considerar a possibilidade da interferência imunológica. Os ensaios imunológicos baseados em anticorpos de cabra, em substituição ao anticorpo murino, podem ser uma opção para minimizar o problema da interferência pelo HAMA.

REFERÊNCIAS

1. CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Interference testing in clinical chemistry; approved guideline. CLSI document EP7-A2, Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
2. WEBER TH, KÄPYAHO KI, TANNER P. Endogenous interference in immunoassays in clinical chemistry. A review. *Scand J Clin Lab Invest.* 1990;50(Suppl. 201):77-82.
3. ISMAIL AA, WALKER PL, CAWOOD ML, BARTH JH. Interference in immunoassay is an underestimated problem. *Ann Clin Biochem.* 2002;39(pt. 4):366-73.
4. CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Immunoassay Interference by Endogenous Antibodies; Approved Guideline. CLSI document I/LA30-A. Wayne: CLSI; 2008.
5. STURGEON CM, VILJOEN A. Immunoassay error and interference. *Ann Clin Biochem.* 2011;48:418-32.
6. BJERNER J, NUSTAD K, NORUM LF, OLSEN KH, BØRMER OP. Immunometric assay interference: incidence and prevention. *Clin Chem.* 2002;48:613-21.
7. ISMAIL AAA. Interference from endogenous antibodies in automated immunoassays: what laboratorians need to know. *J Clin Pathol.* 2009;62:673-8.
8. LEVINSON SS, MILLER JJ. Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays. *Clin Chim Acta.* 2002;325(1-2):1-15.
9. KAPLAN IV, LEVINSON SS. When is a heterophilic antibody not a heterophile antibody? When it is an antibody against a specific immunogen. *Clin Chem.* 1999;45(5):616-8.
10. ISMAIL AA. Interference from endogenous antibodies in automated immunoassays: what laboratories need to know. *J Clin Pathol.* 2009;62(8):673-8.
11. STURGEON CM, VILJOEN A. Analytical error and interference in immunoassay: minimizing risk. *Ann Clin Biochem.* 2011;48(pt. 5):418-32.
12. KOHSE KP, WISSER H. Antibodies as a source of analytical errors. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1990;28:881-92.
13. PARK S, CADEDDU J, BALKO JA, TORTELLI MW, WIANS FH JR. Persistently elevated prostate-specific antigen level after successful laparoscopic radical prostatectomy. *Lab Med.* 2006;37(8):474-7.
14. LEVINSON SS. Antibody multispecificity in immunoassay interference. *Clin Biochem.* 1992;25:77-87.
15. KRICKA LJ. Human anti-animal interferences in immunological assays. *Clin Chem.* 1999;45:942-56.
16. JAHAGIRDAR VR, STROUHAL P, HOLDER G, GAMA R, SINGH BM. Thyrotoxicosis factitia masquerading as recurrent Graves' disease: endogenous antibody immunoassay interference, a pitfall for the unwary. *Ann Clin Biochem.* 2008;45(pt. 3):325-7.

17. EMERSON JF, LAI KKY. Endogenous antibody interferences in immunoassays. *Lab Medicine Winter*. 2013;44(1):69-73.
18. SELBY C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem*. 1999;36:704-21.
19. KRICKA LJ. Interferences in immunoassays – still a threat. *Clin Chem*. 2000;46:1037-8.
20. NORES GA, DENNIS RD, HELLING F, WIEGANDT H. Human heterophile antibodies recognizing epitopes present on insect glycolipids. *J Biochem*. 1991;110:1-8.
21. WHITE GH, TIDEMA PA. Heterophilic antibody interference with CARDIAC T quantitative rapid assay. *Clin Chem*. 2002;48:201-3.
22. FROST SJ, HINE KR, FIRTH GB, WHEATLY T. Falsely lowered FT4 and raised TSH concentration in a patient with hyperthyroidism and human antimouse monoclonal antibodies. *Ann Clin Biochem*. 1998;35:317-20.
23. PAPOIAN R. Non specific immunoglobulin interactions may lead to false-positive results in assays for human anti-mouse monoclonal antibodies (HAMA). *J Immunassay*. 1992;13(2):289-96.
24. BOSCATO LM, STUART MC. Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin Chem*. 1986;32:1491-5.
25. TATE J, WARD G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev*. 2004; 125:105-20.
26. EMERSON JF, NGO G, EMERSON SS. Screening for interference in immunoassays. *Clin Chem*. 2003;49(7):1163-9.
27. ISMAIL AA, ISMAIL AA, ISMAIL Y. Probabilistic Bayesian reasoning can help identifying potentially wrong immunoassays results in clinical practice: even when they appear ‘not-unreasonable’. *Ann Clin Biochem*. 2011;48(pt. 1):65-71.
28. ZEHENDER G, DE MADDALENA C, GIANOTTO M, CAVALLI B, SANTAMBROGIO S, ORSO M ET AL. High prevalence of false-negative anti-HTLV type I/II enzyme-linked immunosorbent assay results in HIV type 1-positive patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1997;3:1141-6.
29. PREISER W, BRINK NS, HAYMAN A, WAITE J, BALFE P, TEDDER RS. False-negative HIV antibody test results. *J Med Virol*. 2000;600:43-7.
30. NEMZEK JA, NEWCOMB DE, CALL DR, REMICK DG. Plasma interference in an enzyme-linked immunosorbent assay using a commercial matched antibody pair. *Immunol Investig*. 1999;28:209-21.
31. KRAHN J, PARRY DM, LEROUX M, DALTON J. High percentage of false positive cardiac troponin I results in patients with rheumatoid factor. *Clin Biochem*. 1999;32:477-80.
32. SCHIETTECATTE J, ANCKAERT E, SMITZ J. Interferences in immunoassays in chapter 3 advances in immunoassay technology. 2005:45-62.
33. ISMAIL AAA. A radical approach is needed to eliminate interference from endogenous antibodies in immunoassays. *Clin Chem*. 2005;51:25-6.
34. BUTLER SA, COLE LA. Use of heterophilic antibody blocking agent (HBT) in reducing false-positive hCG results. *Clin Chem*. 2001;47(7):1332-3.
35. PREISSNER CM, O’KANE DJ, SINGH RJ, MORRIS JC, GREBE SKG. Phantoms in the assay tube: heterophile antibody interferences in serum thyroglobulin assays. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:3069-74.

36. REINSBERG J. Interferences with two-site immunoassays by human anti-mouse antibodies formed by patients treated with monoclonal antibodies: comparison of different blocking reagents. *Clin Chem.* 1998;44(8 pt 1):1742-4.
37. DASGUPTA A, WELLS A, DATTA P. Effect of digoxin Fab antibody on the measurement of total and free digoxin by fluorescence polarization and a new chemiluminescent immunoassay. *Ther Drug Monit.* 1999;21:251-5.
38. ISMAIL, AAA. On detecting interference from endogenous antibodies in immunoassays by doubling dilutions test. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45:851-4.
39. ISMAIL AAA. Interference from endogenous antibodies in automated immunoassays: what laboratorians need to know. *J Clin Pathol.* 2009;62:673-9.
40. PARK S, CADEDDU J, BALKO JA, TORTELLI MW, WIANS FH JR. Persistently elevated prostate-specific antigen level after successful laparoscopic radical prostatectomy. *Lab Med.* 2006;37(8):474-7.
41. WIEDEN PL, WOLF SB, BREITZ HB, APPELBAUM JW, SEILER CA, MALLET R ET AL. Human anti-mouse antibody suppression with cyclosporin A. *Cancer.* 1994;73:1093-7.
42. CHATENOUD L, BAUDRIHAYE MF, CHKOFF N, KREIS H, GOLDSTEIN G, BACH JF. Restriction of the human in vivo immune response against the mouse monoclonal antibody OKT3. *J Immunol.* 1986;137(3):830-8.
43. ISMAIL AA. Interference from endogenous antibodies in automated immunoassays: what laboratorians need to know. *J Clin Pathol.* 2009;62(8):673-8.
44. BOLLAND MJ, CHIU WW, DAVIDSON JS, CROXSON MS. Heterophile antibodies may cause falsely lowered serum cortisol values. *J Endocrinol Invest.* 2005;28:643-5.
45. PREISSNER CM, DODGE LA, O'KANE DJ, SINGH RJ, GREBE SK. Prevalence of heterophilic antibody interference in eight automated tumor marker immunoassays. *Clin Chem.* 2005;51:208-10.
46. PARK S, WIANS FH, CADEDDU JA. Spurious prostate-specific antigen (PSA) recurrence after radical prostatectomy: Interference by human anti-mouse heterophile antibodies. *Internat J of Urology.* 2006;14:251-3.
47. LEVINSON SS, MILLER JJ. Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays. *Clin Chim Acta.* 2002;3(25):1-15.

INTRODUÇÃO

O teste laboratorial remoto (TLR) também conhecido como teste rápido, teste à beira do leito e, em inglês, *point of care* (POCT), é utilizado como triagem, diagnóstico ou acompanhamento de uma doença. Seu objetivo primário é disponibilizar o resultado de um exame nas situações em que a rapidez representa um fator determinante para a decisão clínica. A tecnologia empregada na concepção dos TLR tem evoluído, possibilitando uma maior confiabilidade no desempenho desses dispositivos e equipamentos; no entanto, a fase analítica constitui apenas uma das etapas do processo. Deve-se garantir o treinamento adequado dos usuários em todas as etapas, incluindo o entendimento dos fatores que interferem na fase pré-analítica e pós-analítica.

O conceito de teste rápido é simples, devendo-se definir os objetivos para a sua realização; contudo, alguns obstáculos ainda persistem para sua implantação nos locais onde é indicado. Além de problemas conhecidos, como disponibilidade da tecnologia com custo razoável e a participação do laboratório em controlar quem o realiza e os exames e resultados obtidos, há o desafio de disponibilizar sistemas de fácil manuseio para aqueles que não têm a mesma formação e experiência dos analistas de laboratório. E, ainda, o teste rápido ideal deveria ser à prova de fatores pré-analíticos e interferentes.

A importância dos cuidados pré-analíticos, o que se aplica a todos os exames realizados em laboratório, também inclui o TLR. Neste capítulo, serão discutidos alguns aspectos dos fatores pré-analíticos, lembrando que vários outros fatores comuns a outras áreas do laboratório também devem ser avaliados para o TLR.

Diversos estudos têm demonstrado erros na fase pré-analítica, oscilando entre 32 e 75% (Plebani, 1997: 68,2%; Wang, 2004:17,0% e Carraro, 2007: 61,9%).

Sabe-se que alguns erros não afetam clinicamente o paciente. Entretanto, há outros que implicam a repetição do exame ou causam investigações desnecessárias, resultando na elevação dos custos ou em tratamento inadequado às necessidades do paciente. Dessa maneira, os laboratórios se preocupam em seguir as boas práticas para garantir a coleta adequada da amostra, pois, se a integridade dessa amostra é questionável, não importa se o resultado obtido é exato ou foi entregue no menor tempo possível.

As normas nacionais e internacionais estabelecem os requisitos para que a realização do TLR garanta resultados confiáveis dentro dos padrões de qualidade e segurança para o paciente.

Normas como o PALC (Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos) da SBPC (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica), a ISO 15189 e os guias norte-americanos [p. ex., do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)] contribuem para direcionar a implantação e o gerenciamento do TLR, abrangendo orientações para a fase pré-analítica.

A Norma PALC estabelece, no item “Gestão dos testes laboratoriais remotos”, que o laboratório clínico deve disponibilizar, nos locais de realização de TLR, procedimentos documentados orientando com relação às fases pré-analítica, analítica e pós-analítica.

A Norma ISO 15189:2007, que trata do gerenciamento da qualidade dos laboratórios clínicos, destaca a importância das fases pré e pós-analíticas para que o laboratório possa assegurar a qualidade e melhoria contínua.

O College of American Pathologists (CAP) estabelece em seus *checklists* que o laboratório deve dispor de procedimentos que descrevam os métodos de identificação e preparo do paciente, coleta e identificação da amostra, conservação e condições de transporte e armazenamento antes da análise, de acordo com as boas práticas dos laboratórios.

ERROS PRÉ-ANALÍTICOS MAIS COMUNS NO TLR

Alguns dos erros mais frequentes na fase pré-analítica do TLR estão relacionados a problemas de identificação, preparo do paciente, coleta, manuseio e transporte da amostra e presença de interferentes.

Identificação

Erros de identificação da amostra são críticos, pois causam erros de diagnóstico, tratamento incorreto do paciente e necessidade de novas coletas. São causados principalmente por falta de identificação correta do paciente, erros de transcrição (quando a identificação é manual) ou falta de um procedimento específico para identificar o paciente e a amostra. Para evitá-los, recomendam-se utilizar a dupla

identificação do paciente (p. ex., nome e data de nascimento), usar um código de barras para identificar a amostra e dar preferência para equipamentos que identifiquem a amostra pela leitura desse código.

Preparo do paciente

Em hospitais, comumente, realiza-se o TLR em pacientes que recebem vários medicamentos; muitas vezes, a amostra é coletada sem jejum adequado pela necessidade de resultados liberados com urgência. Além da alteração de alguns parâmetros em razão do efeito direto da alimentação, ocorre o efeito da lipemia pós-prandial, que contribui para a turbidez da amostra, um fator de interferência para algumas metodologias.

Alguns analitos são afetados pelo estado nutricional ou pelo tipo de alimentação, provocando mudanças na concentração desse analito ou interferência no procedimento analítico (p. ex., glicose, triglicerídeos, corpos cetônicos, pH na urina).

O estresse pode afetar a homeostase de alguns analitos alterando o metabolismo do organismo, como a glicose e alguns hormônios.

Medicamentos e suplementos alimentares também podem aumentar a concentração de alguns analitos ou interferir na análise. Por exemplo, o ácido acetilsalicílico (Aspirina®) em concentração acima de 325 mg/dia pode causar resultado falso-positivo para sangue oculto. A maltose é capaz de afetar alguns métodos de dosagem de glicose.

A atividade física pode afetar a concentração de algumas substâncias, como sangue e proteína, na urina. O ciclo menstrual e a gestação conseguem afetar a presença ou concentração de alguns analitos, como hormônios, urina, glicose e creatinina, enquanto o tabagismo pode resultar no aumento da concentração de alguns metabólitos, como a carboxi-hemoglobina e a meta-hemoglobina.

Coleta

Amostras de sangue venoso, arterial ou capilar são utilizadas para a realização do TLR. Para qualquer tipo de amostra, é importante seguir as orientações de boas práticas de coleta.

Preferencialmente, o laboratório deve descrever o procedimento passo a passo da coleta e realizar o treinamento dos profissionais envolvidos, medidas que contribuem para evitar erros.

A coleta do tipo adequado de amostra requer cuidados para evitar amostras hemolisadas, coaguladas, com volume inadequado, homogeneização insuficiente e contaminação.

A utilização de sangue total heparinizado em equipamentos de TLR permite a eliminação da centrifugação, um passo necessário para obter plasma ou soro. Esse é um fator importante para a maior rapidez na obtenção dos resultados.

Quando se trata de coleta de sangue capilar, é importante evitar massagear o local da punção antes da coleta. Esse procedimento é erroneamente empregado quando o fluxo sanguíneo capilar não é suficiente para obter o volume de sangue necessário para realização do TLR. A massagem excessiva pode ocasionar resultados falsamente diminuídos de alguns parâmetros pela diluição da amostra de sangue pelo líquido intersticial. Também pode ocorrer o aumento da concentração de potássio pela hemólise.

Para evitar esse tipo de erro, não manipular o local da coleta e utilizar lancetas que possibilitem a incisão adequada. Além disso, em pacientes com desidratação grave e circulação periférica prejudicada, deve-se evitar a coleta de amostra capilar.

A coleta de amostra adequada é particularmente importante para analitos que apresentam diferentes valores em sangue arterial, venoso ou capilar (p. ex., glicose e lactato).

A contaminação ou a diluição da amostra com outras substâncias podem causar resultado falso-positivo, diminuição na concentração de alguns analitos ou interferência no procedimento analítico (p. ex., glicose e álcool). As amostras não devem ser coletadas em um braço com infusão de solução intravenosa. É importante assegurar que a pele esteja completamente seca após assepsia com álcool antes da coleta.

A coagulação parcial ou a quantidade inadequada de amostra podem causar resultados incorretos, como o fato de a contagem de plaquetas em sangue parcialmente coagulado ser capaz de causar resultados falsamente diminuídos. A coleta deve ser realizada o mais rápido possível para evitar coagulação.

Para evitar os erros citados, é importante descrever as orientações e os cuidados em um procedimento documentado. Os fornecedores também podem contribuir com informações para evitar os erros pré-analíticos.

Manuseio e transporte da amostra

Um dos problemas pré-analíticos que podem resultar na alteração nos resultados é o transporte das amostras. A realização do TLR imediatamente após a coleta minimiza ou exclui a perda da estabilidade da amostra, motivo pelo qual caracteriza uma das vantagens do TLR em comparação às metodologias de referência. Caso não se realize o exame imediatamente, os possíveis erros serão semelhantes aos encontrados em outras áreas do laboratório.

Interferentes

É raro encontrar um TLR não suscetível a interferências por contaminantes, normalmente encontrados no sangue ou nos líquidos biológicos. Faz-se um grande esforço para garantir que os aparelhos lançados no mercado sofram o mínimo de interferência. Os primeiros medidores de glicemia sofriam interferência pela presença de hemoglobina, sendo realizados, por isso, esforços quanto à separação das hemácias ou à filtração. Outras situações, como nível elevado de hematócrito, bilirrubina, triglicerídeos, medicações terapêuticas etc., foram documentadas e alterações nas metodologias são incorporadas para superar essas interferências nos resultados (p. ex., filtração ou cromatografia).

Com frequência, hemólise, icterícia e lipemia podem interferir na detecção óptica de produtos de reação para cálculo dos resultados. No entanto, há métodos não ópticos baseados em eletrodo íon seletivo (ISE), condutividade, eletroforese etc., que não são sensíveis à alteração de cor da amostra. Hemólise, icterícia e lipemia podem causar não apenas interferência óptica, mas também química.

A hemólise *in vitro* ocorre em virtude da destruição mecânica das hemácias durante a coleta, o transporte, o processamento ou o armazenamento (se o soro ou plasma permanece em contato com as células após a centrifugação) da amostra. A hemólise também pode ser causada por congelamento, choque hiperosmótico, detergentes, aumento da fragilidade osmótica por doenças hereditárias etc.

Em amostras ictericas, a interferência é causada pelo aumento da concentração de bilirrubina, que pode impactar nas medições quando as leituras são realizadas no espectro de 400 a 540 nm ou por interferência pela sua reatividade química com componentes dos reagentes como H_2O_2 .

A lipemia é causada pela presença de gorduras no sangue. Outras possíveis causas de turvação no soro e plasma são fragmentos de hemácias, leucócitos e plaquetas e coágulos de fibrina. Independentemente da causa da turbidez, a consequência é a dispersão da luz durante a leitura da reação, afetando, portanto, os métodos baseados em nefelometria e turbidimetria.

PREVENÇÃO DOS ERROS PRÉ-ANALÍTICOS EM TLR

Os princípios analíticos básicos de muitos equipamentos TLR para bioquímica ou imunoquímica são similares aos equipamentos de referência utilizados no laboratório. A principal diferença está relacionada à utilização de um método analítico que possibilita a utilização de sangue total ou a inclusão de uma etapa de remoção das hemácias antes da análise.

Para prevenir a interferência das hemácias nas análises, alguns equipamentos, como o Reflotron® da Roche Diagnóstica, um dos mais antigos modelos de sistema de teste rápido para Bioquímica Clínica, utiliza em sua tira múltiplos reagentes localizados ao

lado de uma camada de separação do plasma que filtra as hemácias; assim, o plasma flui para um reservatório. A reação se inicia quando a tira é inserida no fotômetro que pressiona a camada de reagente em contato com o plasma no reservatório.

Normalmente, os reagentes utilizados para TLR são específicos, devendo ser armazenados conforme as instruções dos fabricantes, além de utilizados de acordo com a data de validade estabelecida. Esses reagentes estão sujeitos a deterioração se armazenados incorretamente; portanto, devem ser descartados se detectada qualquer falha em sua conservação para evitar a obtenção de resultados incorretos.

Quando houver discrepância entre o resultado do paciente e sua condição clínica, os testes devem ser repetidos após nova coleta para confirmar os resultados.

Algumas características dos equipamentos que minimizam riscos no pré-analítico que interferem nos resultados são:

- Aspiração da amostra em vez de injeção;
- Detecção de volume da amostra para prevenir dosagem em volume insuficiente;
- Detecção de coágulo na câmara de análise.

O processo de validação do TLR deve incluir o estudo de interferentes, além das conhecidas avaliações da precisão e exatidão, para que seja conhecida a equivalência com relação aos métodos utilizados no laboratório.

É importante que os resultados dos TLR estejam em conformidade com os resultados do laboratório, porque a conduta médica será definida pela combinação dos resultados de ambos os sistemas analíticos.

A necessidade de validação e acompanhamento dos resultados de TLR é um dos motivos da necessidade de envolvimento do laboratório desde o início da implantação de TLR em um hospital ou em outro serviço que venha a utilizá-los.

Os TLR são conhecidos como simples e fáceis de operar em relação aos métodos utilizados no laboratório e, idealmente, precisam ser à prova de erros, ou seja, devem permitir sua utilização por operadores que não sejam especialistas na área laboratorial. Apesar de serem considerados métodos simples, os processos de verificação de desempenho devem ser realizados por profissionais de laboratórios, capacitados para esse fim.

MONITORES DE GLICEMIA

Os monitores de glicemia são amplamente utilizados para controle da glicose de pacientes diabéticos.

A correlação entre os glicosímetros e o laboratório de referência assume que os dois métodos têm calibração comparável. No entanto, existe uma diferença na concentração de glicose entre o plasma e o sangue total de aproximadamente 11%,

conforme o hematócrito da amostra, sendo a glicose no sangue total mais baixa que a glicose no plasma.

Essa diferença se baseia na distribuição da glicose na porção aquosa do sangue e o conteúdo mais baixo de água dos eritrócitos comparado com a parte líquida do sangue. Enquanto os laboratórios usam amostras de plasma ou soro, os glicosímetros aceitam sangue total. Por meio da calibração ou das correções matemáticas, os glicosímetros podem promover resultados equivalentes.

Os monitores de glicemia ou glicosímetros apresentam desempenho variado quando comparados ao do laboratório e, também, entre si (Tabela 1). Os testes de proficiência demonstram essa variação (*Quality Cross Check – Whole Blood Glucose* do American College of Pathologists).

TABELA 1 Variação de resultados entre glicosímetros de diferentes modelos e marcas

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Monitor 1	430 mg/dL	69 mg/dL	159 mg/dL
Monitor 2	404 mg/dL	49 mg/dL	115 mg/dL
Monitor 3	396,5 mg/dL	99 mg/dL	206 mg/dL

Os monitores 1, 2 e 3 pertencem a diferentes fornecedores e os valores obtidos na mesma amostra variam de 49 a 99 mg/dL, quando se observam, por exemplo, os resultados da amostra 2.

Os fornecedores justificam que essas diferenças decorrem da estabilização química da amostra. Enquanto novos aparelhos passaram a apresentar maior exatidão do que as primeiras gerações, os resultados ainda apresentam grande variabilidade.

As diferenças de precisão e exatidão podem estar relacionadas a um efeito-matriz, assim como a variação da calibração entre os aparelhos. Outro fator de erro é a inadequada utilização dos glicosímetros pelos operadores.

Para utilização em hospitais, os aparelhos devem ter melhor desempenho que aqueles usados pelos pacientes para acompanhamento. Também se indica a utilização de equipamentos mais robustos que os monitores de uso domiciliar, que permitam a identificação do operador, a identificação do paciente por código de barras, a dosagem obrigatória de controles de qualidade com bloqueio de operação no caso de resultados inadequados, a transmissão de resultados via interface e outras características que possibilitem o melhor controle da operação.

Nos hospitais, o mesmo aparelho pode ser usado em múltiplos pacientes e os resultados se alternam com aqueles realizados no laboratório, enquanto o uso domiciliar implica um único operador e seus próprios resultados.

O treinamento consistente e padronizado para os usuários é importante, assim como a frequência de uso do aparelho.

CONCLUSÃO

De acordo com o CLSI POCT07-07, o TLR pode oferecer vários benefícios em relação ao laboratório central, como: acesso rápido aos resultados do paciente pelo médico antecipando a decisão clínica, o que contribui para o tratamento; eliminação ou redução drástica do tempo de transporte da amostra, diminuindo as interferências na estabilidade da amostra, o que pode ser crítico para alguns testes (como gasometria e lactato); menor risco em etapas pré-analíticas (como transporte e identificação das amostras); e menores perdas na coleta e utilização de menor volume de sangue em comparação ao laboratório central, fator importante especialmente nas unidades de terapia intensiva e pediatria. Para que seja possível alcançar esses benefícios, o gerenciamento do TLR deve buscar sempre a melhoria dos processos por meio de padronização e treinamento constantes. Esse desafio se aplica a todas as fases do processo analítico, incluindo a fase pré-analítica.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Essential tools for implementation and management of a point-of-care testing program. CLSI document POCT04. Wayne: CLSI; 2016.

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Procedures and devices for the collection of diagnostic capillary blood specimens. CLSI document GP42-A6. 6. ed. Wayne: CLSI; 2008.

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture, approved Guidelines – CLSI document GP41-A6. 6. ed. Wayne: CLSI; 2007.

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Quality management approaches to reducing errors at the point-of-care. CLSI document POCT07-A. Wayne: CLSI; 2010.

CAP (COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS). All common checklist; 2017.

CAP (COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS). Point-of-care-testing checklist; 2017.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). Determination of analytical performance goals for laboratory procedures based on medical requirements. Technical Report ISO/DIS 15196, ISO/TC 212/WG 3/N70, 2001/05/30.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). Point-of-care testing (POCT) – requirements for quality and competence, Document ISO 22870:2006. Geneva: ISO; 2006.

LEWANDROWSKI K, GREGORY K, MACMILLAN D. Assuring quality in point-of-care testing. Evolution of technologies, informatics, and program management. Arch Pathol Lab Med. 2011;135:1405-14.

PLEBANI M. Does POCT reduce the error in laboratory testing? Clin Chim Acta. 2009 Jun;404(1):59-64.

PLEBANI M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine. Clin Chem Lab Med. 2006;44(6):750759.

SBPC/ML (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL). Programa de Acreditação em Laboratórios Clínicos (PALC) da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial; 2016.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).



Diabetes

HemoCue® Glucose 201 RT

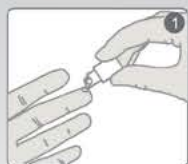
Resultados precisos

Diagnóstico e monitoramento

Analizador com resultados laboratoriais quantitativos para diagnóstico de Diabetes e controle glicêmico. Confiabilidade de análise permitindo ação imediata.



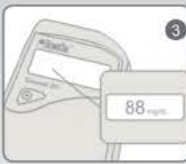
Teste em três etapas simples



Encha a microcuveta



Coloque no Glucose



Verifique o resultado

- Método de precisão laboratorial: Glucose Desidrogenase alterada com resolução por fotometria
- 4 µl de sangue total, capilar, venoso ou arterial
- Resultados em até 60 segundos
- Dispensa manutenção preventiva e calibrações posteriores
- Registro ANVISA 10033120873

BIODINA
BRASIL

DIABETES MELITO (DM)

O DM compreende um distúrbio crônico de caráter multifatorial, não se tratando de uma única doença, mas de um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, resultante da deficiência absoluta ou relativa da produção de insulina, associada ou não a graus variáveis de resistência insulínica.¹ Constitui um importante e crescente problema de saúde, com estimativa, de acordo com a International Diabetes Federation (IDF), de 415 milhões de pessoas com diabetes em 2015, com projeção para 642 milhões em 2040.² Em 2016, a prevalência brasileira estimada pelo VIGITEL é de 8,9%, contabilizando um aumento de 61,8% na última década.³

A classificação atual do DM proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela American Diabetes Association (ADA) inclui quatro classes clínicas.^{1,4,5} O DM tipo 1 abrange 5 a 10% dos casos, caracterizando-se por destruição variável de células betapancreáticas e consequente deficiência de insulina, imunomediada ou idiopática. O DM tipo 2, presente em 90 a 95% dos casos, consiste em defeitos na ação e na secreção da insulina, causando resistência à insulina, o que está atribuído a hábitos de vida (sedentarismo e obesidade), bem como a forte predisposição genética. Já diabetes gestacional, por si, é intolerância à glicose detectada durante a gestação sem DM prévia, compreendendo um dos fatores de risco de DM2 para a gestante e complicações para a mãe e o feto. Por fim, outros tipos específicos de DM são formas menos comuns, contemplando defeitos genéticos na função das células beta e/ou ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino e outras condições, como medicamentos (p. ex., glicocorticoide, neurolépticos atípicos).

Para reduzir as complicações e otimizar terapêutica do diabetes, é necessário garantir o bom controle glicêmico, isto é, níveis glicêmicos dentro da faixa de norma-

lidade com o maior tempo no alvo. Um dos recursos mais utilizados é a medição de glicemia capilar, que pode ser realizada em centros de saúde e em domicílio. O automonitoramento da glicose capilar permite que os próprios pacientes avaliem a resposta individual à terapia e, também, ajuízem se as metas glicêmicas recomendadas estão sendo efetivamente obtidas.^{4,6} O automonitoramento glicêmico é universalmente aceito para DM tipo 1 e é fundamental para o controle de DM tipo 2.⁷

TESTE LABORATORIAL REMOTO (TLR) DE GLICOSE E SUA IMPORTÂNCIA PARA O GERENCIAMENTO DO DM

O teste laboratorial remoto (TLR) ou *point of care testing* (POCT) de glicose ou glicosímetro compreende uma ferramenta que permite saber em tempo real qual o valor da glicemia capilar, representando, hoje, uma facilidade no cuidado de afecções agudas e crônicas. A amostra de sangue é retirada de vasos capilares da ponta do dedo ou do lobo da orelha ou, ainda, de locais alternativos, como palma da mão, braço, antebraço, coxa e panturrilha. Considera-se a verificação da glicemia capilar o padrão de referência do cuidado aos indivíduos portadores de DM.⁴

O sistema de verificação de glicemia capilar compreende um sistema de avaliação laboratorial em uso na beira do leito, em centros de saúde ou na residência dos pacientes. Regulamentados como TLR de glicose, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) normatiza a utilização desses sistemas, afirmando que se deve ter o mesmo cuidado com os demais sistemas laboratoriais.⁸

No ambiente hospitalar, o monitoramento da glicemia capilar é considerado o sexto sinal vital – associado à pressão arterial, temperatura, dor, frequência cardíaca e respiratória – e faz parte do cuidado ao paciente crítico, em ambientes como terapia intensiva e pronto-socorro e durante procedimentos cirúrgicos, mesmo não sendo diabéticos.⁹ Tanto a hiperglicemia quanto a hipoglicemia podem aumentar a morbimortalidade em pacientes hospitalizados clínicos e cirúrgicos.^{9,10} No ambiente ambulatorial e domiciliar, alguns estudos epidemiológicos prospectivos demonstraram que o tratamento e o monitoramento intensivo contribuíram com a redução significativa das complicações, como o estudo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) para DM tipo 1¹¹ e o *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) para DM tipo 2.¹² Do mesmo modo, o monitoramento de rotina da glicemia em diabetes gestacional minimiza as complicações para a mãe e o bebê.¹³

CONCEITOS TECNOLÓGICOS SOBRE TLR DE GLICOSE

Para a medição adequada da glicemia pela tira reagente, é necessário garantir a conversão acurada da concentração de glicose em um sinal específico, o que deve ser feito a partir de uma pequena gota da amostra de sangue total.¹⁴ O TLR de glicemia é um sistema complexo, com duas partes essenciais: química da tira reagente (reação enzimática) e equipamento detector.

Química da tira reagente

Como a molécula de glicose é pequena e difícil de medir diretamente, todos os dispositivos médicos atuais de medição usam uma técnica enzimática indireta, pela química da tira reagente.¹⁵ Os glicosímetros utilizam duas tecnologias básicas:^{16,17}

- Glicose oxidase (GOD): catalisa a oxidação de glicose que utiliza oxigênio, como o aceitador de elétrons externo, liberando peróxido de hidrogênio, cuja concentração é proporcional à da glicose na amostra. Utiliza flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como cofator;
- Glucose desidrogenase (GDH): catalisa a oxidação de glicose ao transferir elétrons para vários aceitadores de elétrons que não o oxigênio, subdivididas de acordo com os seus cofatores redox, componentes não proteicos essenciais naturais ou artificiais que atuam como o aceitador primário de elétrons, como flavina adenina dinucleotídeo (FAD), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), pirroloquinolina quinona (PQQ) e variação mutante de PQQ (mut-Q).

Curiosamente, enquanto os GOD dependem da concentração oxigênio, os GDH de FAD não conseguem utilizar oxigênio, apesar de terem o mesmo cofator redox e com semelhanças estruturais significativas ao GOD.¹⁶

Equipamento detector

Podem ser classificados de acordo com o método de leitura, isto é, biossensores que identificam os níveis de glicemia de maneira quantitativa¹⁷ detectados e medidos por um transdutor.¹⁸ São duas metodologias de leitura:¹⁹

- Colorimétrico (medida da cor final da reação por fotometria ou luminescência, fluorescência ou elipsometria ou reflectância): o produto ou o corante pela reação química determinam a intensidade de mudança da cor, proporcional à glicose presente na amostra. Uma fonte de luz emite um comprimento de onda específico na tira de teste e a fotometria de reflectância quantifica a intensidade do produto colorido pela reação química;
- Eletroquímico (potenciométrico ou amperométrico ou condutimétrico): os elétrons gerados durante a reação química determinam um nível de corrente elétrica, que é proporcional à glicose presente na amostra. A eletroquímica quantifica o número de elétrons gerados pela oxidação da glicose.

CUIDADOS COM O EQUIPAMENTO TLR DE GLICOSE

Calibração, controle da qualidade e codificação

A utilização de qualquer equipamento de medição exige uma calibração inicial e procedimentos de controle da qualidade para garantir a exatidão e a precisão. Em

TLR de glicose, aplica-se um conceito de codificação das tiras reagentes, na qual o equipamento reconhece o lote da tira e recebe informações para calibração do glicosímetro. Há diferentes modos de calibragem:

- *Chip* com codificação;
- Tira especial com código inserido;
- Botões para inserção de um código informado na caixa de tiras reagentes;
- Autocodificação.

A codificação deve ser realizada quando se utiliza o glicosímetro pela primeira vez, ao abrir uma nova caixa de tiras reagentes, ou quando houver aviso de erros emitido pelo glicosímetro. A resolução RDC n. 302 descreve a necessidade de o usuário sempre verificar a codificação e manter um registro atualizado das informações.⁸

Contaminação e segurança

O Centers for Disease Control and Prevention National Center (CDC) orienta que, idealmente, os monitores de glicemia devem ser atribuídos individualmente; e, caso o monitor seja compartilhado, deve ser limpo e desinfetado após cada uso, de acordo com o fabricante, para evitar não somente a contaminação cruzada, mas também da área reagente. Se o fabricante não especificar a respeito disso, então o monitor não deve ser compartilhado.²⁰ Além disso, tanto as lancetas quanto a tira reagente são de uso único e individual. Nunca reutilizá-las no mesmo paciente ou em mais de uma pessoa, sendo descartadas em recipiente apropriado.²⁰ Tais recomendações estabelecem a segurança do operado, o adequado controle e a prevenção de exposição a material biológico e de infecções, principalmente ao vírus da hepatite B, a respeito do qual houveram reportes de transmissão por uso inadequado e inseguro do aparelho.²¹

ANÁLISE LABORATORIAL

Fase pré-analítica

Amostra de sangue

A amostra de escolha dos glicosímetros é o sangue total, cujo processamento viabiliza facilmente o processo, visto que o espécime biológico não necessita de preparo pré-analítico, garantindo o processamento em regiões sem infraestrutura e sem exigência elétrica e hidráulica.²²

Existem várias diferenças bioquímicas nos diferentes tipos de amostras de sangue total (capilar, venosa, arterial e neonatal), quando comparadas, que impactaram nos TLR de glicose:²³

1. Concentração de hemoglobina;
2. Volume de células;
3. Relação entre os itens 1 e 2 (hematócrito);
4. Quantidade de água (viscosidade);
5. Pressão parcial de oxigênio;
6. Níveis de bilirrubina;
7. Anticoagulantes;
8. Drogas e substâncias endógenas interferentes;
9. Diferenças na quantidade de glicose em cada amostra.

Certos tipos de amostras não são recomendados para uso com alguns sistemas de monitoramento. Concentrações de glicose podem diferir entre os diferentes tipos de amostras recolhidas ao mesmo tempo a partir do mesmo indivíduo; concentrações de glicemia capilar são até 30 mg/dL mais elevadas que as concentrações venosas de um indivíduo que recentemente ingeriu alimentos.²⁴

Os fatores que causam imprecisões em recém-nascidos são concentrações de hematócrito, acidose metabólica, pressão parcial de oxigênio e níveis de bilirrubina. Dispositivos para uso em neonatos, especificamente, devem fornecer dados que demonstrem a precisão e exatidão na margem de 10 a 50 mg/dL.²⁴

Os eritrócitos metabolizam a glicose, de modo que a glicólise diminuirá a concentração de glicose em uma amostra a uma taxa de 5 a 7% por hora, desde que o soro/plasma permaneça em contato com os glóbulos vermelhos.²⁴ No glicosímetro, a concentração da glicose dosada é a que está exclusivamente na porção aquosa do sangue. Assim, a alteração no hematócrito pode interferir na medida da concentração.²² O hematócrito compreende um dos fatores mais importantes que influenciam a acurácia da glicemia nos glicosímetros. O número de células vermelhas no sangue total é variável, o que altera o fluxo e o volume de plasma que entra em contato com os reagentes das tiras dos glicosímetros. A tendência é de que ocorra redução da glicemia quando do aumento no hematócrito.²⁵ Em consequência, quando utilizado em algumas populações, como recém-nascidos que apresentam hematócrito elevado,²⁶ a recomendação é que se respeite o intervalo de referência recomendado pelo fabricante.

Um dos possíveis erros pré-analíticos se dá quando não consegue obter uma amostra de sangue de volume adequado ou qualquer amostra, o que resulta em informações indesejadas do nível glicêmico e em uma tomada de decisão errônea. Cada equipamento necessita de um volume adequado para que a reação química ocorra de maneira ideal. Assim, o glicosímetro deve ser capaz de detectar amostragem suficiente de sangue e informar o operador sobre eventuais erros no volume de sangue analisado.²¹

Conservação do TLR de glicose

As tiras de teste para medição de glicemia são sensíveis à umidade, à temperatura e ao tempo de exposição no ar ambiente. Em temperaturas extremas, as enzimas responsáveis pela reação química podem sofrer um processo de desnaturação e inativação.²⁷ Embora embaladas em estado seco, a exposição das enzimas à umidade pode, prematuramente, reidratar as proteínas e limitar a sua reatividade para medição. Altas temperaturas e alta umidade relativa podem trazer resultados mais baixos de glicemia.²⁸ Os medidores de glicose não devem ser submersos em água durante a limpeza e precisam ser protegidos da umidade. O manuseio e o armazenamento adequados dos monitores de glicemia, incluindo as tiras de teste, bem como o bom desempenho do processo, compreendem pré-requisitos obrigatórios para resultados confiáveis e acurados.²⁹

Interferentes analíticos

Os resultados obtidos no automonitoramento de glicemia capilar são confiáveis em razão do elevado grau de exatidão dos resultados. No entanto, vários fatores, como erros de aplicação, condições ambientais extremas, valores extremos de hematócrito ou interferências medicamentosas, podem falsear as leituras de glicose no sangue, as quais, por sua vez, são capazes de resultar em erros de tratamento (p. ex., uma dosagem incorreta de insulina). Portanto, a equipe de diabetes e os pacientes devem estar bem informados sobre limitações no teste de glicose no sangue.²¹

As principais enzimas utilizadas por tiras de teste são a glicose oxidase (GOD) ou a glicose desidrogenase (GDH), além de suas formas derivadas.¹⁶ Interferências são inerentes ao processo e dependem da tecnologia da tira reagente e do método de detecção. São de ordem fisiológica, operacional ou ambiental – desde variância no *design* e na fabricação de tiras reagente, a técnica do operador (paciente ou profissional) em realizar o teste e limpeza dos dedos, a calibração apropriada do medidor com código até a química e a reação cruzada com substâncias interferentes (Tabela 1).³⁰

TABELA 1 Interferentes potenciais para TLR de glicose

Ambiental	Operacional	Fisiológica	Medicamentos
<ul style="list-style-type: none">• Ar, exposição da tira de teste• Altitude• Umidade• Temperatura	<ul style="list-style-type: none">• Hemólise• Anticoagulante• Tira de teste genérica• Volume da amostra• Reúso da tira de teste	<ul style="list-style-type: none">• Hematócrito• Oxigenação• pH• Hiperlipidemia• Pré ou pós-prandial• Bilirrubina	<ul style="list-style-type: none">• Açúcares não glicose (maltose, galactose, xilose)• Manitol• Ácido ascórbico• Acetaminofeno• Salicilato• Antibióticos

Qualquer anemia, pela diminuição do hematócrito, pode resultar em valores inapropriadamente elevados de glicemia, assim como o hematócrito elevado pode subestimar níveis de glicose.³¹ Consequentemente, quando utilizado em algumas populações, a exemplo de recém-nascidos por terem hematócrito elevado, a recomendação é que se respeite a instrução do fabricante quanto ao tipo de amostra e ao intervalo de referência recomendado.²² Como todos os glicosímetros devem ter esse informativo, atentar-se sempre ao tipo de amostra e à faixa de hematócrito atendida para a adequada medição da glicemia, principalmente quanto da utilização de amostras diferentes de capilar e em anemias e na policitemia.²⁵

Substâncias redutoras exógenas, como ácido ascórbico, ácido úrico e acetaminofeno, podem interferir na reação, com as leituras de glicose falsamente mais baixas em GOD, por consumirem o hidrogênio e peróxido de hidrogênio e a reação ser incompleta, e mais altas em GDH por oxidação do eletrodo.¹⁵

Altas concentrações de colesterol, triglicerídeos e bilirrubina podem interferir em algumas metodologias por aumentarem a concentração de componentes celulares na amostra de sangue, resultando em pseudo-hipoglicemia, isto é, resultados falsamente baixos de glicose. Em pacientes em estado grave com choque circulatório, a redução da perfusão periférica aumenta a extração de glicose tecidual, resultando no aumento da discrepância entre a glicemia capilar e a venosa.^{15,29,30}

Interferência por uso de salicilatos pode ocorrer com sistemas baseados em química GOD e normalmente produz resultados falsamente baixos.^{15,32} O uso intravenoso de ceftriaxona pode induzir queda nos níveis de glicemia em sistemas com a química mut-Q-GDH em um curto espaço de tempo logo após a infusão (por 1 e 4 horas se houver a aplicação de 1 e 2 g, respectivamente).

Em outros açúcares não glicose (galactose, xilose e maltose), o mecanismo de interferência para as químicas baseadas em GDH refere-se à não distinção deles da glicose, ocorrendo uma superestimação do resultado. A maltose pode estar elevada em indivíduos submetidos à diálise peritoneal com fluido que contenha icodextrina, assim como naqueles que recebem terapias com imunoglobulinas, em infusão intravenosa que contenha grandes quantidades de maltose como estabilizador. Nesses casos, não se recomenda o uso de glicosímetros baseados em GDH-PQQ.³³ As concentrações de galactose podem estar elevadas na galactosemia hereditária, não se recomendando a utilização de glicosímetros baseados em GDH, principalmente em grupos de risco para galactosemia. A xilose pode interferir em químicas GDH-NAD e GDH-FAD quando o paciente é submetido a teste da xilose, à medida que a metabolização do fármaco se dê na corrente sanguínea.¹⁶

TLR de glicose baseado em GOD depende do oxigênio para sua reação enzimática. Uma das possíveis fontes de erro consiste na variação da concentração de oxigênio.¹⁶ Na literatura, sabe-se que a alta pressão parcial de oxigênio em pacien-

tes que recebem oxigenoterapia pode reduzir falsamente os resultados dos glicosímetros para medidores com base em glicose oxidase, enquanto a hipóxia consegue elevar falsamente os resultados de glicose,^{19,30,34-36} mesmo quando o fabricante não informa esse limitante.³⁷ Historicamente, a GOD foi usada de maneira predominante para a medição de glicemia; no entanto, as tiras reagentes baseadas nessa enzima apresentam uma dependência de oxigênio significativa. Para superar essa limitação – especialmente no cenário clínico no qual são utilizadas amostras de sangue de origem diferente (arterial, venosa, capilar) –, a enzima GDH foi utilizada para desenvolver tiras de teste sem uma dependência de oxigênio.³⁷⁻³⁹

No entanto, é oportuno considerar a possibilidade dessa interferência diante de um resultado clinicamente inconsistente de glicemia, quando do descarte das causas mais comuns de interferência metodológica. É importante compreender as propriedades e limitações básicas das enzimas e dos métodos de leitura empregados, além dos princípios subjacentes à sua atividade catalítica, para evitar perigos potenciais.

Fase analítica

ISO 15197:2013

Independentemente da tecnologia utilizada e dos fatores interferentes, o fabricante deve garantir a acurácia do equipamento de acordo com as especificações determinadas pela International Organization for Standardization (ISO) 15197:2013.⁴⁰ A avaliação mínima deve ser realizada com 100 indivíduos diferentes tomando medidas duplicadas de cada um dos três lotes de reagentes. Para a acurácia analítica, exige-se que 95% dos resultados estejam dentro do intervalo:

- Os resultados do glicosímetro devem atingir os critérios de acurácia de ± 15 mg/dL dos valores obtidos no laboratório em concentrações de glicemia < 100 mg/dL;
- Os resultados do glicosímetro devem atingir os critérios de acurácia de $\pm 15\%$ dos valores obtidos em laboratório em concentrações de glicemia ≥ 100 mg/dL.

Para a precisão, o critério de aceitação está relacionado à acuracidade, isto é, coeficiente de variação (CV) menor ou igual 5% em concentração de glicose. O padrão ISO indica que a calibração do medidor com soluções de controle de qualidade deve ser realizada de acordo com as instruções do fabricante, para assegurar a acurácia.

CLSI POCT₁₂-A₃

Segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI),⁴¹ a acurácia analítica requer que:

- 95% das glicemias pelo glicosímetro, quando comparadas ao método laboratorial de referência, precisam estar dentro de uma faixa de ± 12 mg/dL, para concentrações de glicemia < 100 mg/dL, e dentro de uma faixa de $\pm 12,5\%$, para os valores de concentração de glicemia ≥ 100 mg/dL;
- 98% dos resultados individuais do glicosímetro devem atender ao critério anterior de precisão, segundo o qual a glicemia pelo glicosímetro pode diferir em ± 15 mg/dL em valores < 75 mg/dL, quando comparada ao teste laboratorial de referência, e até $\pm 20\%$, para valores ≥ 75 mg/dL.

Em associação a essas recomendações, o CLSI também requer a verificação dos novos lotes de tiras reagentes, a qual inclui imprecisão, linearidade e concordância com lotes prévios e com os resultados do laboratório central.

Fase pós-analítica

Um erro pós-analítico de um TLR de glicose consiste no erro de apresentação ou interpretação após a medição. Exemplos de erros pós-analíticos incluem a apresentação de unidades incorretas de concentrações de glicose (p. ex., substituição de mmol/L por mg/dL ou vice-versa); registro incorreto de dados em um diário, transmissão incorreta de dados em um dispositivo portátil, computador ou servidor para exibição na Web; armazenamento defeituoso de dados de glicose em um monitor de glicose; ou exibição de instruções incorretas não planejadas se o monitor contiver software de suporte à decisão.⁴² Nesses casos, mesmo que um monitor seja altamente preciso, seu uso ainda não será seguro para os pacientes.

ORIENTAÇÕES PARA A ESCOLHA ADEQUADA

Os glicosímetros são utilizados por uma população diversa de pacientes, em todas as faixas etárias, com os mais variados tipos de condições médicas. Pacientes e profissionais de saúde precisam de certo nível de confiança nos resultados de monitores de glicose para garantir a tomada de decisão quanto ao controle glicêmico. Os sistemas de medição de glicemia modernos que cumprem os critérios de precisão ISO 15197: 2013⁴⁰ operam de modo confiável em condições controladas.⁴³ A ADA recomenda que o treinamento em automonitoramento da glicemia capilar (AMGC) faça parte do programa de educação do portador de DM.¹

Os medidores de glicemia disponíveis são semelhantes em termos de funcionalidade, mas variam em precisão de acordo com múltiplos fatores. Nenhum glicosímetro ou sua respectiva enzima são, de forma geral, melhores ou piores que os outros, independentemente da presença ou ausência do codificador. A não acurácia do método tem caráter multifatorial e não somente química-dependente.

A Food and Drug Administration (FDA), por meio da instrução intitulada *Blood Glucose Monitoring Devices*, recomenda as seguintes orientações.⁴⁴ A precisão dos testes de glicemia depende de muitos fatores, incluindo:

- A qualidade do seu medidor e das tiras reagentes;
- O teste necessita ser bem executado. Devem-se lavar e secar as mãos antes de realizá-lo e seguir corretamente as instruções para operar o seu monitor;
- Os resultados do teste podem não ser exatos se o usuário está gravemente desidratado ou anêmico, pois o hematócrito alto ou baixo pode afetar o teste de glicose;
- Substâncias interferentes: deve-se verificar as instruções para o seu monitor e as tiras de teste, a fim de descobrir quais substâncias podem afetar a precisão do teste;
- Altitude, temperatura e umidade (alta altitude, baixas e altas temperaturas e umidade podem causar efeitos imprevisíveis sobre os resultados de glicose). Verifique o manual e a embalagem da tira de teste para obter mais informações;
- A armazenagem e a manipulação do medidor e das tiras devem estar de acordo com as instruções do fabricante. É importante manter o frasco da tira reagente sempre fechado e o mínimo de tempo possível aberto, suficiente para a retirada de uma tira.

Os guias de conduta orientam para a garantia da precisão do controle glicêmico: não somente profissionais da saúde, como também pacientes e cuidadores devem conhecer o sistema de verificação de glicemia capilar por meio dos manuais de uso, das qualificações e das limitações de cada um dos métodos, sendo nenhum isento de interferências, sempre optando pelo mais adequado para cada usuário e suas respectivas comorbidades.

REFERÊNCIAS

1. Riddle MC (ed.). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes – 2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl. 1):S13-S27.
2. IDF (International Diabetes Federation). *Diabetes Atlas*. International Diabetes Federation. 7. ed. 2015. Disponível em: <<http://idf.org>>. Acesso em: maio de 2018.
3. Vigitel Brasil 2016. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde; 2016.
4. Oliveira JEP, Montenegro Junior RM, Vencio S (orgs.). *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2017-2018)*. Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo: Clannad Editora Científica; 2017.
5. WHO. *Global report on diabetes*. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2016.
6. American Diabetes Association. *Standards of Medical Care in Diabetes – 2017*. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2016;40(Suppl. 1):S11.
7. American Diabetes Association. *Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes – 2018*. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl. 1):S73-S85.

8. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 302, de 13 de outubro de 2005. Regulamento técnico para funcionamento de laboratórios clínicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Ministério da Saúde: Brasília; 2005.
9. Umpierrez GE, Hellman R, Korytkowski MT, Kosiborod M, Maynard GA, Montori VM et al. Management of hyperglycemia in hospitalized patients in non-critical care setting: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(1):16-38.
10. The NICE-SUGAR Investigators. Intensive versus Conventional glucose control in critically ill patients. *New England Journal of Medicine.* 2009;360(13):1283-97.
11. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993;329(14):977-86.
12. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ.* 2000;321(7258):405-12.
13. Coustan DR, Lowe LP, Metzger BE, Dyer AR; International of Diabetes and Pregnancy Study Groups. The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study: paving the way for new diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202(6):654.e1-6.
14. Hönes J, Müller P, Surridge N. The technology behind glucose meters: test strips. *Diabetes Technology & Therapeutics.* 2008;10(s1):S-10-S-26.
15. Dungan K, Chapman J, Braithwaite SS, Buse J. Glucose measurement: confounding issues in setting targets for inpatient management. *Diabetes Care.* 2007;30(2):403-9.
16. Ferri S, Kojima K, Sode K. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes. *J Diabetes Sci Technol.* 2011;5(5):1068-76.
17. Rebel A, Rice MA, Fahy BG. The accuracy of point-of-care glucose measurements. *Journal of Diabetes Science and Technology.* 2012;6(2):396-411.
18. Hönes J, Müller P, Surridge N. The technology behind glucose meters: test strips. *Technology & Therapeutics.* 2008;10(1):10-26.
19. Rice MJ, Pitkin AD, Coursin DB. Glucose Measurement in the operating room: more complicated than it seems. *Anesthesia & Analgesia.* 2010;110(4).
20. Centers for Disease Control and Prevention. Infection prevention during blood glucose monitoring and insulin administration. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/injectionsafety/blood-glucose-monitoring.html>>. Acesso em: jul. 2018.
21. Klonoff DC. Improving the Safety of Blood Glucose Monitoring. *Journal of Diabetes Science and Technology.* 2011;5(6):1307-11.
22. SBPC/ML (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial). Diretrizes para a Gestão e Garantia da Qualidade de Testes Laboratoriais Remotos (TLR) da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). 2. ed. Barueri: Manole; 2016.
23. Negrato CA, Dias JP, Teixeira MF, Dias A, Salgado MH, Lauris JR et al. Temporal trends in incidence of Type 1 diabetes between 1986 and 2006 in Brazil. *J Endocrinol Invest.* 2010;33(6):373-7.

24. Woo HC, Tolosa L, El-Metwally D, Viscardi RM. Glucose monitoring in neonates: need for accurate and non-invasive methods. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2014;99(2):F153-157.
25. Ramljak S, Lock JP, Schipper C, Musholt PB, Forst T, Lyon M et al. Hematocrit interference of blood glucose meters for patient self-measurement. *Journal of Diabetes Science and Technology.* 2013;7(1):179-89.
26. Gatti RA. Hematocrit values of capillary blood in the newborn infant. *The Journal of Pediatrics.* 1967;70(1):117-9.
27. Nerhus K, Rustad P, Sandberg S. Effect of ambient temperature on analytical performance of self-monitoring blood glucose systems. *Diabetes Technol Ther.* 2011;13(9):883-92.
28. Pratumvinit B, Charoenkoop N, Niwattisaiwong S, Kost GJ, Tientadukul P. The effects of temperature and relative humidity on point-of-care glucose measurements in hospital practice in a tropical clinical setting. *J Diabetes Sci Technol.* 2016;10(5):1094-100.
29. Erbach M, Freckmann G, Hinzmann R, Kulzer B, Ziegler R, Heinemann L et al. Interferences and limitations in blood glucose self-testing: an overview of the current knowledge. *J Diabetes Sci Technol.* 2016;10(5):1161-8.
30. Tonyushkina K, Nichols JH. Glucose meters: a review of technical challenges to obtaining accurate results. *Journal of Diabetes Science and Technology (Online).* 2009;3(4):971-80.
31. Karon BS, Griesmann L, Scott R, Bryant SC, Dubois JA, Shirey TL et al. Evaluation of the impact of hematocrit and other interference on the accuracy of hospital-based glucose meters. *Diabetes Technol Ther.* 2008;10(2):111-20.
32. Sylvester ECJ, Price CP, Burrin JM. Investigation of the potential for interference with whole blood glucose strips. *Ann Clin Biochem.* 1994;31:94-6.
33. Important Safety Information on Interference With Blood Glucose Measurement Following Use of Parenteral Maltose/Parenteral Galactose/Oral Xylose-Containing Products. Disponível em: <<https://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/safetyavailability/ucm154213.htm>>. Acesso em: jul. 2018.
34. Kilpatrick ES, Rumley AG, Smith EA. Variations in sample pH and pO₂ affect exactech meter glucose measurements. *Diabetic Medicine.* 1994;11(5):506-9.
35. Schmid C, Baumstark A, Pleus S, Haug C, Tesar M, Freckmann G. Impact of partial pressure of oxygen in blood samples on the performance of systems for self-monitoring of blood glucose. *Diabetes Technol Ther.* 2014;16(3):156-65.
36. Kost GJ, Vu HT, Lee JH, Bourgeois P, Klechle FL, Martin C et al. Multicenter study of oxygen-insensitive handheld glucose point-of-care testing in critical care/hospital/ambulatory patients in the United States and Canada. *Crit Care Med.* 1998;26(3):581-90.
37. Baumstark A, Schmid C, Pleus S, Haug C, Freckmann G. Influence of partial pressure of oxygen in blood samples on measurement performance in glucose-oxidase-based systems for self-monitoring of blood glucose. *Journal of Diabetes Science and Technology.* 2013;7(6):1513-21.
38. Heinemann L. Quality of glucose measurement with blood glucose meters at the point-of-care: relevance of interfering factors. *Diabetes Technol Ther.* 2010;12(11):847-57.

39. Tang Z, Loule RF, Lee JH, Lee DM, Miller EE, Kost GJ. Oxygen effects on glucose meter measurements with glucose dehydrogenase- and oxidase-based test strips for point-of-care testing. *Crit Care Med.* 2001;29(5):1062-70.
40. ISO (International Organization for Standardization). In vitro diagnostic test systems – requirements for blood-glucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus. ISO 15197:2013.
41. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Wayne: CLSI; 2013. Point-of-Care Blood Glucose Testing in Acute and Chronic Care Facilities; Approved Guideline. 3. ed. CLSI guideline POCT12-A3.
42. Carraro P, Plebani M. Post-analytical errors with portable glucose meters in the hospital setting. *Clin Chim Acta.* 2009;404(1):65-7.
43. Freckmann G, Link M, Schmid C, Pleus S, Baumstark A, Haug C. System Accuracy Evaluation of Different Blood Glucose Monitoring Systems Following ISO 15197:2013 by Using Two Different Comparison Methods. *Diabetes Technol Ther.* 2015;17(9):635-48.
44. Blood Glucose Monitoring Devices. U.S. Food and Drug Administration. Disponível em: <<https://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/GlucoseTestingDevices/default.htm>>. Acesso em: jul. 2018.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

Shift

SOLUÇÕES COMPLETAS EM SOFTWARE PARA MEDICINA DIAGNÓSTICA.

Fruto de mais de 25 anos de experiência, o Shift LIS é um sistema de informação que possibilita a gestão completa e inteligente de laboratórios clínicos, com segurança e rastreabilidade de processos, do pré ao pós analítico, e gestão do fluxo de faturamento.



▪ Eficiência Operacional

Tenha um sistema de **gestão integrado** e garanta ao laboratório as melhores práticas de mercado, inteligência de processos e rastreabilidade.

Aumente a sua produtividade, qualidade e conformidade para a conquista das **principais creditações do setor da medicina diagnóstica**.

▪ Gestão de Atendimento

Maior agilidade e **gestão do tempo de espera do paciente** para realização do cadastro e tempo de espera para chamada e realização da coleta.

▪ Inteligência de Negócios

Transforme **dados em indicadores, gráficos e relatórios em tempo real**, suportando a tomada de decisão.

▪ Gestão Financeira

Gerenciamento completo da rotina administrativa e estoque do laboratório, com **gestão de múltiplas empresas no mesmo sistema**.

▪ Interfaceamento

Rapidez e segurança na análise de resultados, com a **automação de equipamentos integrada ao Controle da Qualidade Analítica**.

▪ Integração

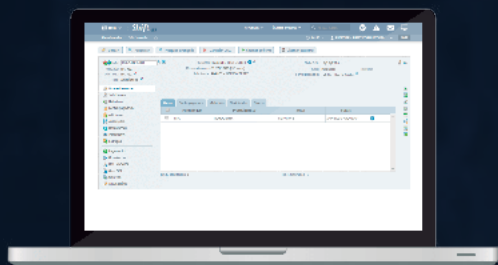
Troca de informações seguras entre sistemas de laboratórios de apoio, hospitais, operadoras, entre outros.



Shift LIS

Gerencia a performance de todos os setores do laboratório

- **Aumenta a produtividade** e orienta o fluxo de trabalho
- **Agilidade no atendimento** aos pacientes
- **Rastreabilidade completa** de todos os processos
- **Reduz o tempo de entrega de resultados** e fideliza médicos e pacientes
- **Escalabilidade do negócio** em diferentes cenários através de uma plataforma única
- **Paperless: Automatiza processos manuais** e diminui o consumo de papel
- **Integração entre sistemas e interface** de equipamentos
- **Dados em cloud e plataforma totalmente web**, intuitiva e amigável
- **Gestão por indicadores** com informações que suportam a tomada de decisão



Eficiência na operação, fornecendo o melhor atendimento aos pacientes, com alta performance na produção, aumentando a qualidade e segurança e reduzindo custos.

www.shift.com.br

T (17) 2136 1555
comercial@shift.com.br

INTRODUÇÃO

O infarto agudo do miocárdio (IAM), conhecido popularmente como ataque cardíaco, ocorre quando as artérias que realizam a oxigenação do tecido cardíaco não o fazem de maneira eficaz, causando necrose dos cardiomiócitos, em geral por uma obstrução com a formação de um trombo em uma das artérias do sítio coronariano.

Antigamente, o diagnóstico do IAM era firmado utilizando dois dos três critérios adotados pela Organização Mundial da Saúde (OMS): história clínica, alterações eletrocardiográficas e elevação dos marcadores de necrose miocárdica (CK total, CK-MB e troponina). Após a chegada das troponinas de alta sensibilidade, as diversas sociedades médicas pelo mundo passaram a considerar, como critério diagnóstico, a elevação da troponina associada ao quadro clínico compatível com síndrome coronariana aguda (SCA). Esta é um conjunto de sinais e sintomas relacionados à obstrução de uma artéria coronária, causando IAM – compreende sempre uma emergência médica. A presença dessa síndrome não é exclusiva do infarto de miocárdio, portanto não é patognomônica.

A SCA pode ser classificada de duas maneiras: SCA com ou sem elevação do segmento ST no eletrocardiograma (ECG). O primeiro exame que o paciente realiza ao chegar ao pronto-socorro é o ECG, que define se o paciente apresenta ou não alteração. Na maioria das vezes, os pacientes são classificados como SCA sem supra desse segmento, casos nos quais a utilização da troponina de alta sensibilidade torna-se fundamental.

As troponinas cardíacas de alta sensibilidade disponíveis no mercado são altamente específicas desse tipo celular, sendo liberadas e detectadas por imunoenaios quimioluminescentes ou eletroquimioluminescentes. Enquanto não havia ensaios sensíveis de troponina disponíveis, não era possível mensurar a lise de pequenas

quantidades de células (pequenos infartos), mas isso passou a ser viável com a chegada dos novos ensaios.

TROPONINA PARA O DIAGNÓSTICO DA SCA COM SUPRA DO SEGMENTO ST

O paciente que apresentar supradesnívelamento do segmento ST deve ser seguido de acordo com o protocolo clínico de tratamento para essa síndrome; a troponina deve ser solicitada para fins prognósticos.

TROPONINA SERIADA PARA O DIAGNÓSTICO DA SCA SEM SUPRA DO SEGMENTO ST

Já para o paciente que apresente suspeita de SCA sem supra do segmento ST, a dosagem de troponina se faz mandatória e padrão de referência para a confirmação diagnóstica.

As troponinas devem ser solicitadas de acordo com o protocolo de dor torácica definido pelo serviço de saúde que atende o paciente com suspeita de SCA.

Para os serviços que utilizam os ensaios de troponina de alta sensibilidade, grande parte dos protocolos define que deve-se coletar três amostras (tempo 0 – chegada do paciente, 1 hora e 3 horas após a admissão). Para a confirmação diagnóstica, variações superiores a 30% sugerem SCA.

ALTO VALOR PREDITIVO NEGATIVO

O grande diferencial no aumento da sensibilidade analítica foi possibilitar um elevadíssimo valor preditivo negativo. O teste negativo (abaixo do ponto de corte determinado pelo laboratório utilizando como critério para definição o percentil 99 e não excedendo 20% no coeficiente de variação) implica o descarte do diagnóstico de IAM.

BIOLOGIA DAS TROPONINAS

O complexo troponina é composto por unidades (troponinas: cTnI – inibidora –, cTnT – ligadora da tropomiosina – e cTnC – ligadora de cálcio) e, com a tropomiosina, está localizado no filamento de actina e é essencial para a regulação de cálcio voltada para a contração dos músculos esquelético e cardíaco. Essas isoformas de troponina são tecido-específicas (cTnI, cTnT e cTnC). A isoforma cardíaca da troponina C é utilizada na contração lenta dos músculos esqueléticos, e, por desempenhar tal função, não tem especificidade cardíaca e, portanto, não é utilizada na prática clínica para diagnóstico da SCA; como consequência, a indústria não investiu seus esforços no desenvolvimento de *kits* diagnósticos. Na Figura 1, estão apresentados o complexo das troponinas e as diferentes concentrações na corrente sanguínea dependentes do processo fisiopatológico.

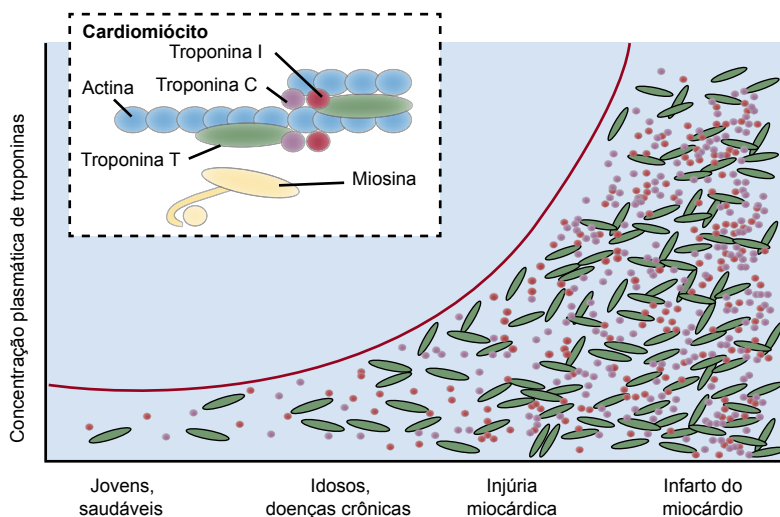


FIGURA 1 Complexo das troponinas (TnI, TnT e TnC) e as diferentes concentrações na corrente sanguínea desde o paciente saudável até aquele que apresentou um infarto do miocárdio.

Fonte: adaptada de Westermann, 2017.¹

INTERFERENTES: ANALÍTICOS DAS TROPONINAS

Os principais interferentes analíticos nas dosagens de troponina são hemólise, lipemia intensa e anticorpos heterófilos. A hemólise está diretamente relacionada ao procedimento pré-analítico para obtenção da amostra biológica. Já os anticorpos heterófilos estão diretamente associados a um grupo de pacientes que os apresentam, como contra imunoglobulinas animais, induzidos a partir de vacinas, contato ambiental ou doenças autoimunes. O mais comum deles é o HAMA (anticorpo antimurino detectado em humano, do inglês *human anti-mouse antibody*), com prevalência de 0,2 a 15% na população geral.

Como existem diferentes fabricantes de imunoenaios (quimioluminescentes/eletroquimioluminescentes) no mercado para avaliação de troponinas, com diferentes características metodológicas, o ideal é que o laboratório analise criteriosamente a bula do *kit* diagnóstico utilizada para verificar a presença desses possíveis interferentes, em maior ou menor incidência. Isso é importante para que o laboratório possa elaborar seus procedimentos e interpretar corretamente seus resultados.

Fase pré-analítica

No diagnóstico da SCA, o tempo é fundamental para a preservação do músculo cardíaco; porém, todos os cuidados pré-analíticos devem ser tomados para que o diagnóstico não seja inadequado.

TROPONINAS DE ALTA SENSIBILIDADE

1. Tempo de jejum: não é necessário realizar jejum para coletar troponinas, visto que o diagnóstico é realizado na emergência. Avaliar se, no ensaio utilizado, a lipemia pode ser um interferente para interpretar corretamente o resultado e avaliar a necessidade de uma nova coleta.
2. Prática de exercício físico: o esforço físico intenso provoca pequenas lesões miocárdicas mensuráveis pelos ensaios sensíveis de troponinas. Dependendo da extensão do dano miocárdico, ela pode permanecer elevada por alguns dias; na maioria das vezes, quando se eleva, permanece detectável por apenas 2 dias.
3. Tipo de amostra ideal: a amostra ideal deve ser verificada na bula do *kit* reagente utilizado. Na maioria dos ensaios, o soro é a amostra referência; porém, em algumas situações, o plasma é aceito.
4. Tipo de anticoagulante: caso a amostra seja o plasma, o tipo de anticoagulante utilizado deve ser avaliado na bula do *kit* reagente utilizado.
5. Procedimento de coleta: sem procedimentos diferenciados para a obtenção da amostra de sangue em relação aos sítios de coleta. Preferencialmente, veia antecubital.
6. Hemólise: para que não haja surpresas na interpretação das troponinas, ele é um importante interferente que deve ser destacado. A Figura 2 representa um gráfico ilustrativo evidenciando um exemplo no qual a hemólise pode interferir, promovendo resultados falso-positivos ou falso-negativos. As limitações proporcionadas pela hemólise nos demais métodos devem ser avaliadas na bula reagente fornecida pelo fabricante.

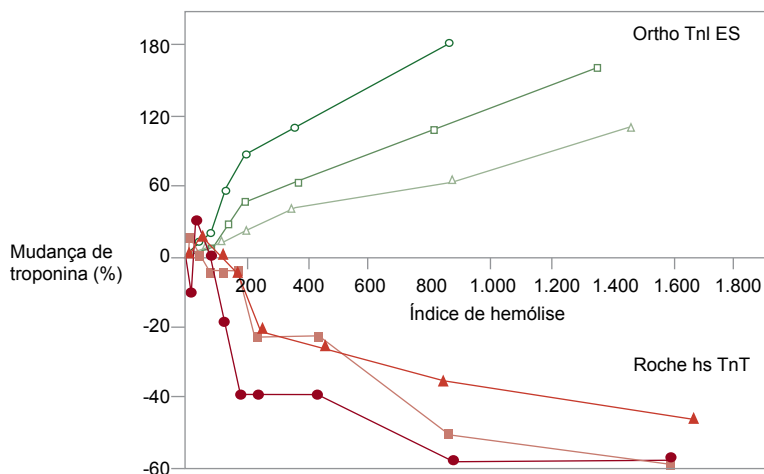


FIGURA 2 Interferência da hemólise em dois diferentes ensaios: um com valores superestimados e outro com valores subestimados.

Fonte: adaptada de Bais, 2010.²

7. Estabilidade da amostra: também deve ser avaliada na bula do *kit* do fabricante. De maneira geral:

- Geladeira = 2 a 8°C (7 dias);
- *Freezer* = -20°C (30 dias);
- *Superfreezer* = -80°C (6 meses a alguns anos);
- Nitrogênio = -196°C (vários anos).

Pós-analítico: interpretação de resultados

A correta interpretação dos resultados é fundamental para que se possa confirmar a hipótese diagnóstica da SCA. Nessa fase, um “interferente” seria a comparação de resultados de diferentes ensaios para interpretar uma curva realizada como critério diagnóstico em um protocolo de dor torácica. Como cada *kit* diagnóstico trabalhou em uma sequência de aminoácidos para o desenvolvimento do seu ensaio, não se pode comparar quantitativamente os diferentes ensaios disponíveis no mercado. Na Tabela 1, há uma lista dos principais ensaios disponíveis pelo mundo.

CASOS CLÍNICOS

Caso clínico 1

Paciente, CRS, do sexo masculino, com 51 anos de idade, com antecedente de cirurgia de revascularização. Portador de hipertensão arterial sistêmica (HAS), insuficiência cardíaca, diabetes melito e dislipidemia.

Deu entrada no pronto-socorro (PS) às 23h com desconforto torácico em região precordial de pequena intensidade com início há 2 horas, sem fatores de melhora e sem irradiação. Nega náuseas e vômitos.

Classificado como alto risco para SCA pelos antecedentes, foi enquadrado no protocolo de dor torácica. Realizou ECG (sem alterações significativas e similar ao seu ECG anterior), coletou a primeira dosagem de troponina de alta sensibilidade e recebeu atendimento clínico para SCA; aguardando a confirmação diagnóstica.

De acordo com o protocolo de dor torácica na hipótese de SCA sem supra do segmento ST, o paciente deve realizar a curva de troponina (tempo 0, 1 hora e 3 horas após a admissão – deltas de variação acima de 30% entre as dosagens confirmam a hipótese de SCA). Realizou a primeira dosagem às 23h30 e foi para casa à revelia, antes da liberação do resultado e sem coletar a segunda amostra 1 hora após a primeira dosagem.

A amostra foi processada em duas metodologias. Os resultados estão descritos na Tabela 2.

TABELA 1 Diferentes ensaios disponíveis de troponina (automação e TLR) no mercado mundial. Com as seguintes informações: limite inferior de detecção (LoD), percentual mensurável em população geral, percentil 99, coeficiente de variação (CV) no percentil 99 e registros para uso clínico no Brasil – Europa e Estados Unidos

Empresa e plataforma ou kit diagnóstico	LoD (pg/mL)	Mensurável na população geral (%)	Percentil 99 (pg/mL)	CV no 99 (%)	Disponível para a prática clínica – Brasil e Europa	Aprovado pela FDA (Food and Drug Administration)
Singulex Erenna MTP	0,09	100	9-40	< 5	Não	Não
Siemens VISTA hs-TnI	0,8	86	33-55	< 5	Sim	Não
Ortho Clinical Diagnostics hs-cTnI	1,0	75	16-23	10	Não	Não
Abbott Architect STAT hs-TnI	1,1-1,9	57-83	16-34	< 6	Sim	Não
Beckman Coulter Access 2 hs-TnI	2,5	80	8,6	10	Sim	Não
Roche Diagnostics TnT (quinta geração)	5	25-100	14-22	< 8	Sim	Sim
Siemens ADVIA Centaur TnI-Ultra	6	6	40	8,8	Sim	Sim
Abbott Architect i2000 STAT c TnI	9	2	28	14	Sim	Sim
Roche Diagnostics TnT (quarta geração)	10	–	10	30	Não – apenas Estados Unidos	Sim
Ortho Clinical Diagnostics Vitros Troponin I ES	12	2	34	10	Sim	Sim
Abbott AxSYM ADV	20	3	34	10	Sim	Sim
Siemens Dimension RLX TnI	40	2	70	20	Sim	Sim
Tosho ST AIA TnI (segunda geração) 60	60	–	60	8,5	Sim	Sim
Siemens IMMULITE 2500 Xpi (TnI)	100	5	200	–	Sim	Sim

(continua)

TABELA 1 Diferentes ensaios disponíveis de troponina (automação e TLR) no mercado mundial. Com as seguintes informações: limite inferior de detecção (LoD), percentual mensurável em população geral, percentil 99, coeficiente de variação (CV) no percentil 99 e registros para uso clínico no Brasil – Europa e Estados Unidos (*continuação*)

<i>Point of Care Testing</i> (POCT) – Teste Laboratorial Remoto (TLR)	LoD (pg/mL)	Mensurável na população geral (%)	Percentil 99 (pg/mL)	CV no 99 (%)	Disponível para Brasil e Europa	Aprovado pela FDA (Food and Drug Administration)
LSI PATHFAST – Tnl	1-8	2-66	20	5-28	Sim	Sim
Radiometer AQT 90 (Tnl)	10	–	17	12,5-20	Sim	Não
BioMérieux Vidas Tnl	10	1	10	27,7	Sim	Sim
Alere Triage Cardio 3 (Tnl)	10	1	12	–	Sim	Não
Abbott i-STAT	20	6	39	16,5	Sim	Sim
Siemens Stratus CS (Tnl)	30	2	70	10	Sim	Sim

Fonte: adaptada de Westermann, 2017.¹

TABELA 2 Resultados de troponinas de alta sensibilidade do paciente CRS

	Troponina I	Troponina T
23h30	324 pg/mL	354 pg/mL
03h30	5.962 pg/mL*	875 pg/mL*

* Amostra hemolisada.

A seguir, os pontos de corte do percentil 99 para os dois ensaios utilizados:

- Troponina I (TnI): 34 pg/mL;
- Troponina T (TnT): 14 pg/mL.

Diante do resultado da primeira dosagem, o médico do PS entrou em contato com o paciente e pediu que ele retornasse ao PS, pois o resultado do seu exame estava alterado e ele poderia estar tendo um infarto. O paciente retornou na madrugada às 03h30, coletou a segunda amostra e foi removido para outro hospital para o seguimento do seu tratamento.

Após a centrifugação do material no laboratório, a segunda amostra estava hemolisada e não foi possível obter uma nova amostra, pois o paciente já havia sido removido para outro hospital. Para fins educacionais, o patologista clínico do laboratório orientou o processamento da amostra hemolisada (resultados na Tabela 2).

Segundo informações das bulas dos *kits* dos fabricantes dos ensaios, o ensaio de TnI sofre interferência da hemólise, superestimando os resultados (ver Figura 2), e o do ensaio de TnT, subestimando os resultados (ver Figura 2).

Avaliando os deltas de variação (Quadro 1) entre as dosagens, fica evidente que, mesmo superestimando e subestimando o resultado, o paciente estava apresentando um quadro de SCA sem supra do segmento ST.

QUADRO 1 Deltas de variação entre as dosagens do caso clínico 1

DELTA (Δ) de variação entre as dosagens
TnI: 1.740%
TnT: 147%

Caso clínico 2

Paciente, VRT, do sexo masculino, com 35 anos de idade, sem antecedentes pessoais. Deu entrada no pronto atendimento (PA) de um hospital às 14h com queixa de dor torácica em pontada, sem irradiação, que iniciou há 2 horas. Foi enquadrado no protocolo de dor torácica – com hipóteses diagnósticas de SCA e dispepsia. Realizou eletrocardiograma (ECG) e coletou troponina de um dispositivo POCT (*point of care testing*)/TLR (teste laboratorial remoto), pois o laboratório central desse serviço de saúde fica distante do PA. De acordo com o protocolo de dor torácica na hipótese

de SCA sem supra do segmento ST, o paciente deve realizar a curva de troponina (tempo 0, 1 hora e 3 horas após a admissão – deltas de variação acima de 30% entre as dosagens confirmam a hipótese de SCA). O ponto de corte no percentil 99 do ensaio de troponina I (TnI) do dispositivo POCT/TLR utilizado é de 23 pg/mL.

O paciente foi classificado como de baixo risco para SCA; o seu ECG estava sem alterações e a primeira amostra do POCT/TLR foi de 221 pg/mL. Diante do resultado, foi solicitada a transferência do paciente para o hospital e a mesma amostra foi encaminhada ao laboratório central do hospital. Esse procedimento é feito, pois esse ensaio de POCT/TLR apresenta uma limitação: a interferência pelo HAMA. A segunda amostra foi coletada antes de o paciente ser removido; o resultado foi de 210 pg/mL, não apresentando variação entre o resultado anterior e aumentando a suspeita de falso-positivo pela interferência descrita.

As amostras foram processadas no ensaio automatizado do laboratório central e os resultados foram inferiores a 12 pg/mL, confirmando que os resultados do ensaio POCT/TLR eram falso-positivos.

O paciente recebeu tratamento para dispnéia apresentando melhora dos sintomas e teve alta no mesmo dia.

A amostra foi encaminhada para a dosagem do anticorpo HAMA, quando se confirmou a presença do anticorpo.

REFERÊNCIAS

1. WESTERMANN D, NEUMANN JT, SÖRENSEN NA, BLANKENBERG S. High-sensitivity assays for troponin in patients with cardiac disease. *Nature Reviews Cardiology*. 2017;14:472-48.
2. BAIS R. The effect of sample hemolysis on cardiac troponin I and T assays. *Clin Chem*. 2010;56(8):1357-9.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- FERREIRA CES. High-sensitivity troponins: a major breakthrough. *J Bras Patol Med Lab*. 2017;53(5):292.
- KELLER T, ZELLER T, PEETZ D, ROTH A, CZYZ E, BICKEL C ET AL. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2009;361(9):868.
- MORROW DA, ANTMAN EM. Evaluation of high-sensitivity assays for cardiac troponin. *Clin Chem*. 2009;55:5-8.
- TANJA S. Cardiac troponin specific autoantibodies: analytical tools for exploring their impact on cardiac troponin I testing [thesis]. Turku, Finland: University of Turku, 2014. Painsalama Ou, Turku, Finland. 2014;1(1):1-86.
- WU AHB, LU QA, TODD J, MOECKS J, WIANS F. Short and long term biological variation in cardiac troponin I measured with a high-sensitivity assay: implications for clinical practice. *Clin Chem*. 2009;55(1):52-9.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).



Imunofluorescência

AQT90 FLEX

Emergências cardíacas e SEPSE
Rapidez e Segurança nas decisões

Marcadores cardíacos, de coagulação, gravidez, infecção e SEPSE com a precisão e exatidão da Radiometer. Total biossegurança no manuseio do teste e no desperdício. Amostras sem necessidade de preparo. Sangue total heparinizado ou EDTA.



RADIOMETER 

Tn I - Myo - CKMB - NT-proBNP
D-Dímero - B β CG - PCR - PCT

- Método de Imunofluorescência com marcador Európio e resolução em tempo
- Até 5 parâmetros em uma única amostra
- Resultados a partir de 10 min

BIODINA[®]
BRASIL

Tel. (21) 2435-9800/(11) 3318-2800 - sac@biodina.com.br / vendas@biodina.com.br
facebook.com/biodinabrasil - www.biodina.com.br / www.radiometer.com

Cardiologia Roche

Laboratorial e Point of Care

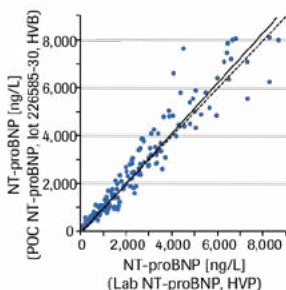


A cada 30 minutos de atraso entre os sintomas e o início do tratamento, aumenta em 7,5% a possibilidade de morte em um ano.¹

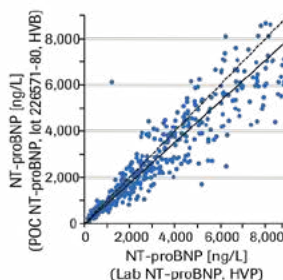
1. Uma amostra, um resultado:



2. Correlação de resultados entre todas as plataformas Roche:



P/B Regressão
 $Y = 1.03 * X + 16.5$
 $N = 238 \quad r = 0.96$



P/B Regressão
 $Y = 0.88 * X + 19.1$
 $N = 497 \quad r = 0.94$

1. De Lucca, G. et al. (2004). *Circulation* 109(10), 1223 - 5.

19 Gasometria

IDENTIFICAÇÃO

A identificação correta do paciente, associada a outras informações complementares, é essencial para avaliar acertadamente os resultados obtidos. A seguir, estão enumeradas algumas informações relevantes para a caracterização da amostra:

1. Nome completo do paciente, idade, sexo;
2. Número/registo do paciente;
3. Identificação do médico solicitante;
4. Localização do paciente: andar, quarto e leito;
5. Data e horário da obtenção da amostra;
6. Fração de oxigênio inspirado (F_iO_2);
7. Temperatura do paciente;
8. Frequência respiratória;
9. Modo da ventilação: respiração espontânea ou ventilação assistida/controlada;
10. Identificação do profissional que está realizando o teste.

Com relação à avaliação do paciente, é importante que alguns pontos sejam observados e devidamente registrados:

- Se o paciente estiver consciente, é importante que se esclareça acerca do procedimento ao qual será submetido;
- O consentimento deve ser obtido previamente à coleta;
- As condições de coleta devem ser verificadas e documentadas;
- Atenção especial aos pacientes em terapia com anticoagulantes;
- Observar o estado do paciente com relação à temperatura, ao padrão de respiração e à concentração de oxigênio inalado;

- O paciente deve estar em uma condição ventilatória estável por aproximadamente 20 a 30 minutos antes da coleta, quando em respiração espontânea. Os outros pacientes necessitam de 30 minutos ou mais para alcançar o equilíbrio após a alteração nos padrões ventilatórios.

Quanto ao tipo de seringa a ser utilizado, quando aplicável, o documento do CLSI C46-A – *Blood Gas and pH Analysis Related Measurements; Approved Guideline* – recomenda o uso de seringas plásticas preparadas com anticoagulante apropriado, preferencialmente a heparina liofilizada. A seringa pode ser mantida à temperatura ambiente por no máximo 30 minutos após a coleta.

Com relação ao anticoagulante, a melhor opção é utilizar uma seringa previamente preparada com heparina de lítio jateada na parede, com “balanceamento” de cálcio. Esse tipo de material é facilmente obtido no mercado e apresenta uma relação custo-eficiência satisfatória. De acordo com a International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), a seringa de gasometria deve conter 50 UI de heparina lítica balanceada com cálcio por mL de sangue total.

O uso de seringa de preparação caseira, com heparina líquida com baixa concentração de sódio, também é aceitável; porém, aumenta a possibilidade de interferência na dosagem de cálcio iônico, pois a heparina pode ligar-se quimicamente ao cálcio, resultando em valores falsamente mais baixos que o real.

A introdução do cálcio em concentração balanceada nas seringas destinadas especificamente para coleta de gasometria e eletrólitos tem por finalidade minimizar os efeitos da queda desse íon na amostra. A heparina líquida em excesso pode, ainda, causar diluição da amostra, resultando em valores incompatíveis com a situação clínica do paciente. As seringas específicas para a análise de gases sanguíneos, além de eliminarem o risco de diluição da amostra, asseguram a proporção exata entre volume de sangue e anticoagulante, evitando, assim, a formação de microcoágulos capazes de produzir resultados errôneos, bem como obstruir os equipamentos analisadores de gases sanguíneos.

A heparina utilizada para fins terapêuticos para anticoagulação sistêmica não deve ser utilizada como agente anticoagulante na análise de gases sanguíneos. A elevada concentração de heparina por mL pode alterar o pH da amostra e o resultado do cálcio ionizado.

Os locais usuais para a realização da punção arterial são as artérias radial, braquial ou femoral. Para a escolha da artéria a ser puncionada, deve-se levar em consideração: a presença de circulação colateral para que, em caso de um possível espasmo ou coágulo, o território não tenha interrompido o fluxo sanguíneo, além de artéria de bom calibre e superficial. A artéria radial preenche esses critérios, sendo, por isso, a mais frequentemente puncionada.

A artéria radial, além de relativamente superficial em sua posição distal, não apresenta outros vasos importantes próximos e possibilita um maior conforto ao paciente e fácil acesso para a realização do procedimento. No entanto, por se tratar de um dos vasos de irrigação da mão, deve-se avaliar a capacidade de suprimento sanguíneo pela artéria ulnar previamente à punção da artéria. O exame que avalia essa circulação é denominado teste de Allen, visando verificar a permeabilidade do arco palmar e seu enchimento pela artéria ulnar. Na primeira fase do teste, comprimem-se as artérias radial e ulnar, orientando o paciente a abrir e fechar a mão cinco vezes, em média, observando a palidez. Na sequência, faz-se a descompressão da artéria ulnar para verificar a perfusão.

A punção arterial não é indicada a pacientes com distúrbio de coagulação, particularmente para punção de artérias profundas ou quando o local escolhido apresenta algum grau de dificuldade de compressão.

Após a obtenção da amostra arterial ou venosa, despreza-se a agulha, esgota-se o ar residual, veda-se a ponta da seringa com o dispositivo ocluser e homogeneiza-se suavemente, rolando-a entre as mãos. A posição preferencial da seringa durante o transporte é a horizontal, pois facilita a homogeneização da amostra previamente à análise e minimiza a sedimentação das hemácias.

PRINCIPAIS PARÂMETROS NA ANÁLISE DOS GASES SANGUÍNEOS

Pressão parcial do oxigênio (PO_2)

A PO_2 arterial indica a eficácia das trocas de oxigênio entre os alvéolos e os capilares pulmonares, dependendo diretamente da pressão parcial de oxigênio no alvéolo, da capacidade de difusão pulmonar desse gás, da existência de *shunt* e da reação ventilação/perfusão pulmonar. Alterações desses fatores constituem causas de variações de PO_2 .

Pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2)

A PCO_2 arterial compreende o parâmetro que indica a eficácia da ventilação alveolar, sendo a PCO_2 arterial praticamente a mesma que a alveolar, em razão da grande difusibilidade desse gás.

Saturação de hemoglobina (SO_2)

A SO_2 refere-se ao percentual de hemoglobina saturado com oxigênio. Corresponde à fração de hemoglobina transportando oxigênio em relação a todas as hemoglobinas que podem transportá-lo.

O cálculo da SO_2 pode ter a acurácia reduzida nas situações em que se detecte a presença das dis-hemoglobinas: meta-hemoglobina (MetHb); carboxi-hemoglobina (COHb); e sulf-hemoglobina (SulfHb). Nessa condição, a saturação de oxigênio deve ser expressa pela fração de oxi-hemoglobina (FO_2Hb).

O método espectrofotométrico utilizado para medida da oxi-hemoglobina, desoxi-hemoglobina, carboxi-hemoglobina e meta-hemoglobina é conhecido como CO-oximetria.

As fórmulas matemáticas para determinação da SO_2 e FO_2Hb estão descritas a seguir:

$$SO_2 = \frac{cO_2Hb}{cO_2Hb + cHHb} \times 100$$

$$FO_2Hb = \frac{cO_2Hb}{cO_2Hb + cHHb + cMetHb + cCOHb + cSulfHb} \times 100$$

Em que:

- SO_2 : saturação de hemoglobina;
- FO_2Hb : fração de oxi-hemoglobina;
- cO_2Hb : concentração de oxi-hemoglobina;
- $cHHb$: concentração de desoxi-hemoglobina;
- $cMetHb$: concentração de meta-hemoglobina;
- $cCOHb$: concentração de carboxi-hemoglobina;
- $cSulfHb$: concentração de sulf-hemoglobina.

Conteúdo total de oxigênio (ctO_2)

Corresponde à soma da concentração do oxigênio ligado à hemoglobina e do oxigênio dissolvido no sangue.

Pressão parcial do oxigênio em saturação de oxigênio de 50% (P_{50})

O grau de associação ou dissociação do oxigênio com a hemoglobina é determinado pelo PO_2 , e a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. A dissociação do oxigênio com a hemoglobina pode ser representada por uma curva sigmoide que relaciona a SO_2 com a PO_2 (Figura 1). A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio depende de cinco fatores: temperatura, pH, PCO_2 , concentração de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e presença das dis-hemoglobinas. A P_{50} é um parâmetro calculado, definido como a pressão parcial do oxigênio (PO_2) em uma saturação de oxigênio de 50%.

Quando a curva sofre um desvio para a direita, a P_{50} se eleva, indicando decréscimo da afinidade do O_2 pela hemoglobina, facilitando a liberação em nível tecidual. Compreendem situações em que se observa elevação da P_{50} : elevação da 2,3-DPG, elevação da temperatura corpórea, aumento da PCO_2 e acidose (Figura 2).

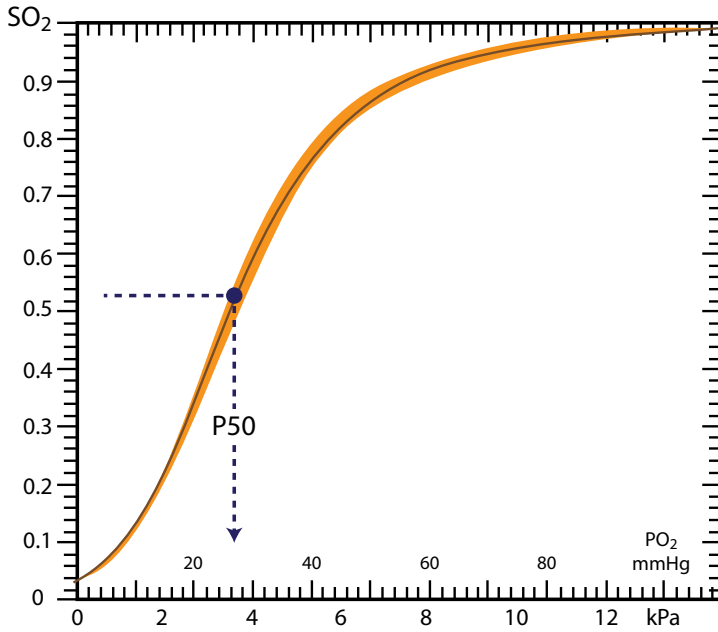


FIGURA 1 Curva de dissociação do oxigênio-hemoglobina e representação gráfica do P₅₀.

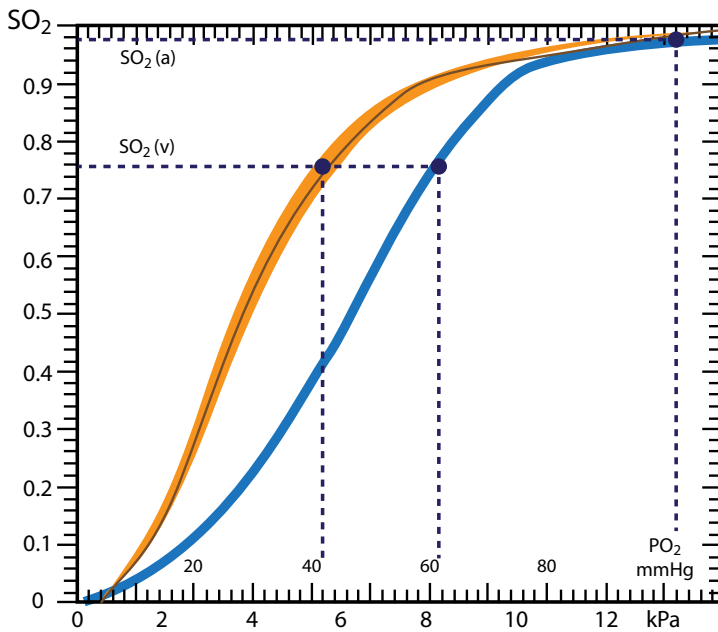


FIGURA 2 Curva de dissociação do oxigênio-hemoglobina com desvio à direita.

Quando a curva sofre um desvio à esquerda, ocorre queda da P_{50} , indicando aumento da afinidade do O_2 pela hemoglobina, dificultando a liberação em nível tecidual. São situações em que se observa elevação da P_{50} : diminuição da 2,3-DPG, queda da temperatura corpórea, diminuição da PCO_2 , alcalose, níveis elevados de COHb, MetHb e hemoglobina fetal (Figura 3).

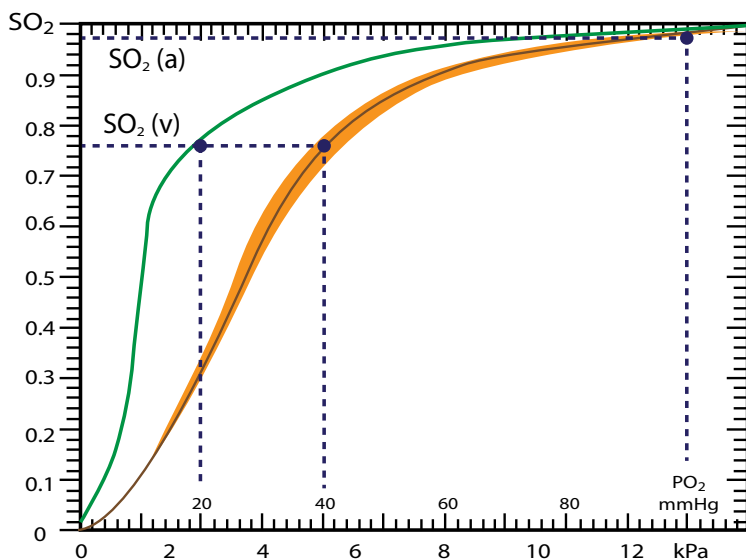


FIGURA 3 Curva de dissociação do oxigênio-hemoglobina com desvio à esquerda.

Lactato

O lactato é produzido em excesso quando há um suprimento inadequado de oxigênio aos tecidos. Trata-se de um marcador do balanço entre demanda e oferta de oxigênio (Figura 4).

O excesso de lactato dá origem à acidose láctica. O ácido láctico se combina com o bicarbonato de sódio formando lactato de sódio. Nessa situação, a queda no bicarbonato sérico não é acompanhada de uma elevação no cloro e há elevação do ânion *gap*. Quanto maior o acúmulo de ácido láctico, maior será a queda no bicarbonato sérico com elevação gradual do ânion *gap*. A magnitude da elevação do ânion *gap* reflete a magnitude do acúmulo de ácidos orgânicos.

ERROS PRÉ-ANALÍTICOS NA ANÁLISE DA GASOMETRIA

Bolha de ar na amostra

Esse tipo de erro compromete os valores de PO_2 . As bolhas de ar devem ser imediatamente removidas da seringa após a obtenção da amostra. O erro aumenta propor-

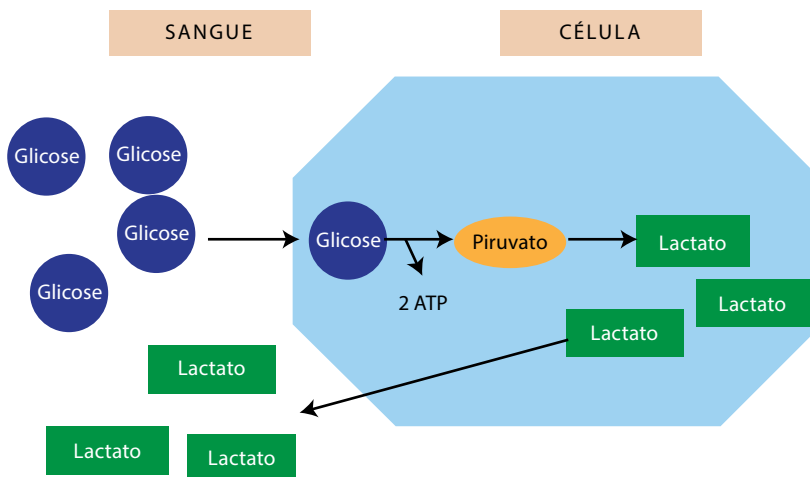


FIGURA 4 Formação do lactato pela célula em razão da baixa oferta de oxigênio (metabolismo anaeróbico).

cionalmente à medida que o tempo da amostra fica em contato com a bolha de ar. O efeito é potencializado se a amostra for armazenada em baixa temperatura, pois ocorre um aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Considerando que o PO_2 no ar atmosférico é ao redor de 150 mmHg, o erro habitualmente será positivo (elevação do na amostra) se o PO_2 na amostra for inferior a esse valor. No entanto, o erro pode ser negativo se o nível de PO_2 na amostra for superior ao PO_2 da bolha de ar.

Sedimentação da amostra

É fundamental que as amostras sejam bem homogeneizadas previamente à análise, visando evitar a análise de uma amostra sedimentada. Todos os parâmetros podem sofrer alteração, em particular o nível de hemoglobina.

Efeito do tempo prolongado entre a coleta e análise da amostra

As células sanguíneas mantêm o metabolismo mesmo após a coleta na seringa, induzindo alteração nos valores de gases sanguíneos, pH e metabólitos. O nível dos gases também pode se alterar pela difusão pela parede de plástico da seringa.

O nível de potássio também pode se alterar em razão da demora na análise, particularmente quando a amostra é resfriada. Nessa condição, ocorre a inibição da bomba de sódio-potássio, que se torna incapaz de manter o gradiente de concentração entre o meio intra e extracelular. O ideal é que a amostra seja analisada imediatamente após a coleta ou em até 30 minutos à temperatura ambiente. Caso contrário, a amostra necessita ser resfriada entre 0 e 4°C, visando diminuir o metabolismo celular.

Diluição da amostra

- Heparina: recomenda-se o uso de seringas pré-heparinizadas com heparina seca. O uso de heparina líquida não é indicado, pois aumenta o risco da diluição da amostra com potencial queda nos níveis de hemoglobina, eletrólitos e metabólitos;
- Coleta de cateter arterial: previamente à coleta de sangue, a solução de infusão presente no cateter arterial necessita ser retirada por completo, visando evitar a diluição da amostra que será analisada. Habitualmente, recomenda-se que de 3 a 6 vezes do volume do cateter seja retirado e desprezado.

Transporte e conservação da amostra

As amostras devem ser analisadas, preferencialmente, em um intervalo de 30 minutos após a coleta, em razão da difusão de gases pela parede da seringa de plástico e da elevação dos níveis de potássio. Se a amostra não puder ser analisada em 10 minutos, necessita ser refrigerada em uma temperatura entre 0 e 4°C e mantida horizontalmente, visando facilitar a mistura e minimizar o efeito da sedimentação.

Água gelada com gelo moído ou gelo reciclável são adequados para o resfriamento das amostras. As amostras não devem ser colocadas diretamente sobre o gelo em razão do risco de hemólise.

Análise

Deve-se assegurar que a porção da amostra a ser avaliada esteja homogênea e seja representativa do total da amostra. É muito importante homogeneizar adequadamente a amostra invertendo-a repetidamente e, também, rolar entre as palmas das mãos, misturando por alguns minutos para que se obtenha uma amostra homogênea. As primeiras gotas da extremidade da seringa devem ser desprezadas.

CÁLCIO IONIZADO

Variáveis pré-coleta

- Atividade física: exercícios moderados podem elevar os resultados pela diminuição do pH e do bicarbonato e pelo aumento do lactato, da albumina e do cálcio total durante os exercícios;
- Postura e repouso no leito: a mudança de postura afeta as proteínas e as moléculas a ela vinculadas, assim como a concentração de íons de baixo peso molecular. Essa alteração ocorre pelo desvio a partir do extracelular, pelo aumento do tônus muscular e da pressão hidrostática. Ao retornar à postura original, isso se reverte. Pacientes acamados podem ter elevação de até 8% do cálcio ionizado, sem alteração do cálcio total;
- Refeições: após a ingestão, há relatos na literatura de uma redução temporária de cerca de 5% do cálcio ionizado. Várias causas podem responder por isso: aumento do pH; aumento da concentração proteica; e aumento da concentração

de bicarbonato e fosfato. Todos esses fatores contribuem para aumentar a formação de complexos do cálcio com a albumina e outros íons;

- Taxa de ventilação: a alcalose respiratória, induzida pela hiperventilação em voluntários, pode diminuir a concentração de cálcio ionizado em 0,05 mmol/L, a cada 0,1 unidade de aumento no pH;
- Variação circadiana: o cálcio ionizado varia de 4 a 10% ao longo do dia. Essas variações podem ser consequência dos seguintes fatores: efeito das refeições, da variação diária do balanço ácido-base e do sono. Dados da literatura apontam que variações hormonais também possam ter alguma influência nessa oscilação.

Recomendações para a coleta do cálcio ionizado

As recomendações descritas a seguir baseiam-se no documento do CLSI C31-A2.¹

Recomenda-se para a coleta de sangue para dosagem de cálcio ionizado:

- Que o paciente esteja relaxado e com a frequência respiratória normalizada por pelo menos 10 minutos;
- Que mantenha a estabilidade postural por pelo menos 5 minutos antes da coleta, sentado ou em pé;
- Que esteja em jejum por, pelo menos, 4 horas.

Escolha da amostra

O estado clínico do paciente deve influenciar na seleção do tipo de amostra para as dosagens de cálcio ionizado. Sangue total heparinizado pode ser o mais apropriado no paciente em estado crítico que requer resultados imediatos. A coleta de soro anaerobicamente pode representar a melhor escolha para a rotina diagnóstica e as aplicações nas pesquisas.

As vantagens do sangue total heparinizado em relação ao soro são:

- Amostras disponíveis imediatamente após a coleta para as análises, sendo as amostras de escolha nos equipamentos de TLR;
- Rapidez nas análises minimiza os efeitos do metabolismo celular na amostra;
- Outros analitos, como o sódio e o potássio, podem ser dosados concomitantemente na mesma amostra e no mesmo analisador.

As desvantagens do uso do sangue total heparinizado:

- A heparina pode se ligar aos íons cálcio na proporção de sua concentração, reduzindo, possivelmente, a sua dosagem;
- Amostras de sangue total não podem ser estocadas por longos períodos, ao contrário do soro;

- A hemólise no sangue total não é rapidamente detectável e pode, artificialmente, diminuir a medida do cálcio ionizado;
- A homogeneização inadequada da amostra pode gerar microcoágulos que interferem no desempenho dos analisadores.

Soro

O soro coletado em condições anaeróbicas consiste no tipo de amostra mais estável para as determinações de cálcio ionizado. Entretanto, tubos incompletamente preenchidos podem sofrer alterações no pH e na concentração do cálcio ionizado. Nas amostras coletadas corretamente, o cálcio ionizado se mantém estável por até 4 horas. Deve-se lembrar que o cálcio ionizado tende a diminuir quando as amostras são expostas ao ar ambiente.

As vantagens do uso de soro são:

- A amostra pode ser utilizada para vários tipos distintos de analitos;
- Estabilidade da amostra por 24 horas em condições anaeróbicas à temperatura de 4°C.

Já suas desvantagens são:

- Atraso no processamento, em virtude do tempo para a retração do coágulo (30 a 45 minutos);
- O metabolismo celular continua durante a centrifugação, afetando o cálcio ionizado presente na amostra;
- O volume de soro obtido corresponde à metade do sangue coletado;
- O cálcio ionizado e o pH são afetados pela elevação da temperatura durante a centrifugação, resultando em diminuição na dosagem, conforme a temperatura de centrifugação.

RECOMENDAÇÕES PARA AS TÉCNICAS DE COLETA

- Não utilizar o torniquete por tempo excessivo durante a coleta;
- Na coleta com seringa, empregar heparina formulada para minimizar os efeitos na dosagem de cálcio ionizado;
- Preencher as seringas no seu volume nominal;
- Se uma série de tubos for usada, o primeiro deverá ser destinado para a dosagem de cálcio ionizado;
- Se a amostra for de sangue capilar, deverá ser empregado capilar heparinizado.

RECOMENDAÇÕES PARA O TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

1. Sangue total:

- Transportar as amostras a 4°C;

- Evitar que as amostras sofram aquecimento acima da temperatura ambiente;
- Amostras de sangue total, nas seringas, não devem ficar mais que 4 horas a 4°C.

2. Soro:

- Centrifugar o material em até 4 horas após a coleta;
- Manter a temperatura durante a centrifugação (+/- 2,5°C);
- O material coletado em tubo com gel separador, após centrifugação, pode ser estocado por até 70 horas a 4°C;
- Gelo seco não deve ser utilizado para o envio de amostras a longa distância, pois pode induzir saturação de CO₂ na amostra, resultando em queda do pH e aumento do cálcio ionizado;
- Não abrir o tubo antes da centrifugação;
- Manter as condições anaeróbicas previamente à dosagem;
- Após a dosagem, manter o tubo fechado.

CASOS CLÍNICOS

Caso clínico 1

Ao avaliar o resultado de um laudo de gasometria arterial em um paciente grave, o médico da unidade de terapia intensiva (UTI) observou um resultado de saturação de oxigênio (SO₂) de 96% e da fração de hemoglobina oxigenada (FO₂Hb) de 75%. O profissional não soube interpretar a diferença nos resultados e contactou o médico patologista clínico para analisar os resultados.

Comentários

Nesse paciente, foi detectada a presença da carboxi-hemoglobina. O valor da SO₂ é obtido por meio de cálculo e pode ter a acurácia reduzida nas situações em que seja detectada a presença das dis-hemoglobinas: MetHb, COHb e Sulf-Hb. Nessa condição, a saturação de oxigênio deve ser expressa pela FO₂Hb. O método espectrofotométrico utilizado para medida da oxi-hemoglobina, desoxi-hemoglobina, carboxi-hemoglobina e meta-hemoglobina é conhecido como CO-oximetria.

Caso clínico 2

O médico da UTI, ao receber o resultado de uma gasometria, cujo sangue foi coletado na artéria radial, em um paciente em ventilação mecânica com valor da SO₂ na oximetria de pulso ao redor de 95%, considerou os resultados inadequados, pois observou valores de PO₂ baixo, PCO₂ elevado e SO₂ muito baixo. Em uma nova coleta, o resultado da SO₂ foi compatível com aquele observado no oxímetro de pulso.

Comentários

Na primeira coleta, ocorreu, possivelmente, a punção de uma veia próxima à artéria radial, resultando na mistura de sangue venoso à amostra de sangue arterial.

REFERÊNCIA

1. CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Ionized Calcium Determinations: Pre-collection Variables, Specimen Choice, Collection, and Handling; Approved Guideline – Second Edition. CLSI document C31-A2. Wayne: CLSI; 2001.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ANDRIOLO A, CARRAZA FR. Diagnóstico laboratorial em Pediatria. 2. ed. São Paulo: Sarvier; 2007.
- ASTRUP PB, SEVERINGHAUS JW. Blood gas transport and analysis. In: West JB (ed.). Respiratory physiology: people and ideas. New York: Oxford University Press; 2000.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Blood gas and pH analysis and related measurements; approved Guideline, Second Edition. CLSI document C46-A2, vol. 29, n. 8 (Replaces C46-A, vol. 21, n. 14). Wayne: CLSI; 2009.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Ionized calcium determinations: pre-collection variables, specimen choice, collection, and handling; approved Guideline, Second Edition. CLSI document H31-A2, vol. 21, n. 10 (replaces C31-A, vol. 15, n. 20). Wayne: CLSI; 2001.
- KROGH A. On mechanism of the gas-exchange in the lungs. Scand Arch Physiol. 1910;23:248-78.
- PRICE CP, ST JOHN A, CRICKA LL. Point-of-care testing. Needs, opportunity and innovation. 3. ed. Washington: AACC Press; 2010.
- PRICE CP, ST JOHN A. Point-of-care testing for managers and policymakers from rapid testing to better outcomes. Washington: AACC Press; 2006.
- ROUGHTON FJW, SEVERINGHAUS JW. Accurate determination of O₂ dissociation curve of human blood above 98,7% saturation with data on O₂ solubility in unmodified human blood from 0° to 37°C. J Appl Physiol. 1973;35:861-9.
- SBPC/ML (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL). Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso, 2009. Disponível em: <<http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320090814145042.pdf>>. Acesso em: 13 maio 2018.
- SEVERINGHAUS JW, ASTRUP PB, MURRAY JF. Blood gas analysis and critical care medicine. Am J Respir Crit Care Med. 1998;157:S114-22.
- SEVERINGHAUS JW, ASTRUP PB. History of blood gases acids and bases. Copenhagen: Munksgaard; 1987.
- SEVERINGHAUS JW. Simple, accurate equations for human blood O₂ dissociation computations. J Appl Physiol. 1979;46:599-602.
- SEVERINGHAUS JW. The invention and development of blood gas analysis apparatus. Anesthesiology. 2002;97:253-6.
- SCHINDLER EI, BROWN SM, SCOTT MG. Electrolytes and blood gases. In: Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 6. ed. St. Louis: Elsevier; 2018. p. 604-25.
- TOFFALETTI JG. Blood gases and electrolytes. 2. ed. Washington: AACC Press; 2009.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

BD A-line™ e BD Preset™

Soluções para Gasometria

Segurança e precisão nos resultados

As seringas BD A-line™ e BD Preset™ foram desenvolvidas para a obtenção de amostras sanguíneas de alta qualidade.

A correta dispersão do anticoagulante na amostra proporciona acuracidade do exame de gasometria o que é essencial para a correta conduta médica. Somente uma amostra de qualidade irá gerar um resultado confiável.



Dispositivo de segurança
BD Eclipse™



Tampa
BD Hemogard™





Sistema de Gestão

AQUIRE

Relatórios e estatísticas

Gestão de dados no Laboratório e TLR

- Tecnologia Microsoft
- Conectividade para várias plataformas
- Software integrado com HIS/LIS



Coletores

Segurança

Redução de erros pré analíticos

Heparina sólida balanceada para eletrólitos

RADIOMETER 



- Capilares plásticos pré-heparinizados, com sistema próprio de homogeneização.

BIODINA
BRASIL

Tel. (21) 2435-9800/(11) 3318-2800 - sac@biodina.com.br / vendas@biodina.com.br
[facebook.com/biodinabrasil](https://www.facebook.com/biodinabrasil) - www.biodina.com.br / www.radiometer.com



Gasometria

ABL90 FLEX

Emergências e UTIs
Rapidez e Portabilidade

Analizador de gasometria, eletrólitos,
oximetria e metabólitos.
Destaque para FHbF em UTI Neo.

RADIOMETER 



pH - pCO₂ - pO₂ - sO₂ - cK⁺ - cNa⁺ - cCa²⁺
cCl⁻ - ctHb - FO₂Hb - FCOHb - FMetHb
FHHb - FHbF - cGlu - cLac - ctBil

- Otimiza os fluxos de trabalho nos setores críticos
- 17 parâmetros em 35 segundos
- Apenas 65 µl de amostra
- Exatidão e redução dos erros pré-analíticos

BIODINA
BRASIL

Tel. (21) 2435-9800/(11) 3318-2800 - sac@biodina.com.br / vendas@biodina.com.br
[facebook.com/biodinabrasil](https://www.facebook.com/biodinabrasil) - www.biodina.com.br / www.radiometer.com



Gasometria

ABL80 Séries

A solução no laboratório ou TLR
Portabilidade e Leveza

Menu de testes personalizável.
Ideal para atender locais com baixo a médio
volume de testes. Rápida troca de consumíveis.

RADIOMETER 



pH - pCO₂ - pO₂ - cK⁺ - cNa⁺ - cCa²⁺
cCl⁻ - cGlu ou cLac

- Baixo volume de amostra, 70 ul
- Resultados em até 100 segundos
- Controle de qualidade automático, portátil
- Funciona com energia elétrica ou bateria, podendo ser compartilhado em vários setores.

BIODINA[®]
BRASIL

Tel. (21) 2435-9800/(11) 3318-2800 - sac@biodina.com.br / vendas@biodina.com.br
facebook.com/biodinabrasil - www.biodina.com.br / www.radiometer.com



Gasometria

ABL800 Séries

Eficácia no fluxo de trabalho
Exatidão e excelente desempenho

O analisador é utilizado como equipamento de referência para gasometria.

O módulo Flex Q permite identificar, homogeneizar e medir automaticamente até 3 amostras ao mesmo tempo.



RADIOMETER 

pH - pCO₂ - pO₂ - sO₂ - cK⁺ - cNa⁺ - cCa²⁺
cCl⁻ - ctHb - FO₂Hb - FCOHb - FMetHb
FHHb - FHbF - cGlu - cLac - cCrea - ctBil

- Permite medir até 18 parâmetros na mesma amostra
- Resultados em até 100 segundos
- Qualidade laboratorial de Crea e do pH no fluido pleural
- Ideal para áreas com alto a médio volume de testes.

BIODINA[®]
BRASIL

Tel. (21) 2435-9800/(11) 3318-2800 - sac@biodina.com.br / vendas@biodina.com.br
facebook.com/biodinabrasil - www.biodina.com.br / www.radiometer.com

Resultado imediato com precisão e conectividade

RADIOMETER 

Gasometria, eletrólitos, metabólitos, oximetria e creatinina



A cada segundo, 5 gasometrias são realizadas nos analisadores Radiometer pelo mundo.

Líder da indústria de testes de gasometria

Reduz erros pré analíticos



Coletores e capilares desenvolvidos para segurança do operador e paciente

Auxilia na detecção da SEPSE



Eficácia e rapidez no resultado
Marcadores cardíacos, de coagulação, gravidez, infecção e SEPSE

BIODINA
BRASIL

Tel. (21) 2435-9800/(11) 3318-2800 - sac@biodina.com.br / vendas@biodina.com.br
facebook.com/biodinabrasil - www.biodina.com.br / www.radiometer.com

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a preocupação quanto a erros em medicina laboratorial aumentou acentuadamente, resultando na publicação de vários estudos abordando a análise das ocorrências e das ferramentas para detectá-los e preveni-los, como gestão da qualidade total, Lean Six Sigma e gestão de riscos. Foram criados grupos de estudos específicos para discussão e padronização das ações a serem tomadas em vários centros na Europa e nos Estados Unidos.

É possível observar que 60 a 70% dos erros laboratoriais resultam de fatores pré-analíticos e envolvem a preparação e a identificação do paciente, a coleta, o transporte e o armazenamento da amostra e o preparo para análise. Plebani e Carraro¹ citam que 62% dos erros laboratoriais decorrem de fatores pré-analíticos, 23% pós-analíticos e 15% de erros analíticos, isso porque, nas últimas décadas, foram realizados grandes esforços para a erradicação de falhas na fase analítica do processo de análise laboratorial, alterando-se a proporção de erros para os valores atuais.

Apesar da grande preocupação das instituições de saúde com a segurança do paciente, a abordagem dos erros pré-analíticos é complexa, envolve uma abordagem multiprofissional e uma perfeita coordenação de todas as fases do processo até a chegada da amostra à área de análise no laboratório. É necessário um esforço conjunto com as gerências multiprofissionais para um resultado satisfatório.

O hemograma compreende um exame que apresenta a análise quantitativa e qualitativa das três séries dos elementos figurados do sangue – a eritrocitária, a leucocitária e a plaquetária. Assim, quando se observam os fatores pré-analíticos, vê-se que determinadas interferências afetam apenas uma das séries e outras, duas ou mais.

Neste capítulo, serão abordados os fatores pré-analíticos e os interferentes seguindo as etapas do fluxo laboratorial, ou seja, preparo e identificação do paciente, coleta, transporte até a área de análise, preparo para análise, interferentes na contagem automatizada e armazenamento da amostra.

PREPARO DO PACIENTE

Para a coleta de hemograma, não é necessário jejum caso o paciente tenha ingerido dieta leve; caso tenha feito uma refeição copiosa, o recomendado é um jejum de 4 horas. Se o plasma não estiver límpido, pode haver interferência na contagem de plaquetas e na dosagem de hemoglobina (Hb), pela presença de lipemia, e, consequentemente, aumento da turbidez do plasma.

Os parâmetros hematológicos apresentam pequena alteração no ritmo circadiano – o hematócrito apresenta valores mais baixos à noite com variação de 5%, os leucócitos têm seu pico na flutuação diária à noite (entre 21 e 24 horas) com variação de $0,9$ a $2 \times 10^9/L$. Para a contagem de reticulócitos, é mais indicada a coleta pela manhã, pois apresentam o pico pela madrugada.

Exercícios físicos de maior intensidade podem induzir à hemoconcentração com elevação da contagem de hemácias, hematócrito e Hb e, também, ocasionar leucocitose por deslocamento do *pool* marginal.

Concentrações elevadas de glicose acima de 600 mg/dL podem elevar o volume corpuscular médio (VCM).

CADASTRO E IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA

Na etapa de cadastro do hemograma, não há grande dificuldade, porque, comumente, esse termo implica a realização do exame completo; alguns serviços realizam o cadastro separado do hemograma e da contagem de plaquetas, mas os analisadores hematológicos automaticamente contam todos os parâmetros. É preciso estar atento quanto à solicitação da contagem de reticulócitos, normalmente realizada separadamente para que não ocorra a falha de não ser realizada.

As organizações de saúde mostram grande preocupação com a segurança do paciente e o quesito identificação do paciente e da amostra coletada é de suma importância, exigindo-se pelo menos dois identificadores nas etiquetas para minimizar a possibilidade de troca.

COLETA

O processo de coleta é crucial para a qualidade do resultado do hemograma, visto que várias etapas durante a coleta podem ocasionar resultados alterados.

Ao realizar antisepsia com álcool na pele para a punção, é preciso esperá-lo secar, pois a contaminação da agulha com o álcool pode resultar em hemólise. Um

fator importante, às vezes negligenciado, é o tempo de garroteamento antes da punção venosa. Lippi et al.,² em seu estudo com ciclistas profissionais, mostraram que o tempo de garroteamento acima de 2 minutos e 30 segundos elevou o hematócrito em 2,4%, a Hb em 1,4% e abaixou a contagem de reticulócitos em 1,9%.

Um aspecto importante refere-se ao anticoagulante utilizado nos tubos de coleta para hemograma, sendo o recomendado pela International Council for Standardization in Hematology (ICSH) e pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) o EDTA K2 (ácido etileno diamino tetracético bipotássico). O EDTA tripotássico pode ocasionar a diminuição do hematócrito e, por isso, não tem sido recomendado. A concentração do sal também é importante, sendo o recomendado 1,5 mg de EDTA por mililitro de sangue; se esta aumentar, pode fazer com os eritrócitos encolham pela hipertonicidade do plasma com aumento da concentração iônica. Isso pode ocorrer quando se coleta um volume inferior ao indicado na etiqueta do fabricante no tubo; por esse motivo, é importante coletar o volume correto para que não haja interferência no resultado do hemograma, principalmente na parte da série eritrocítica.

O EDTA não é capaz de estabilizar completamente as plaquetas: com cerca de 60 minutos após a coleta, elas mudam da forma discoide para esférica, tornando-se discretamente maiores, o que é mais perceptível nos analisadores que utilizam o método de impedanciometria. O VPM (volume plaquetário médio) tende a apresentar valor mais elevado do que nos analisadores que utilizam o método baseado na dispersão da luz *laser* – essa diferença no VPM não interfere na contagem das plaquetas.

A pseudotrombocitopenia induzida pelo EDTA é um fenômeno que ocorre *in vitro* e causa a agregação das plaquetas. Esses agregados não são contados como plaquetas pelos analisadores e, por isso, os valores são falsamente diminuídos, embora os equipamentos sinalizem com alarmes de plaquetas agregadas ou observações similares dependendo do fabricante. Essa agregação com EDTA ocorre em pacientes saudáveis e doentes, não havendo diferença de sexo ou idade, e sua prevalência é de 0,1% da população. Quando há suspeita de agregação pelo EDTA, deve-se pedir nova coleta em tubo com citrato de sódio, frequentemente utilizado para testes de coagulação; se a contagem de plaquetas aumentar, a suspeita é confirmada.

No processo de coleta, o sangue pode coagular no tubo com EDTA, caso no qual é preciso estar atento a duas grandes causas: o tempo entre a punção da veia e a entrada do sangue no tubo; e a homogeneização do tubo após a coleta. Como descrito anteriormente, o tempo entre o garroteamento, a punção e a entrada do sangue no tubo idealmente não deve ultrapassar 2 minutos. O documento H-20 do CLSI recomenda que, para uma perfeita homogeneização do sangue e o contato com o anticoagulante, deve-se fazer um movimento delicado de inversão do tubo de 8 a 10 vezes.

Outro aspecto que pode provocar interferência é a ordem de distribuição do sangue nos tubos quando da realização de uma coleta múltipla. Na coleta de sangue a vácuo, existe uma pequena possibilidade de contaminação de aditivo de um tubo para outro; na coleta com seringa e agulha, pode haver contaminação no contato da ponta da seringa com a parede interna do tubo. A ordem recomendada pelo CLSI desde 2003 é:

- a. Hemocultura;
- b. Tubos com citrato;
- c. Tubos para soro com ativador de coágulo (com ou sem gel separador);
- d. Tubos com heparina (com ou sem gel);
- e. Tubos com EDTA;
- f. Tubos com fluoreto.

TRANSPORTE ATÉ A ÁREA DE ANÁLISE

O transporte do local de coleta até a área de análise deve ser realizado o mais rápido possível para que as condições das células sejam as melhores. Se as amostras forem enviadas para outras instituições ou outro local da mesma instituição, devem ser transportadas em temperatura controlada entre 2 e 8°C, evitando contato direto com o gelo para não hemolisar. Nunca congelar uma amostra de sangue total.

Se o transporte for realizado nas condições descritas, a estabilidade ideal é de 8 horas, exceto para o esfregaço, que deve ser realizado em, no máximo, 3 horas para a boa preservação das células. Estudos mostram que esfregaços realizados em 12 horas após a coleta já mostram alterações celulares, como vacuolização citoplasmática e fragmentação nuclear.

São aceitas amostras para análise até 24 horas após a coleta quando armazenadas entre 2 e 8°C e 8 horas à temperatura ambiente.

INTERFERENTES

Nas últimas décadas, houve um grande avanço tecnológico em relação aos analisadores hematológicos, com excelente desempenho na resolução, exatidão e precisão. Esse aumento da complexidade, entretanto, requer um incansável treinamento dos profissionais do laboratório para que adquiram conhecimento sobre a operação dos equipamentos e o reconhecimento de possíveis resultados incorretos decorrentes de interferentes na amostra. Os analisadores liberam alarmes de algumas alterações, mas, em certos casos, a percepção de que algo errado está ocorrendo aparece nos valores de alguns parâmetros incompatíveis com os demais – isso depende do conhecimento e da experiência dos profissionais.

A seguir, estão descritos os principais interferentes na amostra capazes de promover resultados falsamente alterados, lembrando-se que os equipamentos evoluem rapidamente na questão tecnológica e os fabricantes estão constantemente procurando melhorar a capacidade de detectar esses interferentes.

Crioaglutinina

Esse tipo de aglutina resulta na aglutinação dos eritrócitos, os quais, por sua vez, quando passam na câmara de contagem, são contados como um único eritrócito, o que promove um número falsamente baixo na contagem de eritrócitos e do hematócrito e aumento do VCM. Aquecer a amostra a 37°C por 30 a 40 minutos pode reverter a aglutinação; caso isso não ocorra, a alternativa é fazer o hematócrito por centrifugação.

Crioglobulina

Imunoglobulinas presentes no plasma que precipitam a frio podem ocasionar contagem falsamente elevada de leucócitos, ocasionalmente pequenas elevações na contagem de eritrócitos, Hb e hematócrito. O criofibrinogênio também pode provocar tais alterações. O aquecimento da amostra a 37°C pode regularizar as alterações.

Coágulos

Pequenos coágulos, também chamados de fibrinas, podem ocasionar resultados erráticos dependendo do número de microcoágulos. Em geral, todas as contagens tendem a diminuir; dependendo da sensibilidade do equipamento, ele emite um alerta da presença desse tipo de interferente.

Excesso de EDTA

Os tubos contêm a quantidade de anticoagulante exata para o volume de sangue indicado na etiqueta; quando uma quantidade de sangue menor é colocada no tubo, ter-se-á proporcionalmente excesso de EDTA, o que pode causar uma diminuição no tamanho das hemácias, que aparece principalmente no hematócrito obtido por centrifugação. Nos equipamentos automatizados, as hemácias retornam ao tamanho original ao serem diluídas e nenhuma alteração é detectada.

Plaquetas gigantes

Plaquetas muito grandes podem exceder o limite superior da região de contagem de plaquetas resultando em contagem falsamente baixa de plaquetas, falsa elevação do número de eritrócitos e hematócrito; normalmente, os equipamentos sinalizam esse tipo de interferência.

Hemólise *in vitro*

A ocorrência de hemólise após a coleta resulta em contagens baixas de eritrócitos e hematócrito; quando de um valor de Hb correto, ter-se-ão HCM e CHCM elevados. As causas de hemólise *in vitro* podem se dar por dificuldades na coleta, homogeneização com movimentos rápidos ou transporte em temperatura fora da faixa ideal.

Hemólise *in vivo*

Quando há uma hemólise intravascular extensiva, os valores de hemácias e hematócrito estarão corretos, e a Hb estará falsamente elevada por representar o conteúdo intraeritrocitário adicionado ao plasmático. Para ajustar o valor, pode-se quantificar a Hb plasmática separadamente e diminuí-la do total.

Heparina

A heparina pode reagir com alguns reagentes e causar falsos valores elevados de leucócitos e Hb, e as plaquetas podem apresentar valores baixos por agregação; nesse caso, os equipamentos liberam alarmes alertando o operador.

Leucocitose

Contagem de leucócitos acima de 25.000/mm³ começam a apresentar valores falsamente elevados de Hb, mas somente acima de 50.000/mm³ a interferência na dosagem de Hb começa a ser valorizada clinicamente. Contagens progressivamente maiores começam a elevar os valores de eritrócitos, hematócrito e VCM. A contagem de eritrócitos pode ser corrigida subtraindo-se o valor de leucócitos e o valor de hematócrito determinado por centrifugação.

Hiperglicemia

Pode ocorrer macrocitose com valores de glicemia acima de 600 mg/dL, pelo aumento da osmolalidade intracelular dos eritrócitos que recebem a entrada da solução diluente, o que pode ser percebido pelo incoerente aumento de VCM e diminuição do CHCM em comparação à ausência de alterações eritrocitárias na microscopia.

Lipemia

A turbidez aumentada do plasma lipêmico resultando em uma falsa elevação da concentração de Hb, principalmente nos pacientes com valor de triglicédeos acima de 1.000 mg/dL. Essa interferência pode ser corrigida pela substituição do plasma lipêmico por solução diluente em igual quantidade.

Hemácias microcíticas

Uma moderada quantidade de hemácias microcíticas ou de fragmentos eritrocitários pode ser interpretada pelo equipamento como plaquetas, por entrarem na região de contagem de plaquetas ocasionando valores falsamente elevados. Normalmente, os equipamentos detectam uma interferência na região superior da faixa de plaquetas e emitem um alerta. Uma medida preventiva possível é a determinação do hematócrito por centrifugação em todas as amostras com VCM abaixo de 60 fL para verificar se todas as hemácias foram realmente contadas pelo equipamento.

Proteínas monoclonais

Proteínas monoclonais em pacientes portadores de mieloma múltiplo ou macroglobulinemia de Waldenström podem causar precipitação quando em contato com certos reagentes lisantes, resultando em turbidez da solução e consequente falso aumento na contagem de leucócitos e no valor de Hb.

Eritrócitos não lisados

Em algumas situações, como quando da presença de hemácias hipocrômicas e de Hb S ou C, pode haver resistência à lise no momento em que o equipamento prepara a amostra para a contagem, resultando em uma falsa elevação na contagem de leucócitos e no valor de Hb. Isso pode ser corrigido aumentando-se o tempo de lise quando o equipamento dispor desse recurso.

Fragmentos de leucócitos

Podem ser contados como plaquetas, causando um resultado falsamente elevado. Isso pode ocorrer em pacientes portadores de leucemia aguda e linfoma em fase blástica. A verificação de alertas na região de plaquetas previne a liberação desses resultados.

A Tabela 1 resume as principais interferências possíveis na realização do hemograma. É preciso estar atento à evolução tecnológica, porque os fabricantes estão em constante busca de melhorias nos equipamentos para que as situações descritas deixem de provocar interferências.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

A estabilidade de uma amostra refere-se ao tempo máximo em que os elementos constituintes desta se mantêm iguais aos valores iniciais. Os tubos coletados para o hemograma têm um estabilidade de 24 horas se conservados em geladeira (2 a 8°C); o esfregaço, como dito anteriormente, deve ser realizado em, no máximo, 3 horas. Se os tubos forem conservados à temperatura ambiente (15 a 25°C), sua estabilidade se reduz para 8 horas. O American College of Pathologists recomenda armazenar as amostras por 48 horas em geladeira, após sua análise, para eventual necessidade de repetição.

TABELA 1 Potenciais interferentes em analisadores hematológicos

Parâmetro	Causas de elevação	Causas de diminuição
Leucócitos	Crioglobulinas Crio fibrinogênio Heparina Proteínas monoclonais Eritroblastos Agregados plaquetários Eritrócitos não lisados	Coágulos Células rompidas Uremia + imunossupressores
Eritrócitos	Crioglobulinas Crio fibrinogênio Plaquetas gigantes Contagem de leucócitos acima de 50.000/mm ³	Coágulos Hemólise <i>in vitro</i> Hemácias microcíticas
Hemoglobina (Hb)	Carboxi-Hb acima de 10% Crioglobulinas Hemólise <i>in vitro</i> Heparina Contagem de leucócitos acima de 50.000/mm ³ Lipemia Proteínas monoclonais	Coágulos
Hematócrito automatizado	Crioglobulinas Crio fibrinogênio Plaquetas gigantes Contagem de leucócitos acima de 50.000/mm ³ Hiperglicemia (> 600 mg/dL)	Coágulos Hemólise <i>in vitro</i> Hemácias microcíticas
Hematócrito (micro-hematócrito)	Hiponatremia	Excesso de EDTA Hipernatremia Hemólise <i>in vitro</i>
VCM	Autoaglutinação Contagem de leucócitos acima de 50.000/mm ³ Hiperglicemia (> 600 mg/dL)	Crioglobulina Plaquetas gigantes Hemólise <i>in vitro</i> Hemácias microcíticas
HCM	Contagem de leucócitos acima de 50.000/mm ³ Falsa Hb elevada Falsa contagem de hemácias elevada	Falsa Hb diminuída Falsa contagem de hemácias diminuída

(continua)

TABELA 1 Potenciais interferentes em analisadores hematológicos (*continuação*)

Parâmetro	Causas de elevação	Causas de diminuição
CHCM	Coágulo	Contagem de leucócitos acima de 50.000/mm ³
	Hemólise <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Falsa Hb diminuída
	Falsa Hb elevada	Falsa contagem de hemácias diminuída
	Falsa contagem de hemácias elevada	
Plaquetas	Crioglobulinas	Coágulos
	Hemólise <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Plaquetas gigantes
	Hemácias microcíticas	Heparina
	Inclusões eritrocitárias	Agregado plaquetário
	Leucócitos fragmentados	Satelitismo plaquetário

As plaquetas tendem a se ativar e se agregar em baixas temperaturas, o que pode causar uma falsa plaquetopenia. Os eritrócitos tendem a aumentar de volume, promovendo aumento do VCM e do hematócrito.

CASO CLÍNICO

Durante a análise automatizada de um hemograma, o analista observou que a contagem de plaquetas resultou em um valor de 12.000/mm³ e um alarme de plaquetas agregadas emitido pelo equipamento. Ao examinar a lâmina do esfregaço, observou-se a presença de plaquetas agregadas.

- Comentário 1: a presença de plaquetas agregadas na lâmina de esfregaço do hemograma pode decorrer dos seguintes problemas pré-analíticos: tempo prolongado de garroteamento; demora na obtenção do sangue venoso; homogeneização inadequada; presença de aglutininas antiplaquetas; pseudotrombocitopenia pelo EDTA; e macroplaquetas em grande quantidade. Nessa situação, sugeriram-se solicitar nova coleta e coletar no tubo com EDTA e no citrato;
- Comentário 2: na nova coleta, o resultado foi de 12.600/mm³ no tubo com EDTA e 141.000/mm³ no tubo com citrato após correção com a diluição. A paciente apresenta a agregação plaquetária com EDTA, mas não no citrato, pois o EDTA induz à agregação das plaquetas *in vitro*.

REFERÊNCIAS

1. PLEBANI M, CARRARO P. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. Clin Chem. 2007;53(7):1338-42.
2. LIPPI G, SALVAGNO GL, SOLERO GP, GUIDI GC. The influence of tourniquet time on hematological testing for antidoping purposes. Int J Sports Med. 2006;27:359-62.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- BANFI G. Preanalytical phase in haematology. *JMB*. 2008;27:348-53.
- CORNBLEET J. Spurious results from automated hematology cell counters. *Lab Med*. 1983;14(8):509-14.
- DAVIS BH, DASGUPTA A, KUSSICK S, HAN JY, ESTRELLADO A; ICSH/ICCS WORKING GROUP. Validation of cell-based fluorescence assays: Practice guidelines from the ICSH and ICCS – Part II – Pre-analytical Issues. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84(5):286-90.
- KOEPKE JA, VAN ASSENDELFT OW, BRINDZA LJ, DAVIS BH, FERNANDES BJ, GEWIRTZ AS, RABINOVITCH A. H20-A – Reference leukocyte differential count and evaluation of instrumental methods. *CLSI*. 2007;27(4):1-76.
- LIPPI G, CHANCE JJ, CHURCH S, DAZZI P, FONTANA R, GIAVARINA D ET AL. Preanalytical quality improvement: from dream to reality. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(7):1113-26.
- OLIVEIRA RAG. Erros no hemograma automatizado e suas correções. In: Oliveira RAG. Hemograma: como fazer e interpretar. São Paulo: Livraria Médica Paulista Ltda; 2007. p. 183-200.
- OLIVEIRA RAG. Esfregaço de sangue e colorações. In: Oliveira RAG. Hemograma: como fazer e interpretar. São Paulo: Livraria Médica Paulista Ltda; 2007. p. 220-9.
- PLEBANI M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine. *Clin Chem Lab*. 2006;44:750-9.
- VAJPAYEE N, GRAHAM SS, BEM S. Basic examination of blood and bone marrow. In: McPherson RA, Pincus MR (eds.). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22. ed. St. Louis: Elsevier; 2017. Cap. 30.
- ZINI G. Stability of complete blood count parameters with storage: toward defined specifications for different diagnostic applications. *Int Jnl Lab Hem*. 2014;36:111-3.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).



Abbott



SIMPLICIDADE INTEGRADA SIMPLIFICADO PARA O SEU LABORATÓRIO.

DESCUBRA O NOVO Alinity h-series

Alinity h-series incorpora seu fluxo de trabalho de hematologia, desde alta produtividade para hemograma completo até preparação e coloração de lâminas automatizadas. Com uma esteira interna bidirecional e produtividade de 125 amostras por m², apresenta alto desempenho com um dos menores tamanhos disponíveis.

Visite-nos no [estande #01 e 02](#) no SBPC 2018 ou www.corelaboratory.abbott/alinity para mais informações.


CHOOSE TRANSFORMATION™

Atinja, de forma mensurável, uma melhor performance na área da saúde.



Alinity e Choose Transformation são marcas comerciais da Abbott Laboratories em várias jurisdições.
© 2017 Abbott Laboratories. ADD-00062522.
MP12JUL2018B - Exp. Date: 11 de Julho de 2020 / Registro MS: 80146502148

Alinity h-series



CI ONLINE PARA
ATENDER A TODOS
OS CONTROLES
INTERNOS
LABORATORIAIS,
PORQUE A
ROTINA MERECE SER
MAIS **SIMPLES.**

AMOSTRA		
Gb04	7,86	
Gb05	7,08	
Gb06	7,15	
Gb07	7,15	
Gb08	7,80	7,82
Gb09	7,65	7,68
Gb10	7,08	

Os programas de controle interno da Controllab são uma moderna ferramenta de auxílio aos laboratórios para o **monitoramento contínuo da qualidade** dos sistemas analíticos, fornecendo **segurança na emissão dos laudos** laboratoriais.

Uma grande vantagem na utilização dos Programas de Controle Interno da Controllab é que **as amostras são previamente valoradas por meio do Ensaio de Proficiência ou Interlaboratorial.**

Ao se inscrever nos programas de controle interno, o laboratório participante passa a ter acesso ao serviço via CI ONLINE, que simplifica a rotina.

O CI ONLINE monitora todos os **materiais de controle de outros fornecedores disponíveis no mercado e desenvolvidos pelos próprios laboratórios.** Ele integra-se ao sistema de informática laboratorial (LIS) e automatiza por completo a rotina dos controles internos. Além disso, atende às normas de acreditação laboratorial e comprova com rapidez a credibilidade e qualidade dos exames.



**SOLUÇÕES COMPLETAS PARA
CONTROLE DE QUALIDADE
vide página 48**

Serviços disponíveis para múltiplos segmentos. Consulte o catálogo *online* em www.controllab.com

Controllab
Lado a lado com você

[controllab.com](http://www.controllab.com) | +55 21 3891 9900 | contato@controllab.com

[facebook.com/controllab](https://www.facebook.com/controllab) | plus.google.com/controllab | [instagram.com/_controllab](https://www.instagram.com/_controllab)



Anemia

HemoCue® Hb 301

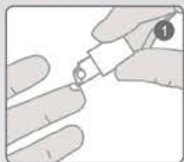
Precisão e rastreabilidade

Eficácia na triagem

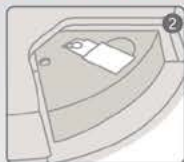
Analizador de hemoglobina total, com resultados quantitativos. Ideal para TLR na triagem de doadores em banco de sangue. Portabilidade e resistência para atuar em áreas de temperatura elevada, locais remotos e coleta externa.



Teste em três etapas simples



Encha a microcuveta



Coloque no Hb 301



Verifique o resultado

- Método de precisão laboratorial:
Absorbância no ponto isobéptico

- 10 µl de sangue total capilar,
venoso ou arterial

- Resultados em até 3 segundos

- Dispensa manutenção preventiva
e calibrações posteriores

- Registro ANVISA 10033120922





Anemia

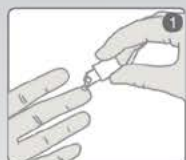
HemoCue® Hb 201+

Precisão e portabilidade Resultados imediatos

Método padrão ouro para diagnóstico e decisão de tratamento. Recomendado para triagem de anemia na atenção básica, pesquisas e setores críticos como centros cirúrgicos e UTIs Neonatais.



Teste em três etapas simples



Encha a microcuveta



Coloque no Hb 201+



Verifique o resultado

- Método de precisão laboratorial: Vanzetti Azidemethemoglobina G
- Amostras com 10 µl de sangue total, capilar, venoso ou arterial
- Resultados em até 60 segundos
- Dispensa manutenção preventiva e calibrações posteriores
- Registro ANVISA 10033120872

BIODINA
BRASIL



 **HEMOCUE**[®]

Infecção

HemoCue[®] WBC DIFF

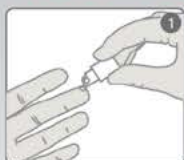
Praticidade e Portabilidade

Resultados quantitativos

Contagem total de leucócitos com diferenciais em 5 classes celulares: Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos e Basófilos. Possibilita diagnosticar infecção viral ou bacteriana para decisão rápida e fluxo de trabalho simplificado.



Teste em três etapas simples



Encha a microcuveta



Coloque no WBC DIFF



Verifique o resultado

- Método de precisão laboratorial: Hemolização, coloração e contagem de células
- 10 µl de sangue total, capilar ou venoso
- Resultados em até 5 minutos
- Dispensa manutenção preventiva e calibrações posteriores
- Registro ANVISA 10033120876

BIODINA[®]
BRASIL

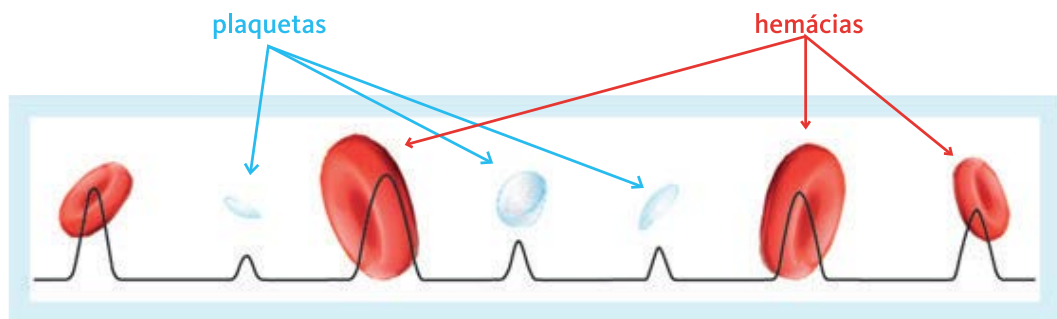
Tel. (21) 2435-9800/(11) 3318-2800 - sac@biodina.com.br / vendas@biodina.com.br
facebook.com/biodinabrasil - www.biodina.com.br - www.hemocue.com

HEMOGRAMA COM CONTAGEM DE PLAQUETAS FLUORESCENTES: MENOS INTERFERÊNCIA E MAIS PRECISÃO

A contagem precisa das plaquetas sempre foi um grande desafio na rotina laboratorial e é de suma importância que essa quantificação seja confiável. Possíveis interferentes que possam causar falsas plaquetoses ou falsas plaquetopenias devem ser identificados e as contagens corrigidas.

Como as plaquetas podem ser quantificadas:

- I. **Por impedância:** as células passam por uma abertura, onde 2 eletrodos emitem uma corrente elétrica. A magnitude da interrupção da corrente elétrica gera sinais correspondentes ao volume da célula.

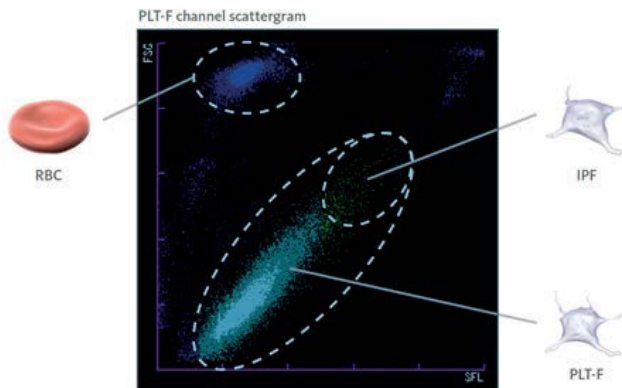


O método de focalização hidrodinâmica utilizado nos analisadores da Sysmex, melhora a performance da discriminação por impedância elétrica, já que com a focalização as partículas passam individualmente pelo centro do capilar.

- II. **Contagem óptica:** baseado na citometria de fluxo. A suspensão de células é injetada em uma fila única (focalização hidrodinâmica) e cada célula atravessa um feixe de luz gerado por um laser diodo. A dispersão de luz é medida em diferentes ângulos que determinam o volume e a complexidade das células.
- III. **Contagem em câmara:** A amostra de sangue é diluída, as hemácias são lisadas e as plaquetas são contadas na câmara de Neubauer ao microscópio.
- IV. **Método imunológico usando marcadores de plaquetas (CD61/CD41):** é o método de referência para a contagem de plaquetas. Receptores específicos da superfície das plaquetas são marcados com anticorpos monoclonais fluorescentes e detectados por citometria de fluxo.

A plaqueta fluorescente

Os analisadores Sysmex Série-XN possuem um canal dedicado à identificação e contagem das plaquetas (PLT-F). Um fluorescente específico – Oxazina – cora o retículo endoplasmático rugoso e a mitocôndria da plaqueta.



Combinando o volume da célula com a intensidade de fluorescência, é possível separar as populações de plaquetas de outras partículas ou de outras células, como hemácias microcíticas ou fragmentadas. Tem a vantagem de também separar as plaquetas imaturas (IPF), parâmetro de valor clínico já reconhecido, principalmente na investigação das plaquetopenias.

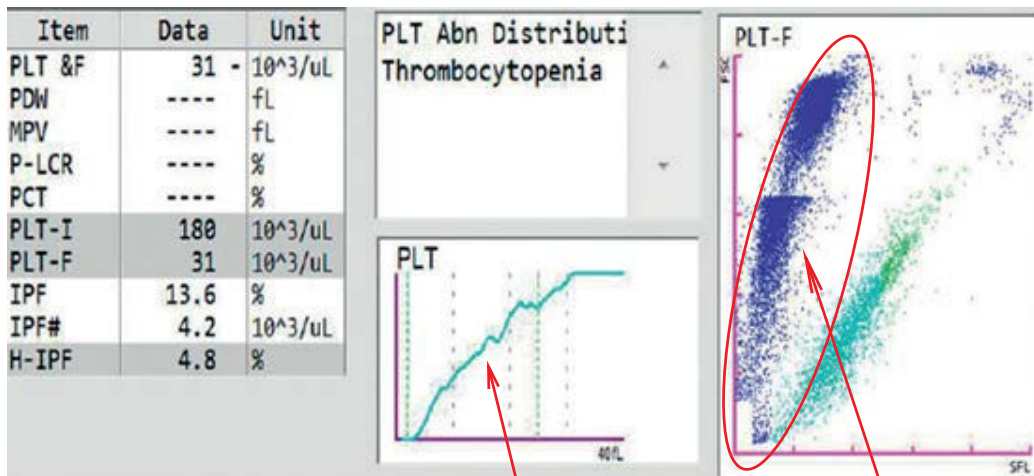
Quando a contagem por impedância não garantir um resultado com precisão, automaticamente a amostra será processada no Canal de PLT-F, onde o tempo de contagem se estende em 6 vezes. Isso possibilita uma contagem mais precisa, principalmente nas plaquetopenias e/ou na existência de interferentes.

Interferentes nas contagens de plaquetas

- Plaquetas gigantes
- Agregação e aglutinação plaquetárias
- Satelitismo plaquetário
- Fragmentos de leucócitos
- Fragmentos de hemácias menores do que 25 fL.
- Bactérias ou fungos
- Hemácias microcíticas

A plaqueta fluorescente na rotina laboratorial

No exemplo abaixo vemos o resultado de uma amostra de sangue em que as contagens de plaquetas pela impedância (PLT-I) e pela fluorescência (PLT-F) mostram valores muito distintos.



Interferência na contagem de plaquetas

População eritrocitária irregular, presença de partículas muito pequenas. Fragmentos?

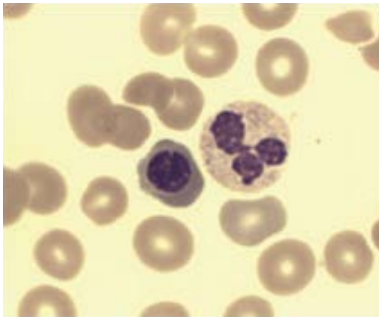
No canal de PLT-F foi possível a diferenciação entre os dois tipos celulares, o que permitiu a constatação da plaquetopenia.

O que isso significa?

- Melhor detecção da presença de interferentes;
- Contagens mais confiáveis, especialmente nos casos de plaquetopenia;
- Maior precisão e agilização da rotina.

CONTAGEM AUTOMATIZADA DE ERITROBLASTOS (NRBC): SEM INTERFERÊNCIA E SEM NECESSIDADE DE CORREÇÕES

Em condições normais os representantes da série eritrocítica que circulam pelo sangue são os reticulócitos e as hemácias maduras, estando os demais tipos celulares restritos ao ambiente da medula óssea (MO). No entanto, o eritroblasto pode alcançar a circulação em situações onde há destruição ou lesão da MO, na hematopoiese extramedular, ou quando há aumento excessivo da atividade eritropoiética, como nos episódios hemolíticos agudos ou hemorragias graves.



Além disso, tem sido observado que a intensidade e duração da presença dos eritroblastos no sangue estão associadas com um pior prognóstico em diversas doenças hematológicas ou não, assim como em processos infecciosos graves.

Assim, sua presença independente do número, deve ser sempre relatada para que se investigue a possível causa da anormalidade.

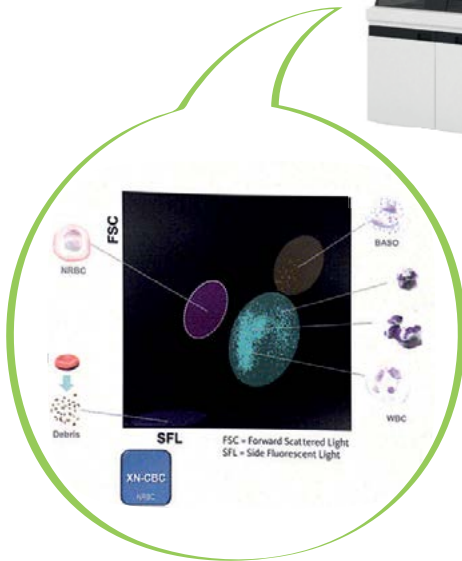
Como detectar e quantificar os eritroblastos?

1. Observação microscópica da extensão sanguínea
 - a. Imprecisa, demorada
 - b. Requer a correção do número de leucócitos totais
2. Citometria de fluxo convencional usando CD 71
 - a. Necessita um profissional especializado
 - b. Alto custo
 - c. Não se aplica ao laboratório de rotina
3. Por automação nos analisadores hematológicos
 - a. Em geral são contados junto com os linfócitos e, portanto, estão inseridos no total de leucócitos. Um alarme é gerado, que indica a necessidade de revisão de lâmina, sua contagem à microscopia e posterior correção da contagem total de leucócitos e dos linfócitos.

VALORES ELEVADOS DE ERITROBLASTOS NO SANGUE PODEM INTERFERIR NAS CONTAGENS DE LEUCÓCITOS, GERANDO FALSAS LEUCOCITOSE

Eritroblastos (NRBC) nos analisadores hematológicos Sysmex Série-XN

Na Série-XN os NRBC são identificados e contados num novo canal -WRN Channel- juntamente com os leucócitos, sem a necessidade de reagente adicional ou preparo especial da amostra, além de dispensar a correção nas contagens de leucócitos, já que essa correção é feita automaticamente.



Nesse canal os basófilos são separados dos demais leucócitos, as hemácias são lisadas e um corante fluorescente cora ácidos nucléicos e organelas celulares dos leucócitos e das hemácias nucleadas. As diferenças de fluorescência separam as células por categorias, que são contadas separadamente.

Mais um aspecto inovador é que a avaliação de NRBC é fornecida em todos os exames, em números percentuais e absolutos, fazendo parte do hemograma de rotina.

O que isso significa?

- **Precisão nas contagens:** muitos eventos contados na mesma amostra, sem interferência nas demais contagens
- **Praticidade:** não há necessidade de cálculos – correção automática das contagens de leucócitos
- **Agilidade na rotina:** liberado junto com o hemograma, sem nenhuma ação adicional

O dímero D (DD) é um produto específico da degradação de coágulos de fibrina que resulta da ação de três enzimas: trombina – gerada a partir da ativação da cascata de coagulação que converte o fibrinogênio (Figura 1A) em monômero de fibrina (Figura 1B); fator XIII ativado – estabiliza a fibrina, polimerizando-a por meio de ligações covalentes entre os seus monômeros (Figura 1C); e plasmina – enzima da fibrinólise que degrada a fibrina polimerizada (Figura 1D). A meia-vida plasmática dos DD é de aproximadamente 8 horas e a depuração ocorre nos rins e no sistema reticuloendotelial.

A quantificação laboratorial é amplamente utilizada, pois o DD compreende um marcador da ativação da coagulação e do processo fibrinolítico. Em indivíduos saudáveis, é detectado pela conversão fisiológica de aproximadamente 2 a 3% do fibrinogênio em fibrina e na vigência de um processo trombótico; os valores podem atingir oito vezes o valor da normalidade, com redução paralela à defervescência dos sintomas clínicos e introdução do tratamento anticoagulante.

Assim como os demais testes da hemostasia, para o ensaio do DD as regras de coleta devem ser obedecidas, evitando-se acessos venosos contendo heparina ou solução salina, correção do volume de anticoagulante, caso o hematócrito do paciente esteja superior a 55%, e uso de agulhas de calibre adequado para evitar o turbilhonamento do sangue. Cabe apontar, principalmente, que, em situações de punção venosa difícil, a liberação do fator tecidual pode desencadear a formação de fibrina e esta, por sua vez, será degradada pela plasmina *in vitro*, causando falsa elevação no resultado do DD.

Muitas condições clínicas se caracterizam pelo aumento das concentrações de DD (Quadro 1); entretanto, o ensaio para a sua quantificação é potencialmente útil no diagnóstico e no tratamento de condições relacionadas com a trombose, in-

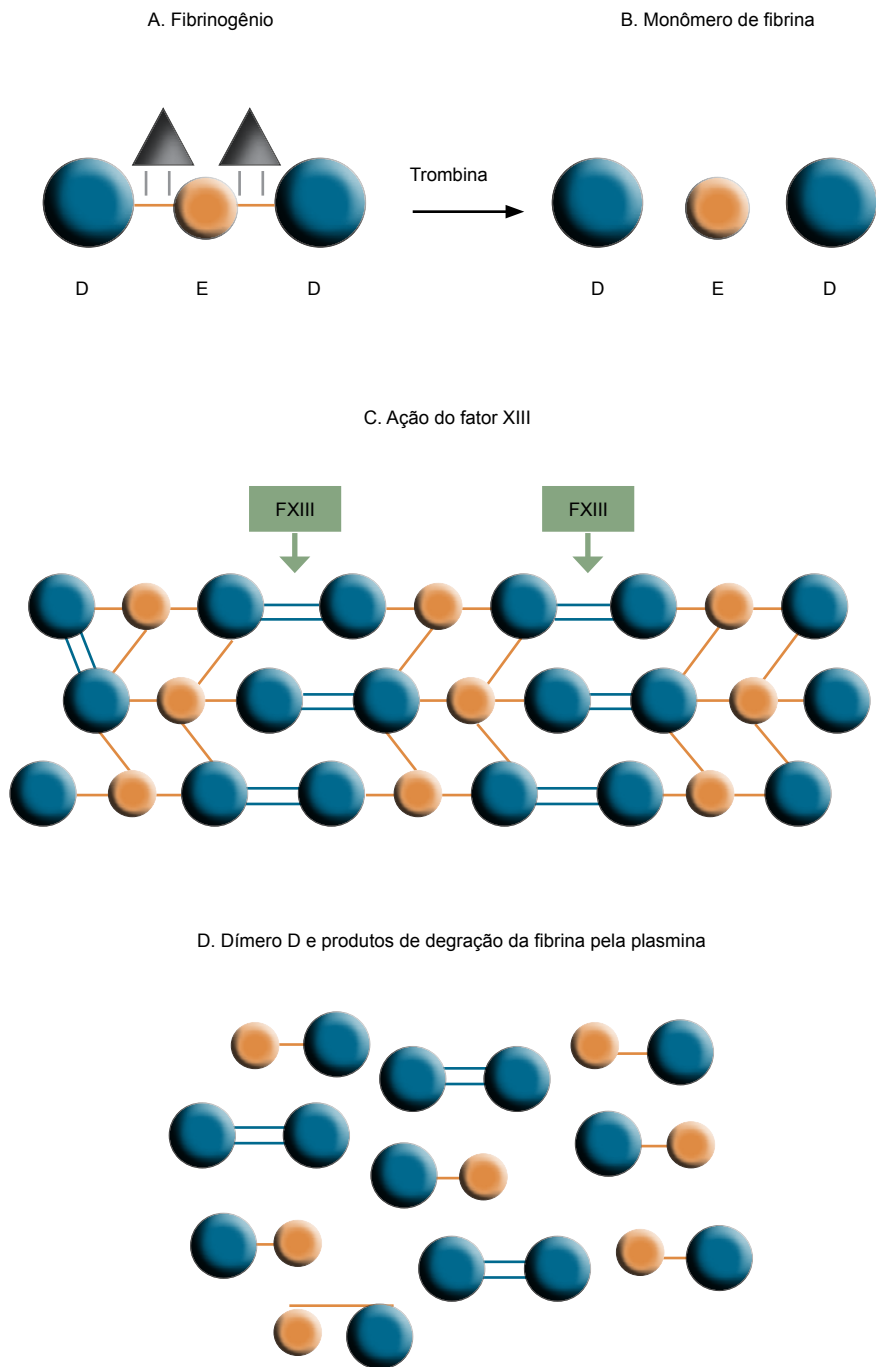


FIGURA 1 Mecanismo de formação dos dímeros.

cluindo coagulação intravascular disseminada (CIVD), tromboembolismo venoso (TEV), cardiopatia isquêmica, acidente vascular encefálico e terapia trombolítica. As concentrações aumentadas observadas em condições clínicas não trombóticas fazem do DD um teste inespecífico. Não obstante a essa limitação, várias aplicações do teste do DD têm sido propostas ao longo dos anos, incluindo: (a) identificação de indivíduos com risco aumentado de primeiro evento trombótico (arterial e venoso); (b) identificação de indivíduos com risco aumentado de TEV recorrente; (c) estabelecimento da duração ótima da profilaxia secundária após um primeiro episódio de TEV; (d) monitoramento da gravidez com risco trombótico.

QUADRO 1 Condições clínicas que cursam com elevação dos dímeros D

Idade avançada

Acidente vascular isquêmico

Período neonatal

Doença arterial periférica

Gestação

Aneurismas

Hospitalização

Insuficiência cardíaca congestiva

Hemólise

Infecção

Hemorragia

Neoplasia

Síndrome da angústia respiratória aguda

Cirurgia

Insuficiência renal ou hepática

Trauma

Queimaduras

Doença inflamatória intestinal

Coagulação intravascular disseminada

Terapia trombolítica

Tromboembolismo venoso

Miocardopatia isquêmica

Encontram-se disponíveis no mercado mais de 30 ensaios para a determinação dos DD, que pode ser realizada por de três categorias de testes:

- ELISA: quantitativo e altamente sensível. Sua alta sensibilidade e seu alto valor preditivo negativo possibilitam a utilização do método na exclusão do diagnóstico de TEV, sendo considerado padrão de referência. Entretanto, como desvantagens, destacam-se o longo tempo para sua execução e o fato de ser trabalhoso, pois requer algumas etapas manuais, além da necessidade de executar várias amostras simultaneamente; dessa maneira, torna-se inadequado para aplicação em situações de emergência. Atualmente, a combinação da técnica de ELISA com detecção final por luminescência (*enzyme linked immunofluorescence assay* – ELFA) representa uma alternativa totalmente automatizada capaz de liberar resultados em 15 a 35 minutos e que executa o teste em uma única amostra se necessário. No último caso, a única desvantagem em destaque refere-se à necessidade de um analisador exclusivo;
- Imunoensaios: baseados em látex realizados manualmente com inspeção visual semiquantitativa. São menos sensíveis que o ELISA, porém mais rápidos e sem necessidade de etapas complexas, o que possibilita sua aplicação em situações de emergência;
- Ensaios automatizados baseados em látex com leituras imunoturbidimétricas: são utilizados anticorpos monoclonais (MoAbs) criados contra epítopos específicos no DD que reagem com a fibrina reticulada, mas não com produtos de degradação do fibrinogênio ou produtos de degradação da fibrina não reticulada, garantindo, assim, alta especificidade do DD como biomarcador de formação e estabilização da fibrina. Apresentam elevada correlação com o método de ELISA e seus resultados são disponibilizados em 5 a 10 minutos.

Métodos de imunoensaio são extremamente comuns em muitas áreas do laboratório clínico; entretanto, são inúmeras as possibilidades de interferência durante a sua realização. As mais comuns estão relacionadas à hemólise, à lipemia, à icterícia e ao fator reumatoide elevado; muito embora outra interferência relativamente frequente seja a presença de anticorpos heterófilos na amostra.

O fator reumatoide é uma estrutura pentamérica da classe IgM capaz de se ligar à fração IgG dos anticorpos monoclonais utilizados no processo de quantificação dos DD por imunoturbidimetria. Essa interação entre o fator reumatoide e os anticorpos monoclonais causa aglutinação excessiva, reduz a turbidez da amostra e promove resultados falso-positivos.

Anticorpos humanos circulantes capazes de reagir com proteínas animais (anticorpos antianimais) muitas vezes não são reconhecidos, mas se revelam como fonte inesperada de interferência nos imunoensaios. Esses anticorpos antianimais surgem como resultado da exposição a um antígeno definido (p. ex., agente tera-

pêutico à base de anticorpos monoclonais), mas também em outras situações em que não se caracteriza essa exposição, como ocorre com os anticorpos antimurinos detectados em humanos (HAMA). Apresentam especificidade variada e a sua interferência nos imunoenaios pode promover resultados falso-positivos ou falso-negativos e decisões clínicas errôneas.

Outro aspecto crítico na determinação laboratorial dos DD é a diversidade de técnicas, cada qual com seus valores de referência, unidades de medida e características operacionais. Como consequência, a comparação direta dos resultados obtidos por diferentes metodologias torna-se inadequada.

A limitação do DD em confirmar o diagnóstico do TEV pode ser acentuada em diversos grupos de pacientes e contextos clínicos, como pós-operatórios, gestantes e puérperas, eventos trombóticos progressivos, idosos etc. Nessas situações, embora a sensibilidade do teste permaneça elevada, a possibilidade de resultados falso-positivos aumenta, uma vez que não foram estabelecidos os valores de referência de normalidade nesses grupos.

Em idosos, a literatura descreve uma significativa redução da especificidade do teste e redução da aplicação clínica do DD com o avanço da idade, permanecendo reservado às situações em que o acesso aos exames de imagem seja restrito, por sua indisponibilidade ou pela insuficiência renal que impeça o emprego de contrastes.

Em pacientes com câncer e com eventos trombóticos prévios, os estudos sobre a utilidade clínica do DD na exclusão do TEV ainda são limitados.

Há um incremento significativo dos níveis de DD com a progressão da idade gestacional; entretanto, descreve-se que cerca de 40% das gestantes apresentam DD normal até a 30ª semana e 25% até a 42ª semana. Considerando-se a porcentagem substancial de pacientes gestantes que se apresentaram com resultados negativos, é possível utilizar o teste como ferramenta diagnóstica, no intuito de se evitar exames radiológicos.

Trinta anos se passaram desde a implantação do DD como teste auxiliar no diagnóstico do TEV e, ao longo desse período, o ensaio demonstrou ter elevada capacidade na exclusão dos eventos trombóticos quando utilizado em pacientes que chegam ao serviço de emergência. Sua principal limitação é a baixa especificidade em grupos especiais de pacientes, como idosos, gestantes e portadores de neoplasias.

CASO CLÍNICO

Mulher, de 24 anos de idade, comparece ao pronto atendimento com história de dor torácica e dispneia há 1 semana, após trauma de tórax. Em seu histórico, relatava uso prévio de contraceptivo oral suspenso há 6 meses, negava viagem prolongada ou intervenção cirúrgica recentes e, também, antecedente tabagismo. Como histórico familiar relevante, referia uma prima com morte súbita aos 36 anos por

embolia pulmonar maciça. Ao exame físico, temperatura de 37°C, frequência respiratória de 20 ipm, frequência cardíaca de 90 bpm e pressão arterial de 110 × 70 mmHg. A ausculta pulmonar evidenciava roncosp bilaterais basais e o exame do abdome estava inalterado. A radiografia de tórax foi normal e o DD (método imunoturbidimétrico), de 2.900 ng/mL FEU (unidades equivalentes de fibrinogênio) (até 500 ng/mL FEU). Foram solicitadas cintilografia de ventilação-perfusão pulmonar e ultrassonografia de membros inferiores, que se mostraram igualmente normais. Iniciada analgesia e solicitada nova determinação de DD por metodologia imunoenzimática, que revelou resultado de 90 ng/mL (até 500 ng/mL).

A incoerência de resultados observados entre as metodologias motivou a determinação do fator reumatoide, a qual foi negativa, e a pesquisa de anticorpos, heterófilos que revelou a positividade de um subtipo anti-HAMA IgM. Tal abordagem permitiu a exclusão de processo tromboembólico e a paciente recebeu alta hospitalar assintomática.

Apesar do valor inicialmente elevado dos DD, o histórico clínico, o exame físico e os exames de imagem (cintilografia e ultrassonografia) possibilitaram a exclusão do evento trombótico e suscitaram a suspeita de possível interferente laboratorial na determinação dos DD. A quantificação por metodologia imunoenzimática resultou normal e a investigação dos possíveis fatores envolvidos em uma quantificação superestimada pela imunoturbidimetria revelou que a paciente apresentava anticorpos heterófilos anti-HAMA.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- KITCHEN S, OLSON J, PRESTON FE. Quality in laboratory hemostasis and thrombosis. 2. ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2013.
- KRICKA LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clinical Chemistry*. 1999;45(7):942-56.
- MEIJER P, HAVERKATE F, KLUFT C. A model of harmonization of test results of different quantitative D-dimer methods. *Thromb Hemost*. 2006;95:567-72.
- RIGHINI M, PERRIER A, DE MOERLOOSE P, BOUNAMEAUX H. D-Dimer for venous thromboembolism diagnosis: 20 years later. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008;(6):1059-71.
- ROUVIÈRE JA, DEVIGNES J, DE MAISTRE E, KENNEL A, CHABOT F, LECOMPTE T. Incohérence entre deux méthodes de dosage des D-dimères: un cas d'interférence d'anticorps humain anti-souris. *Ann Biol Clin*. 2008;66(4):441-6.
- RUTSTEIN JE, HOLAHAN JR, LYONS RM, POPE RM. Rheumatoid factor interference with the latex agglutination test for fibrin degradation products. *J Clin Lab Med*. 1978;(92):529-35.
- TRIPODI A. D-Dimer Testing in Laboratory Practice. *Clinical Chemistry*. 2011;57(9):1256-62.
- WELLS PS, ANDERSON DR, RODGER M, FORGIE M, KEARON C, DREYER J ET AL. Evaluation of D-Dimer in the diagnosis of suspected deep- vein thrombosis. *The New England Journal of Medicine*. 2003;(349):1227-35.

22 Cuidados pré-analíticos em citometria de fluxo para doenças hematológicas

INTRODUÇÃO

A citometria de fluxo é comumente utilizada para o diagnóstico e o seguimento de neoplasias hematológicas, no entanto, também tem aplicações em outras áreas, como hemostasia, hemoterapia, imunologia, patologia e reprodução humana. Neste capítulo, discorrer-se-á sobre os cuidados pré-analíticos com os materiais utilizados para a avaliação de doenças hematológicas. O pré-analítico em imunofenotipagem também envolve a montagem dos painéis, o modo de processamento das amostras, os cuidados com calibração e a padronização do citômetro de fluxo; porém, são temas extensos que demandariam um capítulo específico, o que não compreende o objetivo desta revisão.

Para as diferentes doenças pesquisadas, podem ser analisados diversos materiais, como sangue periférico, aspirado de medula óssea, fragmento de tecidos, líquido cefalorraquidiano e demais líquidos biológicos. Cada material tem diferentes especificidades para transporte, armazenamento e processamento.

Ao contrário do sangue periférico, a coleta de materiais nobres envolve procedimentos caros, invasivos e, por vezes, desconfortáveis. Esses materiais devem ser considerados amostras preciosas para o diagnóstico e ter tratamento diferenciado, com visão mais liberal quanto aos critérios de aceitação quando comparados aos critérios normalmente adotados por laboratórios clínicos.¹ Independentemente das condições em que esse tipo de amostra é recebida, deve-se fazer o necessário para extrair informações úteis de qualquer amostra submetida à análise.¹ No entanto, todos os materiais recebidos em condições não ideais devem ser identificados e o laudo precisa informar as condições em que a amostra foi recebida e as possíveis interferências.¹⁻³

IDENTIFICAÇÃO

As amostras devem ser identificadas antes ou imediatamente após a coleta. A identificação deve conter pelo menos duas informações que permitam individualizar o paciente, a data e a hora da coleta.^{4,5} Quando mais de uma amostra do mesmo paciente for enviada ao laboratório, deve-se descrever o local de coleta de cada amostra na identificação.⁵ É imprescindível enviar o material ao laboratório com um pedido médico que informe a indicação do exame e se o paciente foi submetido recentemente a químico ou imunoterapia.⁵ Sem essas informações, pode haver comprometimento quanto à definição do painel e, conseqüentemente, à qualidade da informação gerada pelo exame.

ANTICOAGULANTES

Todos os materiais biológicos – as células vivas em particular – começam a deteriorar no momento em que são retirados do corpo.⁶ A escolha do anticoagulante influenciará do desempenho do teste e na estabilidade da amostra.⁶ Essa escolha depende do tipo de amostra, da indicação do exame, do transporte e do armazenamento a que será submetida.⁵

Para sangue periférico, o etilenodiamino tetra-acetato (EDTA), a heparina sódica ou o ácido citrato dextrose (ACD) podem ser utilizados.⁵ Se a mesma amostra de sangue periférico também for empregada para realização de hemograma e contagem diferencial, o EDTA deve ser o anticoagulante de escolha.^{4,5}

Para o aspirado de medula óssea, a heparina representa o anticoagulante de escolha para a maior parte das indicações clínicas e deve ser obrigatoriamente utilizada se a mesma amostra for encaminhada para citogenética.^{4,5} Se a coleta for realizada em EDTA, o aspirado pode ser utilizado para citometria de fluxo, mas não para citogenética.^{4,5} O ACD não é apropriado para aspirado de medula óssea, já que, se a proporção entre o volume de amostra e de anticoagulante não estiver correta, pode haver alteração de pH e redução da viabilidade celular.⁵

A escolha do anticoagulante pode interferir na estabilidade da amostra. Os granulócitos começam a apresentar apoptose após 6 horas quando armazenados em EDTA ou em ACD; entretanto, há maior estabilidade e menos células apoptóticas quando armazenados em heparina.⁷

SOLUÇÕES PARA PRESERVAÇÃO

O uso de soluções estabilizantes para preservação celular deve ser validado pelo laboratório antes da implementação em sua rotina. Essas soluções fixam as células e podem provocar alterações de tamanho e complexidade celular, modificar a expressão de antígenos e mascarar epítomos.^{5,6} As soluções estabilizantes devem ser utilizadas se a estabilidade da amostra não for longa suficiente para o seu transporte do local de coleta para o laboratório.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

Em geral, as amostras devem ser enviadas ao laboratório imediatamente após a coleta.^{1,4} Todas devem ser processadas o mais rapidamente possível, sobretudo aquelas que contêm células neoplásicas com alto índice proliferativo, aspirado de medula óssea de pacientes com mieloma ou de pacientes submetidos a químico ou radioterapia.⁵

A integridade de amostras de sangue periférico e aspirado de medula óssea é mantida quando armazenados à temperatura ambiente (18 a 25°C).²⁻⁵ Líquido cefalorraquidiano, linfonodos e fragmentos de tecidos devem ser armazenados refrigerados entre 2 e 8°C.⁴ Se a amostra não for líquida, deve ser mantida em líquido isotônico (meio de cultura ou soro fisiológico) para evitar desidratação.^{1,2} É importante que a temperatura seja controlada, monitorada e registrada durante o transporte e na chegada ao laboratório.

Temperaturas diferentes desse intervalo podem interferir na expressão de antígenos. Manter a amostra armazenada a 37°C acelera a apoptose de neutrófilos com consequente redução da expressão de CD16.⁷ Neutrófilos de amostras preparadas a 4°C expressam menos CD35 e CD11b do que aqueles preparados à temperatura ambiente.⁷ Portanto, deve-se ter cuidado ao analisar amostras refrigeradas durante o armazenamento e processadas à temperatura ambiente, já que essa mudança pode provocar ativação de neutrófilos e modificar a expressão de antígenos.⁷

O tempo-limite para armazenamento depende do tipo de amostra,¹ das condições de armazenamento¹ e da indicação do exame. Sangue periférico e aspirado de medula óssea coletados em heparina apresentam estabilidade de 48 a 72 horas para a maior parte das indicações clínicas,^{1,3,5} EDTA por 48 horas⁵ e ACD por 72 horas.⁵

Os meios de transporte atuais e a logística de envio via aérea possibilitam que as amostras cheguem a qualquer laboratório de referência em até 48 horas após a coleta; entretanto, atrasos podem fazer com que esse intervalo chegue a 72 a 96 horas. Como citado anteriormente, amostras de materiais nobres, como aspirado de medula óssea, biópsia de lesão ou material coletado antes do início de quimioterapia, não devem ser rejeitadas mesmo se recebidas após esse prazo, mas essa condição deve ser reportada no laudo.^{1-3,5}

LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO, LÍQUIDOS CAVITÁRIOS, MATERIAL DE ASPIRADO POR AGULHA FINA E FRAGMENTOS DE TECIDO

Em geral, amostras de líquido cefalorraquidiano são hipocelulares e têm baixa estabilidade para análise por citometria de fluxo. A viabilidade declina rapidamente, e a morte celular começa a ocorrer em menos de 1 hora após a coleta. Essas amostras devem ser transportadas à temperatura ambiente e processadas o mais rapida-

mente possível.⁸ Em razão da baixa estabilidade, recomenda-se que seja coletado em volume igual ou maior de meio de cultura celular ou em volume adequado de soluções comerciais para preservação celular.^{4,5,8} O uso do meio de cultura RPMI possibilita que o líquido cefalorraquidiano seja processado em até 18 horas quando armazenado a 4°C; com o uso do Transfix® (Cytomark™, Reino Unido), a amostra pode ser armazenada por 48 a 72 horas a 4°C.⁸ O médico-assistente deve ser orientado ao fato de que essas soluções são adequadas apenas na imunofenotipagem. Caso haja solicitação de outros exames no líquido cefalorraquidiano, devem ser coletados em recipientes diferentes.

Líquidos cavitários devem ser coletados em tubo seco ou com anticoagulante EDTA, heparina ou ACD.⁵ Caso o líquido esteja contaminado por sangue periférico, deve-se dar preferência à coleta em tubo com anticoagulante.⁵ Material de aspirado por agulha fina deve ser transportado em soluções comerciais para preservação.

Líquidos biológicos são materiais nobres e, em geral, com baixa celularidade. Idealmente, devem ser coletados no mínimo 5 mL;⁴ porém, muitas vezes, isso não é possível e o laboratório precisa fazer todo o esforço para extrair informações úteis de qualquer volume de amostra que receber.

As amostras de tecido devem ser acondicionadas em frasco estéril e imersas em volume suficiente de meio adequado de transporte, preferencialmente meio de cultura celular, enquanto a amostra é transportada para o laboratório de citometria de fluxo.^{4,5} Se possível, o tecido (incluindo medula óssea) deve ser picotado antes do transporte, para aumentar a exposição das células ao meio de cultura.⁵

ESTUDO DE PLAQUETAS

A citometria de fluxo pode auxiliar no diagnóstico de diversas doenças plaquetárias. No entanto, a avaliação da ativação plaquetária *in vivo* deve ser realizada de maneira cuidadosa, pela facilidade de ocorrer ativação plaquetária *in vitro*.⁹

Para estudos de ativação plaquetária, procedimentos standardizados devem ser estabelecidos para a coleta sanguínea, a fim de evitar ativação *in vitro* durante a coleta e o processamento da amostra.⁹

A maior parte dos investigadores sugere utilizar citrato como anticoagulante para o estudo de plaquetas.⁹ Para a avaliação da ativação plaquetária, as amostras devem ser processadas em 15 a 30 minutos após a coleta.⁹ Para análise imunofenotípica de antígenos de superfície, Mody et al. demonstraram não haver alteração na intensidade de expressão de CD41a e CD42b em até 48 horas de armazenamento.⁹ Um estudo ainda não publicado realizado em nosso laboratório confirmou a estabilidade de CD41 em 48 horas de armazenamento, demonstrou que o CD42a e o CD61 apresentam a mesma estabilidade e que há perda não significativa de intensidade de expressão de CD42b nesse mesmo período de armazenamento.

Não há vantagem em fixar amostras com paraformaldeído para análise de plaquetas. A fixação impede a ativação plaquetária e, conseqüentemente, não permite posterior análise funcional das plaquetas.⁹ Além disso, a amostra fixada deve ser diluída ou lavada em até 30 minutos para minimizar os efeitos adversos do formaldeído na expressão antigênica das plaquetas.⁹

RECEBIMENTO DO MATERIAL

No ato do recebimento do material, é importante avaliar as condições da amostra. Coágulos e hemólise podem comprometer a qualidade do exame. Materiais nobres (aspirados de medula óssea, líquidos cavitários e fragmentos de tecido) não devem ser rejeitados. Esses materiais precisam ser processados, analisados cuidadosamente e suas condições subótimas e possíveis interferências relatadas no laudo para melhor interpretação clínica.

Cada laboratório deve manter protocolos específicos que descrevam procedimentos de armazenamento e manipulação das amostras para citometria de fluxo.¹

CASOS CLÍNICOS

Caso clínico 1

Paciente do sexo masculino, 33 anos de idade. Procurou atendimento médico com quadro de febre há 2 dias, adinamia e pequenos sangramentos. Exame físico demonstra palidez cutaneomucosa, equimose, taquicardia e extremidades mal perfundidas. Exames laboratoriais iniciais evidenciam pancitopenia, lactato desidrogenase acima de três vezes o limite superior da normalidade e funções renal e hepática normais. Com a hipótese diagnóstica de leucemia aguda, o hematologista assistente realiza punção de medula óssea, coleta 3 mL de aspirado de medula óssea em tubo com EDTA e o envia ao laboratório para estudo imunofenotípico.

O laboratório recebe a amostra 2 horas após a coleta e confirma que o transporte ocorreu à temperatura ambiente. Após verificar o pedido médico com hipótese diagnóstica informada, realizou-se marcação de painel de triagem para definir linhagem de possível leucemia aguda. Foram obtidos os gráficos demonstrados na Figura 1.

Os gráficos da análise demonstram que há marcação inespecífica para todos os antígenos pesquisados. A partir desse achado e da correlação com a morfologia demonstrada em mielograma, concluiu-se que as células estavam em processo de apoptose, o que, em correlação com achados clínicos, resultou no diagnóstico de necrose medular.

A necrose medular representa um achado raro e de mau prognóstico, geralmente secundária a neoplasias hematológicas da linhagem linfóide ou à infiltração de medula óssea por neoplasia não hematológica.¹⁰ Nesse caso, apesar de os cuidados

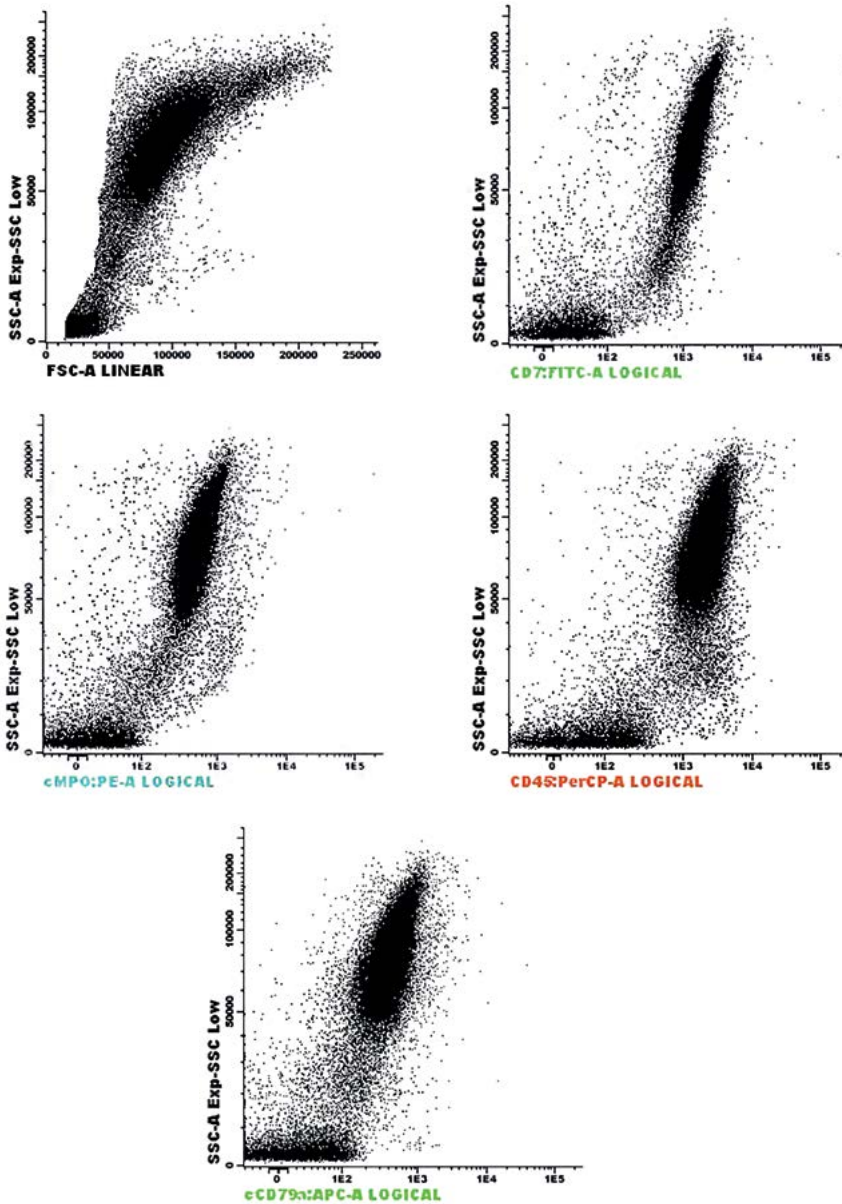


FIGURA 1 Gráfico de análise da amostra. Verifica-se marcação inespecífica para antígenos da linhagem mielóide (MPO), linfóide B (cCD79a) e linfóide T (CD7).

Fonte: arquivo do autor.

pré-analíticos terem sido seguidos adequadamente, a condição clínica do paciente impossibilitou que a amostra chegasse ao laboratório em condições para análise imunofenotípica.

Caso clínico 2

Paciente de 66 anos com diagnóstico recente de leucemia mieloide aguda apresentou sangramento em sistema nervoso central (SNC). Após estabilização clínica, foi realizada punção lombar para avaliação de infiltração neoplásica em SNC. Conforme recomendado, foram coletados 2 mL de líquido cefalorraquidiano em tubo com Transfix®, e a amostra foi refrigerada e transportada imediatamente ao laboratório. A análise demonstrou líquido cefalorraquidiano hiper celular, com 70% de blastos mieloides (Figura 2A).

A equipe médica assistente optou por realizar tratamento quimioterápico intratecal e repetir o exame após 3 semanas. A nova amostra chegou ao laboratório 6 horas após a coleta, foi armazenada em tubo de transporte sem fixador e transportada à temperatura ambiente. Apesar das condições não ideais, optou-se por receber e processar a amostra por tratar-se de material nobre. A análise demonstrou líquido cefalorraquidiano extremamente hipocelular, composto exclusivamente por linfócitos maduros (Figura 2B).

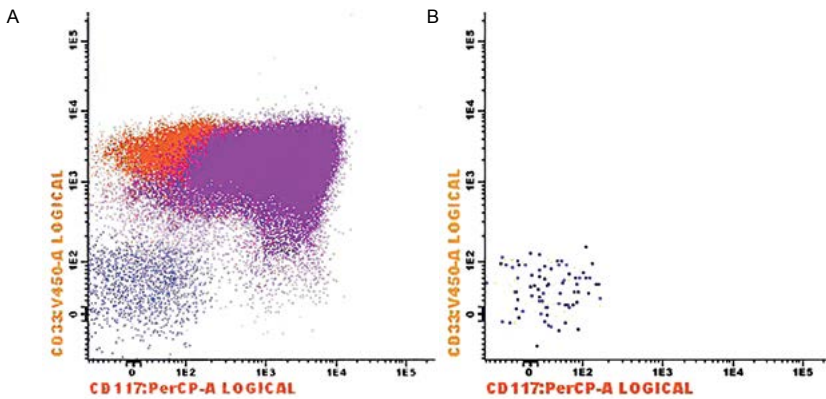


FIGURA 2 Gráficos de análise das amostras de líquido cefalorraquidiano. **A.** Primeira amostra com população de blastos (roxo), granulócitos (laranja) e linfócitos (azul). **B.** Segunda amostra com pequena população de linfócitos.

Fonte: arquivo do autor.

As diferentes condições de armazenamento e transporte podem ter interferido no resultado das análises. A primeira amostra foi coletada e transportada de maneira ideal para manter viabilidade celular e evitar resultado falso-negativo. A segunda amostra não foi armazenada com fixador, tendo sido recebida pelo laboratório apenas 6 horas após a coleta. Desse modo, não se pode saber se a ausência de células neoplásicas nessa amostra decorreu do tratamento realizado ou de interferências pelas condições pré-analíticas não ideais. As condições de recebi-

mento da amostra e a possível interferência no resultado foram relatadas no laudo para possibilitar uma melhor interpretação clínica.

Caso clínico 3

Paciente de 70 anos, em acompanhamento hematológico com suspeita de mieloma múltiplo. Realiza punção de medula óssea: 2 mL do aspirado foram enviados ao laboratório de citometria para pesquisa de plasmócitos clonais. A amostra foi transportada à temperatura ambiente, recebida pelo laboratório 5 horas após a coleta e processada imediatamente. A análise demonstrou 2,08% de plasmócitos com expressão monoclonal de cadeia leve kappa. Para a identificação dos plasmócitos, foi selecionada população celular com expressão de CD38 e CD138 (Figura 3A).

Após a confirmação diagnóstica de mieloma múltiplo, o paciente foi submetido à poliquimioterapia com boa resposta clínica. Seis meses após o último ciclo de quimioterapia, em um sábado à tarde, o paciente procurou novamente atendimento médico com quadro de febre e indisposição. O hemograma demonstrou pancitopenia e a equipe médica optou por realizar punção de medula óssea naquele mesmo dia. Amostra de aspirado de medula óssea foi coletada em tubo com anticoagulante EDTA, mantida à temperatura ambiente e encaminhada ao laboratório na segunda-feira, mais de 24 horas após a coleta. Após o recebimento, foi imediatamente processada. A análise demonstrou 17% de plasmócitos com expressão monoclonal de cadeia leve kappa. Durante a análise, notou-se que a população de plasmócitos mantinha expressão forte de CD38; porém, houve perda da expressão de CD138 (Figura 3B).

De posse desses resultados, a equipe médica assistente decidiu reiniciar o tratamento. Dessa vez, optou-se como tratamento de segunda linha a associação de quimioterapia com anticorpo anti-CD38. Houve melhora clínica e resolução da pancitopenia. Após nove ciclos do tratamento, foi realizada nova punção de medula óssea para pesquisa de doença residual. Foram coletados em EDTA 2 mL de aspirado de medula óssea, transportados no mesmo momento, à temperatura ambiente, ao laboratório de citometria. No pedido médico encaminhado com a amostra, havia descrição do protocolo de tratamento realizado. A amostra foi processada logo após o recebimento. A análise demonstrou 0,9% de plasmócitos com expressão monoclonal de cadeia leve kappa. Durante a análise, notou-se que os plasmócitos mantinham a expressão de CD138; porém, não havia expressão de CD38 em nenhuma célula analisada (Figura 3C).

A citometria de fluxo pode ser utilizada como auxiliar no diagnóstico de mieloma múltiplo e para pesquisa de doença residual em sangue periférico e aspirado de medula óssea.² *In vitro*, os plasmócitos são frágeis e podem se deteriorar em pouco tempo após a coleta.¹¹ As amostra podem ser coletadas em EDTA ou heparina –

a coleta em EDTA é preferível, já que a heparina pode causar redução na intensidade de expressão de CD138.^{2,3} Como visto no exemplo apresentado, o tempo de armazenamento pode reduzir a viabilidade da amostra e provocar a perda de expressão de CD138 pelos plasmócitos (Figura 3B).¹¹

O uso de anticorpos monoclonais para o tratamento de mieloma múltiplo é uma nova opção terapêutica. Esses anticorpos podem impedir a detecção por imunofenotipagem dos antígenos a eles ligados: o daratumumab e o isatuximab impedem a avaliação de CD38 (Figura 3C); o indatuximab ravtensine pode interferir na detecção de CD138.² O emprego desses anticorpos fez com que se iniciasse uma busca de novos marcadores para detecção de plasmócitos, como CD54, CD229, CD269 e CD319.^{2,12}

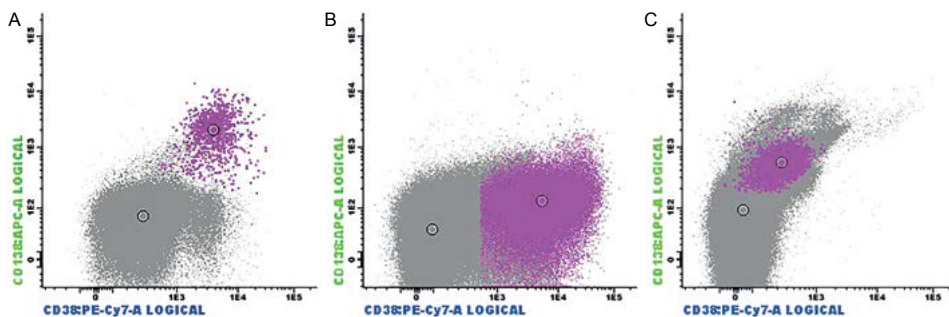


FIGURA 3 Análise dos plasmócitos. **A.** Plasmócitos apresentam expressão forte de CD38 e CD138. **B.** Plasmócitos com expressão de CD38, sem expressão de CD138. **C.** Plasmócitos com expressão de CD138; nota-se que não há expressão de CD38 nas células analisadas.

Fonte: arquivo do autor.

REFERÊNCIAS

1. STELZER GT, MARTI G, HURLEY A, MCCOY JR P, LOVETT EJ, SCHWARTZ A. U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry*. 1997;30(5):214-30. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>. Acesso em: maio de 2018.
2. SOH KT, TARIO JD JR, WALLACE PK. Diagnosis of plasma cell dyscrasias and monitoring of minimal residual disease by multiparametric flow cytometry. *Clin Lab Med*. 2017;37(4):821-53. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2017.08.001>>. Acesso em: maio de 2018.
3. STETLER-STEVENSON M, PAIVA B, STOOLMAN L, LIN P, JORGENSEN JL, ORFAO A ET AL. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(1):26-30. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21249>>. Acesso em: maio de 2018.

4. CORREIA RP, BORTOLUCCI ACA, LOPES ACW, SANDES AF, AZAMBUJA AP DE, VIANA MA ET AL. Recommendations for quality assurance in multiparametric flow cytometry: first consensus of the Brazilian Group of Flow Cytometry (GBCFLUX). *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2015;51(6):389-96.
5. DAVIS BH, DASGUPTA A, KUSSICK S, HAN JY, ESTRELLADO A; ICSH/ICCS WORKING GROUP. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS – part II – preanalytical issues. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84(5):286-90. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21105>>. Acesso em: maio de 2018.
6. DER STRATE BV, LONGDIN R, GEERLINGS M, BACHMAYER N, CAVALLIN M, LITWIN V ET AL. Best practices in performing flow cytometry in a regulated environment: feedback from experience within the European Bioanalysis Forum. *Bioanalysis*. 2017;9(16):1253-64. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4155/bio-2017-0093>>. Acesso em: maio de 2018.
7. ELGHETANY MT, DAVIS BH. Impact of preanalytical variables on granulocytic surface antigen expression: a review. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005;65(1):1-5. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.20051>>. Acesso em: maio de 2018.
8. KRAAN J, GRATAMA JW, HAIOUN C, ORFAO A, PLONQUET A, PORWIT A ET AL. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid. *Curr Protoc Cytom*. 2008;6(Unit 6.25). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/0471142956.cy0625s45>>. Acesso em: maio de 2018.
9. MODY M, LAZARUS AH, SEMPLE JW, FREEDMAN J. Preanalytical requirements for flow cytometric evaluation of platelet activation: choice of anticoagulant. *Transfus Med*. 1999;9(2):147-54. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>. Acesso em: maio de 2018.
10. WOOL GD, DEUCHER A. Bone marrow necrosis: ten-year retrospective review of bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(2):201-13; quiz 306. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1309/ajcp0tn1mcmolmpk>>. Acesso em: maio de 2018.
11. OLDAKER TA, WALLACE PK, BARNETT D. Flow cytometry quality requirements for monitoring of minimal disease in plasma cell myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(1):40-6. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21276>>. Acesso em: maio de 2018.
12. POJERO F, FLORES-MONTERO J, SANOJA L, PÉREZ JJ, PUIG N, PAIVA B ET AL. Utility of CD54, CD229, and CD319 for the identification of plasma cells in patients with clonal plasma cell diseases. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(1):91-100. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21269>>. Acesso em: maio de 2018.

23 Líquido cefalorraquidiano

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido com alto potencial diagnóstico pela existência de biomarcadores para doenças neurológicas, principalmente por sua proximidade das estruturas cerebrais e da medula espinal. É coletado por meio de procedimento médico, principalmente por punção lombar, mas também, em menor escala, por punção suboccipital e por aspiração ventricular. Esse procedimento deve seguir critérios específicos para evitar falta de volume e amostras inadequadas, além de minimizar possíveis interferentes de análise

Os principais erros laboratoriais relacionados à análise do LCR ocorrem na fase pré-analítica do processo laboratorial. Todo processo de análise do LCR deve ser estudado e compreendido por todos colaboradores para que tais fatores sejam minimizados e o potencial de diagnóstico do LCR, preservado.

Os laboratórios responsáveis pela análise do LCR devem ter um alto rigor no processo laboratorial e buscar a excelência em qualidade.

A identificação errada de pacientes, o transporte inadequado da amostra ou o uso de tubo incorreto para a coleta compreendem fatores passíveis de ocorrer em qualquer tipo de laboratório. Tais situações devem ser tratadas como não conformidades e consideradas para o aprendizado de todos os integrantes da equipe de colaboradores. A não identificação desses fatores ou a não correção sistemática desses erros implicam o não seguimento das boas práticas laboratoriais.

Deve-se estimular o uso de ferramentas para diminuir erros pré-analíticos, como a FMEA (*failure mode and effects analysis* – “Análise de modo e efeito de falha”), que visa compreender e analisar riscos, suas causas, suas possíveis fontes e suas consequências. Com a FMEA, pode-se determinar os riscos mais frequentes no laboratório e evitar a falha antes do evento.

Há fatores *in vitro* que influenciam a composição da amostra e, consequentemente, sua análise, podendo ser divididos em: (1) fatores relacionados à coleta da amostra; (2) fatores relacionados ao processamento inicial; e (3) fatores relacionados às condições de armazenamento. A padronização desses fatores é de extrema importância para se obter uma qualidade analítica consistente em que os resultados sejam precisos e reprodutíveis.

FATORES RELACIONADOS À COLETA DE AMOSTRAS

A punção para a coleta de LCR lombar deve ser realizada por médico especializado. São vários os objetivos dessa especialização: (1) realizar a correta interpretação do pedido feito pelo médico solicitante; (2) realizar a discussão do caso do paciente com a finalidade de orientar possíveis novos diagnósticos ou exames não conhecidos ou não solicitados; (3) realizar a técnica de punção perfeita a fim de minimizar a coleta traumática e, consequentemente, o aumento de eritrócitos na amostra (eritrócitos na amostra prejudicam a análise e, muitas vezes, diminuem a sensibilidade diagnóstica); e (4) dominar o conhecimento sobre as contraindicações da coleta.

Contraindicações para realização de punção lombar

A punção lombar (PL) é um procedimento de baixo risco. Contudo, devem ser observadas suas potenciais contraindicações visando prevenir eventuais complicações. As contraindicações devem ser interpretadas dentro do contexto de cada caso. Para tanto, é imprescindível uma análise das condições clínicas do paciente antes de realizar o procedimento. As situações clínicas que merecem especial atenção nesse sentido são descritas a seguir.

Hipertensão intracraniana

A herniação cerebral constitui o maior risco relacionado à PL, podendo ocorrer em pacientes com hipertensão intracraniana (HIC). Dessa maneira, recomenda-se a realização de neuroimagem, como a tomografia computadorizada, em pacientes com potencial risco de HIC. Os sinais que podem indicar HIC são redução do nível de consciência e sinais neurológicos focais, como hemiparesia, afasia, hemianopsia, papiledema, crise convulsiva, além de antecedentes de imunodepressão ou neoplasia. O risco de herniação é mais acentuado entre os pacientes com lesões cerebrais expansivas focais, sendo necessário avaliar mais cuidadosamente esses casos antes da PL. Pacientes com suspeita de meningite, sem lesões expansivas focais à neuroimagem, devem ser submetidos à PL mesmo quando da suspeita de HIC. Pacientes com HIC que tenham indicação absoluta ao exame do LCR podem ser submetidos a medidas para reduzir a pressão intracraniana imediatamente an-

tes da PL, incluindo o uso de manitol intravenoso (1 a 1,5 g/kg) e hiperventilação, reduzindo-se a PCO_2 entre 26 e 30 mmHg.

Risco de sangramento

A PL pode estar associada a risco de sangramento, que varia de um "acidente de punção", com aumento da quantidade de hemácias na análise do LCR, até um hematoma espinal, com sintomas como dor, fraqueza em membros inferiores e alterações esfinterianas, decorrentes de compressão da medula e/ou das raízes nervosas. Habitualmente, as complicações hemorrágicas sérias ocorrem em pacientes com algum distúrbio preexistente de coagulação, incluindo as condições hematológicas e o uso de medicações anticoagulantes.

Condições hematológicas cursando com trombocitopenia aumentam o risco de sangramento à PL, especialmente quando a taxa de plaquetas está abaixo de 50.000/mL. Distúrbios de coagulação, particularmente quando a INR (razão normalizada internacional) estiver acima de 1,5, também aumentam tal risco. Tais condições devem preferencialmente ser corrigidas antes que se proceda à PL.

Outra preocupação se dá com relação aos pacientes em uso de medicamentos anticoagulantes e/ou antiagregantes plaquetários, cada vez mais frequentes atualmente. Seu uso deve ser interrogado antes que se proceda à PL. Em pacientes com indicação eletiva de exame de LCR e baixo risco cardiovascular, normalmente pode-se suspender tais medicações até a realização da PL. Uma exceção corresponde ao ácido acetilsalicílico, cujo uso não se associa a aumento significativo de risco de sangramento e que, por isso, não necessita ser suspenso. Quando a PL é de urgência, ou seja, quando a condição neurológica em investigação requer um exame de LCR de imediato, deve-se proceder à coleta, pois o risco da patologia de base suplanta os riscos de hemorragia relacionados à punção. Quando a PL é eletiva e o paciente tem alto risco cardiovascular, deve-se proceder de maneira individualizada de acordo com a medicação em uso, as recomendações a seguir e a Tabela 1:

- Clopidogrel: considerar a possibilidade de substituí-lo por ácido acetilsalicílico. Em caso de dupla antiagregação, avaliar a possibilidade de aguardar o momento de retirada do clopidogrel para realização da punção;
- Heparina: no caso de heparina não fracionada, aguardar 6 horas após a última dose. Nos pacientes em uso de heparina de baixo peso molecular, aguardar 24 horas após a última dose.

TABELA 1 Recomendações para procedimento de punção lombar em pacientes em uso de anticoagulantes orais

	Situação do paciente	Conduta na emergência	Conduta eletiva
Varfarina (Marevan® ou Coumadin®)	Alto risco trombótico	Realizar PL	Substituir varfarina (terapia de ponte) 5 dias antes da PL
	Função renal normal	Substituir por heparina BPM terapêutica e realizar PL 12 horas após a última dose	
	Função renal prejudicada	Substituir por heparina não fracionada terapêutica e realizar PL 6 horas após a última dose	
	Baixo risco trombótico	Considerar reverter rapidamente o efeito da varfarina e realizar PL assim que o INR for $\leq 1,5$	Descontinuar varfarina 5 dias antes da PL
Novos anticoagulantes orais (Dabigatran – Pradaxa®, Rivaroxaban – Xarelto®, Apixaban – Eliquis®)	Alto risco trombótico	Realizar PL (adiar 1 dia se possível)	Substituir (terapia de ponte) por pelo menos 1 dia com função renal normal e 3 dias com função renal comprometida
	Função renal normal	Substituir com heparina BPM terapêutica e realizar PL 12 a 24 horas após a última dose	
	Função renal prejudicada	Substituir com heparina não fracionada terapêutica e realizar PL 6 horas após a última dose	
	Baixo risco trombótico	Executar PL (adiar um dia se possível)	Interromper por 1 dia se função renal normal e 3 dias com insuficiência renal

BPM: baixo peso molecular; INR: razão normalizada internacional; PL: punção lombar.

Abscesso epidural

A meningite é uma complicação extremamente rara da PL e facilmente passível de prevenção com medidas básicas de prevenção de contaminação. Contudo, em pacientes com abscesso epidural, a PL pode disseminar bactérias para o espaço subaracnóideo, provocando meningite. Portanto, em pacientes com suspeita de abscesso epidural ou qualquer outra condição infecciosa envolvendo a coluna lombossacra, deve-se proceder à investigação com ressonância magnética e afastar tais condições antes de realizar a PL.

COLETA DE LCR

A PL e a coleta de LCR devem seguir algumas recomendações:

- O uso de agulha de calibre mais fino é mais bem tolerada pelos pacientes e possibilita a diminuição de uma das principais complicações da punção, denominada cefaleia pós-punção, além de reduzir o risco de presença de eritrócitos. Aproximadamente 20% das punções lombares apresentam contaminação por células de sangue (eritrócitos) e alguns biomarcadores podem apresentar-se como falso-positivos em casos com grande “acidente de punção”, como as reações de ELISA e VDRL para sífilis. Além disso, patologias como as leucemias podem apresentar blastos na corrente sanguínea e uma punção traumática é capaz de resultar em um exame de citologia oncológica com resultado falso-positivo;
- O volume de amostra coletada influencia a concentração de biomarcadores, a presença de células neoplásicas, a realização de determinados exames e uma possível repetição confirmatória desses exames. Muitas substâncias e células presentes no LCR têm gradiente de concentração craniocaudal. Se um volume pequeno é retirado, este representará somente a composição do LCR lombar/saco dural. Se uma amostra com 2 mL for comparada com outra amostra com 15 mL, esta última será muito mais fidedigna do LCR total e a análise da primeira pode promover resultados equivocados. Além disso, a sequência de retirada da amostra do paciente pode influenciar a análise. Os primeiros 2 mL devem ser utilizados para a análise básica do LCR, enquanto o restante reunido e aliquoteado no laboratório para o restante da análise. Não há relação direta entre volume de LCR coletado e cefaleia pós-punção. O local da punção deve ser sempre documentado em razão do gradiente de concentração craniocaudal. A análise de um LCR ventricular ou um LCR suboccipital apresenta valores de referência diferentes dos de um LCR lombar;
- O uso de tubos apropriados para a coleta de LCR manufaturados com o material polipropileno também é um fator pré-analítico importante, pois essa substância apresenta baixo potencial de ligação com as proteínas. Nenhum aditivo deve ser utilizado nos tubos e os tubos devem dispor de uma rosca para melhor vedação. O emprego de tubos com o reativo estabilizador de antígenos celulares (TRANSFIX®) previne a degeneração e a perda celular no LCR utilizado para a metodologia de citometria de fluxo (imunofenotipagem). Em pacientes com neoplasias hematológicas (leucemias e linfomas), a imunofenotipagem é um método preciso e sensível de diagnóstico de infiltrações no sistema nervoso central. O uso do tubo com TRANSFIX® previne a degeneração celular e aumenta a sensibilidade de detecção de malignidade por citometria de fluxo;

- O horário de retirada da amostra pode influenciar na análise do LCR; porém, ainda existem poucos estudos a respeito desse tema. A padronização da retirada da amostra ainda é uma operação complicada, pois não se consegue realizar um estudo com um grupo-controle de coleta em diferentes horários do dia. Portanto, deve-se seguir as necessidades clínicas de cada caso, e não necessariamente uma rotina fixa de horário de coleta;
- A coleta de soro pareada à coleta de LCR é essencial em determinados casos. Alguns autores sugerem em doenças infecciosas para a determinação da imunoprodução intratecal. Hoje, isso ainda é discutível. Os exemplos de coleta pareada utilizados atualmente são o estudo da barreira hematoencefálica (índice de albumina), o estudo da imunoprodução intratecal (índice de IgG) e o estudo das bandas oligoclonais essenciais nos critérios de diagnóstico da esclerose múltipla e no diagnóstico de doenças desmielinizantes. O índice de albumina tem como interferentes o estado nutricional do paciente, a doença hepática e os estados de proteinúria com as doenças renais.

ARMAZENAMENTO DO LCR

O armazenamento e a temperatura ideal de amostra pré-analítica ainda são considerados assuntos que necessitam de mais estudos. Em um estudo recente, a estabilidade de parâmetros de citologia e bioquímica (proteína, glicose e lactato) mantidos em temperaturas diferentes (4°C, 23°C e 35°C) foi analisada, com diferentes tempos de armazenamento: T0 (chegada no laboratório); T1 – 1 hora após a chegada; T2 – 2 horas após a chegada; e os subsequentes T3 – 3 horas, T4 – 4 horas, T12 – 12 horas, T24 – 24 horas e T48 – 48 horas. De acordo com a análise estatística, não houve variação significativa nas concentrações de proteína e glicose até 48 horas. Quanto ao parâmetro lactato, ele manteve-se estável até 12 horas. Com relação à citologia, houve tendência de queda na média da contagem de todos os grupos celulares avaliados (contagem global: leucócitos e hemácias; contagem diferencial: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos, plasmócitos e macrófagos). A variação, no entanto, somente foi estatisticamente significativa após 12 horas. Os dados obtidos sugerem que as amostras de LCR permanecem relativamente estáveis nos seus parâmetros nas primeiras 12 horas. Contudo, deve-se sempre estimular a rápida chegada da amostra ao ambiente de análise, em condições pré-analíticas aceitáveis.

MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LCR

- Centrifugação: a padronização de centrifugação deve seguir parâmetros determinados. Para a rotina normal do LCR com a realização do quimiocitológico, a rotação deve ser de 2.000 rotações por minuto por 10 minutos. Quando há

necessidade de preservar as células do rompimento causado pela centrifugação, a rotação deve ser lenta (400 rotações/minuto em 10 minutos). Se houver a necessidade de rompimento da célula e exposição de DNA, a rotação deve ser mais vigorosa. Após a centrifugação, deve-se dividir o sobrenadante em alíquotas e armazená-lo imediatamente. Se houver a necessidade de análise imediata, é preciso documentar o tempo de processamento. O processamento dentro de 2 horas para o LCR é o ideal e não produz resultados errôneos; porém, para a análise do soro, apenas 30 minutos de processamento provocam resultados divergentes, principalmente para proteínas, amostras utilizadas para espectrometria de massas e biomarcadores;

- Alíquotas: as alíquotas de LCR devem ser tratadas com extremo cuidado. Ciclos de congelamento e descongelamento precisam ser evitados. Cada ciclo de congelamento e descongelamento pode afetar em 7% o nível proteico ou um biomarcador, como o peptídeo beta-amiloide. Mesmo sem estudos mais precisos e específicos para cada substância estudada, os ciclos de congelamento e degelo devem ser restritos e sempre registrados. O volume das alíquotas deve seguir a rotina do laboratório. Volumes pequenos de 0,5 a 1 mL são os mais recomendados para os padrões operacionais. O uso de códigos de barra em cada tubo e etiquetas à prova de congelamento evitam amostras perdidas e incrementam a velocidade dos procedimentos laboratoriais. A procura de amostras torna-se mais eficiente e a privacidade dos pacientes é mantida segura;
- Congelamento: o armazenamento das amostras congeladas deve ser realizado de acordo com o tipo de análise. Imunoglobulinas têm grande estabilidade quando armazenadas em temperatura de -20°C . O exame de bandas oligoclonais pode ser realizado em amostra congelada após 6 meses. Entretanto, biomarcadores, como a cistatina C, não apresentam estabilidade na temperatura de -20°C e, portanto, devem ser armazenadas em temperaturas de -80°C . Os *freezers* devem ser controlados por alarme e o laboratório dispor de um plano de contingência para intercorrências no local de armazenamento. A temperatura do *freezer* deve ser registrada diariamente. As alíquotas de uma mesma amostra precisam ser dispostas em *freezers* diferentes e, idealmente, deve sempre se dispor de um *freezer* vazio. A localização da alíquota da amostra também influencia a velocidade da rotina laboratorial. Em um sistema baseado em dois eixos, um numérico e outro com letras, para facilitar a localização das alíquotas. Esse sistema deve ser semelhante a uma soroteca e funcionar como um depósito/banco de LCR.

INTERFERENTES NA ANÁLISE DO LCR

Na análise do LCR, existem diversos interferentes em potencial. Na Biologia Molecular, particularmente na reação de PCR (*polymerase chain reaction* ou reação em

cadeia da polimerase) para o vírus herpes em casos de encefalite, os interferentes mais importantes são: (1) o uso de heparina; (2) amostra com hemólise em punções traumáticas; e (3) processos inflamatórios bacterianos e fúngicos. Na pesquisa do Enterovírus, é fundamental o congelamento imediato da amostra, o que confere maior estabilidade na análise e sensibilidade no método.

Os exames para diagnóstico de neurocriptococose também estão sujeitos a diversos interferentes. A pesquisa de antígenos para *Cryptococcus* sp. por aglutinação em partículas de látex apresenta resultado falso-positivo na presença de fator reumatoide positivo (interferente mais frequente), reação cruzada com *Trichosporon*, contaminação, presença de tumores e meningites crônicas. As reações falso-negativas podem ocorrer quando de baixos títulos de antígenos, na presença de imunocomplexos, na ocorrência de efeitos prozona (ocorrência de altos títulos de antígenos) e nas infecções por *Cryptococcus* sp. com pouca ou nenhuma cápsula.

CASO CLÍNICO

Paciente de 42 anos, obesa, chega ao pronto-socorro com quadro de cefaleia. O exame neurológico é normal. A tomografia de crânio não mostrou anormalidades. Foram solicitados PL e exame de LCR, sendo a punção de grande dificuldade técnica em razão da obesidade. O LCR coletado apresenta-se ligeiramente hemorrágico e sua análise mostra 10 leucócitos (60% polimorfonucleares e 40% de linfomononucleares) e 10.148 hemácias íntegras. Glicose, proteína e lactato estavam com valores dentro da faixa de referência. As hemácias estão íntegras e, após centrifugação, o LCR apresenta-se límpido e incolor.

As questões que se colocam são:

1. Trata-se de uma hemorragia meníngea ou de um acidente de punção?
2. De que forma a presença de sangue pode interferir na análise do LCR?

Com relação à primeira questão, trata-se de um acidente de punção, pois o LCR está límpido e incolor após centrifugação e pelo fato de as hemácias estarem íntegras. Essa definição é importante, pois evita a realização de exames desnecessários de neuroimagem, como a arteriografia cerebral, que estaria indicada no caso de uma hemorragia meníngea. Quanto à segunda questão, é importante levar em conta que o sangue pode conter interferentes que prejudicam determinadas análises, como biomarcadores de doenças neurodegenerativas, pesquisas imunológicas (anticorpos) e de PCR.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BERVERN FS, KROKSVEEN AC, BERLE M, RAJALAHTI T, FLIKKA K, ARNEBERG R ET AL. Pre-analytical influence on the low molecular weight cerebrospinal fluid proteome. *Proteomics Clin Appl*. 2007;1:699-711.

BRUNALE F, DOMINGUES R, BRUNIERA G, SENNE C. Rotinas e procedimentos operacionais do laboratório Senne Líquor Diagnóstico; 2018, V2, 100p. No prelo.

CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE – 2008. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2008;41(5):524-44.

DEL CM, MOLLENHAUER B, BERTOLOTTO A, ENGELBORGH S, HAMPEL H, SIMONSEN AH ET AL. Recommendations to standardize preanalytical confounding factors in Alzheimer's and Parkinson's disease cerebrospinal fluid biomarkers: an update. *Biomark Med*. 2012;6:419-30.

DOMINGUES R, BRUNIERA G, BRUNALE F, MANGUEIRA C, SENNE C. Lumbar puncture in patients using anticoagulants and antiplatelet agents. *Arq Neuropsiquiatr*. 2016;74(8):679-86.

SEMPERE AP, BERENQUER-RUIZ L, LEZCANO-RODAS M, MIRA-BERENQUER F, WAEZ M. Lumbar puncture: its indications, contraindications, complications and technique. *Rev Neurol*. 2007;45(7):433-6.

24 Tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)

A avaliação adequada da hemostasia primária e secundária, bem como a investigação de doenças hemorrágicas e trombóticas, faz-se por meio de testes de maior relevância, abrangentes e eficientes, indispensáveis para um bom diagnóstico. Entre eles, estão o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e o tempo de protrombina (TP), os mais utilizados como testes de triagem e que se caracterizam como de grande acuidade na avaliação pré-operatória, exigindo maior atenção e interesse dos profissionais encarregados de sua execução e interpretação. Podem ser empregados para pacientes que serão submetidos a intervenções cirúrgicas, investigação de distúrbios hemorrágicos e monitoramento de medicações; no entanto, a execução de uma metodologia inadequada interferirá no resultado do exame e na conduta médica.

As variáveis pré-analíticas se referem a todos os fatores que afetam a qualidade da amostra antes do início do teste, consistindo em uma fase mais suscetível a erros pelo fato de a maioria de seus processos não ser automatizada, envolvendo atividades manuais.

A amostra que chega ao laboratório e passa pelo processo analítico deve refletir o que está acontecendo no paciente. A observação das variáveis pré-analíticas nos testes de coagulação é extremamente importante para se obter confiabilidade e qualidade em todos os resultados dos testes. É muito importante conhecer as situações que podem afetar a qualidade da amostra antes do início dos testes, tornando-se indispensável o conhecimento do preparo do paciente, da coleta, do transporte e da manipulação das amostras, sempre seguindo procedimentos determinados e validados pelo laboratório.

Os resultados de coagulação sofrem grande influência das variáveis pré-analíticas, principalmente da coleta. Os problemas mais comuns incluem coleta de

sangue de uma infusão intravenosa, aplicação do torniquete por mais de 1 minuto (pode causar hemoconcentração), punção venosa lenta (o que pode ativar a coagulação) e uma agulha de calibre estreitamente inadequada (provocando coagulação ou hemólise da amostra). O preenchimento inadequado do tubo de coleta resulta em uma relação anticoagulante-sangue incorreta, propiciando resultados imprecisos. A proporção de sangue coletado em citrato de sódio deve ser de uma parte de anticoagulante para nove partes de sangue. Para doentes com hematócrito muito baixo ou alto (p. ex., hemólise grave ou policitemia mal controlada), podem ser necessários tubos especialmente preparados com um volume apropriado de anticoagulante (ou volumes de sangue rigorosamente medidos, calculados a partir do hematócrito, coletados em tubos-padrão) para assegurar uma proporção correta de anticoagulante-sangue. A maioria dos tubos é calibrada para coletar 2,7 mL de sangue total em 0,3 mL de citrato de sódio a 3,2% (0,109 M) para dar um volume final de 3 mL e uma relação de sangue total-anticoagulante de 9:1. Quando o hematócrito excede 0,55 (55%), o volume plasmático reduzido requer uma diminuição no volume de anticoagulante usado para manter a proporção adequada. Deve-se, por isso, ajustar o volume de citrato pela fórmula:

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

Em que:

- C = volume de citrato;
- HCT = hematócrito do paciente;
- V = volume de sangue adicionado (se o tubo for de 5 mL, então o volume será 4,5 mL).

Para hematócritos abaixo de 30%, não há informações disponíveis que sustentem a recomendação específica.

O sangue deve ser preferencialmente coletado diretamente de uma veia periférica. Para a coleta com seringa agulhada, deve-se retirar a agulha antes de adicionar o sangue pelas paredes do tubo aberto. Jamais perfurar a tampa do tubo com a agulha para passagem do sangue.

Em algumas ocasiões, principalmente em crianças e pacientes idosos, pode ser necessário coletar amostras de acessos venosos totalmente implantados. Nos casos de acessos venosos totalmente implantados e salinizados, 2 volumes do espaço intraluminal do dispositivo utilizado devem ser desprezados, antes da coleta de amostras para testes de hemostasia. Quando for utilizada outra forma de acesso venoso, primeiro lava-se o acesso infundindo solução fisiológica a 0,9% e, depois, coletam-se 6 volumes de espaço intraluminal, descartados antes da coleta das amostras.

Após a coleta, a homogeneização dos tubos deve ser feita por inversões, de 3 a 5 vezes; não se deve homogeneizar tubos de citrato vigorosamente, sob o risco de ativação plaquetária e interferência nos testes de coagulação. Além disso, a falha na homogeneização propicia a formação de microcoágulos.

É muito importante conhecer os medicamentos que o paciente usa, dada a grande quantidade de medicações que interferem nos resultados; quando possível, é indicada sua substituição ou suspensão após o consentimento do médico do paciente.

O fumo deverá ser evitado no dia da coleta do sangue e se recomenda jejum mínimo de 4 horas para adultos e crianças e 2 horas para lactantes, considerando que a concentração de lipídios pode interferir nos tempos de coagulação e no sistema de detecção do coágulo quando da utilização de equipamentos de coagulação de leitura óptica.

Um paciente confuso, sem pulseira de identificação ou nomes semelhantes de pacientes diferentes também caracterizam fontes de erro pré-analítico. As amostras também podem ser rotuladas erroneamente, especialmente se retiradas de vários pacientes, de uma só vez, para posterior rotulagem.

A exposição de amostras ao excesso de calor pode causar desnaturação das proteínas plasmáticas, o que resulta na formação de micropartículas de proteína.

Estudos recentes demonstraram que atrasos de mais de 6 horas entre a coleta e o processamento de INR (razão normalizada internacional) ou amostras de TP podem causar mudanças significativas (ou seja, > 10%) nos valores medidos. Uma longa viagem de carro causa agitação mecânica e também pode contribuir para resultados inadequados.

Quanto ao processamento da amostra de plasma, a centrifugação deverá ser realizada à temperatura ambiente. No entanto, algumas centrífugas são capazes de aumentar a temperatura interior no processo de centrifugação. Desse modo, recomenda-se o emprego de centrífugas com monitoramento de temperatura.

Para os testes de TP e TTPa, é necessário utilizar o plasma pobre em plaquetas (PPP), com contagem plaquetária inferior a 10.000 plaquetas/mm³, devendo ser centrifugadas por aproximadamente 3.500 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente e não exceder a 25°C. Após a centrifugação, essas amostras poderão ser mantidas à temperatura ambiente por até 4 horas.

Se não houver a possibilidade de realizar esses testes em um período de 4 horas, as amostras podem ser alíquotadas em tubo plástico, material que pode ser armazenado a -35°C ou menos, o que proporciona a ele uma validade de vários anos. O armazenamento a -20°C não é indicado.

Amostras para controle de heparina não fracionadas devem ser centrifugadas em até 1 hora após a coleta em razão da liberação do fator plaquetário 4 (presente nas plaquetas com função neutralizadora de heparina) e realizar o TTPa em até 4 horas.

Ciclos de congelamento e descongelamento repetidos podem afetar o nível de fatores da coagulação, como uma redução na atividade do VWF:CB e nos níveis de FXII. O congelamento-descongelamento também pode produzir microvesículas de membranas ricas em fosfolípidios a partir do dano de plaquetas, conseguindo, então, mascarar a presença de um anticoagulante lúpico.

Existem fatores específicos do paciente que precisam ser investigados, sobretudo a história clínica do paciente (como a investigação de sangramentos) e a pesquisa sobre o uso de medicações, como ácido acetilsalicílico ou mesmo anticoagulantes (p. ex., heparina), que podem causar alterações no resultado por interferirem no processo normal de coagulação.

Diversas variáveis fisiológicas podem estar associadas a certos fatores do paciente, em sua maioria fora do controle do laboratório, embora conhecê-los tornará possíveis os ajustes para eliminar seu efeito ou a interpretação adequada, como ajustar faixas de referência ou alterar técnicas de manipulação de amostras.

A atividade física, em que o esforço físico pode aumentar a atividade de algumas enzimas, o jejum ou a dieta também são capazes de interferir nos resultados, assim como fármacos com efeito fisiológico ou e/ou por interferência analítica.

Outros estados fisiológicos, como a gravidez, podem afetar componentes da coagulação (nesse caso, aumento dos níveis de fator VIII e do fator de von Willebrand, fibrinogênio, queda nos níveis de proteína S e, muitas vezes, uma queda ligeira na contagem de plaquetas).

Em recém-nascidos, os níveis dos fatores de coagulação dependentes da vitamina K são reduzidos, atingindo os valores adultos apenas aos 6 meses de idade, aproximadamente.

Altos níveis de bilirrubina ou lipídios podem resultar em plasma turvo, capaz de, por sua vez, interferir nas medições de densidade óptica usadas para determinar os pontos finais de alguns testes.

Hemólise na amostra talvez seja uma das principais fontes de erros laboratoriais. A princípio, uma amostra com hemólise deve ser descartada, a menos quando inerente ao paciente (p. ex., em casos em que o paciente foi submetido à circulação extracorpórea, uma nova coleta não eliminará a hemólise). A lise das hemácias promove a liberação de líquido intracelular para o meio extracelular, diluindo os fatores de coagulação, além de expor componentes intracelulares e de membrana que podem ativar a coagulação sanguínea. Como resultado, a presença de hemólise pode tanto encurtar quanto prolongar os testes de coagulação. Deve-se considerar ainda que, dependendo do grau da hemólise, pode ocorrer interferência na detecção do coágulo por sistema óptico.

As novas tecnologias para análises de exames de coagulação já disponibilizaram aos laboratórios novos meios para a detecção automática de hemólise, icterícia e

lipemia. Esses índices podem ser úteis para controlar a qualidade e a necessidade de novas coletas. Quando as condições de uma amostra impossibilitam sua análise, o laboratório torna-se responsável por comunicar o problema para o médico ou paciente e solucionar essa questão da melhor maneira possível (p. ex., coletar o exame em outro momento ou alertar em nota as condições da amostra explicando as possíveis alterações que aquele interferente pode causar).

É importante que todas as manutenções dos analisadores automatizados estejam em conformidade, garantido um ambiente limpo, livre de interferentes físicos ou agentes contaminantes que possam interferir nas análises das amostras.

A observação dos controles de qualidade, comercial ou não, passados diariamente pelos colaboradores do laboratório, deve seguir procedimentos bem estabelecidos. Esta é uma parte fundamental envolvendo o controle de qualidade para a consistência nos resultados que serão liberados. De acordo com o comportamento dos controles, faz-se uma avaliação quanto à necessidade ou não de uma verificação do exame a ser realizado (p. ex., troca de um reagente em uso por perda de estabilidade ou contaminação) ou até mesmo uma nova calibração. Esse tipo de avaliação acarreta a liberação ou a rejeição das análises após a análise dos resultados das amostras-controle, a fim de garantir que o processo de análise do teste esteja funcionando corretamente e que possíveis erros com o equipamento ou com os reagentes não venham a refletir em um resultado errado do exame.

Os reagentes utilizados para TP e TTP possibilitam a determinação quantitativa manual ou automática de ambos. Cuidados tomados com os reagentes de trabalho, como o seu preparo, temperatura de armazenamento, estabilidade dentro do analisador e prazo de validade, devem sê-lo de acordo com as instruções do fabricante. Em geral, os reagentes devem ser armazenados a temperaturas inferiores a 0°C e, após reconstituição, entre 2 e 8°C por tempo determinado de acordo com a bula do reagente, mantidos bem fechados para evitar evaporação ou contaminação.

O TP mede a via extrínseca e é utilizado para o controle de pacientes que fazem uso de anticoagulante oral, avaliação hepática e distúrbios da coagulação. Os resultados são expressos em INR para corrigir a variabilidade de resultados entre os laboratórios. Os erros pré-analíticos, com aumento do TP em segundos, ocorrem por uso de substâncias como corticosteroides, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), contraceptivos orais, asparaginase, antibióticos, álcool, heparinas, varfarinas. Já os anti-histamínicos, o butabarbital, a cafeína, o fenobarbital e a vitamina K, podem diminuir o TP.

O TTPa mede a via intrínseca da coagulação, importante no diagnóstico das hemofilias e no monitoramento do uso de heparina não fracionada (HNF), e em deficiências de fatores, principalmente VIII, IX, XI e XII e pré-caliceína. A reação utiliza a cefalina, cálcio e um ativador (ácido elágico ou sílica). O resultado do

TTPa pode apresentar valores aumentados em segundos frente ao uso de contraceptivos orais, estrógenos, cumarínicos, heparina e asparaginases.

Os erros pré-analíticos sempre existirão; porém, podem ser minimizados por meio de estratégias de controle de qualidade. Com os objetivos de reduzir os erros e aumentar a segurança nos processos pré-analíticos, faz-se necessário implantar atividades que visam à formação, educação e cultura de todos os profissionais envolvidos nos processos de obtenção e manipulação de amostras biológicas. É importante que se busque avaliar como os profissionais devem realizar as suas atividades, não mais atribuindo os erros às pessoas, e sim aos processos que podem provocar determinada falha na obtenção de um resultado.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests. Approved Guideline. 4. ed. Wayne: CLSI; 2010.

COSTA VG DA, MORELI ML. Principais parâmetros biológicos avaliados em erros na fase pré-analítica de laboratórios clínicos: revisão sistemática. J Bras Patol Med Lab. 2012;48(3):163-8.

KITCHEN S, MCGRAW A, ECHENEGUCIA M. Sample collection and pre-analytical variables. In: Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders, a laboratory manual. 2. ed. Canadá: World Federation of Hemophilia; 2019. p. 11-3.

PERRY DJ, TODD T. Pre-analytical variables. Disponível em: <<http://practical-haemostasis.com/>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

SARAIVA ASL, STERNICK GMP, SANTOS ME, MONTALVÃO SAL, MACHADO TFGS, ROCHA TRF. Coleta de amostras para coagulação e suas variações pre-analíticas: Manual de diagnósticos laboratorial das coagulopatias hereditárias e plaquetopatias. Brasília: Ministério da Saúde; 2012. p. 13-4.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).



Analizador cobas t 411

Redefinindo a coagulação laboratorial

O analisador de coagulação **cobas t 411** é o mais novo membro do portfólio da Roche Diagnóstica e inicia uma nova era no mercado da coagulação.

Cobrando as diversas necessidades dos laboratórios de hoje, o equipamento é ideal para o máximo de flexibilidade e eficiência, desenhado para laboratórios de baixo e médio volume de amostras.

O analisador de coagulação **cobas t 411** é projetado com um conjunto único de recursos de segurança para garantir resultados robustos e sempre de alta qualidade.

INTRODUÇÃO

“Eletroforese” é um termo abrangente que se refere à migração de solutos ou partículas de qualquer tamanho em um meio, sob a influência de um campo elétrico. O primeiro método de eletroforese utilizado para estudar proteínas foi o de solução livre desenvolvido por Tiselius em 1937, técnica que separava as proteínas séricas em quatro componentes, com a fração alfa-1 incompletamente separada da albumina.

A eletroforese proteica por zonas refere-se à migração das moléculas de proteínas, geralmente em um meio de suporte poroso (como o gel de agarose), de modo que cada zona proteica é separada das zonas vizinhas por uma área livre. As zonas são visualizadas por meio de coloração específica e produzem um traçado, chamado eletroferograma, que pode, então, ser digitalizado e quantificado utilizando-se um densitômetro. Essa técnica pode ser utilizada para separação de proteínas no soro, na urina, no líquido cefalorraquidiano (LCR), além de outros fluidos biológicos.

Mais recentemente, com a técnica de eletroforese capilar (EC) foi possível realizar a separação eletroforética em capilares com diâmetros internos reduzidos, variando de 20 a 75 μm , resultando em um alto poder de resolução, velocidade de separação e capacidade de análise de pequenos volumes.

A eletroforese de proteínas séricas (EPS) produz um traçado com cinco regiões distintas (albumina, alfa-1-globulinas, alfa-2-globulinas, betaglobulinas e gamaglobulinas), estando cada uma delas associada a uma ou mais proteínas (Figura 1).

A imunofixação de proteínas ou imunoeletroforese compreende um método imunológico de grande utilidade, frequentemente utilizado de maneira complementar à eletroforese convencional. Esse método possibilita a caracterização de um eventual componente monoclonal, pois utiliza-se da técnica de eletroforese em gel de agarose somada à adição de antissoros específicos anticadeias pesadas (IgG, IgA e IgM) e anticadeias leves (κ e λ). Após coloração, nos casos em que há um componente monoclonal, ele pode ser identificado por meio de uma banda restrita identificável correspondente à(s) imunoglobulina(s) envolvida(s).

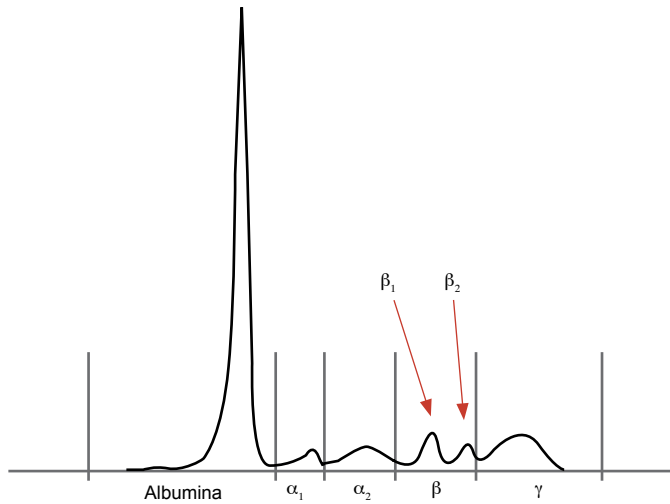


FIGURA 1 Traçado eletroforético demonstrando as regiões de albumina, α_1 , α_2 , β e γ .

CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS

Interferências analíticas afetam a maioria das tecnologias disponíveis, desde ensaios enzimáticos até a cromatografia. As técnicas de eletroforese de proteínas (e, também, de imunofixação) não são exceção – tanto o gel de agarose quanto os métodos baseados em capilares estão sujeitos a uma série de interferentes. Dessa maneira, alguns aspectos técnicos precisam ser observados, conforme descrito a seguir.

Amostragem

Para alcançar um equilíbrio adequado entre sensibilidade e resolução, a quantidade de proteína aplicada ao suporte eletroforético deve ser ideal. Como a albumina é 10 vezes mais concentrada no soro do que a menor fração, as alfa-1-globulinas, a quantidade de soro aplicada deve evitar sobrecarga com albumina, mas ainda precisa ser adequada para quantificar a alfa-1-globulina. Para separar as proteínas no soro utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida, aplicam-se, em geral, 3 mL de soro contendo, aproximadamente, 210 mcg de proteína total. Espécimes de urina requerem concentração de 50 a 100 vezes e/ou tempo de aplicação prolongado, e o LCR pode ou não exigir concentração, dependendo da coloração utilizada. Falhas nessas observações técnicas podem promover padrões eletroforéticos cujas interpretações ficam prejudicadas.

Descontinuidades na aplicação da amostra

Descontinuidades na aplicação da amostra podem ser causadas por (1) aplicadores sujos, (2) absorção desigual ou (3) bolha de ar (se a amostra for pipetada).

A ponta da pipeta deve ser verificada quanto a bolhas de ar antes de a amostra ser aplicada ao molde de gel de agarose.

Taxas de migração desiguais

A migração desigual de amostras pela largura do gel pode ser causada, por exemplo, por eletrodos sujos, que podem resultar na aplicação irregular do campo elétrico. Os géis devem ser mantidos na horizontal durante o armazenamento para evitar irregularidades. Géis armazenados muito perto de fontes de calor (p. ex., sobre uma luminária) podem ter áreas desiguais em virtude de secagem inadvertida, contribuindo para problemas semelhantes.

BANDAS INCOMUNS OU ATÍPICAS

De modo geral, pode-se classificar esses interferentes como decorrentes de fatores endógenos (ou seja, naturais ou relacionados à fisiopatologia da doença) ou de compostos exógenos, na forma de medicamentos e/ou terapias.

Interferentes endógenos

Fibrinogênio

A glicoproteína fibrinogênio compreende o substrato da trombina, sendo clivada em fibrina para formar o coágulo de fibrina na etapa final da cascata de coagulação. Normalmente, o fibrinogênio não está presente em amostras de soro. Porém, quando existem problemas pré-analíticos, como dificuldade de coleta ou inadequada separação do soro, ele pode estar inadequadamente presente na amostra, além de, eventualmente, em pacientes com distúrbios da coagulação. Ainda, pode ser encontrado quando uma amostra de plasma é erroneamente fornecida em vez de soro. Quando se realiza a EPS nessas amostras, o fibrinogênio migra para a região entre beta e gama e pode ser mal interpretado como uma imunoglobulina monoclonal. Nesses casos, a imunofixação auxilia na elucidação do problema, pois, nessa técnica, não se detecta a presença de proteína monoclonal. Na prática diagnóstica, o reconhecimento oportuno desse fenômeno é importante para evitar que se classifique erroneamente uma banda atípica nessa região como uma proteína monoclonal. Embora não seja realizada rotineiramente na prática diagnóstica, a imunofixação com anticorpos antifibrinogênio fornece uma prova sólida de que a banda é, de fato, fibrinogênio. Como recomendação geral, os laboratórios que realizam eletroforese de proteínas devem estar cientes desse artefato potencial (fibrinogênio), utilizando a imunofixação para confirmar a anormalidade observada. A imunofixação também é muito útil para detectar outros tipos de artefatos e deve ser amplamente utilizada para confirmação de qualquer anormalidade observada pela EPS ou pela eletroforese de proteínas na urina.

Hemólise

A hemólise é uma interferência comum, encontrada em muitos testes laboratoriais. O termo “hemólise” refere-se à ruptura das células vermelhas do sangue (hemácias), causando liberação do conteúdo citoplasmático no soro ou plasma e podendo afetar os testes de várias maneiras. Os dois principais mecanismos de interferência são a interferência espectral de altas concentrações de hemoglobina e a liberação de substâncias presentes no interior das hemácias, já que estas apresentam concentrações relativamente elevadas de hemoglobina, potássio, magnésio, ferro, fosfato, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase (AST). Assim, qualquer grau de hemólise aumenta artificialmente esses analitos no soro ou no plasma. A hemólise é facilmente reconhecida visualmente ou, de preferência, usando índices séricos, que indicam de modo automático amostras hemolisadas e fornecem resultados mais consistentes do que a inspeção visual individual.

Pode-se dividir a hemólise em causas pré-flebotomia (*in vivo*) ou durante a flebotomia (*in vitro*). As primeiras são muito numerosas e incluem agentes microbianos, pré-eclâmpsia, anemias hemolíticas (p. ex., doença falciforme e anemia hemolítica autoimune), entre outros. Causas *in vitro* geralmente resultam da ruptura mecânica pela utilização de tamanhos incorretos de agulha para a coleta (força de cisalhamento), sucção excessiva ou armazenamento prolongado da amostra. Além disso, existem condições que tornam as hemácias mais frágeis, como o aumento da rigidez da membrana em neonatos, aumento da fragilidade dos eritrócitos em pacientes idosos hospitalizados ou aqueles em tratamento quimioterápico.

Independentemente da causa da hemólise, a liberação do conteúdo citoplasmático das hemácias afeta diretamente a EPS, na qual complexos de hemoglobina aparecem como pequenas bandas nas regiões alfa-2 e beta. Essas bandas adicionais podem ser erroneamente interpretadas como proteínas monoclonais, um erro de análise facilmente evitado identificando-se amostras hemolisadas antes da interpretação e/ou realizando-se a imunofixação para confirmar a presença de qualquer banda anômala. De modo geral, as hemólises não impedem a identificação de gamopatias monoclonais eventualmente existentes, mas há uma questão quantitativa a ser considerada, já que as frações alfa-2 e beta podem estar falsamente elevadas pela hemólise. Naqueles laboratórios que optam por quantificar proteínas monoclonais nas regiões alfa-2 ou beta, há um risco maior de erro ao se reportarem valores falsamente elevados em razão da existência de complexos de hemoglobina.

Tal como acontece com outros tipos de interferências, a consciência de que o fenômeno pode ocorrer e seus possíveis efeitos sobre os resultados dos testes são as chaves para a resolução de eventuais problemas. De modo geral, orienta-se rejeitar amostras hemolisadas. No entanto, em alguns poucos casos, a hemólise pode persistir, mesmo após a recoleta de nova(s) amostra(s). Nessas situações, a inter-

pretação deve levar em consideração a presença e o efeito da hemólise no material e em qual região ela interfere, ou seja, que pode ocasionar uma falsa elevação nas frações alfa-2 e beta do traçado.

Interferentes exógenos

Contrastes radiológicos

Com o desenvolvimento da EC, um novo tipo de interferência surgiu. Como a EC se baseia na detecção de ligações peptídicas via luz ultravioleta a 200 nm, agentes radiopacos, que absorvem no mesmo comprimento de onda, podem eventualmente ser detectados. Assim, quando uma amostra de sangue é coletada logo após a realização de uma injeção de contraste radiológico, podem ocorrer um pico adicional, distorção, modificação ou aumento de uma fração, simulando a existência, por exemplo, de um componente monoclonal. Numerosos agentes radiopacos já foram descritos, interferindo na fração alfa-2-globulina ou menos frequentemente na fração beta-2-globulina. Nesses casos, é importante realizar a imunofixação do material, que descartará a presença de componente monoclonal. Outra opção, menos conveniente, é a realização da eletroforese em gel de agarose, em que não se observa a interferência por meio de contraste radiológico. Para evitar tal interferência, os médicos devem estar cientes de que imagens usando contrastes devem ser feitas após a coleta de sangue. Essa recomendação é especialmente importante em unidades de hematologia (p. ex., hospitais-dia e centros oncológicos), onde casos de discrasias plasmáticas são mais observados e imagens radiológicas são frequentemente necessárias.

Antifúngicos e antibióticos

A 5-fluorocitosina (5-FC) é uma medicação antifúngica que pode ser utilizada no tratamento de infecções por *Candida* e na criptococose. Recentemente, demonstrou-se que essa medicação pode interferir na EPS simulando um componente monoclonal, situado no fim da fração de gamaglobulinas. Essa interferência ocorre principalmente naqueles pacientes com hipogamaglobulinemia e insuficiência renal. Mais uma vez, a realização da imunofixação é fundamental para descartar a real presença de componente monoclonal.

Vários antibióticos também podem produzir picos adicionais na EC. A ceftriaxona, por exemplo, pode induzir um pequeno pico na fração pré-albumina, quando da coleta da amostra logo após a administração do medicamento. Como a migração se dá na fração pré-albumina, essa interferência não será confundida com uma proteína monoclonal, mas deve ser conhecida por aqueles que interpretam os resultados da EPS. Similarmente, o sulfametoxazol pode produzir um pequeno pico em concentrações terapêuticas, mais perto do pico de albumina do que a ceftriaxona.

Piperacilina associada ao tazobactam também pode induzir um aumento adicional entre a fração alfa-2-beta-1-globulina, o que, nesse caso, pode-se resultar na suspeita do surgimento de um componente monoclonal. Essas interferências são mais prováveis de ocorrer quando da coleta de amostras de sangue muito próximas à infusão do medicamento, especialmente no contexto de insuficiência renal em que o *clearance* destes e de outros medicamentos está diminuído.

Terapias monoclonais

As terapias monoclonais têm uma longa e fascinante história, começando com a descoberta dos hibridomas por Milstein e Köhler na década de 1970. Posteriormente, o desenvolvimento da produção de anticorpos monoclonais resultou na possibilidade que eles fossem utilizados na terapêutica. Embora as terapias monoclonais tenham existido por várias décadas, foi apenas após os ensaios clínicos com siltuximab (no final dos anos 2000) para o tratamento do mieloma múltiplo que tais terapias foram reconhecidas como uma potencial interferência com a eletroforese de proteínas e imunofixação. Com o recente, notável e contínuo desenvolvimento de anticorpos monoclonais para o tratamento das discrasias de células plasmáticas, existem vários medicamentos com a capacidade de interferir nas análises de EPS e imunofixação durante várias semanas após a terapia. Medicamentos como o siltuximab, o daratumumab e o elotuzumab (todos anticorpos monoclonais IgG kappa) podem aparecer como uma pequena proteína M, geralmente em concentrações até 1 g/L, quando utilizados em doses terapêuticas habituais. O aparecimento dessas novas proteínas M nos testes é relevante apenas se causar investigações adicionais desnecessárias ou a incorreta conclusão de que a terapia em curso tem sido menos efetiva. Em geral, a principal preocupação com esses tratamentos corresponde à classificação errônea da resposta da doença. Pacientes com uma pequena banda monoclonal em virtude da terapia monoclonal, em particular, podem ser erroneamente classificados como tendo uma resposta parcial em oposição à resposta completa. Dessa maneira, o International Myeloma Working Group modificou os critérios de resposta, levando em conta a presença de interferência da terapia monoclonal. Considerando esses dados, o risco de interferência depende de vários elementos, como o isotipo da proteína M, o padrão de migração eletroforética, a resposta alcançada e a concentração sérica alvo do medicamento de acordo com a fase de tratamento. Atualmente, a maioria das experiências com terapias de anticorpo monoclonal para tratamento do mieloma múltiplo vem dos medicamentos daratumumab e elotuzumab. Isso tem particular relevância para pacientes com proteína monoclonal do subtipo IgG kappa ou cadeia leve kappa livre. Nesses doentes, a comigração do anticorpo terapêutico e da proteína M maligna pode dificultar a avaliação da correta concentração da proteína M. Esses pacientes correm o risco de serem classificados como apresentando resposta parcial em

vez de completa pela presença de componente monoclonal, que pode ser derivado do medicamento. O elotuzumab e o daratumumab têm meia-vida média de 4,6 e 9 dias, respectivamente. O risco de interferência também depende da frequência da administração durante o tratamento – ele é mais elevado quando a infusão é semanal ou quinzenal (fases de indução e consolidação) e bem mais reduzido quando o tratamento é administrado, por exemplo, a cada 2 meses (tratamento de manutenção). Dessa maneira, a interferência dessas medicações nos testes pode ser limitada pelo planejamento da próxima análise de proteína M por meio da solicitação de eletroforese e da imunofixação tão longe da administração da medicação quanto possível. Do ponto de vista prático, isso coincide com as novas amostras de sangue sendo coletadas imediatamente antes da próxima dose do medicamento. Para superar a interferência do daratumumab ao avaliar a resposta ao tratamento, a comigração do daratumumab e da proteína M maligna do subtipo IgG kappa pode ser mitigada pelo ensaio Hydrashift 2/4 Daratumumab (Sebia, Paris, França). Este se baseia na utilização de um anticorpo contra o daratumumab, que altera a migração desse medicamento durante a eletroforese de modo que a imunofixação consegue determinar se se trata de uma proteína M patológica ou decorrente do uso da medicação. Atualmente estão em investigação soluções similares para mitigar a interferência de outros anticorpos monoclonais. Em circunstâncias normais, o pico observado na eletroforese em decorrência do medicamento é de baixa concentração e não excede 0,10 g/dL. De todo modo, é muito importante que o laboratório tenha acesso aos medicamentos que o paciente está utilizando para auxiliar na liberação dos laudos de eletroforese/imunofixação, independentemente se a proteína M patológica inicial é IgG kappa, kappa livre ou outra. Sabe-se que, no entanto, essa informação nem sempre está disponível. Assim, recomenda-se manter estreito contato com a equipe médica solicitante, de modo a analisar com cuidado aqueles casos em que há o aparecimento de um novo pico IgG kappa após o tratamento ou concomitância na migração da proteína M patológica, quando o valor desta pode estar superestimado.

Em um futuro próximo, provavelmente novas tecnologias possam resolver a questão da interferência da terapia monoclonal completamente. Uma possibilidade promissora consiste no emprego da tecnologia de espectrometria de massas para identificação destas e de outras imunoglobulinas, cada qual com a sua “assinatura” específica, o que resolveria por completo essa questão.

CONCLUSÃO

A eletroforese e a imunofixação de proteínas são testes que, assim como outros, estão sujeitos a muitos diferentes tipos de interferências. A conscientização de que como esses métodos funcionam e o conhecimento de seus potenciais interferentes são fundamentais para a elaboração e a interpretação dos laudos.

CASO CLÍNICO

Paciente do sexo feminino, 59 anos, com antecedente de mieloma múltiplo IgG lambda com migração na região de gamaglobulinas, está realizando seguimento laboratorial. Apresenta a eletroforese descrita na Figura 2 e na Tabela 1.

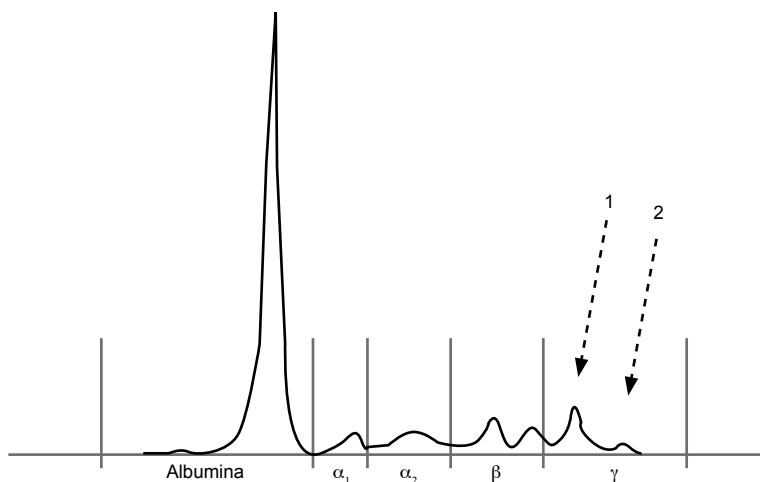


FIGURA 2 Eletroforese das proteínas séricas.

TABELA 1 Método: eletroforese por capilaridade

	Resultado (g/dL, %)	Valores de referência (g/dL, %)
Albumina	4,02 (61,5)	3,50 a 4,85 (54,0 a 60,0)
Alfa-1 globulinas	0,21 (3,2)	0,22 a 0,43 (3,4 a 5,3)
Alfa-2 globulinas	0,55 (8,4)	0,55 a 1,08 (8,4 a 13,3)
Beta-1 globulinas	0,43 (6,5)	0,32 a 0,54 (4,9 a 6,6)
Beta-2 globulinas	0,31 (4,7)	0,24 a 0,54 (3,6 a 6,6)
Gama globulinas	0,41 (6,2)	0,74 a 1,75 (11,4 a 21,6)
Comp. monoclonal (1)	0,50	
Comp. monoclonal (2)	0,10	
Total	6,53	6,50 a 8,10
Rel. albumina/globulina	1,6	0,9 a 2,0

Nesse caso, apareceu uma segunda proteína M na região de gamaglobulinas que não era observada em eletroforeses anteriores. Então, realizou-se imunofixação da amostra, que revelou o componente monoclonal (1) como IgG lambda e o componente monoclonal (2) como IgG kappa.

Assim sendo, o laboratório deve estar atento, pois um novo pico monoclonal não observado em eletroforeses anteriores pode corresponder, por exemplo, ao aparecimento de um novo clone. No entanto, existe também a possibilidade de essa paciente estar recebendo anticorpo monoclonal terapêutico (daratumumab), conhecido interferente do traçado eletroforético. Ao entrar em contato com a equipe médica, verificou-se que a paciente estava fazendo uso da medicação daratumumab para tratamento do mieloma múltiplo. Por fim, pode-se confirmar a suspeita de que o segundo pico monoclonal decorre do medicamento por meio da aplicação do ensaio Hydrashift, no qual a ligação de anticorpos antidaratumumab ao medicamento acarretará no desaparecimento do componente monoclonal (2) observado na imunofixação.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

LOKHORST HM, PLESNER T, LAUBACH JP, NAHI H, GIMSING P, HANSSON M ET AL. Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2015;373:1207-19.

MCCUDDEN CR, JACOBS JFM, KEREN D, CAILLON H, DEJOIE T, ANDERSEN K. Recognition and management of common, rare, and novel serum protein electrophoresis and immunofixation interferences. *Clin Biochem.* 2018;51:72-9.

PLEBANI M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med.* 2006;44:750-9.

QIU LL, LEVINSON SS, KEELING KL, ELIN RJ. Convenient and effective method for removing fibrinogen from serum specimens before protein electrophoresis. *Clin Chem.* 2003;49:868-72.

WILLRICH MAV, LADWIG PM, ANDREGUETTO BD, MURRAY DL, KATZMANN JA, SNYDER MR. Monoclonal antibody therapeutics as potential interferences on protein electrophoresis and immunofixation. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54:1085-93.

26 Fatores pré-analíticos e interferentes no diagnóstico molecular

INTRODUÇÃO

O diagnóstico molecular representa o segmento da medicina laboratorial responsável pela detecção, pela tipagem e pela quantificação de ácidos nucleicos aplicados à genética, ao câncer e às doenças infecciosas. Os ácidos nucleicos em questão incluem o DNA genômico humano, o DNA tumoral e fetal livre circulante, o DNA e o ácido RNA virais, e as fusões de RNA mensageiros.

Para que a detecção, a tipagem e a quantificação dessas moléculas possam ser usadas como ferramentas de triagem, diagnóstico ou estratificação de risco na medicina laboratorial, é necessário garantir a acurácia e a precisão das análises de modo que realmente reflitam a condição clínica do paciente.

Como a fase analítica geralmente é muito bem avaliada pelos fabricantes de testes ou pelas equipes de pesquisa e desenvolvimento de métodos *in house*, a fase pré-analítica, exclusiva de cada laboratório, pode ser a origem de erros ou falhas.

Assim, é necessário conhecer o tipo de ácido nucleico avaliado, sua compartimentalização, suas causas de degradação e os interferentes intrínsecos dos diferentes tipos de materiais biológicos para uma efetiva neutralização dos possíveis efeitos da fase pré-analítica sobre as análises.

O tipo de ácido nucleico torna-se relevante porque DNA e RNA têm estabilidades diferentes que refletem suas diferenças químicas e estruturais. É preciso saber se no material biológico dos pacientes o ácido nucleico alvo do ensaio encontra-se dentro ou fora de compartimentos, como membrana plasmática, parede celular, vesículas ou capsídeos. A quantidade e os tipos de nucleases (enzimas que degradam ácidos nucleicos) variam de espécime para espécime, tornando-se necessário neutralizá-las, limitá-las ou, no mínimo, conhecer seus efeitos e avaliar seus impactos sobre o resultado dos testes.

Além disso, cada espécime tem diferentes tipos e classes de substâncias que, se inadvertidamente introduzidos nas reações enzimáticas subsequentes à extração de ácidos nucleicos, inibem tais reações, tornando-se, assim, interferentes.

Em tempo, é preciso atentar-se ao fato de que cada uma das variáveis supracitadas é única para cada tipo de material biológico passível de ser analisado no setor de diagnóstico molecular (sangue total, plasma, soro, urina, saliva, fezes, esperma e outros).

Contudo, existem formas e artifícios capazes de estabilizar os ácidos nucleicos mitigando os efeitos dessas variáveis pré-analíticas. Tais artifícios, somados às modernas técnicas de purificação de DNA e RNA, possibilitam que os exames de diagnóstico molecular alcancem seu propósito como ferramentas de triagem, diagnóstico ou estratificação de risco na genética, no câncer e nas doenças infecciosas.

FATORES QUE INFLUENCIAM A ESTABILIDADE DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Estrutura e composição química

As características químicas e estruturais dos ácidos nucleicos influenciam diretamente sua estabilidade. O DNA é formado por duas fitas polinucleotídicas complementares, cujo açúcar do esqueleto carbônico é a desoxirribose e não se degrada com o calor. O RNA é formado por uma fita polinucleotídica, cujo açúcar do esqueleto carbônico é a ribose e se degrada com o calor, principalmente na presença de íons divalentes.¹ O grupamento hidroxila no carbono 2' da ribose torna o RNA mais reativo que o DNA. A desoxirribose apresenta um hidrogênio na posição equivalente.^{2,3} A maior exposição das bases nitrogenadas nas estruturas secundárias formadas pelo RNA o torna mais suscetível aos ataques enzimáticos. O DNA, por sua vez, tem bases mais protegidas na dupla hélice, havendo um espaço mínimo para ataques enzimáticos.⁴⁻⁶ Assim, as análises envolvendo o DNA sofrem menos interferência de variáveis pré-analíticas.

Compartimentos

As RNAses são ubíquas nos materiais biológicos.⁷ Assim, não se espera encontrar RNA livre em espécimes laboratoriais. O que torna o RNA estável nos materiais biológicos é sua compartimentação dentro dos capsídeos virais⁸ ou exossomos^{9,10} ou sua constante produção dentro das células.^{11,12}

A detecção e a quantificação de RNA virais são possíveis em razão da proteção do capsídeo.¹³ Encapsular o RNA com proteínas do capsídeo de fagos – simulando uma partícula viral – o protege das ribonucleases (RNAses) dos materiais biológicos, sendo esta a estratégia para a construção de diversos controles e calibradores.¹⁴

Dentro das células, o RNA tem estabilidade variável e diferentes vias de degradação podem ser ativadas durante a adaptação celular a estímulos intrínsecos ou extrínsecos.^{15,16} É preciso atentar-se que as células vivas na amostra *ex-vivo* podem ter sua expressão gênica alterada, o que acontece com os leucócitos no sangue durante seu processamento pré-analítico podendo interferir nos resultados dos exames.¹⁷

Por sua vez, o DNA livre na forma de fita dupla (fisiológico) ou simples (sintético) é bem mais estável que o RNA nos materiais biológicos. Na prática, isso é observado pela existência do DNA livre circulante de origem fetal ou tumoral, alvos dos testes pré-natais não invasivos e das biópsias líquidas, respectivamente, ou mesmo o DNA circulante fisiológico, oriundo da hematopoese e da morte celular.¹⁸⁻²² Na verdade, a maior parte do DNA livre circula associada às histonas do nucleossomo, que dificulta, mas não impede sua degradação pelas DNAses sanguíneas.²³

Os tipos e a concentração das DNAses variam de espécime para espécime. Por exemplo, a concentração de DNAses é muito maior na urina do que no sangue.^{24,25} A compartimentalização dentro de células, membranas plasmáticas, capsídeos virais ou exossomos protege o DNA da ação das DNAses. Nesse sentido, enquanto o DNA livre de células é escasso e fragmentado na urina,^{26,27} o DNA da *Chlamydia trachomatis* pode ser detectado por longos períodos após a coleta²⁸ – protegidos pela parede celular²⁹ ou pelo corpúsculo elementar.³⁰ O uso de tampões estabilizantes pode ser uma alternativa para preservar o DNA em material biológico rico em DNAses.³¹ Na Tabela 1, há um resumo das aplicações do diagnóstico molecular e os respectivos materiais biológicos, ácidos nucleicos alvos e compartimentos.

TABELA 1 Aplicações do diagnóstico molecular e os respectivos materiais biológicos, ácidos nucleicos alvos e compartimentos

Aplicação	Material biológico	Ácido nucleico	Compartimento
Genética			
Mutações germinativas	Sangue total	DNA genômico	Célula eucariótica
NIPT*	Plasma	DNA fetal	Livre/nucleossomos
Câncer			
Biópsia líquida	Plasma	DNA tumoral	Livre/nucleossomos
Fusões gênicas	Sangue total	RNA tumoral	Célula eucariótica
Doenças infecciosas			
Vírus no sangue	Plasma	DNA/RNA viral	Capsídeo viral
Vírus no sêmen	Sêmen	DNA/RNA viral	Capsídeo viral
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Urina	DNA bacteriano	Parede celular/corpo elementar
<i>Clostridium difficile</i>	Fezes	DNA bacteriano	Parede celular

* Triagem pré-natal não invasiva.

DNases

Têm papel fisiológico importante na apoptose, na necrose e no *clearance* de ácidos nucleicos fisiológicos e exógenos.^{32,33} Em cooperação com as proteases, essas enzimas são essenciais para eliminação das células mortas e, conseqüentemente, para homeostase dos tecidos e resolução da inflamação.³⁴ Falhas nos mecanismos de eliminação de DNA do organismo (DNases, metabolização renal e hepática) estão associadas à patogênese de doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico.³⁵

DNase I é a principal enzima capaz de degradar o DNA encontrado nos fluidos biológicos. Sua atividade é maior na urina, seguida de sêmen, saliva e sangue.²⁴ Trata-se de uma enzima dependente de íons divalentes,³⁶ ou seja, pode estar completa ou parcialmente inibida nos tubos contendo EDTA e citrato de sódio como anticoagulante.^{37,38}

A DNase I é responsável por 90% da atividade DNase presente no sangue,²⁵ sendo também a principal DNase encontrada na urina, no sêmen e na saliva.^{25,27} Porém, existem outras quatro enzimas capazes de degradar o DNA nessa espécie: DNase II;²⁴ fosfodiesterase I;³² anticorpos hidrolizantes de DNA;³⁹ e lactoferrina.⁴⁰ A DNase II e a fosfodiesterase I também são encontradas na urina.²⁷

O impacto das DNases sobre o diagnóstico molecular foi negligenciado por muito tempo. A Tabela 2 contém as características das DNases encontradas no sangue.

TABELA 2 Características das DNases encontradas no sangue

DNase	Quantidade	Principal substrato	Íons bivalentes	EDTA
DNase I	Alta	dsDNA	Dependente	Inibe
DNase II	Baixa	dsDNA	Independente	Não inibe
Fosfodiesterase I	Baixa	ssDNA e RNA	Dependente	Inibe
Anticorpos hidrolizantes de DNA	Baixa	dsDNA	Dependente	Inibe
Lactoferrina	Baixa	dsDNA	Estimulada	Inibe

dsDNA: DNA dupla fita; ssDNA: DNA fita simples.

RNases

O genoma humano codifica pelo menos oito RNases ativas (numeradas de I a VIII).⁴¹ As RNases estão presentes em todos os materiais biológicos usados com finalidade diagnóstica, sendo a principal a RNase I.⁴²⁻⁴⁶ A RNase I está presente na

urina, no plasma seminal, no líquido cefalorraquidiano, na saliva e no sangue.⁴¹ No entanto, a RNase II é mais abundante na urina que a RNase I.²⁷

A RNase I do sangue é produzida pelas células endoteliais.⁴⁷ Acredita-se que suas funções sejam degradar o RNA extracelular contribuindo para a normalização da viscosidade sérica e participar de uma resposta fisiológica inespecífica contra o RNA de patógenos.⁴⁸

Quando um RNA desprotegido (livre) é adicionado ao sangue, sua degradação pelas RNases sanguíneas ocorre em 15 segundos.⁴⁹ No entanto, pequenas quantidades de RNA endógeno podem ser detectadas no soro e no plasma até 24 horas após a coleta, sugerindo que há algum mecanismo de proteção,⁴⁹ como a compartimentação nos exossomos.^{50,51}

Interferentes

Os ensaios moleculares podem ser inibidos por substâncias presentes no material biológico caso estes sejam coextraídos com os ácidos nucleicos. Esses inibidores interferem diretamente nas reações enzimáticas, o que diminui a sensibilidade dos testes, podendo até mesmo promover resultados falso-negativos.⁵²

Os inibidores são espécime-específicos, havendo a necessidade da implantação de processos ou protocolos específicos para cada tipo de matriz. Substâncias inibidoras de reação em cadeia da polimerase (PCR) como IgG, hemoglobina e lactoferrina podem ser coextraídas do sangue, soro ou plasma.^{53,54} Hormônios e antivirais (aciclovir) também podem afetar a amplificação.^{55,56} O componente mais crítico da urina é a ureia, que degrada as polimerases.^{45,57,58} Polissacarídeos, sais e ácidos biliares e glicolípídios coextraídos das fezes também são descritos como inibidores.^{57,59}

Os inibidores podem ser também introduzidos na amostra durante a fase pré-analítica e/ou purificação dos ácidos nucleicos, o que inclui pó das luvas, sais (cloreto de sódio e cloreto de potássio), detergentes (SDS) e moléculas orgânicas (etanol, isopropanol e fenol).^{56,60,61} O EDTA, presente em vários tampões de eluição para preservar o DNA, pode inibir as reações de PCR ao sequestrar os íons magnésio.⁵²

A possibilidade de coextração de inibidores faz com que os controles do processo sejam essenciais para o diagnóstico molecular. Esses controles serão abordados no tópico “Controles de processo”.

Anticoagulantes

Os principais anticoagulantes utilizados em medicina diagnóstica são EDTA, heparina e citrato de sódio.⁶² O EDTA e o citrato de sódio apresentam mecanismo de ação anticoagulante distinto do da heparina. A diferença entre esses mecanismos tem um importante impacto sobre os métodos moleculares.

O EDTA e o citrato de sódio são quelantes de cálcio, e o sequestro deste íon, considerado o fator IV da coagulação, inibe a cascata porque o cálcio é importante para a ligação dos demais fatores de coagulação aos fosfolipídios.⁶³ A heparina se complexa com a antitrombina III induzindo mudanças estruturais que potencializam sua ação sobre a trombina e sobre o fator X ativado. Isso impede a ativação da trombina e, conseqüentemente, a conversão do fibrinogênio em fibrina.⁶²

Em virtude de seu mecanismo de ação, os quelantes de cálcio apresentam uma vantagem secundária. Além de inibirem a coagulação, inibem as DNases do sangue, enzimas dependentes de cálcio e magnésio (outro íon bivalente sequestrado pelo EDTA). O EDTA na concentração usual dos tubos encontrados no mercado, entre 1,4 e 2,2 g/L,⁶² é capaz de inibir consideravelmente as DNases do sangue.³⁷ No entanto, as concentrações de citrato de sódio em geral encontradas nos tubos disponíveis no mercado, entre 3,2 e 3,8%,⁶² inibem parcialmente as DNases do sangue. Seria necessária uma concentração de 8% para que o citrato de sódio apresente uma inibição semelhante à do EDTA.³⁸

Contrariamente, as DNases do sangue estão ativas no sangue total e no plasma coletados na heparina, pois esta não inibe as DNases do sangue. Sendo que, dentre os principais anticoagulantes (EDTA, citrato de sódio e heparina), as amostras colhidas em heparina são as que apresentam maior atividade DNase.³⁸ Ademais, existe o consenso na literatura de que a heparina inibe as reações moleculares se coextraída com os ácidos nucleicos.⁵² Portanto, o uso da heparina como anticoagulante deve ser evitado no diagnóstico molecular.

As DNases do sangue também estão ativas no soro. Sua atividade nesse espécime é um pouco menor que na heparina, em virtude da inibição promovida pela G-actina liberada no soro durante a coagulação. No entanto, o congelamento a -20°C é capaz de inibir a atividade DNase do soro.³⁷ Conclui-se que a baixa temperatura durante o transporte e o armazenamento também protegem os alvos moleculares do efeito dessas enzimas.

Em conjunto, essas informações são relevantes principalmente para os testes envolvendo o DNA genômico e o DNA livre de células. A inibição das DNases do sangue protege esses alvos *ex-vivo*, ou seja, durante o transporte e o armazenamento. É possível estender a proteção para DNA viral, pois, se ele perder seu compartimento protetor, tornando-se um DNA viral livre, suas características químicas e a inibição das DNases pelo EDTA poderiam protegê-lo. De fato, controles sintéticos podem ser construídos pela adição de DNA sintético fita simples ou fita dupla desprotegidos diretamente no plasma-EDTA, pois sua quantidade é bem estável nesse espécime.

Assim, entre os anticoagulantes comuns, o EDTA é o de escolha para os testes moleculares, pois inibe as DNAses, conferindo proteção ao DNA. Como as RNAses não dependem de íons bivalentes, elas não são inibidas pelo EDTA.

Temperatura de transporte, temperatura de armazenamento e tempo entre a coleta e a realização dos exames

O transporte e o armazenamento a uma temperatura baixa (4 a 8°C) consistem em aliados do diagnóstico molecular – vários alvos moleculares são estáveis por alguns dias nessa temperatura, como pode ser observado a seguir.

O DNA genômico no sangue total EDTA é muito estável e pode inclusive ser transportado e armazenado à temperatura ambiente.^{64,65} Sua quantidade depende do número de células nucleadas, que diminuem na amostra ao longo do tempo após a coleta, tanto à temperatura ambiente quanto refrigerada.⁶⁶ Mesmo com essa diminuição com o passar dos dias, a quantidade de DNA recuperada é mais que suficiente para a maioria das análises genéticas. De fato, se congelado, a quantidade de DNA recuperada diminui.⁶⁷ Mas alguns estudos relatam que o DNA genômico de alto peso molecular pode ser extraído do sangue total EDTA após 1 ano de armazenagem a -20°C.⁶⁵ Essas evidências indicam que não há muita dificuldade em trabalhar com o DNA genômico extraído do sangue.

O cenário muda quando se trata do RNA intracelular extraído a partir do sangue total EDTA, como é o caso da detecção ou da quantificação das fusões BCR-ABL na leucemia mieloide crônica.⁶⁸ Sabe-se que a expressão gênica das células nucleadas do sangue se altera *ex-vivo* pouco tempo depois da coleta. Em 24 e 48 horas, já se percebem alterações e alguns genes podem ser ativados ou inibidos. Assim, é necessário validar se o tempo de transporte e a armazenagem a 4°C interferem no ensaio.⁶⁹ No entanto, existem tubos especializados que evitam esse efeito (vide tópico “Tubos especializados”).⁷⁰ Usando-se os tubos convencionais de sangue total EDTA, recomendam-se: isolar o botão leucocitário; romper seletivamente as hemácias;⁷¹ e adicionar um tampão de lise baseado em sais de guanidina, o qual lisa os leucócitos, degrada as RNAses e estabiliza o RNA. Esse RNA estabilizado pode ser guardado a -20°C por meses até o momento da extração de ácidos nucleicos.^{72,73} Portanto, deve-se evitar congelar o sangue total-EDTA antes da extração de RNA, pois a hemólise e a lise de leucócitos provocada pelo congelamento dificultam o isolamento do botão leucocitário.⁷⁴

No caso do plasma-EDTA para detecção de vírus de DNA e RNA, tradicionalmente, o espécime é centrifugado poucas horas após a coleta, pois alguns vírus se mostraram instáveis no sangue total à temperatura ambiente,^{75,76} e evita o aumento da proporção do DNA genômico do paciente no plasma em razão da lise de leucócitos.⁷⁷ Nesse caso, recomenda-se o uso de tubos com gel separador, pois evita

a transferência do plasma do tubo primário.⁷⁸ Os vírus tendem a ser bem estáveis nesse espécime, principalmente a 4 a 8°C para transporte e estocagem de curto prazo^{79,80} e a -20 ou -80°C na estocagem de longo prazo.⁸¹ No entanto, as condições pré-analíticas de transporte e armazenamento não foram avaliadas extensivamente para todos os vírus, principalmente os considerados “novos”, como os vírus zika e chikungunya. Nesse caso, são extrapoladas dos estudos com vírus mais tradicionais, como o HIV e CMV. Todavia, tais extrapolações devem ser avaliadas pelo laboratório na validação ou na verificação dos ensaios.

A mesma indicação de separação em poucas horas após a coleta é válida para o plasma-EDTA para análise do DNA fetal e do DNA tumoral livre circulante, pois evita sua contaminação com DNA originado da lise de células nucleadas do sangue.^{77,82} O uso de tubos específicos com estabilizantes evita essa questão,⁸² mas resultados aceitáveis podem ser obtidos com o plasma-EDTA.^{82,83}

O congelamento influencia negativamente o ensaio para detecção do DNA da *Chlamydia trachomatis* na urina. Contudo, a bactéria se mostrou estável na urina por 15 a 30 dias à temperatura ambiente^{28,84} e 30 dias se resfriada a 4 a 8°C.²⁸ O DNA da *Neisseria gonorrhoeae* foi estável na urina por 15 dias à temperatura ambiente.⁸⁴ O DNA da *Trichomonas vaginalis* foi estável entre 3 e 7 dias na urina resfriada, mas não à temperatura ambiente.⁸⁵ A extrapolação desses dados para outras bactérias deve ser validada pelo laboratório. Fabricantes dos ensaios para *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* recomendam a transferência da urina para um meio de transporte baseado em sais de guanidina em até 24 horas.⁸⁴ Uma vez nesse meio, o DNA do patógeno tende a permanecer estabilizado por 28 dias à temperatura ambiente.⁸⁶

O sêmen tornou-se um importante material biológico para pesquisa de vírus, pois estes tendem a permanecer por mais tempo nesse espécime em comparação ao sangue e a outros materiais biológicos.^{87,88} Como o esperma é altamente imunogênico, a resposta imune fica restrita nos testículos para tornar possível a sobrevivência dos espermatozoides⁸⁹ – essa pode ser a explicação para a maior permanência e persistência dos vírus nesse material biológico.⁹⁰ Uma revisão da literatura demonstrou que mais de 27 vírus podem ser encontrados no sêmen.⁹⁰ Como o uso do sêmen para pesquisa de vírus utilizando métodos moleculares é muito incipiente, as considerações pré-analíticas para as culturas microbiológicas do sêmen ou do plasma-seminal podem ser extrapolados.⁹¹

No caso das fezes para análise molecular de patógenos gastrintestinais, esse material biológico tem sido estabilizado e transportado no meio Cary-Blair,⁹² no qual a estabilidade do material é de 4 dias à temperatura ambiente e resfriada a 4 a 8°C. A estabilidade a -20°C é desconhecida.

TUBOS ESPECIALIZADOS

O PAXgene® (Qiagen) e o Tempus® (Life Technologies) são tubos que preservam o RNA da amostra de sangue instantaneamente após a coleta,⁷⁰ evitando as alterações na expressão gênica que ocorrem *ex-vivo*.^{93,94} Eles fazem com que o perfil de expressão gênica da amostra seja mais fiel à condição *in-vivo* do paciente. O tubo BCT® (Streck) contém estabilizantes de células nucleadas que impedem seu rompimento durante o transporte, evitando, assim, a contaminação do plasma a ser usado em biópsia líquida ou NIPT com sequências de DNA genômico dos pacientes, o que poderia diminuir a sensibilidade do método.⁹⁵

EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A principal extração de ácidos nucleicos utilizada na atualidade é a extração de Boom, método que se baseia na lise dos possíveis compartimentos, na inativação de nucleases com um agente caotrópico (sais de guanidina), e na ligação do ácido nucleico às partículas de sílica,⁹⁶ magnéticas ou não. O método tem a capacidade de extrair todos os diferentes tipos de ácidos nucleicos que possam estar presentes na amostra,⁹⁶ sendo utilizado nas principais extrações manuais baseadas em coluna e nos principais equipamentos de extração automatizada de ácidos nucleicos. O método também é genérico com relação ao tipo de material biológico.

A primeira etapa da extração consiste na mistura da amostra com um tampão de lise, justamente a solução que contém altas concentrações de sais de guanidina. Como dito anteriormente, esse tampão lisa todos os possíveis compartimentos contendo ácidos nucleicos e degrada todas as nucleases, incluindo as RNases. Assim, esse tampão de lise compreende uma ótima maneira de estabilizar os ácidos nucleicos e inativar possíveis patógenos na amostra. Uma vez no tampão de lise, os ácidos nucleicos, tanto DNA quanto RNA, ficam estabilizados por alguns dias à temperatura ambiente e vários meses a -20°C e anos a -80°C .^{72,73}

Quantidade de ácido nucleico de fundo nas amostras

A quantidade de ácidos nucleicos do próprio paciente varia entre as amostras. Esse DNA de fundo será coextraído com o ácido nucleico alvo do teste. Nos ensaios para detecção de alvos em baixo número de cópias, ou seja, ensaios em que a sensibilidade é um fator importante, quanto maior a quantidade de DNA nas reações moleculares, maior a chance de resultados inespecíficos. Assim, o DNA de fundo pode ter impacto na sensibilidade do ensaio,^{97,98} principalmente nos casos em que o conjunto de iniciadores de PCR não é específico ou o DNA de fundo contenha sequências muito similares às sequências-alvo do ensaio. Contudo, nas situações em que os iniciadores de PCR são muito específicos, o DNA de fundo não interfere no resultado do ensaio.⁹⁹ Se aplicável, o efeito do DNA de fundo sobre o ensaio

deve ser validado. As concentrações de DNA genômico humano nos diferentes tipos de amostra podem ser encontradas na Tabela 3.

TABELA 3 Concentrações de DNA genômico humano nos diferentes espécimes usados no diagnóstico molecular

Espécime	DNA de fundo
Sangue total EDTA	~ 18.000 a 180.000 ng/mL ^{100,101}
Plasma-EDTA	~ 3 a 30 ng/mL ^{102,103}
Soro	~ 50 a 500 ng/mL ¹⁰³
Urina	~ 40 a 200 ng/mL ¹⁰⁴
Fezes	~ 90 a 110 ng/mg ¹⁰⁵
Plasma seminal	~ 13.400 ng/mL ¹⁰⁶
Saliva	~ 15.000 a 74.000 ng/mL ^{101,107}

CONTROLES DE PROCESSO

Apesar dos esforços para eliminá-los, os inibidores de PCR ainda podem estar presentes nas amostras após a extração de ácidos nucleicos.⁵² Além disso, existem situações específicas em que a extração de ácidos nucleicos é excelente para o plasma, o soro e outros tipos de amostras, mas coextrai um inibidor do sangue total¹⁰⁸ (fato que também demonstra a importância da validação da extração).

Como as reações moleculares podem ser completamente inibidas pelos interferentes mesmo com a presença do ácido nucleico alvo na amostra, controles de reação devem ser usados para excluir a possibilidade de resultados falso-negativos.¹⁰⁹ O controle de reação pode ser um ácido nucleico alvo sabidamente presente na amostra (controle endógeno), ou um ácido nucleico sintético ou mesmo um microrganismo com quantidade ou resultado esperado conhecido (controle exógeno). O controle de reação pode ser adicionado à amostra e analisado com o alvo principal na mesma reação (controle interno) ou em uma reação exclusiva (controle externo). Se adicionados à amostra primária (ou durante a extração), controlam todo o processo; se adicionados após a extração, controlam apenas a amplificação.⁵²

Amostras ricas em DNA e RNA, como o sangue total, possibilitam o emprego de controles de reação endógenos. Amostras escassas em ácidos nucleicos, como plasma e urina, exigem controles de reação externos. Se o controle exógeno for um RNA desprotegido, este deve ser adicionado às amostras após a etapa de lise na extração de Boom, pois, nesse momento, as RNases foram inativadas.¹¹⁰

Para que a amplificação do controle de reação não interfira na amplificação do alvo principal, limita-se a quantidade dos iniciadores de PCR para o controle de reação em um terço da quantidade usada para o alvo principal.⁵²

Além disso, os controles de reação podem ser utilizados para avaliar o impacto da fase pré-analítica sobre a amostra. Por exemplo, recomenda-se obter uma quantificação mínima de cópias de um gene referência (p. ex., 10 mil cópias do mRNA do gene *ABL1* ou 4 logs) nas reações para detecção e quantificação das fusões gênicas BCR-ABL1 para avaliar o impacto pré-analítico sobre o ensaio e garantir a sensibilidade do método.^{111,112}

CASO CLÍNICO | SEXAGEM FETAL NO SANGUE CAPILAR

Sabe-se que o DNA fetal livre de células está presente na circulação materna, tem origem nas células da placenta e sua quantidade aumenta ao longo da gestação. Tradicionalmente, sua detecção é feita no sangue venoso coletado por venipuntura. Uma de suas principais aplicações é a determinação não invasiva do sexo fetal após a 8ª semana de gestação.¹¹³

Normalmente, não há razões médicas para descobrir o sexo fetal durante a gestação. A exceção é quando do risco de o bebê portar doenças genéticas importantes e que dependem do seu sexo. Por exemplo, os meninos, mas não as meninas, têm risco de herdar a distrofia muscular Duchenne da mãe se ela for portadora.^{114,115}

No entanto, o teste é muito utilizado para sanar a curiosidade dos pais em relação ao sexo do seu futuro filho e se baseia na detecção do cromossomo Y na circulação materna, quando sua presença indica a gestação de um feto do sexo masculino e sua ausência a de um feto do sexo feminino.

Com a intenção de trazer conforto para as mães que têm fobia de agulhas ou muita ansiedade na venipuntura, testou-se a possibilidade de executar a sexagem fetal no sangue capilar. Para isso, comparou-se a execução do teste no sangue venoso (espécime padrão de referência) e no sangue capilar (espécime teste) de voluntárias grávidas.¹¹⁶ Os espécimes foram coletados na mesma ocasião e executadas no mesmo momento.

Observou-se uma percentagem muito alta de resultados falso-positivos no sangue capilar – 46% das amostras classificadas como femininas no sangue venoso foram classificadas como masculinas no sangue capilar. Além disso, o sinal falso-positivo observado no sangue capilar era indistinguível de um sinal verdadeiro-positivo. E, ainda, os resultados no sangue venoso concordaram completamente com o sexo ao nascimento.¹¹⁶

Essas observações sugerem que o sangue capilar, mas não o sangue venoso, estava contaminado com sequências do cromossomo Y. De fato, as amostras de sangue capilar estão mais suscetíveis a contaminantes, porque a gota formada na superfi-

cie da pele durante a coleta possibilita que DNA contaminantes presentes nas pontas dos dedos entrem na amostra. Diferentemente, o sangue venoso é diretamente aspirado do vaso sanguíneo para um tubo de coleta estéril.

Então, introduziu-se uma assepsia das pontas do dedo com hipoclorito de sódio diluído e tamponado em vez de álcool isopropílico. O hipoclorito de sódio diluído é muito utilizado para eliminar DNA indesejável.^{117,118} Sua segurança e suas propriedades não irritantes são bem conhecidas e aceitas.^{119,120}

A nova assepsia foi capaz de reduzir a contaminação com sequências exógenas de cromossomo Y, observando-se concordância completa entre os resultados do sangue capilar, do sangue venoso e do sexo ao nascimento.

Isso confirma que a contaminação tinha origem nas pontas dos dedos e mostra a importância da validação do novo tipo de material biológico antes de o método ser colocado na rotina.

REFERÊNCIAS

1. CLANCY S. Chemical structure of RNA. *Nature Education*. 2008;7:60.
2. WANG S, KOOL ET. Origins of the large differences in stability of DNA and RNA helices: C-5 methyl and 2'-hydroxyl effects. *Biochemistry*. 1995;34:4125-32.
3. DWORKIN JP, LAZCANO A, MILLER SL. The roads to and from the RNA world. *J Theor Biol*. 2003;222:127-34.
4. ZIEHLER WA, ENGELKE DR. Probing RNA structure with chemical reagents and enzymes. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* 2001;Chapter 6:Unit 6 1.
5. LU XJ, SHAKKED Z, OLSON WK. A-form conformational motifs in ligand-bound DNA structures. *J Mol Biol*. 2000;300:819-40.
6. LIMA WF, CROOKE ST. Cleavage of single strand RNA adjacent to RNA-DNA duplex regions by *Escherichia coli* RNase H1. *J Biol Chem*. 1997;272:27513-6.
7. PROBST J, BRECHTEL S, SCHEEL B, HOERR I, JUNG G, RAMMENSEE HG, PASCOLO S. Characterization of the ribonuclease activity on the skin surface. *Genet Vaccines Ther*. 2006;4:4.
8. BUTTERFIELD GL, LAJOIE MJ, GUSTAFSON HH, SELLERS DL, NATTERMANN U, ELLIS D, BALE JB, KE S, LENZ GH, YEHDEGO A AND OTHERS. Evolution of a designed protein assembly encapsulating its own RNA genome. *Nature*. 2017;552:415-20.
9. CHENG L, SHARPLES RA, SCICLUNA BJ, HILL AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell Vesicles*. 2014;3.
10. KOGA Y, YASUNAGA M, MORIYA Y, AKASU T, FUJITA S, YAMAMOTO S, MATSUMURA Y. Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. *J Gastrointest Oncol*. 2011;2:215-22.
11. CHEN CY, EZZEDDINE N, SHYU AB. Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. *Methods Enzymol*. 2008;448:335-57.

12. YANG E, VAN NIMWEGEN E, ZAVOLAN M, RAJEWSKY N, SCHROEDER M, MAGNASCO M, DARNELL JE JR. Decay rates of human mRNAs: correlation with functional characteristics and sequence attributes. *Genome Res.* 2003;13:1863-72.
13. CLIVER DO. Capsid and infectivity in virus detection. *Food Environ Virol.* 2009;1:123-8.
14. NINOVE L, NOUGAIREDE A, GAZIN C, THIRION L, DELOGU I, ZANDOTTI C ET AL. RNA and DNA bacteriophages as molecular diagnosis controls in clinical virology: a comprehensive study of more than 45,000 routine PCR tests. *PLoS One.* 2011;6:e16142.
15. ROSS J. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev.* 1995;59:423-50.
16. WU X, BREWER G. The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene.* 2012;500:10-21.
17. DVINGE H, RIES RE, ILAGAN JO, STIREWALT DL, MESHINCHI S, BRADLEY RK. Sample processing obscures cancer-specific alterations in leukemic transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:16802-7.
18. VANDEWOESTYNE M, VAN HOOFFSTAT D, FRANSSSEN A, VAN NIEUWERBURGH F, DEFORCE D. Presence and potential of cell free DNA in different types of forensic samples. *Forensic Sci Int Genet.* 2013;7:316-20.
19. RETHMEYER JA, TAN X, MANZARDO A, SCHROEDER SR, BUTLER MG. Comparison of biological specimens and DNA collection methods for PCR amplification and microarray analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51:e79-83.
20. VAN GINKEL JH, VAN DEN BROEK DA, VAN KUIK J, LINDERS D, DE WEGER R, WILLEMS SM ET AL. Preanalytical blood sample workup for cell-free DNA analysis using Droplet Digital PCR for future molecular cancer diagnostics. *Cancer Med.* 2017;6:2297-307.
21. LU T, LI J. Clinical applications of urinary cell-free DNA in cancer: current insights and promising future. *Am J Cancer Res.* 2017;7:2318-32.
22. DE MAIO G, RENGUCCI C, ZOLI W, CALISTRI D. Circulating and stool nucleic acid analysis for colorectal cancer diagnosis. *World J Gastroenterol.* 2014;20:957-67.
23. CHANDRANANDA D, THORNE NP, BAHLO M. High-resolution characterization of sequence signatures due to non-random cleavage of cell-free DNA. *BMC Med Genomics.* 2015;8:29.
24. CHEREPANOVA A, TAMKOVICH S, PYSHNYI D, KHARKOVA M, VLASSOV V, LAKTIONOV P. Immunochemical assay for deoxyribonuclease activity in body fluids. *J Immunol Methods.* 2007;325:96-103.
25. NADANO D, YASUDA T, KISHI K. Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clin Chem.* 1993;39:448-52.
26. CASADIO V, SALVI S, MARTIGNANO F, GUNELLI R, RAVAIOLI S, CALISTRI D. Cell-free DNA integrity analysis in urine samples. *J Vis Exp.* 2017.
27. BRYZGUNOVA OE, LAKTIONOV PP. Extracellular nucleic acids in urine: sources, structure, diagnostic potential. *Acta Naturae.* 2015;7:48-54.
28. VAN DOMMELEN L, WOLFFS PF, VAN TIEL FH, DUKERS N, HERNGREEN SB, BRUGGEMAN CA, ET AL. Influence of temperature, medium, and storage duration on *Chlamydia trachomatis* DNA detection by PCR. *J Clin Microbiol.* 2013;51:990-2.
29. ELWELL C, MIRRASHIDI K, ENGEL J. *Chlamydia* cell biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14:385-400.

30. BLOCKER ME, KRYSIAK RG, BEHETS F, COHEN MS, HOBBS MM. Quantification of Chlamydia trachomatis elementary bodies in urine by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3631-4.
31. OLSON J, WHITNEY DH, DURKEE K, SHUBER AP. DNA stabilization is critical for maximizing performance of fecal DNA-based colorectal cancer tests. *Diagn Mol Pathol.* 2005;14:183-91.
32. BARANOVSKII AG, BUNOVA VN, NEVINSKY GA. Human deoxyribonucleases. *Biochemistry (Mosc).* 2004;69:587-601.
33. VAN DER VAART M, PRETORIUS PJ. The origin of circulating free DNA. *Clin Chem.* 2007;53:2215.
34. LIANG YY, RAINPRECHT D, EICHMAIR E, MESSNER B, OEHLER R. Serum-dependent processing of late apoptotic cells and their immunogenicity. *Apoptosis.* 2015;20:1444-56.
35. MARTINEZ VALLE F, BALADA E, ORDI-ROS J, VILARDELL-TARRES M. DNase I and systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2008;7:359-63.
36. GUEROULT M, PICOT D, ABI-GHANEM J, HARTMANN B, BAADEN M. How cations can assist DNase I in DNA binding and hydrolysis. *PLoS Comput Biol.* 2010;6:e1001000.
37. BARRA GB, SANTA RITA TH, DE ALMEIDA VASQUES J, CHIANCA CF, NERY LF, SANTANA SOARES COSTA S. EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. *Clin Biochem.* 2015;48:976-81.
38. BARRA GB, SILVA VM, JÁCOMO RH, VAZ JAR, SANTA RITA TH. Sodium citrate at 8% is equivalent to EDTA as anticoagulant of choice for circulating cell-free DNA analysis: low contamination by blood cells genomic DNA and inhibition of blood nuclease activity. *Clinical Chemistry.* 2014;60:S190.
39. BARANOVSKII AG, ERSHOVA NA, BUNOVA VN, KANYSHKOVA TG, MOGELNITSKII AS, DORONIN BM ET AL. Catalytic heterogeneity of polyclonal DNA-hydrolyzing antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis. *Immunol Lett.* 2001;76:163-7.
40. BARTHE C, GALABERT C, GUY-CROTTE O, FIGARELLA C. Plasma and serum lactoferrin levels in cystic fibrosis. Relationship with the presence of cystic fibrosis protein. *Clin Chim Acta.* 1989;181:183-8.
41. SORRENTINO S. The eight human “canonical” ribonucleases: molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Lett.* 2010;584:2194-200.
42. FUTAMI J, TSUSHIMA Y, MURATO Y, TADA H, SASAKI J, SENO M, YAMADA H. Tissue-specific expression of pancreatic-type RNases and RNase inhibitor in humans. *DNA Cell Biol.* 1997;16:413-9.
43. BLANK A, DEKKER CA. Ribonucleases of human serum, urine, cerebrospinal fluid, and leukocytes. Activity staining following electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Biochemistry.* 1981;20:2261-7.
44. NISHIMURA N, NAKAYAMA H, YOSHIZUMI S, MIYOSHI M, TONOIKE H, SHIRASAKI Y ET AL. Detection of noroviruses in fecal specimens by direct RT-PCR without RNA purification. *J Virol Methods.* 2010;163:282-6.
45. WILSON IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:3741-51.
46. MORITA T, NIWATA Y, OHGI K, OGAWA M, IRIE M. Distribution of two urinary ribonuclease-like enzymes in human organs and body fluids. *J Biochem.* 1986;99:17-25.

47. LANDRE JB, HEWETT PW, OLIVOT JM, FRIEDL P, KO Y, SACHINIDIS A, MOENNER M. Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (RNase 1). *J Cell Biochem.* 2002;86:540-52.
48. SORRENTINO S, NADDEO M, RUSSO A, D'ALESSIO G. Degradation of double-stranded RNA by human pancreatic ribonuclease: crucial role of noncatalytic basic amino acid residues. *Biochemistry.* 2003;42:10182-90.
49. TSUI NB, NG EK, LO YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem.* 2002;48:1647-53.
50. LI Q, SHAO Y, ZHANG X, ZHENG T, MIAO M, QIN L ET AL. Plasma long noncoding RNA protected by exosomes as a potential stable biomarker for gastric cancer. *Tumour Biol.* 2015;36:2007-12.
51. HUANG X, YUAN T, TSCHANNEN M, SUN Z, JACOB H, DU M ET AL. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics.* 2013;14:319.
52. SCHRADER C, SCHIELKE A, ELLERBROEK L, JOHNE R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 2012;113:1014-26.
53. AL-SOUD WA, RADSTROM P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol.* 2001;39:485-93.
54. AL-SOUD WA, JONSSON LJ, RADSTROM P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38:345-50.
55. YEDIDAG EN, KOFFRON AJ, MUELLER KH, KAPLAN B, KAUFMAN DB, FRYER JP ET AL. Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus. *Transplantation.* 1996;62:238-42.
56. BURKARDT HJ. Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38:87-91.
57. SAULNIER P, ANDREMONTE A. Detection of genes in feces by booster polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2080-3.
58. TOYE B, WOODS W, BOBROWSKA M, RAMOTAR K. Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for Chlamydia trachomatis testing. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2356-8.
59. OIKARINEN S, TAURIAINEN S, VISKARI H, SIMELL O, KNIP M, VIRTANEN S, HYOTY H. PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *J Clin Virol.* 2009;44:211-4.
60. DEMEKE T, JENKINS GR. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem.* 2010;396:1977-90.
61. WEYANT RS, EDMONDS P, SWAMINATHAN B. Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase. *Biotechniques.* 1990;9:308-9.
62. BOWEN RA, REMALEY AT. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochem Med (Zagreb).* 2014;24:31-44.
63. PALTA S, SAROA R, PALTA A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth.* 2014;58:515-23.
64. NEDERHAND RJ, DROOG S, KLUFT C, SIMOONS ML, DE MAAT MP. Investigators of the Et. Logistics and quality control for DNA sampling in large multicenter studies. *J Thromb Haemost.* 2003;1:987-91.

65. BULLA A, DE WITT B, AMMERLAAN W, BETSOU F, LESCUYER P. Blood DNA Yield but not integrity or methylation is impacted after long-term storage. *Biopreserv. Biobank* 2016;14:29-38.
66. HUANG LH, LIN PH, TSAI KW, WANG LJ, HUANG YH, KUO HC, LI SC. The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. *PLoS One*. 2017;12:e0184692.
67. ROSS KS, HAITES NE, KELLY KF. Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: effects on DNA yield and integrity. *J Med Genet*. 1990;27:569-70.
68. MULLER MC, MERX K, WEISSER A, KREIL S, LAHAYE T, HEHLMANN R, HOCHHAUS A. Improvement of molecular monitoring of residual disease in leukemias by bedside RNA stabilization. *Leukemia*. 2002;16:2395-9.
69. MALENTACCHI F, PAZZAGLI M, SIMI L, ORLANDO C, WYRICH R, GUNTHER K ET AL. SPIDIA-RNA: second external quality assessment for the pre-analytical phase of blood samples used for RNA based analyses. *PLoS One*. 2014;9:e112293.
70. HANTZSCH M, TOLIOS A, BEUTNER F, NAGEL D, THIERY J, TEUPSER D, HOLDT LM. Comparison of whole blood RNA preservation tubes and novel generation RNA extraction kits for analysis of mRNA and MiRNA profiles. *PLoS One*. 2014;9:e113298.
71. DAGUR PK, MCCOY JP JR. Collection, storage, and preparation of human blood cells. *Curr Protoc Cytom*. 2015;73:511-6.
72. KRAVCHENKO AV, CHETVERINA EV, CHETVERIN AB. Retention of nucleic acid integrity in guanidine thiocyanate lysates of whole blood. *Bioorg Khim*. 2006;32:609-14.
73. LIU X, LI Q, WANG X, ZHOU X, LIAO Q, HE X, ZHANG J, ET AL. Comparison of six different pretreatment methods for blood RNA extraction. *Biopreserv Biobank*. 2015;13:56-60.
74. FARKAS DH, KAUL KL, WIEDBRAUK DL, KIECHLE FL. Specimen collection and storage for diagnostic molecular pathology investigation. *Arch Pathol Lab Med*. 1996;120:591-6.
75. DICKOVER RE, HERMAN SA, SADDIQ K, WAFER D, DILLON M, BRYSON YJ. Optimization of specimen-handling procedures for accurate quantitation of levels of human immunodeficiency virus RNA in plasma by reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*. 1998;36:1070-3.
76. KESSLER HH, STELZL E, RAGGAM RB, HAAS J, KIRCHMEIR F, HEGENBARTH K ET AL. Effects of storage and type of blood collection tubes on hepatitis C virus level in whole blood samples. *J Clin Microbiol*. 2001;39:1788-90.
77. BARRETT AN, ZIMMERMANN BG, WANG D, HOLLOWAY A, CHITTY LS. Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: accurate identification of factors affecting fetal DNA yield. *PLoS One*. 2011;6:e25202.
78. HOLODNIY M, RAINEN L, HERMAN S, YEN-LIEBERMAN B. Stability of plasma human immunodeficiency virus load in VACUTAINER PPT plasma preparation tubes during overnight shipment. *J Clin Microbiol*. 2000;38:323-6.
79. ABDUL-ALI D, KRAFT CS, INGERSOLL J, FREMPONG M, CALIENDO AM. Cytomegalovirus DNA stability in EDTA anti-coagulated whole blood and plasma samples. *J Clin Virol*. 2011;52:222-4.
80. AMELLAL B, MURPHY R, MAIGA A, BRUCKER G, KATLAMA C, CALVEZ V, MARCELIN AG. Stability of HIV RNA in plasma specimens stored at different temperatures. *HIV Med*. 2008;9:790-3.

81. JENNINGS C, WAGER CG, SCIANNA SR, ZACCARO DJ, COUZENS A, MELLORS JW ET AL. Use of external quality control material for HIV-1 RNA testing to assess the comparability of data generated in separate laboratories and the stability of HIV-1 RNA in samples after prolonged storage. *J Clin Microbiol.* 2018;56(6). pii: e00120-18.
82. KANG Q, HENRY NL, PAOLETTI C, JIANG H, VATS P, CHINNAIYAN AM ET AL. Comparative analysis of circulating tumor DNA stability In K3EDTA, Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clin Biochem.* 2016;49:1354-60.
83. HENAO DIAZ E, YACHNIN J, GRONBERG H, LINDBERG J. The in vitro stability of circulating tumour DNA. *PLoS One.* 2016;11:e0168153.
84. LE GUERN R, MIAUX B, PISCHEDDA P, HERWEGH S, COURCOL R. DNA stability of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in urine. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;85:313-4.
85. INGERSOLL J, BYTHWOOD T, ABDUL-ALI D, WINGOOD GM, DICLEMENTE RJ, CALIENDO AM. Stability of Trichomonas vaginalis DNA in urine specimens. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1628-30.
86. SHERMAN D, MENG Q; SEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS, ASSIGNEE. Urine transportation medium. US Patent Application Publication. 2011 (US2011/0065108A1).
87. ATKINSON B, THORBURN F, PETRIDOU C, BAILEY D, HEWSON R, SIMPSON AJ ET AL. Presence and persistence of zika virus RNA in semen, United Kingdom, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2017;23:611-615.
88. BRAINARD J, POND K, HOOPER L, EDMUNDS K, HUNTER P. Presence and persistence of ebola or marburg virus in patients and survivors: A rapid systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004475.
89. LI N, WANG T, HAN D. Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis. *Front Immunol.* 2012;3:152.
90. SALAM AP, HORBY PW. The Breadth of viruses in human semen. *Emerg Infect Dis.* 2017;23:1922-4.
91. WHO. World Health Organization – laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: WHO Press; 2010.
92. BUSS SN, LEBER A, CHAPIN K, FEY PD, BANKOWSKI MJ, JONES MK ET AL. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2015;53:915-25.
93. RAINEN L, OELMUELLER U, JURGENSEN S, WYRICH R, BALLAS C, SCHRAM J ET AL. Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem.* 2002;48:1883-90.
94. BAECHLER EC, BATLIWALLA FM, KARYPIS G, GAFFNEY PM, MOSER K, ORTMANN WA ET AL. Expression levels for many genes in human peripheral blood cells are highly sensitive to ex vivo incubation. *Genes Immun.* 2004;5:347-53.
95. NORTON SE, LECHNER JM, WILLIAMS T, FERNANDO MR. A stabilizing reagent prevents cell-free DNA contamination by cellular DNA in plasma during blood sample storage and shipping as determined by digital PCR. *Clin Biochem.* 2013;46:1561-5.
96. BOOM R, SOL CJ, SALIMANS MM, JANSEN CL, WERTHEIM-VAN DILLEN PM, VAN DER NOORDAA J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990;28:495-503.
97. CHOU Q, RUSSELL M, BIRCH DE, RAYMOND J, BLOCH W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:1717-23.

98. BOWERS HA, TENGS T, GLASGOW HB JR, BURKHOLDER JM, RUBLEE PA, OLDACH DW. Development of real-time PCR assays for rapid detection of *Pfiesteria piscicida* and related dinoflagellates. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:4641-8.
99. LOFTIS AD, MASSUNG RF, LEVIN ML. Quantitative real-time PCR assay for detection of *Ehrlichia chaffeensis*. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3870-2.
100. GAIL MH, SHEEHY T, COSENTINO M, PEE D, DIAZ-MAYORAL NA, GARCIA-CLOSAS M ET AL. Maximizing DNA yield for epidemiologic studies: no more buffy coats? *Am J Epidemiol* 2013;178:1170-6.
101. GUDISEVA HV, HANSEN M, GUTIERREZ L, COLLINS DW, HE J, VERKUIL LD ET AL. Saliva DNA quality and genotyping efficiency in a predominantly elderly population. *BMC Med Genomics.* 2016;9:17.
102. SZPECHCINSKI A, CHOROSTOWSKA-WYNIMKO J, STRUNIAWSKI R, KUPIS W, RUDZINSKI P, LANGFORT R ET AL. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. *Br J Cancer.* 2015;113:476-83.
103. ZINKOVA A, BRYNYCHOVA I, SVACINA A, JIRKOVSKA M, KORABECNA M. Cell-free DNA from human plasma and serum differs in content of telomeric sequences and its ability to promote immune response. *Sci Rep.* 2017;7:2591.
104. SU YH, WANG M, BRENNER DE, NG A, MELKONYAN H, UMANSKY S ET AL. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *J Mol Diagn.* 2004;6:101-7.
105. KLAASSEN CH, JEUNINK MA, PRINSEN CF, RUERS TJ, TAN AC, STROBBE LJ, THUNNISSEN FB. Quantification of human DNA in feces as a diagnostic test for the presence of colorectal cancer. *Clin Chem.* 2003;49:1185-7.
106. LI HG, HUANG SY, ZHOU H, LIAO AH, XIONG CL. Quick recovery and characterization of cell-free DNA in seminal plasma of normozoospermia and azoospermia: implications for non-invasive genetic utilities. *Asian J Androl.* 2009;11:703-9.
107. LOOI ML, ZAKARIA H, OSMAN J, JAMAL R. Quantity and quality assessment of DNA extracted from saliva and blood. *Clin Lab.* 2012;58:307-12.
108. JEDDI F, PIARROUX R, MARY C. Application of the NucliSENS easyMAG system for nucleic acid extraction: optimization of DNA extraction for molecular diagnosis of parasitic and fungal diseases. *Parasite.* 2013;20:52.
109. PARSHIONIKAR SU, CASHDOLLAR J, FOUT GS. Development of homologous viral internal controls for use in RT-PCR assays of waterborne enteric viruses. *J Virol Methods.* 2004;121:39-48.
110. HOORFAR J, MALORNY B, ABDULMAWJOOD A, COOK N, WAGNER M, FACH P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1863-8.
111. CROSS NC, WHITE HE, MULLER MC, SAGLIO G, HOCHHAUS A. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012;26:2172-5.
112. CROSS NC, WHITE HE, COLOMER D, EHRENCRONA H, FORONI L, GOTTARDI E ET AL. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2015;29:999-1003.

113. FERNANDEZ-MARTINEZ FJ, GALINDO A, GARCIA-BURGUILLO A, VARGAS-GALLEGO C, NOGUES N, MORENO-GARCIA M, MORENO-IZQUIERDO A. Noninvasive fetal sex determination in maternal plasma: a prospective feasibility study. *Genet Med*. 2012;14:101-6.
114. DEVANEY SA, PALOMAKI GE, SCOTT JA, BIANCHI DW. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2011;306:627-36.
115. WRIGHT CF, WEI Y, HIGGINS JP, SAGOO GS. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. *BMC Res Notes*. 2012;5:476.
116. RITA THS, NOBRE CS, JACOMO RH, NERY LFA, BARRA GB. Non-invasive fetal sex determination by analysis of cell-free fetal DNA in maternal capillary blood obtained by fingertip puncture. *Prenat Diagn*. 2018.
117. PRINCE AM, ANDRUS L. PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques*. 1992;12:358-60.
118. SCHWARK T, POETSCH M, PREUSSE-PRANGE A, KAMPHAUSEN T, VON WURMB-SCHWARK N. Phantoms in the mortuary – DNA transfer during autopsies. *Forensic Sci Int*. 2012;216:121-6.
119. LEVINE JM. Dakin's solution: past, present, and future. *Adv Skin Wound Care*. 2013;26:410-4.
120. BRUCH MK. Toxicity and safety of topical sodium hypochlorite. *Contrib Nephrol*. 2007;154:24-38.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

Roche Soluções Moleculares

Portfólio completo para atender as necessidades do seu laboratório

A **Roche Soluções Moleculares** traz em seu portfólio Sistemas e Reagentes para:

- **Diagnóstico Molecular** (Virologia, Microbiologia, Saúde da Mulher, Oncologia, Testes Desenvolvidos pelos Laboratórios, Banco de Sangue)
- **Diagnóstico em Tecidos** (Coloração H&E, Imunohistoquímica, Imunofluorescência e Patologia Digital)
- **Sequenciamento** (Paineis para Oncologia, Doenças Hereditárias, Cardiologia, Soluções para Biópsia Líquida, Teste Pré-Natal Não-Invasivo - NIPT)

Nossos produtos trazem inovação científica em aplicações práticas, personalizadas e integradas.



 **Soluções**
moleculares

*Revolucionando a ciência.
Transformando vidas.*

27 Coleta de exames de rotina de urina

INTRODUÇÃO

O exame de urina de rotina compreende um dos testes laboratoriais mais frequentemente solicitados, sendo suplantado apenas pelo perfil bioquímico do soro e pelo hemograma. É solicitado como teste de triagem em indivíduos assintomáticos que se submetem à avaliação periódica, para diagnóstico e acompanhamento de portadores de enfermidades renais ou doenças sistêmicas, ou, ainda, em pacientes com enfermidades crônicas em tratamento para monitorar possível toxicidade da terapêutica ou complicações da doença. Durante décadas, a análise físico-química da urina e microscópica do sedimento foi considerada o padrão de referência. A introdução de novas tecnologias e a automação melhoraram a produtividade e a acurácia desse exame. No entanto, a terceirização de laboratórios tem aumentado a distância física entre o paciente e a bancada do laboratório, o que promove um maior desafio pré-analítico. Para Delanghe e Speeckaert,¹ a melhora na confiabilidade e na padronização de técnicas analíticas, dos reagentes e instrumentos, que, por um lado, reduziu em cerca de 10 vezes o erro analítico nos últimos 10 anos, e, por outro, contribuiu com a redução dos erros diagnóstico em razão dos progressos na tecnologia da informação e nos métodos de garantia de qualidade, têm tornado as fases pré e pós analíticas as mais vulneráveis aos erros nos exames laboratoriais, particularmente na urinálise.

PREPARO DO PACIENTE

O laboratório é responsável pelas informações dadas ao paciente, que possibilitarão a preparação ideal a fim de coletar uma amostra representativa sem fatores interferentes. Embora, de maneira geral, não haja necessidade de nenhum preparo especial do paciente para a coleta de um exame de rotina de urina, deve-se consi-

derar que algumas características da urina se modificam ao longo do dia, conforme o tempo de jejum, a composição da dieta, a atividade física e sexual e o uso de alguns medicamentos, que podem ser significativas e precisam ser consideradas quando da interpretação dos resultados. Desse modo, as informações dadas ao paciente para a coleta do exame devem ir além das explicações quanto ao aspecto prático do procedimento de coleta da amostra, enfatizando os efeitos de possíveis interferentes, como dieta, diurese, exercício, atividade sexual e medicamentos.

Após exercícios físicos, as alterações mais frequentemente encontradas na amostra de urina são aumento na quantidade de hemácias, cilindros e proteínas,² sendo a proteinúria a mais marcante. Essa excreção de proteínas em indivíduos saudáveis variará de acordo com a intensidade, a duração e o tipo de exercício. Em um estudo realizado em nosso meio³ com voluntários submetidos a exercícios de força de baixa e alta intensidade, constatou-se a elevação de proteínas em relação à coleta precedente à atividade em todas as amostras após a atividade física de baixo impacto, sendo ultrapassado em 33% dos casos o limite superior da normalidade para aquela população. Nos voluntários submetidos a exercícios de alto impacto, essa alteração foi mais marcante, e, em 66,6% das amostras, o limite superior da normalidade foi ultrapassado.³

Apesar do fornecimento de instruções por escrito, boa parte dos pacientes parece não seguir adequadamente as recomendações. Miler e Simundic,⁴ avaliando a aderência dos pacientes às recomendações para a coleta de urina de 24 horas, observaram que mais da metade dos pacientes não fazia a coleta adequada, principalmente aqueles com mais de 65 anos e portadores de doença crônica. Em nosso meio, Silva et al.,⁵ avaliando as variáveis bacteriúria, presença de muco e células epiteliais e a turbidez das amostras para exames de rotina de urina recebidas por um laboratório clínico, observaram que quase 60% continham um número aumentado de células epiteliais e muco, e quase 75% apresentavam alteração na turbidez, evidenciando uma assepsia deficiente da região urogenital.

Já a atividade sexual pode determinar aumento no número de células epiteliais e proteínas. A urina masculina pode ser contaminada por fluidos prostáticos e a das mulheres por secreções vaginais.

Idealmente, a urina deve ser coletada no mínimo 2 horas após a última micção, sem que o indivíduo tenha realizado atividade física intensa ou atividade sexual nas 6 horas precedentes. Em mulheres, deve-se evitar a coleta do exame de rotina de urina no período menstrual; caso não possa ser adiada, deve-se considerar a utilização de um tampão vaginal para minimizar a contaminação da amostra. Os pacientes devem ser instruídos a entregar a amostra no laboratório o mais brevemente possível, não podendo esse tempo exceder 2 horas após a coleta. Após esse período, é importante que a amostra seja refrigerada ou se lance mão de conservantes apropriados.

TIPOS DE AMOSTRAS DE URINA

Para que o exame de urina forneça resultados representativos e confiáveis, é importante que a coleta siga um protocolo bem estabelecido. O procedimento deve ser explicado de maneira clara e minuciosa ao paciente e controlado pelo pessoal do laboratório. Os tipos de amostras mais utilizados são amostra aleatória, primeira urina da manhã e segunda urina da manhã. Cada uma apresenta vantagens e desvantagens específicas. A escolha do tipo de amostra dependerá da comodidade e das condições clínicas do paciente, como suspeita de infecção do trato urinário, uso de cateterismo etc.

Amostra aleatória

Trata-se da amostra mais comumente recebida em razão da comodidade para o paciente, já que pode ser realizada a qualquer momento, desde que respeitado o intervalo de 2 horas após a última micção. O horário da coleta deve ser registrado no frasco. A amostra é adequada para testes rotineiros para detectar anormalidades, mas pode ser mais facilmente afetada por fatores como dieta e atividade física. Desse modo, caso exista suspeita da influência de tais fatores em alguma anormalidade evidenciada, pode ser necessária uma nova amostra de urina em condições mais controlada.

Primeira amostra da manhã

Nesta, o paciente é orientado a coletar amostra de urina logo após despertar. Para muitos, é considerada a amostra ideal para o exame de rotina de urina por ser mais concentrada, possibilitando a detecção de substâncias químicas e elementos formados que podem estar ausentes em amostras aleatórias. No entanto, o crescimento bacteriano na bexiga durante a noite pode afetar a detecção de cilindros e elementos celulares.

Segunda amostra da manhã

Deve ser coletada entre 2 e 4 horas após a primeira micção, período em que o paciente deve permanecer em jejum. Essa coleta minimiza eventuais interferências dos metabólitos provenientes de alimentos ingeridos na noite anterior e a ação da flora bacteriana sobre cilindros e elementos celulares.

Em todos os três tipos, o paciente deve ser instruído a entregar a amostra no laboratório no prazo máximo de 2 horas após a coleta.

INSTRUÇÕES AOS PACIENTES

Nas coletas realizadas no laboratório, os pacientes devem ser orientados a lavar as mãos antes de iniciar a coleta e a fazer a assepsia da região urogenital. É preciso fornecer o material de higiene adequado, um recipiente identificado com o nome e a data da coleta e as instruções ilustradas para a higienização e a coleta do material.

Para a higienização, recomenda-se o uso de sabonetes neutros. A utilização de antisépticos não é recomendada.^{1,6} A clorexidina pode reduzir a contagem de colônias bacterianas e o iodo polivinilpirrolidona determinar um resultado falso-positivo de presença de hemoglobina. Ao receber a amostra, a atendente deve se certificar de que o paciente seguiu todos os procedimentos de higienização e de coleta recomendados e que o recipiente esteja adequadamente fechado e identificado.

Pela simplicidade do procedimento e a comodidade, um grande número de pacientes opta por fazer a coleta da amostra de urina em domicílio. Como a coleta representa um estágio muito sensível para a ocorrência de erros e interferentes no exame de urina de rotina, cuidados especiais devem ser tomados para que as informações sejam passadas de maneira clara, por escrito e com desenhos ilustrativos para garantir a realização da coleta dentro dos critérios adequados. Os pacientes devem receber as instruções ilustradas e os recipientes já com a sua identificação, bem como ser orientados a entregar a amostra no laboratório o mais brevemente possível, sem ultrapassar 2 horas após a coleta.

As instruções recomendadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para a coleta do exame de urina de rotina para o sexo masculino e feminino são descritas a seguir.⁷

Para o sexo masculino:

1. Identificar o frasco de coleta (fornecido pelo laboratório) colocando o nome do paciente, a data e o horário de coleta.
2. Lavar as mãos com água e sabão.
3. Retrair o prepúcio para expor o meato uretral.
4. Lavar a glândula com água e sabão, começando pelo meato uretral.
5. Enxugar, utilizando gaze ou toalha, a partir do meato uretral.
6. Com uma das mãos, manter o prepúcio retraído.
7. Com a outra mão, segurar o frasco de coleta de urina já destampado.
8. Iniciar a micção, desprezando o primeiro jato de urina no vaso sanitário.
9. Coletar urina do jato médio até mais ou menos um terço ou a metade da capacidade do frasco.
10. Desprezar o restante de urina no vaso sanitário.
11. Fechar o frasco de coleta.
12. Encaminhar o frasco para o laboratório no prazo máximo de 2 horas, mantendo-o em local fresco e ao abrigo da luz.

Para o sexo feminino:

1. Identificar o frasco de coleta (fornecido pelo laboratório) colocando o nome do paciente, a data e o horário de coleta.

2. Lavar as mãos com água e sabão.
3. Fazer a higiene da região genital com água e sabão, sempre no sentido de frente para trás. É importante remover totalmente os resíduos de pomadas, pós e cremes vaginais eventualmente utilizados.
4. Enxugar toda a região genital com gaze ou toalha, sempre no sentido de frente para trás.
5. Separar os grandes lábios, limpar o meato uretral e a região ao redor da uretra.
6. Com uma das mãos, manter os grandes lábios separados.
7. Com a outra mão, segurar o frasco de coleta de urina já destampado.
8. Iniciar a micção, desprezando o primeiro jato de urina no vaso sanitário.
9. Coletar urina do jato médio até mais ou menos um terço ou a metade da capacidade do frasco.
10. Desprezar o restante de urina no vaso sanitário.
11. Fechar o frasco de coleta.
12. Encaminhar o frasco para o laboratório no prazo máximo de 2 horas, mantendo-o em local fresco e ao abrigo da luz.

Para a coleta de urina de pacientes que não têm controle da micção, pode-se realizar o procedimento com saco coletor; nesse caso, se a coleta for realizada em domicílio, as orientações para os pacientes do sexo masculino são:

1. Identificar o saco coletor com o nome do paciente e a data.
2. Proceder à higienização da região genital como descrito anteriormente.
3. Certificar-se de que as regiões genital e perineal estejam secas.
4. Retirar o papel que cobre a área aderente do coletor.
5. Fixar o saco coletor na área genital de modo que o pênis permaneça no seu interior.
6. Aguardar que ocorra a micção espontânea. Se não ocorrer micção em um prazo de 60 minutos, retirar o saco coletor e repetir os procedimentos de 1 a 4.
7. Ocorrendo a micção, retirar o saco coletor, vedá-lo adequadamente, colocar o horário da coleta e encaminhá-lo ao laboratório no prazo máximo de 2 horas, mantendo-o em local fresco e ao abrigo da luz.

Para o sexo feminino, as instruções são as seguintes:

1. Identificar o saco coletor com o nome do paciente e a data.
2. Proceder à higienização da região genital como descrito anteriormente.
3. Certificar-se de que as regiões genital e perineal estejam secas.
4. Retirar o papel que cobre a área aderente do coletor.

5. Fixar o saco coletor na área genital, esticando a pele para remover as dobras, cuidando para que a região anal fique fora da área de coleta.
6. Aguardar que ocorra a micção espontânea. Se não ocorrer micção em um prazo de 60 minutos, retirar o saco coletor e repetir os procedimentos de 1 a 4.
7. Ocorrendo a micção, retirar o saco coletor, vedá-lo adequadamente, colocar o horário da coleta e encaminhá-lo ao laboratório no prazo máximo de 2 horas, mantendo-o em local fresco e ao abrigo da luz.

TIPOS DE COLETA

Na maior parte das vezes, a urina a ser analisada é emitida espontaneamente. Nesses casos, a preferência se dá pela coleta do jato médio com assepsia. A denominação vem do fato de essa amostra corresponder à porção intermediária do fluxo urinário coletado espontaneamente após assepsia genital. O paciente é orientado a, após a realização da assepsia, desprezar o primeiro jato de urina emitida e, sem parar a micção, iniciar a coleta a seguir. Esse jato inicial pode conter secreções presentes no terço distal da uretra e no meato uretral. Um estudo multicêntrico⁸ comparou os resultados de amostras obtidas do primeiro jato e do jato médio de indivíduos sadios. A contagem de células epiteliais, de hemácias e de leucócitos, mas não de cilindros, foi significativamente mais elevada em amostras do primeiro jato. Um aumento significativo na contagem de células epiteliais, hemácias e leucócitos foi observado em mulheres em relação aos homens nas amostras obtidas do primeiro jato, enquanto não se verificaram diferenças consideráveis no jato médio. Esses achados confirmaram a amostra de jato médio como a mais adequada, uma vez que nela está minimizada a presença de elementos contaminantes, como bactérias, células e partículas formadas.

Nos pacientes sem controle esfinteriano, como crianças e idosos, frequentemente são utilizados sacos coletores para a coleta das amostras para o exame de urina de rotina. Trata-se de sacos plásticos transparentes, estéreis, macios e com dispositivo adesivo hipoalergênico para sua fixação. Apesar de um procedimento simples, deve ser realizado apenas por pessoal capacitado e bem treinado.

Nos casos em que a coleta espontânea não seja possível e a amostra também seja utilizada para o exame de urocultura, procedimentos mais invasivos, como o cateterismo vesical e a punção suprapúbica, devem ser considerados.

A amostra cateterizada é coletada sob condições estéreis, pela colocação de um cateter pela uretra até a bexiga. É muito utilizada para a coleta de material para urocultura de crianças, uma vez que, em virtude da grande possibilidade de contaminação de urinas coletadas por saco coletor, as culturas obtidas por meio desses dispositivos têm um maior valor preditivo negativo do que positivo. Um tipo de amostra cateterizada mais raramente empregado refere-se à cateterização isolada de cada ureter para

obter amostras separadas de cada rim. Esse procedimento deve ser realizado apenas por profissionais capacitados e com competência legal para isso.

A punção suprapúbica é obtida pela introdução de uma agulha pela parede abdominal até a luz da bexiga. Esse procedimento deve ser realizado apenas por profissionais capacitados e com competência legal para isso.

COLETA SEGURA

A urina é um material biológico potencialmente contaminante e exige a observação de cuidados específicos de coleta, para que se preservem a integridade da amostra e a segurança dos profissionais e do paciente que a manuseiam. As normas de biossegurança existem para proteger os profissionais que trabalham no laboratório e os pacientes em atendimento. Assim, é importante que tanto o paciente quanto esses profissionais que participarão da coleta e do manuseio da amostra sejam orientados oralmente e por escrita sobre os procedimentos. O paciente deve ser orientado sempre a fazer a higienização das mãos antes do início da coleta e após a sua conclusão. Em todos os momentos em que seja possível o contato físico com a amostra, o profissional responsável pela coleta, pelo transporte e o manuseio deve utilizar luvas adequadas.

As amostras devem ser etiquetadas com o nome do paciente, número de identificação, código de barras (se for utilizado pelo laboratório), data e hora da coleta e o tipo de material coletado. As etiquetas precisam ser fixadas no corpo do recipiente, e não em sua tampa, devendo ser de natureza tal que não se despreguem em caso de necessidade de refrigeração.

Um formulário de requisição precisa acompanhar as amostras enviadas ao laboratório. No formulário, devem constar as informações que estão nas etiquetas das amostras acrescidas de informações adicionais com a inclusão de informações clínicas, medicações em uso e possíveis fatores interferentes.

Quando as análises não forem realizadas em um prazo máximo de 2 horas após a coleta, a amostra deverá ser refrigerada e protegida da luz, e nunca congelada. Nessas condições, em geral, as amostras se manterão adequadas para avaliação por um período de até 12 horas.⁹

FRASCOS DE COLETA

A amostra deve ser coletada em um frasco de material inerte, limpo, seco, à prova de vazamento, de material não absorvente e que permita a visualização da cor e do aspecto da urina. Ele deve ter boca larga e base ampla e chata, para facilitar a coleta no sexo feminino e evitar o tombamento. A capacidade recomendada é de 50 mL, volume suficiente para possibilitar a realização de pesquisas químicas e microscópicas e eventuais confirmações, sobrando espaço para que a amostra seja homogê-

neizada no próprio frasco. Deve-se preferir recipientes descartáveis, pois eliminam a possibilidade de contaminação decorrente de uma lavagem inadequada.

CASO CLÍNICO 1

LBA, 25 anos, do sexo masculino, fez, por solicitação médica, uma avaliação laboratorial que constava de hemograma, avaliação bioquímica do sangue e um exame de urina de rotina. Fez a coleta de sangue no laboratório e optou por trazer a urina mais tarde. Os resultados obtidos mostraram exames dentro da normalidade, exceto pela urina, que mostrou densidade de 1,030, proteína 2+, vestígios de hemoglobina, e, na microscopia, 4 hemácias e 5 leucócitos por campo, algumas células epiteliais e alguns cilindros hialinos. O horário da coleta, 12h30, evidenciava uma amostra aleatória. O paciente foi contatado por telefone e informou que havia feito treino de musculação durante a manhã no dia da coleta. A repetição do exame em primeira urina da manhã no dia seguinte mostrou todos os parâmetros dentro da normalidade.

Esse caso mostra a importância do registro do horário da coleta que pode alertar o laboratório sobre o tipo de amostra que analisa. A amostra aleatória, embora mais cômoda para o paciente, é sujeita à influência de fatores como dieta e atividade física. As alterações encontradas no exame são compatíveis com as observadas após atividade física extenuante.

CASO CLÍNICO 2

MAF, 15 anos, do sexo feminino, procura o laboratório para realização de exames para avaliação de sobrepeso, já trazendo recipiente com amostra de sua primeira micção. O exame da urina mostrou densidade de 1,020, pH 7,0, aspecto turvo e proteína ++, e, na microscopia, numerosas células epiteliais, grande quantidade de muco, 15 leucócitos e 7 hemácias por campo e numerosas bactérias. Foi solicitada uma nova coleta, associada à urocultura, coletada no laboratório. A urocultura foi negativa e o resultado do novo exame de rotina de urina não mostrou anormalidades.

Nesse caso, urina turva, grande quantidade de células epiteliais e muco sugerem uma urina contaminada por provável coleta inadequada. As possibilidades mais prováveis são higienização incorreta e coleta de primeiro jato. Nessas situações, além de maior quantidade de células epiteliais e de muco, pode-se ter um aumento de proteínas e no número de leucócitos, hemácias e flora bacteriana. A nova coleta realizada em condições mais controladas confirmou essa hipótese.

REFERÊNCIAS

1. DELANGHE J, SPEECKAERT M. Preanalytical requirements of urinalysis. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014;24(1):89-104.
2. GUSMÃO L, GALVÃO J, POSSANTE M. A resposta do rim ao esforço físico. *Rev Port Nefro Hipert*. 2003;17(1):73-80.

3. MELO NETO OP, CARVALHO AS DE, NICOLAU L DE S, COSA AC, DIAS GP DA S. Análise da proteinúria após exercício físico intenso. RBAC. 2017;49(3):256-62.
4. MILER M, SIMUNDIC AM. Low level of adherence to instructions for 24-hours urine collection among hospital outpatients. Biochem Med (Zagreb). 2013;23(3):316-20.
5. SILVA B, DAL MOLIN DB, MENDES GA. Adequabilidade de amostras de urinas recebidas por um laboratório de análises clínicas do noroeste do estado do Rio Grande do Sul. RBAC. 2016;48(4):352-5.
6. EUROPEAN CONFEDERATION OF LABORATORY MEDICINE: EUROPEAN URINALYSIS GUIDELINES. Scand J Clin Lab Investig. 2000;60:1-96.
7. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15.268:2005. Laboratório clínico – Requisitos e recomendações para exame de urina. Disponível em: <www.abtn.org.br>.
8. MANONI F, GESSONI G, ALESSIO MG, CALEFFI A, SACCANI G, SILVESTRI MG ET AL. Mid-stream vs. first-voided urine collection by using automated analyzers for particle examination in health subjects: An Italian multicenter study. Clin Chem Lab Med. 2012;50:679-84.
9. SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/ MEDICINA LABORATORIAL (SBPC/ML). Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Coleta e preparo da amostra biológica. Barueri: Manole; 2014.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

KOCH VH, ANDRIOLO A. Exame de urina de rotina. In: Kirsztajn GM. Diagnóstico laboratorial em nefrologia. São Paulo: Sarvier; 2009.

28 Exame de rotina de urina

INTRODUÇÃO

O exame de rotina de urina inclui a avaliação macroscópica, física e química, além da análise dos elementos presentes no sedimento urinário. A análise química é realizada por meio de tiras reagentes baseadas em química seca cujos resultados são determinados visualmente ou por instrumentos semiautomatizados ou automatizados. Os elementos presentes no sedimento urinário podem ser examinados por meio de métodos convencionais de microscopia ou novos e modernos métodos automatizados.

Os interferentes listados a seguir aplicam-se tanto a técnicas manuais quanto automatizadas.

EXAME FÍSICO-QUÍMICO

Cor

A cor da urina depende do estado de hidratação do indivíduo, normalmente apresentando-se em variados tons de amarelo. Tanto em situações fisiológicas quanto patológicas a urina pode apresentar uma coloração atípica. Dentre as condições fisiológicas, destacam-se a ingestão de alimentos com coloração forte (p. ex., beterrabas) ou consumo de grande quantidade de corantes alimentícios. Alterações metabólicas, metabólitos de drogas utilizadas pelo indivíduo e diversas condições patológicas (p. ex., alterações hepáticas, hemólise, infecção urinária entre outras) também provocam alteração na cor da urina.

Aspecto

A urina normal e recém-emitida é límpida ou discretamente opalescente, alterando-se em virtude da presença de numerosas células epiteliais, leucócitos, hemácias,

bactérias e leveduras, filamentos de muco e cristais. Diversos contaminantes interferem no aspecto da urina, como talco, cremes vaginais e contrastes radiográficos.

Densidade

Reflete o estado de hidratação do paciente e a capacidade dos rins de concentrarem a urina. Quando avaliada por meio de refratometria, sofre interferência da glicosúria e/ou da proteinúria. As tiras reagentes avaliam a concentração iônica e não sofrem interferência de componentes não iônicos da urina, como a glicose, embora proteinúria e cetonúria significativas possam ocasionar resultados falsamente elevados.

pH

O pH urinário varia de acordo com o tipo de alimentação: dietas ricas em proteínas, por exemplo, são responsáveis por urinas ácidas, enquanto, na dieta vegetariana, a urina é mais alcalina.

Desconhece-se a presença de interferentes na medida do pH na urina. Entretanto, erros na manipulação da tira reagente que provoquem um excesso de urina na tira fornecem resultados de pH mais ácidos por contaminação dessa área reagente pelo tampão ácido do teste da proteína.

Sangue (hemoglobina)

O teste é mais sensível à hemoglobina livre do que aos eritrócitos intactos, sendo a sensibilidade do teste reduzida em urinas alcalinas. Uma das maiores dificuldades na sua interpretação é a alta sensibilidade da área reagente. Reações falso-positivas ocorrem quando na presença de mioglobina, outras peroxidases, como a peroxidase bacteriana, e quando há contaminação com hipoclorito e/ou formol. Densidade aumentada, metabólitos de captopril, presença de proteína, nitrito e ácido ascórbico em altas concentrações são causas de resultados falso-negativos.

A grande sensibilidade da área reagente tornou sua aplicação prática bastante reduzida. Na prática clínica, valorizam-se apenas os resultados negativos, que tornam possível excluir com boa margem de segurança a presença de hematúria ou hemoglobinúria.

Proteína

Proteínas na urina representam um dos principais indicadores de doença renal. Esse teste é mais sensível à presença de albumina, não detectando outras proteínas, como a de Tamm-Horsfall, a principal matriz dos cilindros. Reações falso-negativas são observadas com a excreção de outras proteínas que não a albumina, como o caso do mieloma múltiplo (excreção de cadeias leves livres).

O uso de frascos descartáveis para coleta reduziu drasticamente a possibilidade de resultados falso-positivos, raros e resultados da presença de resíduos de detergentes não iônicos e aniônicos no recipiente de coleta da urina.

Glicose

Aparece na urina quando a quantidade de glicose que entra na luz dos túbulos excede sua capacidade de reabsorção. A pesquisa pelas tiras reagentes é específica para glicose e não detecta outros açúcares, como frutose, lactose ou galactose. Observam-se resultados falso-negativos na presença de níveis muito elevados de ácido ascórbico, especialmente nas amostras com baixas concentrações de glicose.

Cetonas

Normalmente, não se observa a presença de cetonas na urina. Resultados positivos estão associados a cetoacidose diabética, jejum prolongado, algumas dietas para emagrecimento, febre e exercícios intensos, surgindo em decorrência do metabolismo de ácidos graxos.

Não se conhecem interferentes que causem reações falso-negativas para cetonas. Resultados falso-positivos são observados quando de altas concentrações de metabólitos de alguns medicamentos, como levodopa e captopril, substâncias contendo grupos sulfidrílica ou em amostras de urina muito pigmentadas.

Bilirrubina

Apenas a bilirrubina direta (conjugada) é encontrada em amostras de urina, estando relacionada às icterícias obstrutivas e às hepatocelulares (hepatites, cirrose hepática). Trata-se de uma das reações mais sujeitas à ação de interferentes. O principal interferente refere-se à presença de substâncias que provocam alterações na cor normal da urina. Outras causas de resultados falso-positivos incluem urobilinogênio elevado, fenotiazina e clorpromazina. Resultados falso-negativos são originados por exposição prolongada da amostra à luz ultravioleta (luz solar), presença de nitrito ou grandes quantidades de ácido ascórbico.

Urobilinogênio

Urobilinogênio na urina correlaciona-se a excesso de produção de bilirrubina (hemólise) ou nas lesões hepáticas (redução da reabsorção). Resultados falso-negativos decorrem da exposição prolongada da amostra à luz ultravioleta (luz solar), da presença de nitrito, da formalina ou de grandes quantidades de ácido ascórbico. Urinas muito pigmentadas e metabólitos de nitrofurantoína, riboflavina, fenazopiridina, ácido p-aminobenzoico e medicamentos que contêm corantes diazoicos provocam resultados falso-positivos.

Nitrito

Nitrito positivo é observado na urina em decorrência de bactérias Gram-negativas fermentadoras com a propriedade de reduzir o nitrato a nitrito (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., e algumas cepas de *Pseudomonas*). Resultados negativos são observados quando da presença de bactérias que não reduzem o nitrato, da falta de nitrato na dieta (p. ex., nos lactentes e em dietas com baixa ingestão de vegetais verdes) e de incubação da urina na bexiga insuficiente para que haja a redução de nitrato a nitrito. São poucas as causas de resultados falso-negativos (ácido ascórbico em altas concentrações, urinas pouco concentradas) e falso-positivos (corantes na urina).

Leucócito (esterase leucocitária)

Esterase leucocitária positiva (presente nos granulócitos intactos ou lisados) está associada à infecção urinária ou a processos inflamatórios das vias urinárias. Resultados negativos são observados quando de leucócitos não granulócitos. Alguns antibióticos, como cefalexina, cefalotina e tetraciclina, bem como altas concentrações de ácido oxálico, ocasionam resultados falso-negativos. Metabólitos de antibióticos à base de imipeném, meropeném ou ácido clavulânico e agentes oxidantes (hipoclorito de sódio) e de formaldeído promovem resultados falso-positivos.

ELEMENTOS PRESENTES NO SEDIMENTO URINÁRIO

Os principais interferentes na análise do sedimento urinário, tanto por microscopia óptica comum quanto por métodos automatizados, são a contaminação de coleta ou a falta de experiência do analista. Presença de muco, numerosos precipitados amorfos e grande número de células pavimentosas consistem nos principais interferentes nessa etapa do exame de urina.

Leucócitos

Leucocitúria acentuada e presença de grumos leucocitários interferem na contagem de leucócitos por dificultarem sua visualização, podendo super ou subestimá-los. *Trichomonas* sp., pequenas células epiteliais redondas e hemácias volumosas são ocasionalmente contados como leucócitos.

Hemácias

Assim como nos casos de leucocitúria acentuada, hematúria intensa promove contagens equivocadas. Hemácias fantasmas e hemácias com grande alteração no tamanho e forma são causas comuns de contagens subestimadas. Por sua vez, leveduras isoladas, cristais de oxalato de cálcio discoides e gotículas de gordura são eventualmente classificados como hemácias.

Cilindros

Os principais interferentes são filamentos de muco, fibras, células epiteliais pavimentosas alongadas, numerosos precipitados amorfos e grumos leucocitários e de bactérias. Todos esses elementos dificultam a visualização, além de induzirem uma classificação equivocada.

Cristais

Cristal de oxalato de cálcio discoide pode ser confundido com hemácias. Cristais não usuais, formas raras de cristais de ácido úrico e cristais patológicos muitas vezes são desconsiderados por um analista menos experiente ou incorretamente nomeados.

Células epiteliais

Quando em grande quantidade, prejudicam a visualização dos demais elementos, sendo, muitas vezes, classificadas como leucócitos, quando se trata de células redondas, ou como cilindros patológicos, quando assumem uma forma mais alongada.

Filamentos de muco

Trata-se de outro grande interferente na análise dos elementos presentes na urina. Ocasionalmente, são confundidos com cilindros hialinos.

Outros elementos

A diferenciação entre precipitados amorfos e bactérias apresenta certa dificuldade. Como citado anteriormente, leveduras, muitas vezes, são classificadas equivocadamente como hemácias e parasitas, como o *Trichomonas* sp., como leucócitos.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ANDRIOLO A. Função renal e exame de urina. São Paulo: Sarvier; 2012. (Coleção 156 perguntas e respostas).

AYDIN O, ELLIDAG HY, EREN E, YILMAZ N. High false positives and false negatives in yeast parameter in an automated urine sediment analyzer. J Med Biochem. 2015 Jul;34(3):332-7.

CLSI. Urinalysis. Approved Guideline. 3. ed. CLSI document GP16-A3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

COLOMBELI, ASS, FALKENBERG M. Comparação de bulas de duas marcas de tiras reagentes utilizadas no exame químico de urina. J Bras Patol Med Lab. 2006;42(2):85-93.

DELANGHE J, SPEECKAERT M. Preanalytical requirements of urinalysis. Biochem Med (Zagreb). 2014;24(1):89-104.

DUMONCEAUX M, GAMEZ M. Rediscovering urine chemistry – and understanding its limitations. *Med Lab Observer*, 2016. Disponível em: <<https://www.mlo-online.com/rediscovering-urine-chemistry-and-understanding-its-limitations>>. Acesso em: 8 maio 2018.

LEE W, KIM Y, CHANG S, LEE AJ, JEON CH. The influence of vitamin C on the urine dipstick tests in the clinical specimens: a multicenter study. *J Clin Lab Anal*. 2017 Sep;31(5).

MARQUES AG, DOI AM, PASTERNAK J, DAMASCENA M DOS S, FRANÇA CN, MARTINO MDV. Desempenho da fita de urina como resultado presuntivo para cultura de urina negativa. *Einstein (São Paulo)*. 2017;15(1):34-9.

MCPHERSON RA, PINCUS MR. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 23. ed. St. Louis: Elsevier; 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL (SBPC/ML). *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Realização de exames de urina*. Barueri: Manole; 2016. 306p.

STRASINGER AS, DI LORENZO MS. *Urinálise e fluidos corporais*. 5. ed. São Paulo: LMP; 2009.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).



HAS/DM

HemoCue® Albumin 201

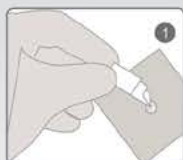
Praticidade e rapidez

Acessibilidade para prevenção

Identifica precocemente lesões renais e cardiovasculares através da detecção de microalbuminúria. Possibilita o diagnóstico imediato com apenas 1 gota de urina aleatória.



Teste em três etapas simples



Encha a microcuveta



Coloque no Albumin



Verifique o resultado

- Método de precisão laboratorial: Aglutinação por anticorpo Policlonal
- 18 µl de urina (aleatória ou de 24h)
- Resultados em até 90 segundos
- Dispensa manutenção preventiva e calibrações posteriores

BIODINA
BRASIL

29 Hemocultura

Embora eventualmente evitáveis, as infecções de corrente sanguínea (ICS) compreendem as complicações mais devastadoras nas unidades de terapia intensiva (UTI) e representam uma importante causa de morbidade e mortalidade em humanos, além de outras consequências, como prolongamento do tempo de internação hospitalar e aumento nos custos da assistência. Há evidências de que a terapêutica adequada precoce melhora o prognóstico desses pacientes, o que aumenta a necessidade de obter um resultado mais rápido e preciso da hemocultura, que configura, sem dúvida, um dos mais importantes exames microbiológicos.

Do ponto de vista prático, é importante a divisão da ICS em síndromes que apresentem características específicas, devendo ser abordadas de maneira diferente:

- Infecções primárias da corrente sanguínea (IPCS): sem foco infeccioso primário identificável;
- Infecções secundárias da corrente sanguínea (ISCS): com foco infeccioso primário identificável em outra localização;
- Infecções da corrente sanguínea relacionadas ao cateter (ICS-CR): têm como fonte de infecção o cateter vascular.

O aumento na prevalência de bacteremias, que geralmente resultam em uma ICS, tem sido determinado por fatores como o aumento de pacientes com risco de infecções, o surgimento de “novos” patógenos na corrente sanguínea, a difusão de procedimentos diagnósticos e terapêuticos invasivos, e o uso de cateteres intravasculares.

A ICS é diagnosticada pela detecção de microrganismos viáveis na corrente sanguínea, condição definida como bacteremia. Tal diagnóstico é facilitado quando o médico informa ao laboratório as condições clínicas e sua provável hipótese etiológica.

O laboratório clínico tem um papel extremamente importante no tratamento desses pacientes, uma vez que a hemocultura positiva representa um indicador altamente específico da infecção. Outro fato de grande relevância é que a identificação do agente infeccioso e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos auxiliam na orientação terapêutica correta, cujo início precoce tem demonstrado redução significativa na taxa de mortalidade.

Conceitualmente, a bacteremia se classifica em transitória, intermitente, contínua ou de escape:

- Bacteremia transitória: em geral rápida, com duração que pode variar de alguns minutos a poucas horas, é a mais comum, surgindo após a manipulação de algum tecido infectado (p. ex., casos de abscessos, furúnculos e celulites), durante algum procedimento cirúrgico envolvendo tecidos contaminados ou colonizados (p. ex., procedimentos dentários, cistoscopia, cateterização ou dilatação uretral), ou quando de abortamento ou endoscopias digestivas;
- Bacteremia intermitente: manifesta-se em intervalos de tempo variáveis, tem como agente o mesmo microrganismo e frequentemente se manifesta com febre de origem indeterminada (geralmente em processos infecciosos, como pneumonias, abscessos intracavitários, como os pélvicos, perinefréticos, hepáticos, prostáticos etc.);
- Bacteremia contínua: característica das endocardites infecciosas agudas e subagudas e de outras infecções endovasculares. Esse padrão também é encontrado nas primeiras semanas da febre tifoide e na brucelose;
- Bacteremia de escape (*breakthrough*): ocorre mesmo enquanto o paciente estiver recebendo antibioticoterapia sistêmica apropriada, isto é, o agente infeccioso é sensível ao medicamento em uso. Quando se dá no início da terapêutica, geralmente resulta de concentrações insuficientes do antimicrobiano atingidas na corrente sanguínea. É interessante lembrar que, nas estafilococcias, é comum haver escape nos primeiros dias de tratamento, mesmo sob condições adequadas de antibioticoterapia. Já os episódios de escape tardios geralmente se dão por drenagem inadequada do foco infeccioso, acesso inadequado da medicação ou comprometimento do sistema imunológico do paciente.

É importante saber que, na maioria das vezes, as bacteriemias são causadas por um único microrganismo, mas, em algumas situações, pode ser de etiologia polimicrobiana. Existem, ainda, fatos que interferem no diagnóstico da bacteremia, como o fato de a eliminação do agente poder ser menos eficiente quando de microrganismos encapsulados ou situações em que tratamento é ineficaz, provocando a manutenção ou recorrência do episódio de bacteremia, como nos casos de

infecções a partir de focos intravasculares, na presença de dispositivos invasivos pela formação de biofilme ou em endocardites.

Em geral, as fontes mais comuns de ICS, incluindo as de origem comunitária ou hospitalar, são: dispositivos intravasculares (19%); trato geniturinário (17%); trato respiratório (12%); intestino e peritônio (5%); pele (5%); trato biliar (4%); abscesso intra-abdominal (3%); outros sítios (8%); e sítios desconhecidos (27%).

É fundamental ter consciência de que muitas bactérias e fungos que compõem o meio ambiente ou a microbiota normal do indivíduo podem causar ICS em indivíduos gravemente comprometidos, sobretudo quando de casos de imunossupressão (p. ex., pacientes transplantados, pacientes em quimioterapia), situação em ocorrem mudanças dramáticas no potencial do hospedeiro, tornando-o suscetível a esses microrganismos. Portanto, vários fatores são importantes para facilitar o diagnóstico dessa infecção: a indicação clínica precisa, a coleta, o transporte e o processamento da amostra de sangue, que devem ser realizados adequadamente.

O resultado da hemocultura depende de vários fatores envolvidos nas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica (Figura 1).

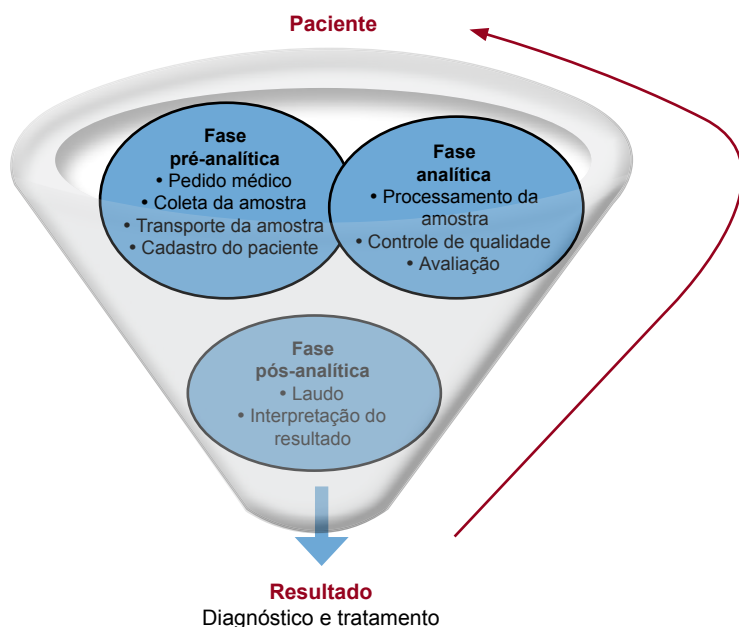


FIGURA 1 Representação esquemática do fluxograma da amostra clínica enviada para o exame microbiológico.

CUIDADOS NA FASE PRÉ-ANALÍTICA E SEUS INTERFERENTES

Os cuidados em cada etapa da fase pré-analítica da hemocultura são fundamentais para que obter um bom resultado do exame, tornando, assim, a terapêutica do paciente eficaz.

Indicação clínica

O médico tem um papel fundamental na acurácia do resultado da hemocultura, pois seu conhecimento a respeito da epidemiologia e da fisiologia da ICS será crítico quando da solicitação do exame. A suspeita clínica determinará a indicação clínica adequada do exame, o tempo de coleta entre as amostras, o frasco adequado para o agente específico e o processo utilizado pelo laboratório.

O indicador para a solicitação hemocultura refere-se à suspeita de bacteremias, sepse, sepse grave, choque séptico ou febre de origem indeterminada. A indicação é adequada quando há suspeita de bacteremia clinicamente significativa, fungemias, micobacteremias ou calafrios, febre ou hipotermia, leucocitoses (principalmente com a presença de formas imaturas dos granulócitos), granulocitopenia ou comprometimento hemodinâmico sem causa conhecida, ou na combinação destes. É importante lembrar que pacientes idosos, imunocomprometidos e recém-nascidos podem não manifestar quadros clínicos tipos de infecções graves. Recomenda-se a hemocultura na suspeita de endocardite infecciosa, febre de origem indeterminada, infecções em pacientes imunocomprometidos (oncológicos, neutropênicos, usuários de corticosteroide, AIDS), pneumonias graves, pacientes em uso de cateter venoso central com sinais de infecção de corrente sanguínea e em casos de sepse, sepse grave e choque séptico. A hemocultura deve também ser solicitada no momento em que o paciente estiver recebendo infusão venosa ou em hemodiálise, apresentando sinais de bacteremias. Quando o paciente está em uso de antibioticoterapia, subsequentes solicitações de hemoculturas poderão ser justificadas em casos de não melhora clínica ou de evidências de falência terapêutica.

É fundamental que a solicitação da hemocultura seja adequada e que o médico informe ao laboratório se há hipótese de uma suspeita diagnóstica específica (p. ex., endocardite, bacteremia pós-cirurgia precoce) ou se pode se tratar de uma infecção relacionada ao cateter. Outra informação muito útil ao processamento do exame refere-se à suspeita de um agente específico, como micobactérias, fungos filamentosos etc. Essas informações facilitam o processamento do exame, assim como a liberação do resultado – a falta delas poderá resultar até mesmo na liberação de um resultado falso-negativo.

Coleta da amostra

A acurácia do resultado da hemocultura é diretamente influenciada pela qualidade da amostra de sangue coletada. Portanto, para que as amostras de hemoculturas sejam adequadas, deve-se considerar alguns conceitos básicos gerais:

- O conhecimento da história natural e da fisiopatologia dos processos infecciosos é fundamental na determinação do período ótimo para a coleta do sangue para a cultura;
- Tanto os antibióticos agentes bactericidas quanto os bacteriostáticos poderão dificultar o crescimento bacteriano. Sempre que possível, deve-se coletar a amostra antes da administração da terapia antimicrobiana. Caso o paciente esteja fazendo uso de terapia antimicrobiana, o sangue deverá ser coletado antes da próxima dose do medicamento;
- A amostra clínica deve representar o material do verdadeiro local da infecção, evitando-se a sua contaminação a partir de tecidos adjacentes (no caso, a pele e o lúmen de cateteres);
- Deve ser obtida quantidade de sangue suficiente para evitar resultados falso-negativos, pois a sensibilidade do exame depende do volume de sangue coletado;
- A suspeita de potencial agente etiológico define o frasco adequado que suporte a viabilidade e o isolamento do microrganismo responsável pela infecção. Existem microrganismos que exigem cultivos especiais, sendo, por isso, de fundamental importância informar ao laboratório quando da suspeita de um agente infeccioso específico (p. ex., micobactérias, fungos filamentosos, *Legionella* spp. etc.);
- Informar sempre a origem da amostra de sangue, isto é, se foi coletado de vaso periférico ou pelo lúmen do cateter;
- Sempre identificar corretamente o frasco encaminhado para o laboratório, facilitando o retorno do resultado para o paciente. É fundamental o horário de coleta da amostra;
- A amostra deve ser encaminhada imediatamente ao laboratório após a coleta, com a finalidade de assegurar o isolamento principalmente dos microrganismos mais sensíveis e exigentes, além de evitar a demora na liberação do resultado;
- Toda amostra clínica deverá ser considerada potencialmente infectante, devendo-se manuseá-la com muito cuidado.

Procedimento da coleta

A contaminação por hemocultura representa uma fonte contínua de frustração para clínicos e microbiologistas. Com frequência, os resultados ambíguos da cultura promovem incerteza diagnóstica no manejo clínico e aumento desnecessário do custo da assistência. Portanto, estratégias são necessárias para diminuir as taxas de contaminação do sangue para o exame microbiológico.

Normalmente, a pele é colonizada por uma microbiota bacteriana permanente, o que torna o procedimento da coleta da hemocultura crítico. Nesse sentido, ele deve ser feito utilizando técnicas rigorosas de antissepsia para evitar a contaminação da amostra, apesar de uma taxa de contaminação inferior a 3% ser aceitável. A ausência de uma preparação adequada no local da punção compreende a razão mais comum para a ocorrência de contaminantes na amostra de sangue, lembrando que hemoculturas obtidas a partir de dispositivos intravasculares, como cateteres ou *portocaths*, estão associadas a taxas de contaminações maiores, sendo descritos até 10%. Enquanto as taxas-alvo de contaminação foram fixadas em 2 a 3%, as taxas reais parecem variar amplamente entre as instituições, de apenas 0,6% a mais de 6%.

Alguns tipos de microrganismos são mais frequentemente associados à contaminação (menos de 5% de chance de bacteremia verdadeira), como *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Propionibacterium acnes*, pois estes são componentes da microbiota da pele; portanto, a antissepsia adequada da pele é um passo fundamental no processo de coleta da amostra de sangue para cultura, pois se trata do fator que determina a probabilidade de uma hemocultura positiva ser considerada contaminação ou infecção.

A coleta do sangue deverá ser feita por meio de punção em veia periférica precedida por antissepsia adequada da pele seguindo um protocolo estabelecido; a punção arterial não aumenta a sensibilidade da hemocultura.

- Avaliar a solicitação do exame e preparar o material adequado – frasco de hemocultura, material para punção, antisséptico, etiqueta com a identificação adequado do paciente etc. Nota: *Não colar a etiqueta sobre o código de barras do frasco;*
- Fazer a antissepsia da tampa de borracha do frasco com álcool 70%, desprezar o algodão e deixar outro sobre a tampa até a inoculação do sangue;
- Escolher o vaso a ser puncionado;
- Colocar luva de procedimento ou estéril. Se usar a luva estéril, lembrar-se de que não poderá tocar materiais que não sejam estéreis;
- Fazer a antissepsia da pele com algodão embebido em álcool isopropílico a 70%, fazendo movimentos centrífugos a partir do local escolhido para a punção. Repetir o procedimento usando outro algodão com álcool 70% ou outro antisséptico, como solução de tintura de iodo 1 a 2%, clorexidina alcoólica a 0,5% etc., deixando secar por 1 minuto;
- Fazer a punção e a coleta da amostra de sangue, e, depois, a remoção da solução de iodo da pele; caso tenha sido utilizada clorexidina, este passo não se faz necessário;
- Fazer a transferência do sangue para o frasco de hemocultura. Não se deve trocar a agulha após a coleta de sangue para inoculação no frasco, pois não há decréscimo significativo na taxa de contaminação quando da troca, podendo

aumentar o risco de acidentes para o profissional e o custo do exame. A transferência da amostra para os frascos de hemoculturas deve ser feita primeiro no frasco de anaeróbio, sem troca da agulha. Se a coleta foi realizada com sistema de coleta fechado, inocular primeiro no frasco aeróbio; é importante lembrar que, nesse caso, o frasco de hemocultura deverá permanecer em pé durante toda a coleta, para evitar refluxo para a veia do paciente. Observar o volume correto a partir da análise da guia de marcação na etiqueta do próprio frasco;

- Dispensar o material de coleta em local apropriado, isto é, em caixa de perfurocortante.

Número de amostras

Levando em consideração os vários tipos de bacteremias, o momento e o local da coleta, o número de amostras a serem coletadas varia de acordo com o quadro clínico, ficando essa orientação, assim, sob responsabilidade do médico. É importante ressaltar que, idealmente, uma amostra de hemocultura é formada por quatro frascos coletados de duas punções diferentes (primeira e segunda amostras) e identificadas corretamente. Há estudos mostrando resultados cumulativos na recuperação do patógeno que variam de acordo com o número de frascos coletados. Dados exibem que as coletas de mais de três amostras não aumentam significativamente a sensibilidade da hemocultura.

Não se recomenda a coleta de uma única amostra de hemocultura, pois ela pode não ser suficiente para detectar a bacteremia ou fungemia e, também, dificultar a interpretação da significância clínica da recuperação de microrganismos, como estafilococos coagulase-negativa ou corinebactérias, que frequentemente são contaminantes, mas poderão ser a causa de bacteremias, principalmente em pacientes imunocomprometidos, portadores de próteses etc. Exceções podem se dar em paciente que apresentam sinais de bacteremias durante uma infusão de medicamentos ou uma sessão de hemodiálise.

Em conclusão, o número de amostras deve ser de no mínimo duas e, no máximo, quatro amostras por episódio infeccioso. Um maior número de amostras traz poucos benefícios, aumentando o custo do exame, o trabalho e o risco de provocar espoliação desnecessária no paciente, sem aumento significativo da positividade. Essa amostragem também representa o volume de sangue adequado para o isolamento, possibilitando auxiliar na interpretação do resultado, pois a relação entre o número de amostras de hemoculturas positivas *versus* o total de amostras coletada é uma ferramenta muito útil na interpretação do significado clínico.

Hora, intervalos e local de punção para a coleta

A coleta da hemocultura deve ser indicada o mais precocemente possível quando do início dos sintomas de infecção e antes de começar a antibioticoterapia.

Nas bacteremias transitórias, é importante valorizar o início do estado febril, pois trabalhos experimentais mostram que a maior carga bacteriana ocorre até 1 hora antes dos calafrios e do pico febril, possibilitando um intervalo entre as coletas das amostras. O intervalo entre as punções é irrelevante em situações clínicas nas quais há suspeita de bacteremia contínua (p. ex., endocardites, septicemias etc.). Nesses casos, as amostras de sangue deverão ser coletadas o mais precocemente possível. Em pacientes em antibioticoterapia, o momento da coleta deverá ser aquele em que há menor concentração de antibiótico na corrente sanguínea, portanto, antes da administração da próxima dose (vale) do medicamento.

O sangue deverá ser coletado por meio de punção em veia periférica, precedida pela antisepsia adequada da pele. A coleta de sangue arterial não está associada a aumento da sensibilidade, mas não é recomendada a princípio. Também não se indica a coleta da hemocultura para diagnóstico de bacteremia ou fungemia direto de cateter central. Exceções podem se dar nos recém-nascidos com cateter em artéria umbilical, em pacientes em que a punção deverá ser evitada (p. ex., o paciente em transplante de medula) e pacientes nos quais há hipótese de que a fonte da infecção seja o cateter central – nesses casos, deve ser coletada também uma amostra periférica.

O uso de antitérmicos não interfere nos resultados de hemoculturas.

Vários frascos inoculados com sangue de uma mesma punção são considerados uma mesma amostra de sangue, isto é, uma amostra com volume de sangue maior. Cada amostra deve ser coletada de punções separadas e de sítios anatômicos diferentes.

Alguns autores, classicamente, recomendam a coleta de amostras em intervalos arbitrários de 30 a 60 minutos. No entanto, alguns observaram que não há diferenças significativas entre os índices de positividade de hemoculturas obtidas em diferentes tempos em relação ao pico febril ou em um período de 24 horas quando obtidas simultaneamente ou com intervalos. O estado clínico do paciente determinará o momento e o intervalo entre as coletas (Tabela 1).

Volume de sangue

Outra importante variável na detecção de bacteremias é o volume de sangue cultivado. A maioria das bacteremias tem baixa magnitude, sendo menores no adulto do que nas crianças, principalmente se o paciente estiver em uso de antibiótico. Com base nessas informações, recomenda-se que 20 a 30 mL de sangue sejam coletados no adulto, e volumes maiores que 40 mL não aumentam a taxa de recuperação bacteriana. Em crianças, apesar de não estar bem definido, é recomendada a coleta de 1 a 5 mL ou até 1% de sua volemia, embora alguns autores recomendem até 4% da volemia. Ainda não é possível estabelecer volumes ótimos para crianças muito pequenas ou prematuras. A Tabela 2 apresenta recomendações para a coleta de sangue para hemoculturas em lactentes e crianças.

TABELA 1 Recomendações para coleta de hemoculturas em diferentes condições ou síndromes infecciosas

Condição ou síndrome infecciosa	Recomendações
Suspeita de bacteremia ou fungemia primária (endocardite, meningite, osteomielite, artrite e pneumonia bacteriana etc.)	Obter 4 frascos (1ª e 2ª amostras) e, no mesmo momento, uma amostra de cada local de punção, o mais precocemente possível ao início dos sintomas e antes do uso de antibióticos
Febre de origem indeterminada (p. ex., abscessos ocultos, febre tifoide, brucelose ou outra síndrome infecciosa não diagnosticada)	Obter 4 frascos (1ª e 2ª amostras) e, no mesmo momento, uma amostra de cada local de punção, inicialmente. Se não houver a recuperação de nenhum microrganismo, solicitar mais 2 amostras após 24 e/ou 48 horas de incubação
Suspeita de bacteremia ou fungemia com persistentes hemoculturas negativas	Devem ser utilizados métodos alternativos de hemoculturas específicos para aumentar a recuperação de micobactérias, fungos e microrganismos fastidiosos
Pacientes imunocomprometidos:	
Câncer	Obter 4 frascos (1ª e 2ª amostras) e, no mesmo momento, cada amostra de um local de punção, o mais precocemente possível ao início dos sintomas e antes do uso de antibióticos
AIDS	Solicitar também amostras para a recuperação de micobactérias, levando sempre em consideração níveis de CD4, inferior a 100 células/mcL

Fonte: adaptada de Baron, 2005.¹

TABELA 2 Volume de sangue sugerido para hemoculturas de lactentes e crianças

Peso (kg)	Volemia (mL)	Volume de sangue por amostra (mL)		Volume total de sangue para cultura (mL)	% da volemia
		Cultura n. 1	Cultura n. 2		
≤ 1	50 a 99	2	—	2	4
1,1 a 2	100 a 200	2	2	4	4
2 a 12,9	> 200	4	2	6	3
13 a 36	> 800	10	10	20	2,5
> 36	> 2.200	20 a 30	20 a 30	40 a 60	1,8 a 2,7

Fonte: adaptada de Baron, 2005; Kellog, 2000.^{1,2}

Tipo de frascos de hemoculturas

A diluição do sangue no meio de cultura é mantida de 1:5 até 1:10 (sangue/meio de cultura) na maior parte dos sistemas de cultura comerciais, diluindo, assim, fatores capazes de inibir o crescimento bacteriano. Hoje, estão disponíveis no mercado vários tipos de frascos para coleta de hemocultura. Existem frascos para o isolamento de bactérias aeróbias, anaeróbias, fungos, micobactérias e, ainda, com resinas aniônicas e catiônicas, para adsorção de antibióticos. Os frascos para os procedimentos automatizados são adequados ao equipamento utilizado pelo laboratório. Diante da grande variedade de frascos para hemocultura, a sua escolha depende da suspeita clínica.

Transporte da amostra

O frasco de hemocultura inoculado com a amostra de sangue deve ser encaminhado imediatamente ao laboratório em temperatura ambiente.

São da responsabilidade do laboratório a implantação e o treinamento da coleta da hemocultura, informando como se realizam o seu processamento e a liberação de laudos parciais e final. Dessa maneira, todos os fatores da fase pré-analíticas precisam ser cumpridos, possibilitando que as taxas de contaminação sejam as menores possíveis e que o laboratório não se responsabilize por impactos negativos na assistência ao paciente, uso inadequado de antimicrobianos e no financeiro da instituição e resultados falso-positivos promovidos pela contaminação da hemocultura.

REFERÊNCIAS

1. BARON EJ (COORD.). Blood culture IV. Washington: ASM Press; 2005.
2. KELLOG JA, BANKERT DA. Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2181-85.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ARAUJO MRE. Hemoculturas – Recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. *J Infect Control.* 2012;1(1):8-19.
- BENNETT IL JR, BEESON PB. Bacteremia: a consideration of some experimental and clinical aspects. *Yale J Biol Med.* 1954;26:241-62.
- CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Principles and procedures for blood culture, approved guideline. M47-A. Wayne: CLSI; 2007;27(17).
- DOERN GV. Blood cultures for the detection of bacteremia. *UpToDate.* 2018.
- HALL KK, LYMAN JA. Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Oct;19(4):788-802.
- KIRN TJ, WEINSTEIN MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report and interpret. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:513-20.

- MICHAEL D JR, FREDERICK SN, MICHAEL LW. Blood cultures III. Washington: ASM Press; 1997.
- MILLER JM. A guide to specimen management in clinical microbiology. 2. ed. Washington: ASM Press; 1999.
- PASQUALINI L, MENCACCI A, LELI C, MONTAGNA P, CARDACCIA A, CENCI E ET AL. Diagnostic performance of a multiple real-time PCR assay in patients with suspected sepsis hospitalized in an internal medicine ward. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1285-8.
- WASHINGTON JA. II. Blood cultures: principles and techniques. *Mayo Clin Proc.* 1975;50:91-8.
- WEINSTEIN MP. Blood culture contamination: persisting problems and partial progress. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2275-8.
- WEINSTEIN MP, DOERN GV. A critical appraisal of the role of the diagnosis of bloodstream infections. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9S):S26-S29.

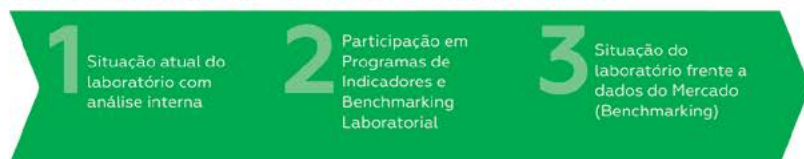
* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

PROGRAMA DE INDICADORES E BENCHMARKING LABORATORIAL

Acesso sem complexidade a **informações mercadológicas**, como apoio a qualidade e **sustentabilidade do laboratório**.

Desenvolvido em parceria com a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML), o Programa permite comparação das práticas e métricas do laboratório com o mercado, em nível nacional e internacional, para maior efetividade na tomada de decisão frente a suas estratégias e melhoria contínua do processo.

COMO ESTÃO OS LÍDERES DE MERCADO?



A prática do benchmarking possibilita uma visão mais abrangente e real dos processos do laboratório, permitindo direcionar os esforços àqueles que realmente requerem atenção, diminuindo custos e tempo.



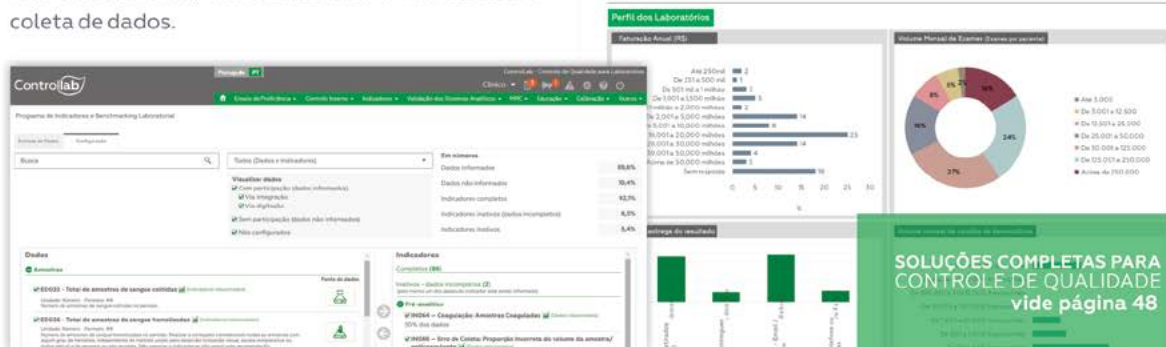
Indicadores do programa: Indicadores de gestão de recursos, organizacional, demográficos e de processo.

Programa 100% online, garantindo o sigilo das informações e permitindo a **Integração** dos sistemas laboratoriais, automatizando e facilitando a coleta de dados.

Programa de Indicadores e Benchmarking Laboratorial



Perfil de Resultados



Serviços disponíveis para múltiplos segmentos. Consulte o catálogo online em www.controllab.com



[controllab.com](http://www.controllab.com) | +55 21 3891 9900 | contata@controllab.com

[facebook.com/controllab](https://www.facebook.com/controllab) | plus.google.com/controllab | [instagram.com/_controllab](https://www.instagram.com/_controllab)

A urocultura é considerada o exame “padrão-ouro” no diagnóstico laboratorial das infecções.

Visto que o crescimento bacteriano a partir da cultura de urina pode se dar por contaminação externa do trato urinário, colonização da porção distal da uretra e colonização assintomática da urina na bexiga, há fatores pré-analíticos que devem ser seguidos para obter resultados mais confiáveis.

A urocultura também representa a maior parte do trabalho na rotina laboratorial. O adequado manejo dos componentes da fase pré-analítica, incluindo identificação adequada da amostra, coleta, preservação, armazenamento e transporte, reflete-se no resultado final entregue ao paciente.

Um estudo externo de comparação entre pares (Q-Probe) conduzido pelo College of American Pathologists em 1998 e repetido em 2008¹ avaliou a taxa de contaminação em uroculturas, definida como mais de 2 isolados em quantificação acima de 10^4 unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (mL) e rotina de coleta e gestão da amostra. Taxas de contaminação de 41,7% (local com baixo desempenho), 15% (médio) e 0,8% (alto) corresponderam aos percentis 10, 50 e 90. As taxas de contaminação não tiveram correlação com o local de coleta, o uso de *kits* de coleta, conservantes ou recipientes de transporte com isolamento térmico. No entanto, as taxas de contaminação foram substancialmente afetadas pelo processamento pós-coleta, especialmente a refrigeração da amostra. Em alguns casos, as instruções dadas aos pacientes externos também tiveram influência nas taxas de contaminação.

Dessa maneira, a observação dos fatores pré-analíticos em urocultura tem a finalidade de reduzir a contaminação e melhorar a acurácia no diagnóstico do paciente.

O QUE PODE E O QUE NÃO PODE?

Considerando-se que a urocultura representa um procedimento quantitativo, destaca-se primeiro o fato de que a coleta deve ocorrer em condições normais de hidratação.

Segundo publicação da American Society for Microbiology (ASM), as recomendações mais significativas para as principais formas de coleta estão resumidas na Tabela 1.

TABELA 1 Principais recomendações pré-analíticas relacionadas à coleta, ao transporte e ao volume mínimo para realização de urocultura

Tipo de amostra	Recomendações de coleta	Transporte e/ou volume mínimo
Jato médio feminino	Iniciar a micção mantendo os lábios afastados. Após eliminação de vários mililitros, coletar o jato médio sem interromper o fluxo de urina	Recipiente estéril resistente a vazamento com ou sem conservante (ácido bórico)/≥ 1 mL
Jato médio masculino	Iniciar a micção mantendo retração do prepúcio. Após eliminação de vários mililitros, coletar o jato médio sem interromper o fluxo de urina	Recipiente estéril resistente a vazamento com ou sem conservante (ácido bórico)/≥ 1 mL
Por meio de sondagem de alívio	Assepsia do meato uretral com água e sabão. Enxaguar a área com compressas de gaze úmida. Inserir o cateter na bexiga de maneira asséptica. Após descartar aproximadamente 15 mL, coletar a urina que será analisada em um recipiente estéril	Recipiente estéril resistente a vazamento com ou sem conservante (ácido bórico)
Por meio de sonda de demora	Clampamento do cateter abaixo do local de coleta da bolsa por 10 a 20 minutos e desinfecção com álcool 70%. Assépticamente, coletar 5 a 10 mL de urina	Recipiente estéril resistente a vazamento com ou sem conservante (ácido bórico)

Fonte: adaptada de Doern, 2018.²

Para coletas nas quais está envolvida sondagem vesical, deve-se observar ainda que pacientes sondados cronicamente sempre apresentam bactérias na bexiga; portanto, a solicitação de urocultura somente deve ser feita quando houver um sinal ou sintoma que a justifique. Contudo, a cateterização vesical de alívio pode introduzir microbiota uretral na bexiga.

O tempo entre o transporte e o processamento para amostras coletadas sem conservante é de até 2 horas à temperatura ambiente ou até 24 horas a 4°C. Amostras coletadas com conservante podem ser mantidas à temperatura ambiente por até 24 horas.

Com relação ao momento da coleta da amostra, para pacientes com controle de esfíncter, é necessário um período maior que 2 horas entre o momento da coleta e a última micção, mas não necessariamente a primeira amostra do dia.

Apesar de a prática mais usual de coleta em crianças sem controle de esfíncter utilizar sacos coletores, sua maior finalidade é descartar infecção do trato urinário no caso de urocultura negativa, em vez de confirmá-la. O método recomendado nessa situação é a sondagem vesical.

Não se recomenda coleta de urina em comadre ou urinol.

Quanto à cultura de urina para micobactérias, recomenda-se a coleta da primeira amostra (toda a micção), sendo necessário um volume acima de 20 mL.

Apesar de todos os aspectos discutidos anteriormente serem bastante clássicos dentro da microbiologia, uma metanálise recente procurou evidências que os fundamentassem.³ Os principais achados foram divididos em recomendados, não recomendados e “nem a favor ou contra”, de acordo com os critérios apresentados a seguir, referindo-se à coleta de urina por métodos não invasivos:

- Recomendados: coleta de jato médio em homens, mulheres e crianças com assepsia;
- Não recomendados: jato inicial em homens, jato médio em crianças sem assepsia, urina de saco coletor em crianças;
- “Nem a favor nem contra” em razão de falta de evidência suficiente: jato médio em mulheres ou homens sem assepsia, jato médio em mulheres em comparação à sondagem de alívio, jato médio em homens e crianças em comparação à sondagem de alívio ou punção suprapúbica. Para o processamento da amostra mantida à temperatura ambiente, refrigerada ou conservada com ácido bórico, também não houve evidência suficiente para escolher um ou outro método; a refrigeração e o uso de conservantes preservam amostras adequadamente por até 24 horas, mas ainda são necessários estudos que avaliem a utilidade dessas práticas.

Com relação aos interferentes no resultado de urocultura, além da possível contaminação vaginal e da colonização uretral, o uso de antimicrobianos previamente à coleta representa um fator bastante significativo.

Desse modo, a correlação entre forma de coleta, tipo de frasco, tempo entre a coleta e o processamento da amostra e temperatura do transporte são fatores

pré-analíticos muito importantes, cuja indicação deve ser cada vez mais estudada, inclusive em trabalhos comparativos dentro das diferentes instituições.

Ainda, laudos inapropriados reportando culturas positivas que refletem contaminação podem resultar na utilização desnecessária de antimicrobianos, que não contribuem para a evolução do paciente, provocam aumento de custos e a promoção de resistência bacteriana.

CASOS CLÍNICOS

A seguir, são apresentados casos típicos de resultados de urocultura, cujos resultados refletem a interferência de fatores pré-analíticos.

1. Criança com 6 meses de vida é atendida no pronto atendimento com história de febre, sem sinais de localização. Segue protocolo institucional com coleta de urina para exame de urina tipo I e urocultura.

Inicialmente, opta-se por coleta por meio de saco coletor:

- Resultado do exame de urina tipo I: 250.000 leucócitos/mL.

Decidiu-se coletar a amostra por meio de sondagem vesical:

- Resultado do exame de urina tipo I: 3.000 leucócitos/mL.

Após incubação, a urocultura revelou:

- Na coleta da amostra por meio de saco coletor, houve crescimento de 100.000 UFC de *Pseudomonas aeruginosa*, após 18 horas de incubação;
- Na coleta da amostra por meio de sondagem vesical, não houve crescimento bacteriano em 48 horas de incubação.

1a. Como explicar a diferença de resultado entre as amostras processadas no exame de urina tipo I?

1b. Como explicar a diferença de resultado entre o crescimento em uma das amostras e negativos em outra?

1c. Qual o valor do achado do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* nessa faixa etária?

Aspectos a serem discutidos: caso clássico em que há contaminação da amostra quando coletada por meio de saco coletor. Lembrar que o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* não é comum nessa faixa etária, o que reforça a possibilidade de contaminação.

2. Criança do sexo feminino com 7 anos de idade em bom estado geral relata desconforto para urinar.

Coleta exame de urina tipo I e urocultura.

Resultados de relevância:

- Urina tipo I: 80.000 leucócitos/mL.

Urocultura:

- Crescimento de *Escherichia coli* (10^4 UFC/mL);
- *Enterococcus faecalis* (10^3 UFC/mL).

2a. Qual seria uma boa hipótese para esse crescimento com mais de um patógeno associado à queixa clínica?

Aspectos a serem discutidos: a presença de mais de um patógeno, em quantificação não muito relevante, deve levantar a hipótese de o patógeno não estar relacionado à infecção do trato urinário. A possibilidade de vulvovaginite nessa faixa etária e com este descritivo na urocultura compreende a hipótese mais provável.

3. Criança do sexo masculino com 6 anos de idade apresenta febre sem sinais de localização. Na investigação, coleta-se urina para a realização de urina tipo I e urocultura.

Resultados de relevância:

- Urina tipo I: 4.000 leucócitos/mL.

Urocultura:

- Crescimento de *Proteus mirabilis* (10^5 UFC/mL);
- *Enterococcus faecalis* (10^4 UFC/mL).

3a. Qual o significado do isolamento de *Proteus mirabilis*?

Aspectos a serem discutidos: o crescimento de um patógeno na urocultura, na ausência de leucocitúria, não é o achado mais esperado para um paciente com infecção do trato urinário. Considerando-se que o paciente é uma criança do sexo masculino, a maior probabilidade desta associação é a colonização de prepúcio, na qual na fase pré-analítica do exame, não foi feita assepsia adequada.

4. Paciente com 40 anos do sexo feminino realiza urocultura cujo bacterioscópico identificou bacilos Gram-positivos.

Posteriormente, a cultura identificou *Lactobacillus* spp.

4a. Qual seria a importância desse isolado?

Aspectos a serem discutidos: a identificação de *Lactobacillus* spp. na urocultura é um indicativo de contaminação vaginal na fase pré-analítica (coleta) do exame.

5. Paciente jovem é atendida no pronto atendimento com queixa de disúria há 1 dia. Antes da coleta da urina para exame de urina I e urocultura, relata que tomou somente uma dose de quinolona.

Resultados de relevância:

- Urina tipo I: 350.000 leucócitos/mL;
- Urocultura: negativa após 48 horas de incubação.

5a. O que justifica a cultura ser negativa, uma vez que a paciente permanece sintomática?

Aspectos a serem discutidos: apesar de a dose de antimicrobiano não ter sido suficiente para tratar a infecção do trato urinário, trata-se de um fator interferente

capaz de negativar uma urocultura. Os antimicrobianos podem, inclusive, ter efeito pós-antibiótico; desse modo, recomenda-se que o controle de uma urocultura, de maneira geral, seja feito somente 72 horas após o término do tratamento.

6. Durante uma investigação do trato urinário, solicita-se que o paciente realize uma urocultura e, também, um exame de ultrassonografia.

6a. É possível realizar esses exames em uma única admissão do paciente, já que existe a recomendação da ingestão de 4 copos de água 1 hora antes da realização do exame de imagem?

Aspectos a serem discutidos: para viabilizar que os exames aconteçam na sequência, a única possibilidade é recomendar que o paciente encha a bexiga normalmente (4 horas sem urinar) e, após realização do exame, faça a coleta da amostra. Caso o paciente tome os 4 copos de água recomendados para a ultrassonografia, após a realização do exame, terá que esvaziar a bexiga e esperar pelo menos 2 horas para realizar a coleta.

REFERÊNCIAS

1. BEKERIS LG, BRUCE AJ, WALSH MK, WAGER EA. Urine culture contamination: a College of American Pathologists Q-Probes study of contaminated urine cultures in 127 laboratories. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:913-7.
2. DOERN CD. *Pocket guide to clinical microbiology.* 4. ed. Washington: ASM Press; 2018.
3. LAROCCO M, FRANEK J, LEIBACH EK, WEISSFELD AS, KRAFT CS, SAUTTER RL ET AL. Effectiveness of preanalytic practices on contamination and diagnostic accuracy of urine cultures: a laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29:105-47.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BARON EJ, MILLER JM, WEINSTEIN MP, RICHTER SS, GILLIGAN PH, THOMSON RB ET AL. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis.* 2013;57:e22-e121.

CARDOZO D, KUSSEN GMB, COGO LL. Research on antimicrobial residues activity in urine samples of hospitalized patients. *J Bras Patol Med Lab.* 2014;50(6):417-20.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

BD Vacutainer®

Sistema de coleta de urina



É a hora de nos questionarmos sobre exame de urina ?

20 minutos é o tempo necessário para dobrar a quantidade de bactérias quando a amostra de urina é acondicionada incorretamente.



Com a solução BD Vacutainer® para coleta de urina, é possível manter a amostra conservada em temperatura ambiente por até 48 horas.



INTRODUÇÃO

Microorganismos são seres vivos que rapidamente crescem, se reproduzem e morrem.

Pode haver resultados de exames microbiológicos incompletos ou errôneos se um desses fatores ocorrer antes de a amostra ser processada.

O material biológico deve ser representativo do provável local de infecção, procurando-se sempre evitar a contaminação com a microbiota das áreas adjacentes, como pele e mucosas.

A coleta ou o transporte inadequados podem ocasionar falhas no isolamento do agente etiológico e favorecer o desenvolvimento da flora contaminante, induzindo ao isolamento de um “falso” agente etiológico, resultando em uma orientação terapêutica inadequada.

Cada resultado liberado pelo laboratório de microbiologia decorre da qualidade da amostra e das informações que a acompanham, principalmente do tipo de material coletado e do local de infecção, o que direciona o microbiologista a uma procura direcionada do provável agente causal.

SOLICITAÇÃO DE EXAMES

Idealmente, o pedido de exames deve trazer informações de identificação e demográficas do paciente, como idade, doença de base, suspeita diagnóstica e indicação do uso de antibióticos. A discriminação do material biológico e o perfil de exames a serem solicitados para cada situação são grandes desafios de educação continuada ao corpo clínico, o que pode ser melhorado à medida que se tenham protocolos clínicos, pedidos médicos específicos para microbiologia e, principalmente, aprimoramento do prontuário eletrônico, padronizando os perfis de exames recomendados para cada tipo de material e o correspondente local de infecção, garantindo o melhor aproveitamento da amostra e objetivando o diagnóstico. A possibilidade

de um sistema com dois campos distintos para a descrição do material tem grande valia para simplificar e, ao mesmo tempo, propiciar um maior número de combinações e menor quantidade de parâmetros.

É interessante que o laboratório de microbiologia, com o corpo clínico dos hospitais e do SCIH (Serviço de Controle de Infecção Hospitalar), padronize a solicitação de exames, indicando quais são mais apropriados para determinados tipos de materiais. Ainda, é importante que o sistema disponha de uma ferramenta de alarme para amostras repetidas de um mesmo tipo de exame e material em intervalos de tempo definidos, evitando réplicas, desperdício e, eventualmente, até mesmo confusão diagnóstica.

Um pedido de exames ou um menu específico para microbiologia também tem a vantagem de poder inserir informações que auxiliam o clínico a indicar e direcionar a coleta mais adequada, como no caso de uma solicitação de cultura de cateter vascular, em que deve aparecer a informação de que esta somente deve ser solicitada se houver suspeita de infecção relacionada ao dispositivo, que a ponta deve ter cerca de 5 cm para cultura e que deve ser acompanhada de uma hemocultura periférica. Na coleta de secreções, pode haver um alerta sobre evitar amostras coletadas por *swab* e dar preferência a materiais mais representativos de infecção, como biópsias de tecido ou punções. A formatação da solicitação de exames e eventuais notas adicionadas aos laudos microbiológicos passam a ser, então, um canal de comunicação com o médico e uma ferramenta de educação permanente.

COLETA

Para garantir melhores resultados, algumas condições pré-analíticas são desejáveis:

- Coletar o material o mais precocemente possível em relação ao início do quadro infeccioso;
- O material deve ser coletado antes da antibioticoterapia ou no vale (antes da administração da próxima dose) sempre que possível;
- Optar pela coleta de materiais do local mais profundo e provável de o microrganismo ser isolado, como punções de coleções, fragmentos de tecido ou líquidos cavitários, além de hemoculturas e uroculturas, conforme a suspeita clínica;
- Evitar coleta de amostras superficiais ou que tenham contato com mucosas e, também, por *swab*, pois, além de serem pouco representativas pelo pequeno volume de amostra (apenas 150 mcL) e promoverem resultados falso-negativos, podem provocar resultados falso-positivos por estarem sujeitos à contaminação superficial;
- Considerar também o estágio da doença na escolha do material. Patógenos entéricos, causadores de gastroenterite, estão presentes em maior quantidade e são mais facilmente isolados durante a fase aguda ou diarreica do processo infeccioso intestinal. Já na suspeita de febre tifoide, por exemplo, a fase da doença

determinará o melhor local da coleta (na 1ª semana da doença é mais provável isolar o agente no sangue e, após a 2ª semana, nas fezes);

- Quantidade suficiente de material deve ser coletada para permitir uma análise completa. Caso a quantidade seja pequena, demanda-se a comunicação com o médico do paciente, preferencialmente junto ao microbiologista, a fim de definir prioridades.

É desejável disponibilizar *kits* de coleta, com os materiais necessários de acordo com o tipo de material biológico e instruções de coleta anexadas. Dessa maneira, garante-se a melhor qualidade da amostra.

SEGURANÇA

Todos os materiais biológicos devem ser considerados fontes potenciais de microrganismos patogênicos. Para garantir a proteção dos colaboradores e do ambiente, algumas recomendações são necessárias:

- Utilizar as barreiras de proteção necessárias em cada procedimento, como óculos, luvas, máscara e avental;
- Usar frascos e meios de transporte apropriados;
- Não manusear amostras durante o transporte;
- Sempre verificar se o frasco de transporte está firmemente fechado e não contaminar a superfície externa do frasco de coleta. Caso ocorram respingos ou contaminação na parte externa do frasco, fazer desinfecção cuidadosa com álcool 70% e aguardar secar;
- Transportar os frascos de amostras em sacos plásticos vedados;
- Não contaminar o pedido de exames;
- Identificar corretamente a amostra coletada com a etiqueta do paciente e com dados de data e hora de coleta e o responsável;
- Colocar a identificação do tipo de material e sítio de coleta em etiqueta no corpo frasco, e nunca na tampa ou sobre rótulos;
- Encaminhar os materiais o mais rapidamente possível ao laboratório.

CRITÉRIOS DE REJEIÇÃO

Cabe ao laboratório clínico rejeitar amostras que possam comprometer a qualidade dos resultados ou provocar falsas interpretações. Porém, é preciso ressaltar que a comunicação com a enfermagem e o médico-assistente deve ser feita prontamente, a fim de evitar erros futuros e deixá-los cientes dos motivos que levaram ao cancelamento ou à rejeição do material e uma possível reorientação para uma nova amostra, quando indicado. Esse pode vir a ser um dado para monitoramento por meio de indicadores em busca de melhoria constante.

Além dos erros de identificação do paciente, considerados muito graves, os critérios de rejeição de amostras para cultura, em geral, são:

- Falta de clareza ou identificação do material biológico ou erro de cadastro de exames;
- Material clínico recebido em meio de transporte inadequado, como anticoagulantes, álcool ou formalina;
- Pontas de drenos cirúrgicos ou de sonda vesical (cateter de Foley);
- Material fora da estabilidade (tempo de conservação ou temperatura inadequados);
- Frascos não estéreis;
- Vazamentos, frascos quebrados ou sem tampa, com contaminação na superfície externa ou até mesmo perdendo a integridade do conteúdo interno do frasco;
- Mais de uma amostra do mesmo tipo e do mesmo local coletadas em um mesmo dia;
- Somente um *swab* ou fragmento de tecido muito pequeno com múltiplas requisições de testes microbiológicos;
- Cultura para anaeróbios recebida em condições não apropriadas ou solicitada em materiais como secreções de mucosas de orofaringe, geniturinárias, gastrintestinais ou respiratórias, fezes, colostomia ou urina de micção espontânea;
- *Swab* de lesões, como úlceras varicosas ou de decúbito, queimaduras, gastrostomia ou jejunostomia, que frequentemente representam colonização;
- Vômitos ou conteúdo gástrico ou intestinal.

TRANSPORTE, TEMPERATURA E ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS

Os critérios adotados para aceitabilidade dos materiais para microbiologia variam conforme a natureza e o local de coleta do material e a metodologia utilizada. Em geral, os princípios básicos são:

- Materiais potencialmente contaminados com microbiota da pele e das mucosas, como secreções respiratórias, urina ou fezes, necessitam de refrigeração precoce ou meios de transporte para evitar a proliferação de germes da microbiota capazes de interferir na análise promovendo resultados falso-positivos, e, ao mesmo tempo, garantir a sobrevivência dos potenciais patógenos;
- Os materiais considerados nobres, ou seja, aqueles oriundos de localizações estéreis e cavidades fechadas, como líquido cefalorraquidiano, líquidos cavitários, sangue e punções aspirativas, normalmente têm uma estabilidade maior em temperatura ambiente, pois não há potenciais contaminantes na amostra capazes de interferir na cultura;

- Algumas bactérias exigentes, como *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus* spp., apesar de sobreviverem melhor em temperatura ambiente, requerem condições especiais para crescimento em meios enriquecidos e precisam de maior agilidade para sementeira inicial nos meios enriquecidos e temperatura adequada.

Na Tabela 1, estão destacados alguns pontos críticos com relação à coleta, à manutenção e ao transporte de amostras no período pré-analítico, uma etapa crucial para a garantia da qualidade dos resultados microbiológicos. Neste capítulo, não foram inseridas as amostras de hemoculturas e do trato urinário, pois estão descritas nos capítulos 29 e 30.

O transporte de amostras deve ser realizado individualmente em sacolas plásticas, com a requisição de exame em compartimento separado.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os desafios da fase pré-analítica em microbiologia são enormes, pois existem cada vez menos profissionais especializados na área habilitados a realizar treinamentos. Essa etapa requer uma atuação multidisciplinar envolvendo equipes do laboratório, enfermagem, corpo clínico, comissão de controle de infecção hospitalar, educação continuada, documentação e atualização constante dos manuais de coleta. Além disso, exige revisão periódica dos pedidos médicos se adequando aos novos exames e tecnologias, muitas vezes necessitando da intervenção nos acordos comerciais com vistas não somente ao custo bruto do exame, mas também viabilizando o uso de metodologias com melhor custo-benefício que tenham verdadeiro impacto na vida do paciente, garantindo um diagnóstico rápido, melhor ajuste e sucesso terapêutico e com menor tempo de internação.

O sistema de informação laboratorial (SIL) e os prontuários eletrônicos tornam os profissionais cada vez mais dependentes de um sistema de informática integrado que requer uma participação ativa e integração do microbiologista para garantir que o cadastro e o perfil dos exames estejam compatíveis e correlacionados com as amostras clínicas, padronizar os critérios de rejeição e evitar repetições desnecessárias, além de permitir que sejam liberados resultados parciais e finais em tempo real com acesso instantâneo ao corpo clínico de maneira simples e acessível.

Com a tendência mundial de terceirização dos laboratórios, na qual a análise microbiológica algumas vezes ocorre a distância, deve haver um cuidado muito importante quanto aos ajustes da logística da fase pré-analítica para que sejam garantidas com prioridade máxima as condições das amostras biológicas. Para aquelas amostras cuja estabilidade é curta ou em que a rapidez no resultado venha a ter um impacto clínico muito significativo, como hemoculturas, pode ser necessária a descentralização de alguns processos para áreas próximas ao local de origem para assegurar a qualidade e a rapidez nos resultados.

TABELA 1 Pontos críticos da coleta, transporte e estabilidade de materiais biológicos mais comuns enviados para microbiologia

Material	Pontos críticos – coleta	Tipo de frasco/meio de transporte	Estabilidade
Líquido cefalorraquidiano (LCR)	Após antissepsia da pele, coletar material por punção (1 a 2 mL/ tubo em 3 tubos)	Líquido turvo ou purulento: frasco/tubo estéril com tampa de rosca. Líquido límpido: frasco de hemocultura (enviar também material <i>in natura</i> para bacterioscopia). Bactérias ≥ 1 mL; fungos ≥ 2 mL; BAAR ≥ 2 mL; vírus ≥ 1 mL. Se somente um tubo, enviar primeiro para bacteriologia. Se mais de um tubo, submeter o tubo n. 2	Bactérias: Ideal: ≤ 15 min TA Tempo máximo: ≤ 24 h TA Vírus: Ideal: ≤ 15 min TA Tempo máximo: ≤ 72 h a 8°C
Líquidos cavitários (pleural, pericárdico, ascítico, peritoneal, sinovial e outros fluidos)	Após antissepsia da pele, coletar material por punção (se possível, volume ≥ 5 mL, mínimo 1 mL)	Líquido turvo ou purulento: frasco/tubo estéril com tampa de rosca ou seringa protegida (<i>luer cap</i>). Líquido límpido: frasco de hemocultura (enviar também material <i>in natura</i> para bacterioscopia)	Ideal: ≤ 2 h TA Tempo máximo: ≤ 24 h TA Para pesquisa de fungos ou micobactérias: ≤ 24 h a 8°C
Cateter vascular	Após antissepsia da pele, remover completamente o cateter, cortar assepticamente cerca de 5 cm da ponta distal e enviar imediatamente para evitar ressecamento. Cateter totalmente implantado (tipo Port): enviar a ponta distal em um frasco e o reservatório em outro frasco	Frasco/tubo estéril com tampa de rosca	Ideal: ≤ 2 h TA Tempo máximo: ≤ 24 h a 8°C
Fragmentos de tecido ou biópsias em geral	Material obtido cirurgicamente. Para amostras pequenas, adicionar algumas gotas de água ou salina estéril para evitar ressecamento. Submeter a maior quantidade de tecido possível	Frasco/tubo estéril com tampa de rosca com solução salina o suficiente para evitar ressecamento ou meio de transporte recomendado pelo laboratório	Ideal: ≤ 2 h TA Tempo máximo: ≤ 24 h TA

(continua)

TABELA 1 Pontos críticos da coleta, transporte e estabilidade de materiais biológicos mais comuns enviados para microbiologia (*continuação*)

Material	Pontos críticos – coleta	Tipo de frasco/meio de transporte	Estabilidade
Secreções de feridas abertas ou superficiais	Remover exsudato superficial com gaze embebida em solução salina 0,9% estéril. Aspirar, se possível, com seringa ou passar o <i>swab</i> mais profundamente às bordas da lesão (primeiro <i>swab</i> para cultura e segundo <i>swab</i> para bacterioscopia). Se coleta por <i>swab</i> para bacterioscopia, umedeçê-lo com solução salina estéril para evitar ressecamento. Em caso de material escasso, dar preferência à coleta para cultura	<i>Swab</i> com meio de transporte (Stuart) para cultura. <i>Swab</i> sem meio de transporte para bacterioscopia. Nota: dar sempre preferência à coleta de materiais profundos, punções, biópsias e hemoculturas em vez de amostras por <i>swab</i> . Alguns laboratórios de microbiologia não aceitam amostras coletadas por <i>swab</i> conforme a rotina hospitalar. Verificar indicação local	Ideal: ≤ 2 h TA Tempo máximo: ≤ 24 h TA
Secreções de feridas fechadas ou coleções e abscessos	Após antisepsia da pele, coletar material por punção	Frasco/tubo estéril com tampa de rosca ou seringa protegida (<i>luer cap</i>)	Ideal: ≤ 2 h TA Tempo máximo: ≤ 24 h a 8°C
Lavado broncoalveolar (LBA) ou aspirado traqueal (AT)	LBA: material coletado por meio de broncoscopia com instilação e aspiração de solução salina 0,9%. Para microbiologia, enviar a porção média do aspirado (menor probabilidade de contaminação com trato respiratório superior). AT: utilizando técnica asséptica, aspirar secreção pela cânula, preferencialmente sem diluição da amostra. Caso necessário, anotar no frasco de coleta o volume de salina utilizado para diluição	Frasco coletor universal estéril ou “bronquinho”	Ideal: ≤ 2 h TA Tempo máximo: ≤ 24 h a 8°C

(continua)

TABELA 1 Pontos críticos da coleta, transporte e estabilidade de materiais biológicos mais comuns enviados para microbiologia (*continuação*)

Material	Pontos críticos – coleta	Tipo de frasco/meio de transporte	Estabilidade
Escarro	Coleta preferencialmente em jejum, uma amostra por dia. Orientar o paciente a escovar a gengiva e a língua com água e enxaguar a boca. Coletar material de tosse profunda. Não coletar saliva ou descarga nasal posterior	Frasco coletor universal estéril	Ideal: ≤ 2 h TA Tempo máximo: ≤ 24 h 2 a 8°C
Secreção vaginal	Observar o preparo da paciente de acordo com as normas do laboratório. Remover o excesso de secreção após colocação do espéculo, quando indicado. Obter material do fundo de saco vaginal com <i>swab</i> com meio de transporte para cultura. Para bacterioscopia, coletar mais um <i>swab</i> umedecido em salina estéril para o preparo de 2 lâminas e um <i>swab</i> para inocular em tubo com salina para pesquisa de <i>Trichomonas</i> e leveduras. Para pesquisa de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> ou <i>Mycoplasma/Ureaplasma</i> , coletar <i>swab</i> de colo uterino com suaves movimentos de rotação, preferencialmente após a remoção do material em excesso para cultura. Enviar em meio de transporte indicado pelo laboratório	<i>Swab</i> com meio de transporte (Amies com carvão ou Stuart) para cultura (se indicado). <i>Swab</i> sem meio de transporte para bacterioscopia (ou esfregaço em lâmina). Tubo com 1 mL de salina 0,9% estéril para pesquisa direta (<i>Trichomonas</i> e leveduras). Nota: para pesquisa de <i>Chlamydia</i> , <i>Mycoplasma/Ureaplasma</i> , <i>Trichomonas</i> ou outros agentes específicos: verificar recomendação do laboratório de acordo com a metodologia utilizada quanto à coleta e à estabilidade da amostra	Ideal: ≤ 2 h TA Tempo máximo: ≤ 24 h TA para cultura e pesquisa de fungos

(continua)

TABELA 1 Pontos críticos da coleta, transporte e estabilidade de materiais biológicos mais comuns enviados para microbiologia (continuação)

Material	Pontos críticos – coleta	Tipo de frasco/meio de transporte	Estabilidade
Secreção uretral	<p>Sexo feminino: remover exsudato do orifício uretral. Se secreção abundante na uretra, coletar material com <i>swab</i>. Se material escasso, fazer higiene da genitália com água e sabão e inserir o <i>swab</i> fino 1 a 2 cm na uretra fazendo suaves movimentos de rotação.</p> <p>Sexo masculino: inserir o <i>swab</i> uretral por 2 a 4 cm fazendo suaves movimentos de rotação</p>	<p><i>Swab</i> com meio de transporte (Amies com carvão ou Stuart) para cultura.</p> <p><i>Swab</i> sem meio de transporte para bacterioscopia.</p> <p>Tubo com 1 mL de salina 0,9% estéril para pesquisas diretas (<i>Trichomonas</i> e leveduras).</p> <p>Nota: para pesquisa de <i>Chlamydia</i>, <i>Mycoplasma/Ureaplasma</i>, <i>Trichomonas</i> ou outros agentes específicos: verificar recomendação do laboratório de acordo com a metodologia utilizada quanto à coleta e à estabilidade da amostra</p>	<p>Ideal: ≤ 2 h TA</p> <p>Tempo máximo: ≤ 24 h TA para culturas e pesquisa de fungos</p>
Fezes	<p>Cultura de rotina e <i>Campylobacter</i>: Coleta preferencialmente com conservante (Cary-Blair). Podem também ser oferecidas instruções de coleta ao paciente para coletar <i>swab</i> com meio de transporte Cary-Blair observando a amostragem de porção da amostra apresentando muco, sangue ou pus</p>	<p>Tempo entre coleta e processamento: < 1 hora: amostra sem conservante.</p> <p>Tempo entre coleta e processamento > 1 hora: <i>swab</i> ou frasco coletor universal, com conservante (Cary-Blair)</p>	<p>Ideal: ≤ 1 h TA (sem conservante)</p> <p>Tempo máximo: ≤ 24 h TA (com conservante Cary-Blair)</p>
<i>Swab</i> retal para cultura de vigilância (controle de infecção e pesquisa de bactérias resistentes)	<p>Introduzir o <i>swab</i> 2 a 4 cm a partir da borda anal para o reto fazendo suaves movimentos de rotação e colocar no meio de transporte Para pacientes que se recusam a realizar a coleta, pode ser realizada a coleta de fezes recém-emitidas ou <i>swab</i> de fezes. Para crianças e pacientes imunossuprimidos, preferencialmente coletar fezes recém-emitidas ou <i>swab</i> perianal</p>	<p><i>Swab</i> com meio de transporte (Stuart)</p>	<p>Ideal: ≤ 2 h TA</p> <p>Tempo máximo: ≤ 24 h TA</p>

TA: temperatura ambiente; BAAR: bacilos álcool-ácido resistentes; h: horas.

Surpreendentemente, os microbiologistas recebem mais treinamento sobre a coleta e o transporte de amostras para o diagnóstico de infecção do que os próprios médicos ou profissionais de enfermagem, aqueles que, na maioria das vezes, realizam o procedimento. Por sua vez, os microbiologistas precisam oferecer aos médicos a confiança na acurácia dos resultados e que estes são clinicamente relevantes. Por isso, precisa-se estar sempre vigilante com relação à importância da garantia da fase pré-analítica adequada interagindo com os diversos setores da cadeia e trabalhando sempre em direção à melhoria da comunicação e às parcerias entre as equipes para chegar ao objetivo final: um resultado rápido, acurado e de relevância clínica.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BARON EJ, MILLER JM, WEINSTEIN MP, RITCHER SS, GILLIGAN PH, THOMPSON RB JR ET AL. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). Clin Infect Dis. 2013;57(4):485-8.

JORGENSEN JH, PFALLER MA, CARROLL KC, FUNKE G, LANDRY ML, RITCHER SS, WARNOCK DW (EDS.). Manual of clinical microbiology. 11. ed. Washington: American Society for Microbiology (ASM); 2012.

MACIEL GP, TASCA T, DE CARLI GA. Clinical aspects, pathogenesis and diagnostic of *Trichomonas vaginalis*. J Bras Med Lab. 2004;40(3):152-60.

MILLER JM. A guide to specimen management in clinical microbiology. Washington: American Society for Microbiology; 1996.

MILLER JM, ASTLES R, BASZLER T, CHAPIN K, CAREY R, GARCIA L ET AL.; Biosafety Blue Ribbon Panel; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. Recommendations of a CDC-convened, Biosafety Blue Ribbon Panel. MMWR Suppl. 2012;61(1):1-102. Erratum in: MMWR Surveill Summ. 2012;61(12):214.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Serviços de Saúde. Gerência de Controle de Riscos à Saúde. Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Hospitalar Módulo I. Capítulo 2. Brasília: Ministério da Saúde; 2000.

SIEGEL JD, RHINEHART E, JACKSON M, CHIARELLO L; HEALTHCARE INFECTION CONTROL PRACTICES ADVISORY COMMITTEE. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. Am J Infect Control. 2007;35(10 Suppl. 2):S165-93.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

MUITO ALÉM DA TECNOLOGIA



Workflow de
atendimento integrado



Automação
integrada ao
Controle de
Qualidade
Analítica



Análise do
Turn Around Time, com
monitoramento da
eficiência operacional
dos processos



Gestão de
múltiplas empresas no
mesmo sistema



Tecnologia
totalmente **Web**



Gestão à vista
com **monitores**
em **tempo real**



Módulo de **Vacinas,**
Microbiologia Automatizada



Interoperabilidade
entre sistemas

Soluções completas em software para medicina diagnóstica.

www.shift.com.br

T (17) 2136 1555 | comercial@shift.com.br

 **Shift**
Tecnologia que pulsa

INTRODUÇÃO

O marcador tumoral bioquímico circulante é conceituado como qualquer substância presente no sangue ou em outros fluidos biológicos, produzida pelo tumor ou por algum órgão ou tecido normal, em resposta à sua ocorrência. Uma condição importante para incluir a substância como marcador tumoral é que sua concentração guarde alguma relação com a atividade do processo neoplásico.

Os marcadores tumorais se constituem um importante recurso laboratorial na prática oncológica, não tanto por seu poder diagnóstico dos processos primários, mas por sua capacidade em auxiliar no estadiamento da doença, na detecção precoce de recidiva e como indicadores da efetividade do tratamento.

Uma variedade de substâncias, como enzimas, hormônios e antígenos, pode ser classificada como marcadores tumorais.

Algumas enzimas e isoenzimas que apresentam elevações significativas da atividade total ou variações no padrão de distribuição das isoformas podem indicar a existência de processo neoplásico. Em geral, esse tipo de marcador tem baixa especificidade, encontrando no antígeno prostático específico uma exceção importante.

Hormônios também podem ser utilizados como marcadores tumorais, envolvendo-se de duas maneiras distintas: por produção aumentada pelo tecido endócrino normalmente produtor ou pela produção ectópica por tecido normalmente não produtor de hormônios. Essas duas formas podem ser exemplificadas pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) presente em concentrações anômalas tanto no tumor primário da hipófise quanto no tumor de células pequenas do pulmão, respectivamente.

Algumas substâncias estão presentes em concentrações elevadas em tecidos embrionários e baixas no indivíduo adulto hígido. Em pacientes com alguns tipos de câncer, essas substâncias podem reaparecer em elevados níveis na circulação,

demonstrando que certos genes foram reativados como decorrência da transformação neoplásica. São denominados antígenos oncofetais e os mais amplamente utilizados são o antígeno carcinoembrionário (CEA) e a alfafetoproteína (AFP).

A concentração de determinados antígenos presentes na superfície de células, atuando como receptores moleculares, é significativamente elevada na circulação sanguínea quando da instalação de um processo neoplásico. São exemplos os antígenos carboidratos CA 125, CA 15-3 e CA 19.9, os quais, por essa característica, podem ser utilizados como marcadores tumorais.

A discussão sobre fatores pré-analíticos e interferentes em ensaios laboratoriais em relação à medida de marcadores tumorais bioquímicos circulantes tem relevância, considerando-se a importância da informação contida no resultado e a necessidade de sua correta interpretação.

De modo geral, os interferentes pré-analíticos podem ser divididos em dois grandes grupos: aqueles que se aplicam à maioria dos marcadores e os que afetam, particularmente, um ou um grupo determinado de marcador.

FATORES PRÉ-ANALÍTICOS E INTERFERENTES COMUNS AOS DIFERENTES MARCADORES

Deve-se sempre considerar as condições do paciente previamente à coleta da amostra biológica para a medida de marcadores tumorais no que se refere ao possível uso de substâncias que alterem suas condições habituais. A administração de quimioterápicos ou tratamentos radioterápicos, por exemplo, promoverão elevação, muitas vezes, significativa da concentração de marcadores, e o tempo para retorno aos níveis basais pode variar, conforme não somente o marcador, mas também a natureza e a intensidade do estímulo e a resposta individual.

A qualidade da amostra a ser analisada, incluindo eventual hemólise, lipemia, hiperbilirrubinemia e outras substâncias potencialmente interferentes, como anticoagulantes ou conservantes adicionados à amostra, autoanticorpos e anticorpos inespecíficos, constitui um fator que pode interferir na exatidão dos resultados. O grau de interferência que essas substâncias causam depende, além das suas concentrações na amostra, do próprio marcador em questão e da metodologia utilizada.

Na maioria das vezes, o soro é o tipo de amostra recomendado para a medida de marcadores tumorais. As grandes exceções incluem os marcadores de tumores de bexiga, pesquisados na urina, e os de sistema nervoso central, passíveis de pesquisa no líquido cefalorraquiano. Amostras de plasma coletadas em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), heparina ou oxalato podem interferir nos sistemas analíticos e devem ser evitadas. O gel separador presente nos tubos para amostras de soro, em geral, não causa interferência.

Amostras de soro que apresentem lipemia ou hemólise intensas ou turbidez não devem ser utilizadas para a medida de marcadores tumorais. A causa da interferência

provocada pela lipemia pode ser, entre outras, o bloqueio que o excesso de lipídios é capaz de provocar em relação ao acesso dos anticorpos utilizados nos imunoenaios, além da eventual interferência óptica quanto à leitura final das reações.

Com relação à hemólise, além da maior quantidade de hemoglobina livre, facilmente observada pela coloração do soro, é importante lembrar que a concentração de diversos outros componentes intraeritrocitários fica elevada na amostra e alguns deles podem funcionar como competidores ou inibidores das reações padronizadas sem sua presença.

A metodologia utilizada para a medida da maioria dos marcadores tumorais circulantes baseia-se em imunoenaios, que utilizam anticorpos policlonais ou monoclonais. Nesse tipo de metodologia, as ligações entre a substância pesquisada e os anticorpos se constituem em etapa crítica para o bom desempenho do ensaio.

Anticorpos humanos antianimais são encontrados em até 30 a 40% das amostras. Esses anticorpos se desenvolvem após tratamento com imunoglobulinas de origem animal e, em geral, têm alta avidéz e baixa especificidade, podendo bloquear sítios críticos, interferindo na dinâmica das reações desejadas.

O anticorpo antimurino detectado em humano (HAMA) é o mais frequente, podendo produzir tanto resultados falso-positivos quanto falso-negativos. Curiosamente, esse tipo de anticorpo tem a habilidade de interferir em imunoenaios diferentes, mas não necessariamente em todos os imunoenaios para o mesmo analito, o que promove dificuldades na interpretação de resultados discordantes. Algumas vezes, mesmo a adição de substâncias com a finalidade de bloquear esses interferentes não é suficiente para inibir totalmente o efeito.

Os anticorpos heterófilos no soro humano podem reagir com as imunoglobulinas, interferindo em imunoenaios *in vitro*. Os pacientes rotineiramente expostos a animais ou a produtos de soro animal são mais propensos a apresentar essa interferência, portanto, ocasionalmente, observam-se valores anômalos.

Autoanticorpos contra o analito, com a formação de macroenzimas, podem causar interferência, mesmo em ensaios não imunométricos (p. ex., na medida de prolactina).

Uma característica dos imunoenaios do tipo “sanduíche”, nos quais são utilizados dois anticorpos – um de captura, geralmente na fase sólida, e outro sinalizador, na fase líquida – é o efeito gancho. Quando a amostra contém concentração muito elevada do analito, a ligação do anticorpo sinalizador fica comprometida e a reação não se completa, sugerindo níveis baixos do analito.

Outra possível causa de interferência dependente da qualidade da amostra é o manuseio inadequado do material a ser examinado, como a não refrigeração, caso a análise não seja realizada imediatamente, ou quando submetida a ciclos repetidos de congelamento e descongelamento. Esse processo resulta em desnaturação proteica, formação de complexos insolúveis, inativação de enzimas etc.

A partir de 2012, surgiram os primeiros trabalhos indicando a possibilidade de interferência da biotina, também denominadas vitamina B₇ ou B₈, vitamina H ou coenzima R, em exames laboratoriais que utilizam a reação biotina-estreptoavidina. A biotina está presente em complexos polivitamínicos e em produtos destinados aos cuidados das unhas, da pele e do cabelo. Os ensaios para a medida de alguns marcadores tumorais se utilizam dessa reação, em que os pacientes devem ser orientados a não fazer uso desses produtos pelo menos 72 horas antes da coleta de sangue para a realização dos exames.

A intensidade e o efeito da interferência causada pela biotina dependem do tipo do ensaio realizado. Nos ensaios competitivos, observam-se resultados falsamente elevados, enquanto, nos ensaios tipo sanduíche, podem ser obtidos resultados falsamente rebaixados.

Alguns procedimentos podem ser realizados com a finalidade de identificar interferentes: realizar a medida após diluições seriadas da amostra e avaliar a linearidade; utilizar bloqueadores de imunoglobulinas de diferentes espécies; utilizar ensaio alternativo que, idealmente, empregue anticorpos de espécie diferente do imunoenensaio com suspeita de interferência.

A literatura refere que as taxas de resultados falso-positivos dos ensaios para a medida de marcadores tumorais são em torno de 5%, fazendo necessária a confirmação, com a repetição do exame em nova amostra, de qualquer resultado discordante da expectativa clínica.

Mesmo considerando os avanços no conhecimento dos mecanismos envolvidos nas interferências na medida dos marcadores tumorais, não há um procedimento único que permita neutralizar todas as possíveis causas de inexatidão dos resultados. É preciso um esforço com relação às causas pré-analíticas passíveis de controle e manter estreita comunicação com o solicitante do exame para esclarecer qualquer discordância clínico-laboratorial.

Mesmo que não seja causa pré-analítica de variação, é relevante ressaltar que resultados obtidos por conjuntos diagnósticos de procedência diversa, mesmo baseados no mesmo princípio metodológico, em geral não se correlacionam bem entre si. Ainda que um grande esforço esteja sendo feito para a harmonização dos sistemas analíticos, ainda não se obteve correlação adequada entre os diversos fornecedores. A contribuição para a variação entre as diferentes plataformas e conjuntos diagnósticos para as diferenças dos resultados não é bem compreendida. Uma das causas prováveis consiste na diversidade de especificidade dos anticorpos utilizados nos diferentes ensaios. Por essa razão, é necessária uma atenção especial ao se interpretar resultados seriados obtidos por diferentes ensaios.

FATORES INTERFERENTES PRÉ-ANALÍTICOS EM MARCADORES TUMORAIS MAIS COMUMENTE UTILIZADOS NO BRASIL

Alfafetoproteína (AFP)

Trata-se de uma proteína produzida em grande quantidade durante a fase embrionária e cuja síntese se reduz rapidamente após o nascimento, atingindo os níveis do adulto após 18 meses de idade. É utilizada como marcador tumoral, em especial para tumores hepáticos, estando elevada em cerca de 80% dos tumores sintomáticos, embora se eleve, também, nos tumores de células germinativas (p. ex., não seminoma e coriocarcinoma). Sua medida é relevante na triagem em indivíduos com risco elevado de hepatocarcinoma, ou seja, em portadores crônicos dos vírus das hepatites B ou C e em pacientes com hemocromatose.

Uma causa não neoplásica da elevação de AFP é a gravidez, na qual ocorre elevação fisiológica gradual, atingindo pico de, aproximadamente, 500 ng/mL no 3º trimestre.

Agressão ao parênquima hepático de qualquer etiologia pode causar elevação nos níveis de AFP. Hepatite crônica, cirrose hepática, doença de Wilson, tirosinose hereditária e doença intestinal inflamatória também são causas relativamente comuns de elevação de AFP, mas, em geral, os níveis permanecem abaixo de 200 ng/mL. O tabagismo e o etilismo também elevam os níveis séricos de AFP.

Antígeno carcinoembriônico (CEA)

Está elevado em diversas neoplasias, sobretudo nas do trato gastrointestinal, mas também em câncer de pulmão, ovário, mama e útero. Níveis acima dos intervalos de referência podem ser observados em doenças não neoplásicas, como hipotireoidismo, cirrose hepática, obstrução biliar, pancreatite, enfisema e infecção pulmonar, doença inflamatória intestinal, diverticulite e polipose retal. Em indivíduos fumantes com níveis de CEA significativamente mais elevados que os não fumantes, os intervalos de referência específicos são utilizados para cada uma das situações.

CA 15-3

Esse marcador é expresso por uma variedade de adenocarcinomas, especialmente os associados à mama. Adicionalmente, cirrose hepática e algumas doenças benignas da mama podem elevar os níveis séricos de CA 15-3.

Como os demais marcadores, não deve ser utilizado para diagnóstico, mas apenas para monitoramento da eficiência da terapia, detecção de recidivas e avaliação da progressão da doença. Uma mudança significativa, definida como aumento superior a 25%, correlaciona-se com a progressão da doença em 80 a 90% dos casos.

O tratamento com tamoxifeno aumenta ligeiramente o CA 15-3. Há algumas evidências que sugerem que pacientes submetidos à angiografia retiniana com

fluoresceína podem reter quantidades de fluoresceína no corpo por até 36 a 48 horas após o tratamento. Em pacientes com insuficiência renal, o tempo de retenção pode ser muito maior, o que pode causar valores falsamente elevados ou falsamente deprimidos.

CA 125

A maior indicação clínica para a medida do CA 125 é avaliar a resposta ao tratamento de câncer de ovário, mas a determinação pré-operatória pode ser útil no sentido de prever se as massas pélvicas são benignas ou malignas. Dada sua baixa sensibilidade, não deve ser utilizado como triagem para detecção primária de tumores ovarianos. Esse marcador é bastante útil para o monitoramento tanto da evolução quanto da resposta terapêutica, sendo observada elevação significativa em 2 a 12 meses (em média 3,6) antes de qualquer evidência clínica de recorrência.

Uma aplicação prática importante desse marcador é quando da realização da segunda intervenção cirúrgica. Resultados falso-negativos ocorrem em cerca de 40% dos casos, ou seja, a concentração do marcador está dentro do intervalo de referência, mas a malignidade é demonstrada histologicamente. Por sua vez, resultados falso-positivos praticamente não são observados nessas circunstâncias.

Uma causa não neoplásica que se apresenta com elevação do CA 125 é a endometriose, e esse marcador tem sido utilizado como um auxiliar na avaliação da resposta ao tratamento. Resultados falso-positivos podem ser observados, também, em portadoras de cistos ovarianos, doença inflamatória pélvica, processos inflamatórios do cólon, hepatite e pancreatite crônicas. Derrame pleural ou pericárdio, doenças autoimunes e neoplasias pulmonares e de mama também podem causar elevação dos níveis da CA 125. Importante lembrar que a concentração desse marcador oscila com as fases do ciclo menstrual.

CA 19-9

Trata-se de um antígeno relacionado a tumores malignos do trato gastrointestinal, sobretudo os de pâncreas e vias biliares. Em pacientes com câncer colorretal, em geral, a medida é realizada em associação à do CEA, aumentando a sensibilidade da detecção de recidivas após o tratamento.

Níveis pouco aumentados desse marcador podem estar associados a doenças benignas do trato digestivo, como pancreatite, colecistite aguda, cálculos biliares, colite ulcerativa e doença inflamatória intestinal. Cirrose hepática, independentemente da causa, e icterícia também são acompanhadas de elevação dos níveis de CA 19-9.

Antígeno prostático específico (PSA)

Trata-se de uma enzima produzida pelas células epiteliais da próstata que revestem os ductos e os acinos da glândula. Na circulação, estão presentes tanto o PSA ínte-

gro quanto algumas isoformas, como p2PSA, p5PSA, p7PSA. O PSA íntegro pode circular livre (PSA livre) ou ligado a diferentes proteínas, sendo a principal delas a alfa-1-antiquimiotripsina. Essa fração é denominada PSA complexado.

No que se refere à qualidade da amostra, a hemólise interfere, significativamente, na medida do PSA, fornecendo resultados falsamente baixos, em especial com relação à fração livre do PSA, comprometendo a interpretação da relação PSA livre/PSA total.

Qualquer tipo de agressão mecânica ou química que provoque ruptura da estrutura glandular ou modificações na permeabilidade das membranas da glândula prostática resulta em liberação de maior quantidade de PSA para a circulação sistêmica, promovendo elevação dos seus níveis séricos.

Maior produção fisiológica de PSA pode, também, ser causa de elevação, como visto em indivíduos portadores de hiperplasia benigna da próstata. Igualmente, redução da capacidade de excreção do PSA, ou de algumas de suas formas, como acontece na insuficiência renal, será responsável pela elevação de PSA circulante.

Em geral, essas causas resultam em elevações relativamente discretas de PSA, o qual se mantém em níveis elevados, mas constantes.

Causas traumáticas de elevação de PSA incluem prática de hipismo e de ciclismo, mesmo bicicleta ergométrica, devendo ser respeitado um intervalo de, pelo menos, 2 semanas entre essas atividades e a coleta de sangue para o exame.

Processos infecciosos urinários e prostáticos condicionam alterações significativas na circulação sanguínea e na permeabilidade das membranas da glândula, favorecendo uma maior difusão de PSA para o sangue.

Ainda que questionável por alguns autores, a realização do exame digital retal pode causar elevação do PSA, assim como a instrumentação urológica. Outras causas menos óbvias incluem tempo de jejum prévio à coleta do sangue, ejaculação, uso de alguns medicamentos, como finasterida e ciproterenol, entre outros.

Gonadotrofina coriônica, fração beta (beta-HCG)

A gonadotrofina coriônica é uma glicoproteína sintetizada pelas células do sincitiotrofoblasto da placenta normal. A molécula desse hormônio é constituída por duas subunidades, alfa e beta. A subunidade alfa é comum a vários outros hormônios, como o luteinizante, o foliculo estimulante e o tireoestimulante. A subunidade beta, por sua vez, é específica da gonadotrofina coriônica.

Além da gravidez normal, concentração elevada é encontrada em doenças do tecido trofoblástico e em tumores de células germinativas, principalmente no carcinoma testicular não seminomatoso. Outras neoplasias, como de mama, trato gastrintestinal, pulmão e ovário, podem ser acompanhadas de elevações menos significativas de gonadotrofina coriônica.

O uso de maconha pode aumentar os níveis de beta-HCG, assim como a doença inflamatória intestinal, a úlcera duodenal e a cirrose hepática. Diferentemente do que acontece com a AFP, o tabagismo reduz os níveis de beta-HCG.

CYFRA 21-1

A principal indicação de sua medida consiste no monitoramento da resposta terapêutica do paciente com câncer de pulmão de não pequenas células. A redução rápida da concentração após a cirurgia é um forte indicativo de remoção total do tumor. A progressão ou recidiva da doença é demonstrada, precocemente, pela elevação da concentração do marcador, que antecede as manifestações clínicas e os achados dos exames de imagem.

Valores discretamente elevados, em geral, abaixo de 10 ng/mL, podem ser encontrados em pacientes com hepatopatias e insuficiência renal crônica. Algumas doenças não neoplásicas do pulmão, como pneumonia, tuberculose e doenças intersticiais pulmonares, também podem fornecer resultados elevados.

Enolase neurônio-específica (NSE)

Sob a denominação enolase, reúnem-se diferentes isoformas de uma enzima encontrada em elevada concentração em neurônios e em células de origem neuroendócrina.

A medida dessa enzima no soro é utilizada como marcador para tumores brônquicos de células pequenas. Pode ser utilizada como indicador de prognóstico da doença durante o tratamento, sendo que de 80 a 96% dos pacientes em remissão mantêm a atividade dessa enzima dentro dos intervalos de referência.

Esse marcador pode ser útil, também, para o acompanhamento de pacientes com neuroblastoma, 62% deles apresentando valores acima de 30 ng/mL. Em casos de tumores cerebrais, primários ou metastáticos, como melanoma e feocromocitoma, é indicada a dosagem desse marcado no líquido cefalorraquidiano.

Calcitonina

Produzida nas células do tipo C da tireoide, é secretada em resposta ao aumento do nível sérico de cálcio, contrapondo-se à ação do paratormônio. É útil como marcador do carcinoma medular familiar de tireoide, cuja herança é autossômica dominante, no monitoramento da terapia e na detecção precoce de recorrências.

Está elevada em casos de hiperparatireoidismo, anemia perniciosa e, fisiologicamente, na gravidez.

Proteína de membrana nuclear (*nuclear membrane protein* – NMP-22)

Diferentemente dos marcadores anteriormente descritos, a pesquisa ou a medida dos marcadores relacionados ao câncer de bexiga não são realizadas no soro, mas na urina.

O NMP-22 quantifica o aparelho mitótico nuclear, cuja matriz é superexpressa pelas células tumorais da bexiga e liberada na urina. Estudos clínicos têm evidenciado que, quando o teste é realizado 6 a 40 dias após a cirurgia, níveis elevados são capazes de prever a recorrência em cerca de 70% dos pacientes, enquanto níveis dentro do intervalo de referência são observados em 86% dos indivíduos que não apresentarão recorrência.

Infecção do trato geniturinário, hematúria ou cirurgia recente de bexiga podem causar resultados falso-positivos.

Antígeno tumoral associado ao tumor de bexiga (*bladder tumor associated antigen – BTA STAT*)

Corresponde ao fator H do complemento ou às proteínas a ele relacionadas. O teste se baseia em ensaio cromatográfico e fornece resultado semiquantitativo do fator H e das proteínas relacionadas.

Resultados falso-positivos podem ser obtidos em pacientes com glomerulonefrite, litíase, infecção urinária, hematúria ou que tenham sido submetidos à cirurgia de bexiga recentemente.

Antígeno tumoral associado ao tumor de bexiga (*bladder tumor associated antigen – BTA TRAK*)

Esse exame detecta os mesmos antígenos identificados pelo BTA STAT, mas por ensaio imunoenzimático, sendo, portanto, quantitativo.

Também nesse teste são encontradas elevadas taxas de resultados falso-positivos em pacientes com doenças geniturinárias não neoplásicas, como glomerulonefrite, calculose urinária, infecções geniturinárias, hematúria e cirurgia vesical recente.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ABELEV GI, PEROVA SD, KHRANKOVA NI, POSTNIKOVA ZA, IRLIN IS. Production of embryonal alpha-globulins by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation*. 1963;1:174-80.

ANDRIOLO A. Marcadores tumorais bioquímicos circulantes. In: José Renan Q. Guimarães e vários colaboradores (orgs.). *Manual de oncologia*. São Paulo: Libbs Farmacêutica Ltda.; 2004. p. 663-73.

BOSCATO LM, STUART MC. Heterophilic antibodies: A problem for all immunoassays. *Clin Chem*. 1988;34(1):27-33.

CHAN DW, STEWART S. Tumor markers. In: Burtis CA, Ashwood ER (eds.). *Tietz fundamentals of clinical chemistry*. 5. ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2007. p. 390-413.

DEMIR K, TARHAN F, ORÇUN A, ORÇUN A, ASLAN H, TÜRK A. Effects of ejaculation on serum prostate-specific antigen levels. *Turk J Urol*. 2014;40(1):40-5.

DUFFY MJ, ESTEVA FJ, HARBECK N, MOLINA R, HAYES DF. National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. NACB: Practice Guidelines

and Recommendations for Use of Tumor Markers in the Clinic Breast Cancer (Section 3F). 2006;1-26. Disponível em: <<http://www.aacc.org>>. Acesso em: maio de 2018.

FRITSCHÉ HA, H. Barton Grossman HB, Lerner SP, Sawczuk I. National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumor Markers in Bladder Cancer. NACB: Practice Guidelines and Recommendations for Use of Tumor Markers in the Clinic Bladder Cancer (3H). 2006;1-17. Disponível em: <<http://www.aacc.org>>. Acesso em: maio de 2018.

ISMAIL AAA, WALKER PL, CAWOOD ML, BARTH JH. Interference in immunoassay is an underestimated problem. *Ann Clin Biochem*. 2002;39:366-73.

KAPLAN IV, LEVINSON SS. When is a heterophile antibody not a heterophile antibody? When it is an antibody against a specific immunogen. *Clin Chem*. 1999;45(5):616-8.

LILJA H, SEMJONOW A, SIBLEY P, BABAIAI R, DOWELL B, RITTENHOUSE H, SOKOLL L. National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumor Markers in Prostate Cancer. NACB: Practice Guidelines and Recommendations for Use of Tumor Markers in the Clinic Prostate Cancer (Section 3B). 2006;1-28. Disponível em: <<http://www.aacc.org>>. Acesso em: maio de 2018.

LINK RE, SHARIAT SF, NGUYEN CV, FARR A, WEINBERG AD, MORTON RA ET AL. Variation in prostatic specific antigen results from 2 different assay platforms: clinical impact on 2304 patients undergoing prostate cancer screening. *J Urol*. 2004;171(6):2234-8.

MARKS V. False-positive immunoassay results: a multicenter survey of erroneous immunoassay results from assays of 74 analytes in 10 donors from 66 laboratories in seven countries. *Clin Chem*. 2002;48(11):2008-16.

RODRIGUES-RUBBIO FI, ROBLES JE, GONZÁLEZ A, AROCENA J, SANZ G, DÍEZ-CABALLERO F ET AL. Effect of digital rectal examination and flexible cystoscopy on free and total prostate-specific antigen, and the percentage of free prostate-specific antigen. Differences between two PSA assays. *Euro Urol*. 1998;33(3):255-60.

SAĞLAM HS, KÖSE O, ÖZDERMİR F, ADSAN Ö. Effect of heamolysis on prostate-specific antigen. *ISRN Urology*. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5402/2012/729821>>. Acesso em: maio de 2018.

SINGH I, PRASAD R, AGARWAL V, TRIPATHI RL. Does rigid cystoscopy affect total serum prostate-specific antigen levels? *Indian J Surg*. 2015;77(Suppl. 2):365-9.

SORHAUG S, STEINSHAMN S, HAAVERSTAD R, NORDRUM IS, MARTINSEN TC, WALDUM HL. Expression of neuroendocrine markers in non-small cell lung cancer. *APMIS*. 2007;115(2):152-63.

TATE J, WARD G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev*. 2004;105-20.

TCHETGEN MB, SONG JT, STRAWDERMAN M, JACOBSEN SJ, OESTERLING JE. Ejaculation increases the serum prostate-specific antigen concentration. *Urology*. 1996;47:511-6.

VIEIRA JGH. Avaliação dos potenciais problemas pré-analíticos e metodológicos em dosagens hormonais. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002;46(1):9-15.

INTRODUÇÃO

Na prática clínica, o monitoramento terapêutico de medicamentos (*Therapeutic Drug Monitoring* – TDM tem por objetivo garantir a eficácia do tratamento e a aderência dos pacientes ao tratamento.

O número e a frequência de uso dos medicamentos, bem como a relação de comunicação e confiança entre o paciente e o prestador de cuidados de saúde, são essenciais para influenciar a adesão ao tratamento. A falta de adesão representa um problema sobretudo entre os usuários de medicamentos; as taxas de não adesão também foram relacionadas ao nível de apoio social, educação e socioeconômico. Como a não adesão é mais comportamental do que uma conduta médica, muitos estudos se concentraram em explorar possíveis preditores psicológicos.

Nos Estados Unidos, o número de casos graves reportados aos centros de controle toxicológico aumenta 4,6% ao ano, particularmente o grupo das intoxicações por analgésicos (8,8%/ano) e sedativos, hipnóticos e antipsicóticos (7,1%/ano). A maioria (83,2%) dos casos fatais resulta da ingestão excessiva de medicamentos.

A toxicologia clínica tem como objetivos prevenir e tratar efeitos tóxicos dessas substâncias. O TDM é uma área da farmacocinética clínica que visa à individualização da dose e à otimização dos tratamentos farmacológicos, com o objetivo de alcançar a máxima eficácia terapêutica com a mínima incidência de efeitos adversos. O termo foi descrito pela primeira vez em 1950, aplicado ao tratamento de arritmias cardíacas com quinidina. A utilização da monitoração de drogas tem aumentado desde a segunda metade da década de 1960 com a evolução das técnicas analíticas e dos fundamentos farmacocinéticos da ação de medicamentos.

Atualmente, a melhoria dos cuidados de saúde cria situações clínicas complexas que tornam o TDM relevante na decisão e na gestão terapêutica.

O papel do laboratório está na determinação das concentrações desses medicamentos para melhorar a conduta médica, principalmente nos transplantes de órgãos, quando o risco de rejeição ou efeitos adversos pode provocar danos irreversíveis aos pacientes.

Métodos confiáveis, precisos e exatos são essenciais para monitorar com eficácia os níveis e fazer ajustes apropriados da dose de diversas medicações com vistas ao monitoramento adequado e assegurar que as concentrações sanguíneas ou plasmáticas sejam mantidas dentro da faixa-alvo.

As classes de medicamentos comumente analisadas no laboratório clínico são:

1. Antibióticos: vancomicina, amicacina, gentamicina, cloranfenicol;
2. Antifúngicos: voriconazol, cetoconazol, itraconazol;
3. Antiepiléticos: ácido valproico, carbamazepina, lamotrigina, fenobarbital, fenitoína, topiramato;
4. Benzodiazepínicos: bromazepam, clobazam, clordiazepóxido, lorazepam;
5. Imunossupressores: ciclosporina, tacrolimo, sirolimo, everolimo, metotrexato;
6. Antidepressivos tricíclicos: imipramina, desipramina, amitriplina, clomipramina, nortriptina.

Para a fenitoína e o ácido valproico, recomenda-se a análise em soro, no caso de hipoalbuminemia, da fração livre (forma ativa do medicamento), assim como na uremia, no uso concomitante de fármacos que competem com as proteínas plasmáticas e nas situações de toxicidade inesperada com concentrações plasmáticas totais dentro da janela terapêutica.

Nas condições que causam diminuição da concentração plasmática de albumina (desnutrição, insuficiência renal ou hepática) ou deslocamento do fármaco a partir de locais de ligação (administração concomitante de outro fármaco ou na uremia), a concentração total do fármaco pode subestimar a fração do fármaco na forma livre, e a diminuição dos níveis da alfa 1-glicoproteína ácida nos neonatos, na gravidez e na insuficiência renal ou hepática resulta no aumento da fração livre de fármacos básicos, como a lidocaína ou a imipramina. Ao contrário, os níveis dessa proteína de fase aguda estarão aumentados após situações de queimadura, trauma ou infarto agudo do miocárdio.

Em laboratórios clínicos distintos, o TDM apresenta diferenças metodológicas e práticas, que podem causar a variabilidade observada entre laboratórios. Dados de programas de proficiência mostram uma significativa variabilidade interlaboratorial quando da utilização de métodos cromatográficos.

Sugerem-se três razões principais para a variabilidade interlaboratorial:

1. Falta de padronização de procedimentos laboratoriais e fluxos de trabalho incluindo coleta e manuseio de amostras;
2. Falta de uso de materiais de referência apropriados (p. ex., isótopos-padrão internos para cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem);
3. Baixa conformidade com diretrizes de boas práticas de laboratório internacionalmente aceitas (p. ex., relacionadas ao controle de qualidade, garantia de qualidade, validação, treinamento de pessoal).

FASE PRÉ-ANALÍTICA

Essa fase também contribui para aumentar a variabilidade e, conseqüentemente, a confiabilidade dos métodos.

Com relação à coleta de sangue para a realização de exames laboratoriais, é importante conhecer, controlar e, se possível, evitar algumas variáveis capazes de interferir na exatidão dos resultados. Classicamente, são referidas como condições pré-analíticas a variação cronobiológica, o gênero, a idade, a posição, a atividade física, o jejum, a dieta e o uso de medicamentos para fins terapêuticos ou não. Em uma abordagem mais ampla, outras condições devem ser consideradas, como a realização de procedimentos terapêuticos ou diagnósticos atuais, cirurgias, transfusão de sangue e infusão de soluções. Em situações específicas, os intervalos de referência devem considerar essas diferenças.

É importante lembrar que as mesmas causas de variações pré-analíticas afetam os resultados em idosos, mas a intensidade da variação tende a ser maior nesse grupo etário. Doenças subclínicas também são mais comuns nos idosos e precisam ser consideradas na avaliação da variabilidade dos resultados. A mudança rápida na postura corporal causa variações na concentração de alguns componentes séricos. Substâncias não filtráveis, como as proteínas de alto peso molecular e os elementos celulares, têm sua concentração relativa elevada até que o equilíbrio hídrico se restabeleça. Por essa razão, níveis de albumina, colesterol, triglicerídeos, hematócrito, hemoglobina, de drogas que se ligam às proteínas e o número de leucócitos, por exemplo, podem ser superestimados se a coleta de sangue ocorrer antes que o equilíbrio hídrico tenha se estabelecido. Esse aumento pode ser de 8 a 10% da concentração.

Recomenda-se para a coleta de sangue total tubos com etilenodiaminotetracético (EDTA), que não afeta a contagem celular e altera minimamente o tamanho da célula. A heparina não deve ser usada, pois pode formar crioprecipitados.

As variáveis pré-analíticas têm grande impacto sobre a qualidade dos resultados de laboratório e estão agrupadas em três categorias: variáveis fisiológicas, variáveis

de coleta e fatores de interferência, que podem suscitar interpretações errôneas dos resultados dos exames. Ao fazer a correlação clínico-laboratorial dos resultados, deve-se ter em mente possíveis alterações ligadas às variáveis fisiológicas, como sexo, idade, raça, gravidez etc. Fatores de interferência, como dieta (*grape-fruit* altera a absorção de ciclosporina) e o uso de bebidas alcoólicas que podem causar danos hepáticos e influenciar na absorção de imunossupressores.

Armazenamento

Os componentes dos tubos de soro com gel separador, como o silicone, podem adsorver fármacos e afetar a análise. Em geral, os fármacos afetados são a fenitoína, a carbamazepina, o fenobarbital, a lidocaína, a quinidina e os antidepressivos tricíclicos.

A estabilidade da amostra deverá ser uma das etapas avaliadas no processo de validação do método.

Exemplo: everolimo e sirolimo: até 28 dias (de -30 a -70°C); tacrolimo e ciclosporina: até 14 dias (de -30 a -70°C); plasma (MPA e MPAG): até 28 dias (de -30 a -70°C).

A bilirrubina interfere nos imunoenaios em virtude de suas propriedades químicas, fotométricas e fluorométricas. Por exemplo, está descrita a interferência negativa da bilirrubina (> 20 mg/dL) na análise da concentração de vancomicina por imunoenensaio de fluorescência polarizada (FPIA). A elevação da hemoglobina em amostras hemolisadas é uma fonte de erro, por suas propriedades fotométricas, fluorométricas e quimioluminescentes. A hiperlipidemia e a elevação de paraproteínas no mieloma múltiplo afetam particularmente os ensaios turbidimétricos. Se os resultados forem suspeitos, deve-se repetir a análise com outra técnica ou após tratamento da amostra para eliminar possível interferência.

Durante o procedimento de coleta, devem ser evitados fatores capazes de provocar hemólise (os tubos devem ficar na posição vertical). O avanço tecnológico possibilitou a realização de análises de medicamentos em sangue total. Assim, diante de um resultado não esperado para determinado parâmetro analisado em sangue total, deve-se verificar se este não foi influenciado pela hemólise presente na amostra. Recomenda-se que uma pequena amostra do sangue total seja centrifugada para observar se há ou não hemólise.

Os critérios de aceitação e rejeição de amostras, assim como a realização de análises em amostras com restrições, devem estar definidos em procedimentos documentados. O laboratório precisa ter um sistema para aceitar ou rejeitar amostras biológicas, recebidas ou coletadas por ele, além de registrar aquelas que não estejam em conformidade com os critérios de aceitação definidos. O laboratório deve garantir que os testes realizados em amostras fora das especificações ideais, ou coletados sem o devido preparo, tenham essa condição registrada no laudo, de

maneira a informar as precauções para interpretação do resultado, quando aplicável. Nesse caso, deve haver registros que identifiquem o responsável pela autorização das análises realizadas em amostras com restrições.

Ciclosporina A, tacrolimo, sirolimo e everolimo estão altamente ligados às hemácias e proteínas, e o monitoramento terapêutico é realizado com sangue total. A porcentagem de ligação às hemácias é de 50 a 55% para a ciclosporina A, de 95 a 98% para o tacrolimo e 95% para o sirolimo e o everolimo. Conseqüentemente, alterações no hematócrito e hemólise grave podem afetar a precisão dos resultados dos testes em sangue total.

Especificamente, valores baixos de hematócrito (25%) estão associados com concentrações de tacrolimo superestimadas por alguns imunoensaios, e a superestimacão pode ser explicada pela correção do hematócrito. Além disso, as concentrações intracelulares de inibidores de calcineurina (tacrolimo e ciclosporina) apresentam alta variabilidade interpessoal e intrapaciente.

As concentrações plasmáticas desses fármacos são várias vezes inferiores às do sangue total e as concentrações podem cair abaixo do limite de quantificação do método. Outra limitação do uso de plasma para monitoramento terapêutico é que a medicação não ligada pode se difundir passivamente dentro dos eritrócitos.

A coleta de sangue capilar em manchas de sangue seco (DBS) também pode ser usada como um tipo de amostra para TDM. O sangue de uma picada no dedo é aplicado ao papel de amostragem. O DBS deve ser completamente seco antes do armazenamento ou do transporte para o laboratório para minimizar o crescimento bacteriano. O papel de amostragem é enviado para o laboratório, onde um disco circular é perfurado para fora da mancha de sangue e, em seguida, extrai-se o medicamento da matriz para análise.

Os benefícios do uso do DBS são o fato de que a coleta não exige o uso de flebotomistas, o tempo de amostragem pode ocorrer com conveniência e sem deslocamento para uma clínica para coleta de sangue, o risco biológico é reduzido e a estabilidade do medicamento pode ser mantida no DBS. Calibradores e controles devem ter a mesma matriz em DBS. Amostras de sangue ou sangue hemolisado com um hematócrito anormal terão impacto na precisão dos resultados de algumas drogas. A qualidade do papel de amostragem e o método analítico também afetarão a confiabilidade dos resultados.

O sangue capilar também pode ser utilizado para monitoramento terapêutico em pacientes pediátricos. Outro tipo de amostra para a análise de medicamentos são as células mononucleares do sangue periférico, que podem exigir a separação celular por centrifugação, purificação, extração e análise usando um espectrômetro de massa altamente sensível com quantificação abaixo de 1 pg/mL. Intervalos terapêuticos para DBS e células mononucleares do sangue periférico não estão bem estabelecidos.

Na fase pré-analítica, é de crucial importância que sejam reportadas as informações de maneira completa, quanto à dose, ao horário de coleta após a dose, ao tipo de transplante e a outras medicações utilizadas simultaneamente, com informação adicional da data e hora da última dose, sendo necessário também anotar a concentração da dose.

A coleta antes da próxima dose (vale) é preconizada para a avaliação de concentrações do medicamento, principalmente no período de manutenção e quando há suspeita de que o paciente não está atingindo a concentração mínima eficaz. Quando há suspeita de que o paciente está sendo exposto a doses elevadas e as concentrações estão acima das concentrações máximas desejáveis, a coleta deverá ser realizada após a dose administrada (pico), de acordo com o fármaco; caso o paciente apresente sinais clínicos de intoxicação, a coleta deverá ser realizada em qualquer período pós-dose.

O melhor parâmetro que identifica a exposição ao medicamento é a área sob a curva total (AUC), realizada por coletas em espaços de tempo determinados (p. ex., de 1 em 1 hora), e o período de coleta deve ser ao menos 3 meias-vidas da droga (12 horas, 24 horas etc.); visto que nem sempre a logística para essas coletas é fácil, pois o paciente deve permanecer nesse tempo no local da coleta, opta-se pela concentração mínima (vale) ou pela concentração máxima (pico) ou pela associação das duas coletas para melhor avaliar a exposição do indivíduo ao medicamento estudado. Na Figura 1, está demonstrada a distribuição da medicação após a dose de EC-MPS (micofenolato sódico com revestimento entérico). É necessário conhecer a distribuição do fármaco no organismo para analisar o melhor período pós-dose para a coleta.

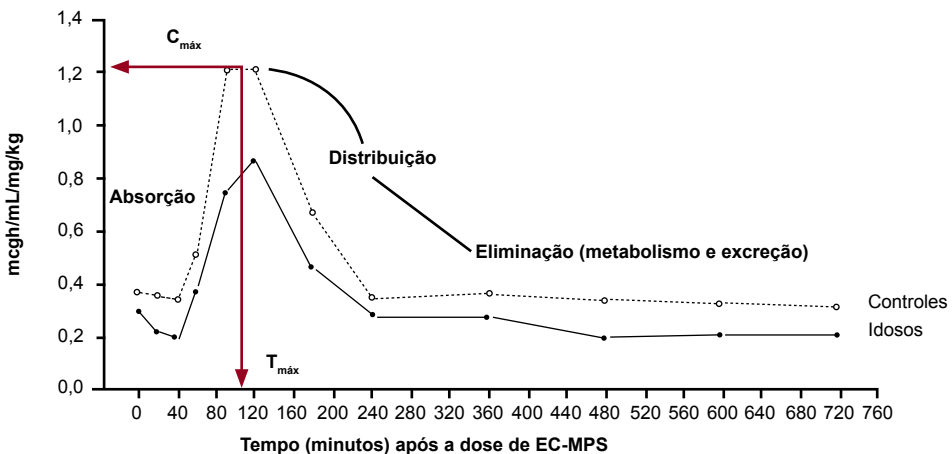


FIGURA 1 Curva farmacocinética (média de concentração) após a dose de EC-MPS (micofenolato sódico com revestimento entérico).

Fonte: adaptada de Romano, 2015.

FASE ANALÍTICA

O TDM (Figura 2) deve ser realizado para medicamentos que apresentam alta variabilidade intra e interindividual, os que têm janela terapêutica estreita ou quando a coadministração com outras medicações pode modificar a absorção do fármaco de interesse. Do mesmo modo, pacientes que apresentam outras comorbidades podem ter a função renal e hepática afetadas, o que pode promover uma diminuição de metabolismo e eliminação desses medicamentos, resultando em um aumento das concentrações no plasma ou sangue total e consequentes efeitos adversos.

O período pós-dose é essencial para o acompanhamento dos pacientes – uma medicação administrada leva ao menos de 4 a 5 meia-vidas do fármaco para atingir o estado de equilíbrio estacionário (*steady state*), sendo muitas vezes necessária a administração de doses mais altas na 1ª semana após a dose, para que a faixa terapêutica seja alcançada e para manter o paciente dentro da faixa de segurança clínica.

As principais vias de metabolismo das medicações são as representadas pelo citocromo P450- CYP450 (fase I: oxidação, redução, metilação, hidroxilação e deaminação) e por uridina glutamiltransferases-UGTs [fase II: conjugação (D-glucoronidação, O-sulfonação, N-acetilação, O-,N-,S-metilação), glutationa ou aminoácido conjugação]. Na fase I, lipofílicos são transformados em polares e não há mudança na atividade dos medicamentos. Na fase II, são formados metabólitos mais polares, mais facilmente excretados pelos rins ou pelas vias biliares e metabólitos inativos. Os metabólitos formados também podem ser metabolizados pelas enzimas das fases I ou II antes da eliminação. Exemplo: tacrolimo, ciclosporina, sirolimo e everolimo são principalmente metabolizados por CYP3A5, MPA por UGT1A9 e azatioprina pela tiomercaptopurina.

Alguns fatores podem alterar a farmacocinética de medicamentos, como lesão renal por redução da excreção, lesão hepática por redução da eliminação, interações entre fármacos, disfunções da tireoide e diarreia.

O monitoramento de certas medicações com uma estreita janela terapêutica melhora significativamente a condição do paciente, por exemplo, a quantificação dos imunossupressores em amostras de pacientes após transplante de órgão é um pré-requisito essencial para a prevenção tanto das reações adversas dos medicamentos quanto dos eventos de rejeição.

A necessidade de medição exata, precisa e padronizada dos medicamentos apresenta um grande desafio para os laboratórios clínicos e a indústria diagnóstica.

Uma multiplicidade de diferentes métodos foi desenvolvida no passado para satisfazer essas exigências.

Atualmente, imunoensaios e métodos baseados na cromatografia líquida em conjunto com espectrometria de massa (LC-MS/MS) consistem nas abordagens mais prevalentes nos laboratórios clínicos. Essas técnicas diferem em muitos aspectos; ao fazer a escolha, o laboratório deve considerar os critérios técnicos, clínicos e econômicos, assim como as qualificações da equipe.

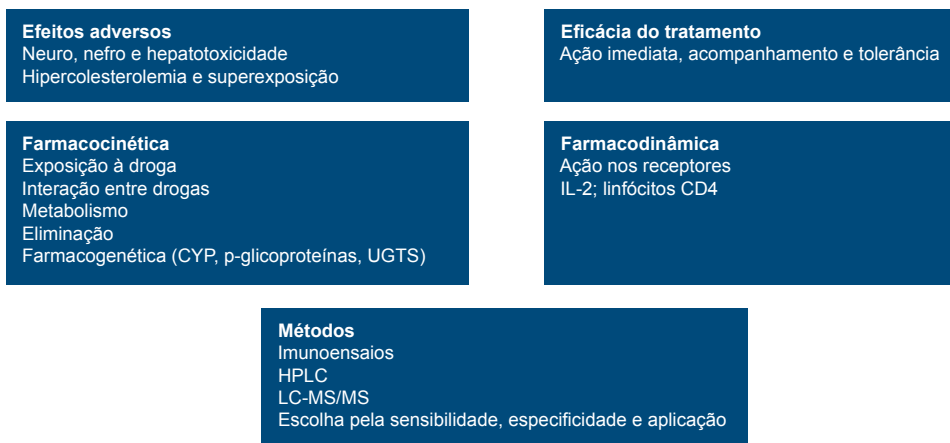


FIGURA 2 Resumo de etapas de conhecimento para um adequado TDM.

Vários imunoensaios produzem resultados que apresentam um viés positivo em relação aos métodos cromatográficos, em razão da reatividade cruzada com os metabólitos pelos anticorpos de detecção. O viés real varia de acordo com o paciente e o tempo pós-dose, entre outras variáveis, mas, em média, os resultados de imunoensaio podem apresentar resultados 20 a 60% mais altos do que aqueles obtidos por técnicas cromatográficas. Os imunoensaios não são validados para matrizes alternativas com possível utilidade clínica para populações especiais e podem não fornecer intervalos de medição analíticos suficientes para apoiar protocolos de conservação selecionados ou estudos farmacocinéticos. Métodos cromatográficos, acoplados a vários detectores diferentes, foram desenvolvidos para superar as preocupações sobre a especificidade e o desempenho dos imunoensaios, em relação ao TDM.

MÉTODOS PARA MONITORAMENTO DE MEDICAMENTOS LC-MS/MS

A espectrometria de massa diferencia a relação massa/carga de átomos ou moléculas ionizadas. Gera íons em fase gasosa, separa-os pela relação massa/carga e quantifica-os com base nessa relação; HPLC é facilmente acoplado a um MS, mas a cromatografia gasosa (CG) necessita de interfaces mais delicadas em virtude do estado em que a amostra sai da coluna. A Figura 3 demonstra algumas etapas para LC-MS/MS para medicamentos.

As colunas, as fases móveis utilizadas na cromatografia e os tipos de analisadores são variáveis de acordo com as características físico-químicas da molécula em estudo.

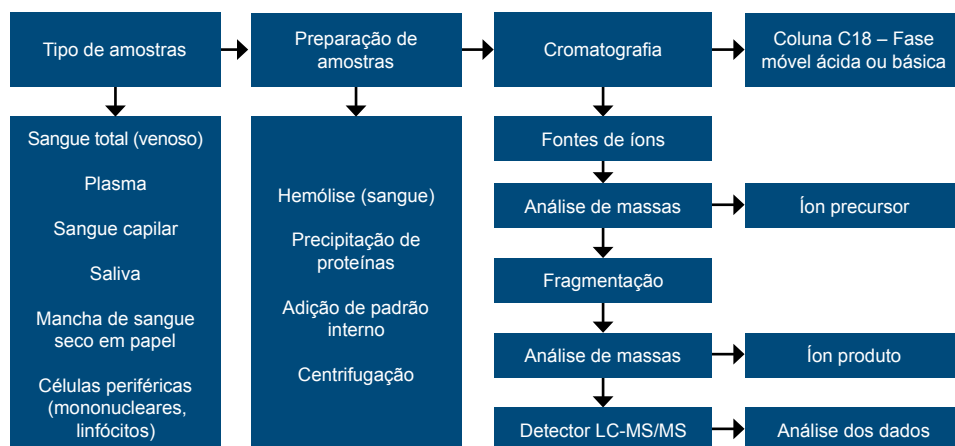


FIGURA 3 Esquema de LC-MS/MS para medicamentos.

Amostras entram no espectrômetro de massa pelo uso de termopulverização, eletropulverização, ionização química pré-secagem atmosférica ou ionização por pressão atmosférica. Em seguida, são guiados por campos elétricos, de radiofrequência ou magnéticos até o analisador de massa. O analisador de massa funciona para separar ou isolar os íons pela sua relação entre a massa e a carga na molécula *versus* tempo. Os analisadores também podem ser projetados para detectar todos os íons em uma faixa de massa, como na espectrometria de massa de tempo de voo, em que os íons são projetados em um tubo de voo e identificados pela massa exata e pelo tempo necessário para atingir o detector. A armadilha de íons, o setor magnético, os espectrômetros de massa de ressonância ciclotrônica e a transformada de Fourier são outras formas de analisadores para seleção de massa. Esses analisadores de massa podem ser acoplados em conjunto para formar tecnologias híbridas, como o tempo de voo quadrupolo (QTOF).

Quando os íons são detectados, o detector converte a quantidade de íons para uma taxa específica de massa para carga em um sinal. Os detectores podem consistir em multiplicadores de fótons ou elétrons. Analisadores de massa têm limitações com relação a maior relação massa-carga que pode ser detectada, resolução de dois picos por unidades de massa, velocidades de varredura para detecção de massa e número de íons capazes de alcançar o detector.

MÉTODOS DE LC-MS/MS PARA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS

Inúmeros métodos de espectrometria de massa foram publicados para a análise de drogas terapêuticas. Algumas das características comuns para a preparação da amostra incluem hemólise, precipitação de proteínas com sulfato de zinco, metanol e acetonitrila, seguidas de adição de padrão interno à amostra, centrifugação e

análise. Os padrões internos usados em vários métodos incluem padrões deutera- dos. A separação cromatográfica geral é realizada por HPLC ou por cromatografia líquida de ultra-alta pressão (UPLC) com uma coluna de fase inversa C18 ou ou- tras específicas para o medicamento de interesse. Pode-se utilizar uma fase móvel de grau binário de passo, que consiste geralmente nos seguintes solventes em com- binação: acetato de amônio, formiato de amônio, ácido fórmico, acetonitrila, meta- nol e água. O pH da fase móvel é acidificado para aumentar a ionização positiva de adultos de amônio $[M + NH_4]^+$, por exemplo, para a molécula de everolimo, cujos metabólitos ativos e inativos geralmente podem ou não ser monitorados.

A ionização também pode ocorrer em modo negativo com perda de prótons (corticosteroides); o importante é conhecer as características físico-químicas de cada molécula (medicamento) e sua afinidade pela fase móvel ou fase estacionária (coluna de separação cromatográfica).

Vale ressaltar que ciclosporina, tacrolimo, sirolimo e everolimo são compostos que não são facilmente protonados (ionizados), mas que formam adutos, preferencialmente com cátions presentes na solução (Na^+ , K^+ , NH_4^+); a adição de tam- pões voláteis ajuda na ionização (p. ex., acetato de amônio).

O laboratório deve monitorar no mínimo duas transições para quantificação com relação massa/carga (m/z) do íon precursor e de um íon produto e usar um segundo íon produto como íon qualificador (o que aumenta a especificidade do método). Na Tabela 1, são apresentados exemplos de transições para medicamentos.

A estrutura química das moléculas ajudará a entender onde e como essas molé- culas serão fragmentadas (Figura 4).

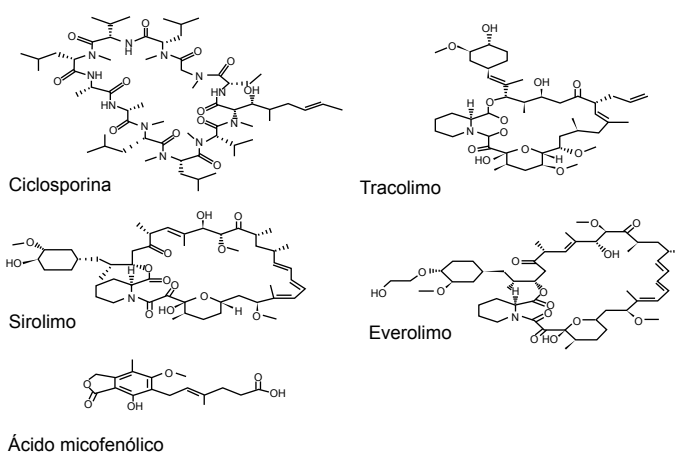


FIGURA 4 Estrutura molecular de imunossupressores.

Fonte: adaptada de Zhang e Zhang, 2018.

TABELA 1 Transições esperadas para algumas drogas e seus padrões internos em LC-MS/MS e parâmetros espectrométricos

Analito	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Dwell time (s)	Voltagem cone (v)	Energia de colisão (eV)	Tempo de retenção (minutos)
Clonazepam	316;2	270,0	0,200	40	25	5,82
Clonazepam-d ₄	320,0	274,0	0,200	40	25	5,83
Clobazam	301,0	259,0	0,200	35	20	4,00
Clobazam- ¹³ C ₆	307,0	265,0	0,200	35	20	4,02
N-desmethyloclobazam	287,0	245,0	0,200	35	20	5,79
Temazepam	301,0	255,0	0,200	25	20	5,78
Tacrolimo	821,1	768,5	0,025	36	22	0,700
Sirolimo	931,6	864,5	0,025	32	18	0,705
Everolimo	975,6	908,6	0,025	32	18	0,705
Ciclosporina A	1219,8	1203,0	0,025	30	20	0,775
MPA	338,1	207,1	0,025	15	25	0,260
MPAG	514,2	206,9	0,025	15	25	0,260
Ascomicina (IS)	809,4	756,4	0,025	32	22	0,660
MPA deuterado (d ₃) (IS)	341,2	210,1	0,025	15	25	0,260
Everolimo deuterado-d ₄ (IS)	979,6	912,5	0,025	32	25	0,705
Ciclosporina A deuterado-d ₄ (IS)	1223,9	1206,8	0,025	30	20	0,775
Sirolimo deuterado-d ₃ (IS)	934,6	864,5	0,025	32	18	0,705
Tacrolimo ¹³ C-deuterado-d ₂ (IS)	824,5	771,6	0,025	36	22	0,700

IS: padrão interno; *dwell time*: tempo de permanência.

Tempo de permanência representa a duração em que cada sinal de íon m/z é coletado. Aumentar o tempo de permanência melhora a contagem de íons do detector, isto é, a sensibilidade, calculando a média do sinal durante um período mais longo. No entanto, isso resultará em menos pontos no pico. Para uma quantificação precisa, o tempo de espera é reajustado para obter pelo menos 10 a 12 pontos

de dados no pico. Fluxos mais altos produzem picos mais nítidos, normalmente tornando os tempos de permanência mais curtos.

IMUNOENSAIOS

Trata-se de métodos analíticos baseados na alta bioafinidade do antígeno e na reação do anticorpo, que forma uma base de radioimunoensaios (RIA).

A seletividade dos anticorpos fundamenta-se na especificidade do local de ligação ao antígeno. Anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais, em que os anticorpos monoclonais são produzidos por um único clone de célula produtora de anticorpos e têm a mesma afinidade. Em contraste, os anticorpos policlonais são mais baratos que os anticorpos monoclonais, mas têm afinidades variadas. Os imunoenaios podem ser classificados em modos competitivos e sanduíche. E, nos princípios de operação, como fluorescência polarizada, quimioluminescência, bioquimioluminescência e eletroquimioluminescência, com base nas técnicas de detecção. A imunoprecipitação é o método mais simples porque não requer um processo de extração. No entanto, a sensibilidade desse método é muito menor em comparação aos métodos com extração para imunoenaios que desempenham um papel importante nos laboratórios clínicos e tornaram-se recentemente mais populares. De fato, os imunoenaios podem substituir os métodos de espectrometria de massa inicialmente estudados. O mais utilizado atualmente é a quimioluminescência (CMIA), um ensaio competitivo em que o medicamento presente na amostra liga-se ao anticorpo (Ac) revestido, procedendo-se à lavagem para tirar o excesso de Ac. Utiliza como marcador a acridina, que se liga à medicação (Ag). A formação da CMIA é medida por unidades de luz (Rlu). A relação indireta do medicamento na amostra com a quantidade de Rlu é detectada pelo sistema óptico.

A análise das vantagens e desvantagens dos métodos analíticos fornece uma orientação geral para a otimização das estratégias analíticas para TDM. Uma das principais vantagens da espectrometria de massa é que os usuários podem desenvolver seus próprios testes. Testes baseados na espectrometria de massa podem ser analiticamente sensíveis, específicos e capazes de medir vários compostos em uma única corrida de análises. Essa é uma abordagem rentável para monitorar pacientes que estejam recebendo terapia multimedicamentosa (p. ex., terapia antiviral para pacientes com HIV). A seletividade fornecida por sucessivas filtrações de massa compreende outra vantagem da espectrometria de massa em relação aos imunoenaios, como é por exemplo para os imunossuppressores. Outra vantagem da espectrometria de massa é a capacidade de desenvolver métodos em um período mais rápido e a autonomia associada de não ter que depender de um fabricante de imunoenensaio para fornecer um novo produto.

Entre as desvantagens dessa técnica, estão requerimentos de grande investimento de capital e de custos de serviços, estar sujeita aos efeitos matriciais e à supressão de íons, e os resultados de diferentes laboratórios necessariamente não são comparáveis, pois são métodos *in house*, com diferentes calibradores, controles, solventes e equipamentos utilizados pelos usuários.

As vantagens dos imunoensaios para a análise de drogas incluem sua fácil integração ao laboratório e a capacidade de medi-los conjuntamente com outros imunoensaios, como aqueles para fatores sorológicos e hormonais. Além disso, imunoensaios para TDM do mesmo fabricante compartilham o mesmo método, calibradores e instrumentação, resultando em uma harmonização efetiva entre os laboratórios. A principal desvantagem é o fato de que esses testes podem ser afetados por reatividade cruzada com metabólitos e outras substâncias.

Ambas as tecnologias têm suas respectivas forças e fraquezas para o uso em TDM. A simplicidade dos imunoensaios automatizados fornece facilidade de uso, ao passo que os métodos de espectrometria de massa exigem uma equipe científica treinada e especializada. Isso pode se tornar até mesmo mais importante quando testes de pacientes “fora das horas normais” são necessários. Outra importante vantagem dos imunoensaios é a capacidade de realizar testes de acesso randômico. Além disso, imunoensaios são fornecidos como uma solução completa para o monitoramento de uma medicação específica, ao passo que os métodos de espectrometria de massa requerem um profissional habilitado para estabelecer um método que possa requerer a fonte dos materiais certificados e dos padrões internos.

Porém, a avaliação das tecnologias deve ser baseada no valor médico e nos benefícios que elas oferecem para os pacientes. No caso de TDM, acurácia analítica e tempo de liberação da amostra (TAT) são de alta prioridade, pela importância de manter valores terapêuticos dentro de um intervalo estreito e predefinido. Embora os TAT sejam comparáveis para as duas metodologias, imunoensaios oferecem uma produtividade muito maior do que a LC-MS/MS. As duas metodologias também produzem resultados comparavelmente confiáveis, embora o fato de que sistemas de imunoensaio automatizados não dependem da dedicação em tempo integral de operadores especializados, o que pode minimizar erros humanos e diminuir a variabilidade de resultados entre laboratórios ou entre períodos de trabalho diferentes no laboratório.

Para a análise de TDM, como em muitas outras análises, espera-se que atenda várias exigências atuais: (a) integração em um laboratório central (que implica elevada automação), elevada consolidação (realizando mais testes em menos plataformas) e redução dos custos de operação; (b) rastreabilidade para acreditação e validação do método; e (c) desempenho analítico em termos de sensibilidade, especificidade, imprecisão, acurácia, possíveis interferências analíticas, robustez e consistência.

Geralmente, métodos de espectrometria de massa são considerados métodos de referência, ao passo que imunoenaios estão mais integrados ao laboratório (mais automação, menos problemas) e em fornecer *kits* e métodos validados [selo de Conformidade Europeia (CE) ou liberação da Food and Drug Administration dos Estados Unidos (FDA)]. Alguns *kits* de diagnóstico *in vitro* de LC-MS/MS estão agora comercialmente disponíveis com selos da CE e liberação pelo FDA, e alguns imunoenaios mostram um desempenho analítico (sensibilidade, especificidade, acurácia) equivalente ao das técnicas de LC-MS/MS. Infelizmente, alguns imunoenaios têm desempenho analítico ruim, e alguns métodos mal validados de LC-MS/MS mostram desempenho inaceitável (p. ex., efeitos da supressão de íons), com ambos promovendo resultados inconsistentes com potencial impacto clínico. Resumidamente, as vantagens da espectrometria de massa incluem a potencial especificidade e sensibilidade analítica, medições múltiplas (quantificação simultânea de várias medicações), flexibilidade, produtividade relativamente alta e potencial para importante economia de custos. As desvantagens incluem falta de automação, necessidade de rigorosa validação (evitar efeitos da supressão de íons), falta de robustez, falta de um serviço de suporte técnico de 7 dias por semana e a necessidade de uma equipe qualificada.

Para imunoenaios, as vantagens incluem automação e integração ao laboratório central, melhor rastreabilidade (*on-line* com um sistema de informação do laboratório, leitores de códigos de barra e *kits* bem validados), nenhuma necessidade de pessoal especializado, robustez e contratos de manutenção acessíveis que incluam suporte técnico de 7 dias por semana. As desvantagens incluem desempenho analítico relativamente ruim, pelo menos para alguns testes como viés de calibração, sensibilidade e especificidade analítica com uma série de potenciais interferências (reatividade cruzada com outros medicamentos ou metabólitos, anticorpos heterófilos, compostos endógenos) e custo dos reagentes.

Qual será a tecnologia líder no futuro? A atual tecnologia líder para TDM são os imunoenaios, o que deve continuar no futuro próximo. Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida de alta resolução é de grande utilidade em áreas como monitoramento de antirretrovirais e drogas imunossupressoras, contudo, não é a tecnologia dominante. Espectrometria de massas também pode ter um papel na evolução do monitoramento farmacodinâmico. Infelizmente, não existem dados clínicos publicados que claramente mostrem que uma das duas metodologias forneça melhores resultados para os pacientes. Tais estudos seriam um importante condutor para levar adiante aquela tecnologia “cl clinicamente superior” no futuro. Imunoenaios, com sua capacidade inata de “achar uma agulha no palheiro”, e a espectrometria de massa, com sua seletiva detecção baseada nas propriedades físico-químicas do analito, são metodologias complementares. A combinação

dessas tecnologias em um instrumento híbrido seria uma ótima união, podendo constituir o futuro da TDM.

Sistemas públicos e privados de tratamento de saúde estão crescentemente procurando pagar pelo valor dos resultados corretos em vez de pagar pelo volume ou o número de diagnósticos; portanto, a tecnologia mais provável de ser amplamente adotada será aquela que oferecer o maior valor médico em termos de benefícios para os pacientes, para os profissionais da saúde e para as fontes pagadoras. Há um impressionante aumento nos usuários da LC-MS/MS em TDM, como mostrado pelos esquemas externos de testes de proficiência. Muito provavelmente, esse progresso permanecerá devido à elevada penetração nos grandes centros diagnósticos, mas dificilmente a LC-MS/MS substituirá os imunoensaios na medicina laboratorial.

Imunoensaio para tacrolimo tem alta produtividade com pré-tratamento automatizado diretamente no equipamento (sem extração prévia); entretanto, esse teste tem sido questionado por interferência de anticorpos endógenos, interferência de fatores reumatóides e alta imprecisão do teste em baixas concentrações. Todas as estratégias para automação, especialmente para os testes que exigem sangue total, devem incluir um robusto passo de extração automatizada que minimize os efeitos matriciais na LC-MS/MS e na interferência dos anticorpos heterófilos nos imunoensaios.

Atualmente, a preparação da amostra *on-line* (tipicamente mudança de coluna) é a base da automação na LC-MS/MS. A automação dos métodos da espectrometria de massa deve ser melhorada. O máximo em automação seriam a amostragem do tubo primário de coleta de sangue, a preparação da amostra com acesso randômico (possivelmente um método genérico) e, finalmente, o relatório direto do espectrômetro de massa. Até que isso esteja disponível, LC-MS/MS não poderá competir com os imunoensaios na questão de automação.

A implicação e o benefício mais óbvio de aumentar a automação são a redução do risco de erro humano e dos custos gerais. Além disso, a racionalização do fluxo de trabalho resulta em imediato valor diagnóstico, acelerando a tomada de decisão clínica pela diminuição do TAT da amostra. Isso, por sua vez, promove decisões de tratamento mais precoces e que ajudam a maximizar a eficácia da terapia e a reduzir o tratamento empírico. O uso da LC-MS/MS carrega várias considerações logísticas e financeiras adicionais não associadas aos imunoensaios, incluindo volumes maiores de resíduos abrangendo solventes orgânicos, custos maiores de energia, maiores exigências de segurança com relação aos compressores, maior tempo de inatividade do instrumento e um ambiente de trabalho mais barulhento.

GARANTIA E CONTROLE DA QUALIDADE

A validação do método é utilizada para avaliar seu desempenho por meio do estudo de precisão (erro aleatório), exatidão (erro sistemático), linearidade, limite

de quantificação e detecção, robustez, estabilidade e efeito da matriz de amostras, sempre antes da implantação da rotina.

REQUERIMENTOS DA PRÉ-VALIDAÇÃO

Qualificação analítica do equipamento, conformidade do sistema e estabilidade das soluções e amostras. A qualificação analítica do equipamento envolve a adequação do equipamento diante de resultados esperados. Para tanto, o equipamento deve estar em boa manutenção e, principalmente, calibrado.

A acurácia e a especificidade devem ser avaliadas por diferentes estudos de desempenho dos métodos, para melhores conhecimento e avaliação dos resultados. Na Tabela 2, estão descritos os resultados obtidos para validação do método de LC-MS/MS na Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (DLC-HCFMUSP) no período de dezembro 2012 a março de 2013, para imunossupressores.

Em LC-MS/MS, soluções estoque para a preparação de calibradores são também utilizadas para preparo de amostras para controle de qualidade (34% dos laboratórios empregam essa prática). Isso é uma fonte potencial de erro, a menos que se verifique a exatidão da solução de estoque periodicamente. Além disso, 25% dos laboratórios utilizam diluições seriadas para a preparação de calibradores, um erro que pode ocorrer em uma dessas etapas se não for analisada a acurácia dessa solução estoque.

Os dados de exames de proficiência representam uma fonte rica de informações. Além da precisão interlaboratorial e do viés, a média intralaboratorial afere a precisão e o viés ao enviar amostras idênticas em diferentes momentos. Adição de amostras enriquecidas com metabólitos de medicamentos ou a inclusão frequente de pacientes nas amostras enviadas permite a discriminação entre o viés do método induzido por matriz (falta de comutabilidade da amostra). Possibilita, ainda, a identificação de um erro de calibração; um rigoroso *design* de método e validação pode prevenir tais situações problemáticas e o viés do método induzido por reação cruzada. Variabilidade de 15% foi observada nas concentrações-alvo (terapêuticas) de tacrolimo e ciclosporina e 20% em concentrações fora do alvo. Para o ácido micofenólico, o sirolimo e o everolimo, os coeficientes de variação (CV%) para concentrações dentro e abaixo das faixas-alvo avaliadas foram 20 e 30%, respectivamente. Considerando que os imunoenaios atualmente disponíveis demonstram comparável variabilidade, os CV% em concentrações mais baixas são mais altos e excedem 20%. Essa variabilidade pode ser minimizada por um método validado corretamente e pela utilização de calibradores e controles comerciais.

A Figura 5 demonstra a variabilidade de LC-MS/MS comparativamente aos imunoenaios para drogas imunossupressoras.

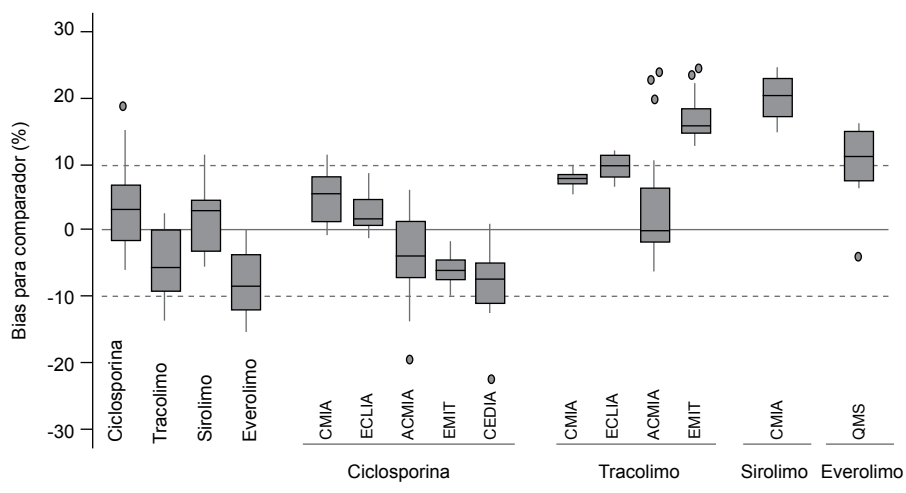


FIGURA 5 Bias em diferentes métodos para análise de medicamentos imunossupressores.

Fonte: adaptada de UKNEQAS PT Scheme (<www.bioanalysis.co.uk>).

TABELA 2 Resultados da validação de método LC-MS/MS na Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (DLC-HCFMUSP)

	Tacrolimo	Everolimo	Sirolimo	Ciclosporina	Ácido micofenólico	Glucoronídeo do ácido micofenólico
Tipo de amostra	Sangue total	Sangue total	Sangue total	Sangue total	Plasma	Plasma
Número de amostras	55	60	20	25	20	20
Coeficiente de correlação (r)	0,9908	0,9650	0,9454	0,9853	0,9327	0,9438
Slope	1,086 (1,045 a 1,126)	1,099 (0,955 a 1,243)	0,734 (0,507 a 0,960)	0,828 (0,663 a 0,994)	0,734 (0,507 a 0,960)	0,279 (0,230 a 0,327)
Intercepto	-1,50 (-2,30 a 0,71)	-0,65 (-1,55 a 0,24)	0,94 (-1,86 a 3,73)	19,65 (-19,84 a 59,14)	0,844 (0,682 a 1,005)	0,06 (-3,28 a 3,38)
Erro-padrão estimado	1,69	0,68	2,14	26,54	0,79	1,30
Precisão intraensaio de amostra baixa CV%	7,8	12,8	16,0	8,4	4,2	4,1

(continua)

TABELA 2 Resultados da validação de método LC-MS/MS na Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (DLC-HCFMUSP) (continuação)

	Tacrolimo	Everolimo	Sirolimo	Ciclosporina	Ácido micofenólico	Glucoronídeo do ácido micofenólico
Tipo de amostra	Sangue total	Sangue total	Sangue total	Sangue total	Plasma	Plasma
Precisão intraensaio de amostra média CV%	5,4	5,3	22,5	2,0	3,6	1,6
Precisão intraensaio de amostra alta CV%	3,9	5,0	17,6	5,2	3,8	1,1
Precisão interensaio de amostra baixa CV%	7,4	12,1	8,8	6,7	9,7	6,0
Precisão interensaio de amostra média CV%	6,2	10,1	8,1	9,3	9,8	3,7
Precisão interensaio de amostra alta CV%	7,3	5,7	4,9	5,3	5,2	2,6
Teste de recuperação	98,3 a 100,9%	97,2 a 100,3%	98,3 a 102,3%	98,0 a 100,0%	98,5 a 100%	99,5 a 100,4%
Verificação de linearidade	40,1 ng/mL	41,5 ng/mL	40,0 ng/mL	1.360 ng/mL	14,5 mcg/mL	350 mcg/mL
Sensibilidade analítica	0,2 ng/mL	0,2 ng/mL	0,2 ng/mL	23,5 ng/mL	0,2 mcg/mL	18,3 mcg/mL
Teste de <i>carryover</i>	0,02 (< 0,33 erro-limite)	-0,02 (< 0,69 erro-limite)	0,06 (< 0,10 erro-limite)	-0,04 (< 2,18 erro-limite)	0,16 (< 0,66 erro-limite)	-0,12 (< 0,40 erro-limite)
Estabilidade da amostra em freezer -30°C	60 dias	60 dias	60 dias	60 dias	60 dias	60 dias
Estabilidade da amostra em 2 a 8°C	5 dias	5 dias	5 dias	5 dias	5 dias	5 dias

mcg/mL= µg/mL

A análise dos controles de qualidade, interno e externo deve ser usada para confirmar a qualidade dos resultados produzidos por qualquer uma das metodologias. Os laboratórios devem ser desafiados com controles de qualidade externos preparados de amostras reais. Uma ação corretiva deve ser obrigatória se os resultados não forem satisfatórios.

Na fase pós-analítica, o laudo deve ser claro descrevendo valores sugeridos para as concentrações no pico ou vale devidamente validados para a população-alvo. Por exemplo, os níveis de imunossupressores no sangue são influenciados pelo tipo de transplante, resposta do paciente, pós-transplante, coadministração de outros medicamentos e formulação de medicamentos; alguns valores sugeridos estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3 Valores de janela terapêutica sugeridos na literatura para imunossupressores

Tipo de amostra	Medicamento	Horário após a dose	Valor de referência
Sangue total	Tacrolimo	C ₀	5,0 a 15,0 ng/mL
	Tacrolimo	C ₂	5,0 a 30,0 ng/mL
	Ciclosporina	C ₀	100 a 400 ng/mL
	Ciclosporina	C ₂	800 a 1.700 ng/mL TX renal
	Ciclosporina	C ₂	600 a 1.000 ng/mL TX hepático
	Everolimo	C ₀	3 a 8 ng/mL TX renal e cardíaco
	Sirolimo	C ₀	4 a 20 ng/mL
Plasma	MPA	C ₀	1,0 a 3,5 mcg/mL
	MPAG	C ₀	35 a 100 mcg /mL

CASO CLÍNICO

Paciente do sexo masculino, 44 anos, portador de transplante renal, tratado com ciclosporina A e sirolimo. O paciente estava clinicamente estável, com concentrações pré-dose direcionada a 80 ng/mL para ciclosporina A e 7 ng/mL para sirolimo. O paciente foi monitorado em seu hospital local, onde o transplante foi realizado, mas mudou para outro estado 3 anos após o transplante por mudança no emprego. Os resultados de TDM obtidos em novo laboratório foram confusos, porque, enquanto o resultado do sirolimo concordava com os resultados de testes anteriores, a ciclosporina A era substancialmente maior que o esperado (100 ng/mL). A investigação do provedor revelou que o laboratório hospitalar original realizou TDM

para ciclosporina A com um método LC-MS/MS, enquanto o novo realizou TDM usando um imunoenensaio monoclonal com detecção por fluorescência polarizada (FPIA) para ciclosporina A e um imunoenensaio quimioluminescente de micropartículas magnéticas (CMIA) para sirolimo. As superestimações das concentrações de ciclosporina A, quando determinadas pela FPIA, relativas à LC-MS/MS, estão bem documentadas e são exageradas quando um paciente também é tratado com sirolimo. Em contraste, o CMIA para sirolimo tem pouco viés com LC-MS/MS.

A análise consistiu em: a mudança entre plataformas, quer entre as plataformas de imunoenensaio, quer entre imunoenensaio e LC-MS/MS ou HPLC, pode produzir resultados diferentes clinicamente significativos.

Se diferentes métodos de determinação de imunossuppressores são utilizados no monitoramento de um único paciente, sem o conhecimento do profissional de saúde, a dose pode ser ajustada inadequadamente com potenciais consequências, como a rejeição do enxerto, se a exposição de medicamentos é muito baixa, ou efeitos colaterais tóxicos, se a exposição é alta.

Pode-se utilizar imunoenensaio ou LC-MS/MS, mas sempre mantendo o método de monitoramento ou, caso não seja possível, informando ao corpo clínico qualquer mudança na metodologia, pois poderá mudar a janela terapêutica.

É preciso lembrar, ainda, que na fase pós-analítica os valores críticos, ou seja, valores quantitativos, devem ser imediatamente comunicados ao médico solicitante ou responsável pelo paciente, já que se trata de resultados que colocam a vida do paciente em alto risco.

O futuro do TDM depende da inovação tecnológica dos métodos analíticos e da farmacogenômica, sendo inúmeros os exemplos de polimorfismos genéticos que se relacionam à resposta clínica. O TDM e a farmacogenômica são duas abordagens de farmacovigilância, que podem servir de apoio à decisão clínica.

Em trabalhos futuros, melhorias nos métodos analíticos devem ser continuamente realizadas em diferentes abordagens para TDM. Para LC-MS/MS, desenvolver métodos rápidos, padronizados e comercialmente disponíveis será a perspectiva. Tendo em mente que a maioria das drogas ligam-se aos glóbulos vermelhos e às proteínas plasmáticas, apenas o fármaco não ligado pode interagir com sítios de ação. Portanto, a determinação da concentração da fração livre de medicamentos pode fornecer mais informações sobre seus efeitos em comparação ao sangue total. Essa abordagem inclui a adaptação de protocolos de extração e, além disso, a obtenção de limites de quantificação muito abaixo dos atuais. Outra abordagem compreende a determinação de concentrações intracelulares (p. ex., em linfócitos) ou o efeito em proteínas-alvo (p. ex., calcineurina). Foi demonstrado que a concentração de algumas medicações em sangue total nem sempre está correlacionada com o efeito da medicação no organismo, e que a variabilidade entre pacientes

desempenha um papel importante. Para imunoenaios, os anticorpos altamente específicos devem ser produzidos para reduzir a reatividade cruzada com metabólitos. Essas mudanças poderão beneficiar a conduta clínica.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BRANDHORST G, OELLERICH M, MAINE G, TAYLOR P, VEEN G, WALLEMACQ P. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry or automated immunoassays: what are the future trends in therapeutic drug monitoring? *Clin Chem*. 2012;58(5):821-5.

BURTIS CA, ASHWOOD ER, BRUNS DE. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2006.

CABRERA FIGUEROA S, FERNANDEZ DE GATTA M, HERNANDEZ GARCIA L, DOMINGUEZ-GIL HURLE A, BUSTOS BERNAL CR ET AL. The convergence of therapeutic drug monitoring and pharmacogenetic testing to optimize efavirenz therapy. *Ther Drug Monit*. 2010;32:579-85.

CHRISTIANS U, JACOBSEN W, SERKOVA N, BENET LZ, VIDAL C ET AL. Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2000;748:41-53.

CHRISTIANS U, VINKS AA, LANGMAN LJ, CLARKE W, WALLEMACQ P, VAN GELDER T ET AL. Impact of laboratory practices on interlaboratory variability in therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2015;37(6):718-24.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Approved Guideline EP-6; Evaluation of linearity of quantitative methods*. 2. ed. Wayne: CLSI; 2009.

DAVID-NETO E, ROMANO P, TRIBONI AHK, RAMOS F, AGENA F, EBNER PAR ET AL. Longitudinal pharmacokinetics of tacrolimus in elderly compared to younger recipients in the first 6 months after renal transplantation. 2017;101(6):1365-1372.

KAHAN BD, KEOWN P, LEVY GA, JOHNSTON A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Ther*. 2002;24(3):330-50.

KORECKA M, SOLARI SG, SHAW LM. Sensitive, high throughput HPLC-MS/MS method with on-line sample clean-up for everolimo measurement. *Ther Drug Monit*. 2006;28:484-90.

KOVARIK JM, BEYER D, SCHMOUDER RL. Everolimo drug interactions: application of a classification system for clinical decision making. *Biopharm Drug Dispos*. 2006;27(9):421-6.

MOWRY JB, SPYKER DA, CANTILENA LR JR., Bailey JE Ford M. 2012 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 30th Annual Report. *Clin Toxicol (Phila)*. 2013;51:949-1229.

MOYER TP, POST GR, STERIOFF S, ANDERSON CF. Cyclosporine nephrotoxicity is minimized by adjusting dosage on the basis of drug concentration in blood. *Mayo Clin Proc*. 1988 March;63(3):241-7.

OLIVEIRA CA, MENDES ME (ORGS.). *Gestão da Fase Analítica do Laboratório – como assegurar a qualidade na prática*. v. I. Controllab; 2011.

POQUETTE MA, LENSMEYER GL, DORAN TC. Effective use of liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) in the routine clinical laboratory for monitoring sirolimo, tacrolimo, and cyclosporine. *Ther Drug Monit*. 2005;27:144-50.

ROTHENBURGER M, ZUCKERMANN A, BARA C, HUMMEL M, STRÜBER M, HIRT S ET AL. Recommendations for the use of everolimo (Certican) in heart transplantation: results from the second German-Austrian Certican. Consensus Conference. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26(4):305-11.

TAYLOR PJ. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit*. 2004;26:215-9.

YU HY. The prescription drug abuse epidemic. *Clin Lab Med*. 2012;32:361-77.

ROMANO P, AGENA F, EBNER P, TRIBONI A, RAMOS F, GALANTE N ET AL. Pharmacokinetics of Mycophenolic Acid (MPA) in elderly compared to young recipients in the first year after renal transplantation. Data from the NEverOld trial [abstract]. *Am J Transplant*. 2015;15(Suppl. 3).

ZHANG Y, ZHANG R. Recent advances in analytical methods for the therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs. *Drug Test Anal*. 2018;10:81-94.

INTRODUÇÃO

As exposições a substâncias químicas tóxicas, as superdosagens medicamentosas e a utilização de substâncias com fins abusivos constituem situações extremamente frequentes. Nem sempre o diagnóstico é simples, pois, em muitos casos, desconhece-se o agente tóxico ou o paciente não colabora com a história clínica. Acrescenta-se o fato de o laboratório clínico nem sempre dispor de todas as informações sobre o quadro clínico do paciente. As exposições a substâncias potencialmente tóxicas são extremamente frequentes tanto em adultos quanto em crianças em todo o mundo. A principal faixa etária na qual ocorrem as intoxicações está entre 0 e 14 anos de idade, mais da metade na faixa até os 4 anos. Deve-se sempre ter em vista que toda suspeita de intoxicação precisa ser observada como uma situação potencialmente grave, mesmo que os sintomas pareçam de pequena intensidade.

O laboratório deve se cercar de alguns cuidados além daqueles citados em outros pontos desta obra. Aspectos ligados a identificação, acondicionamento, critérios de rejeição e, principalmente, limitações sobre procedimentos serão comentados neste capítulo. Essa discussão, limitada anteriormente aos serviços de saúde, visava somente ao aspecto terapêutico. Porém, essa discussão extrapolou essas fronteiras atingindo o aspecto jurídico, quando a preocupação é focada no aspecto criminal, ou, ainda, em outras esferas, como no mundo do trabalho.

Várias dúvidas surgem quando o laboratório se vê envolvido com essas questões:

- Como fazer a coleta, o manuseio e o armazenamento das amostras?
- O exame mostra o uso recente, eventual ou continuado da droga?
- Qual o melhor material biológico para investigação?
- Deve-se estabelecer uma cadeia de custódia da amostra?
- Quais cuidados na medida da alcoolemia?

Fazer, então, o “diagnóstico” do uso dessas substâncias tornou-se a preocupação dos envolvidos com o problema.

INDICAÇÕES DE SOLICITAÇÃO

O uso abusivo de substâncias é responsável por até 50% das entradas nos serviços de emergência nos Estados Unidos. Por essa razão, testes de drogas de abuso incluem testes para substâncias comumente utilizadas para fins ditos “recreativos”, como os opiláceos, cocaína, anfetaminas, canabinoides e benzodiazepínicos. Esses testes também podem ser utilizados em clínicas especializadas em tratamento da dor para avaliar a evolução da terapêutica e detectar o uso inadequado ou abusivo. Clínicas de desintoxicação, especializadas em acompanhamentos de usuários crônicos, podem ser solicitadores frequentes.

Serviços de saúde ocupacional têm promovido uma demanda significativa desse tipo de exame, principalmente naqueles focados em programas de prevenção de drogas psicoativas.

As indicações clínicas se dão, portanto, nos casos em que há suspeita clínica justificada. É muito comum o laboratório ser procurado por pais ou familiares angustiados com a suspeita de uso de drogas por familiares próximos. Não é raro que, inclusive, tragam amostras “coletadas” sem o consentimento do paciente. Nesse momento, é fundamental alertar que, além de todas as dificuldades e fragilidades técnicas desse processo, tal ato implica falta ética e está passível de questionamento legal inclusive. Isso sem falar no impacto extremamente negativo no relacionamento familiar, conseguindo, com isso, piorar uma situação que, de início, já é bastante ruim.

A suspeita justificada no ambiente de trabalho deve ser levantada por um profissional da saúde devidamente treinado. Há algumas exceções, como em programas específicos (caso da aviação civil – RBAC 120), em que supervisores podem fazer essa indicação. Não é necessário ressaltar que, nessas exceções, a supervisão médica é fundamental para evitar equívocos ou aspectos de assédio moral ligado ao trabalho.

HISTÓRICO DO PACIENTE

Quando da coleta do material, deve-se obter o maior número de dados possíveis sobre hábitos e usos de drogas, tanto ilícitas quanto terapêuticas.

No caso de pesquisa de drogas de abuso, precisa-se investigar maneiras não usuais de contato com a droga. No caso da investigação do uso da cocaína, por exemplo, deve-se perguntar sobre o uso de compostos contendo a droga, mesmo em doses pequenas, como chá de folhas de coca. No caso da maconha, pode haver consumo de produtos que contenham a droga, como fibras e óleos.

As drogas terapêuticas, mesmo as tidas como banais, como analgésicos, relaxantes musculares ou, ainda, antigripais, devem ser perguntadas, pois pode haver falso-positivos em drogas de abuso em reações cruzadas para esses tipos de medicamentos. Pode-se citar anfetaminas no caso de antigripais e benzodiazepínicos nos relaxantes musculares. Especial atenção deve ser dada às reações cruzadas para opioides em pacientes em uso de quinolonas.

No caso das drogas ilícitas, tentar conhecer o padrão de uso prévio é bastante interessante, pois uma determinação positiva não consegue distinguir o usuário eventual do crônico.

OPORTUNIDADES DE COLETA

É possível pensar em dois grandes ambientes distintos: em ambulatorios assistenciais e nas empresas

No primeiro, as oportunidades de coleta estão ligadas a demandas clínicas (história, sinais e sintomas). Ainda, há casos de solicitação de acompanhamento clínico dos pacientes.

No âmbito da empresa, em vários momentos, esses testes podem ser solicitados: mudança de função (de não risco para risco, ou seja, na qual o uso de substância psicoativa pode representar risco); sorteio aleatório; retorno ao serviço após teste positivo confirmado; ou, ainda, pós-acidente ou pós-incidente. Também são solicitados para acompanhamento de funcionários em programa de prevenção ao uso de substâncias psicoativas.

Nos exames pré-adimensionais, não se recomenda essa investigação. Há, inclusive, um parecer do Conselho Federal de Medicina (CFM n. 26/2012), que considera não ser eticamente aceitável esse tipo de determinação.

TIPOS DE AMOSTRAS

Pode-se optar por alguns tipos de amostra: sangue, urina, cabelo (as mais usuais) e saliva, suor, líquidos ou tecidos (menos comuns). Aqui, comentar-se-á sobre as vantagens e limitações de cada uma delas.

O *sangue* é a principal amostra que vem à mente. Sua principal vantagem consiste no fato de que nela pode-se determinar a droga-mãe, com seus metabólitos. Porém, trata-se de uma amostra “suja”, ou seja, há grande variedade de possíveis interferentes e, também, a janela de detecção é menor em relação aos outros tipos de amostra. Porém, para fins periciais, a detecção de substância no sangue é uma prova praticamente irrefutável de uso de droga.

A *urina* compreende a amostra de escolha para a maioria das solicitações. A janela de detecção varia de 2 horas a 2 semanas. O volume necessário para análise pode variar de algumas gotas (ou seja menos de 1 mL) até 30 mL, dependendo do teste.

Para os testes de drogas de abuso, a urina tornou-se o material preferido, pois as drogas mais comuns podem ser detectadas por períodos mais longos do que no sangue. A Figura 1 compara as janelas de detecção de algumas amostras. Além disso, a coleta de urina não exige flebotomia e representa uma amostra estável. Isso facilita a triagem para drogas de abuso realizada no local de trabalho a fim de avaliar potenciais empregados e aqueles que executam trabalhos perigosos ou profissões que podem impactar a segurança pública.

Uma consideração quanto ao teste de urina refere-se ao fato de que, quando ela se encontra visualmente turva ou contendo sedimento, pode exigir pré-centrifugação para evitar resultados falso-negativos. Além disso, os médicos devem estar cientes das técnicas de adulteração e possíveis variações pré-analíticas, como aquelas envolvendo variações de pH, gravidade específica, aroma e aparência. Tais achados são indícios que podem sugerir tentativa de adulteração da urina. Quando esses sinais estiverem presentes na amostra, ela deve ser rejeitada pelo laboratório.

A estabilidade da amostra pode sofrer algumas variações de acordo com os processos utilizados, mas gira em torno de temperatura ambiente: 5 dias; refrigerada (2 a 8°C): 15 dias; e congelada (-20°C): 1 mês.

O uso de *cabelo* como amostra biológica vem se tornando cada vez mais comum. Trata-se de uma amostra extremamente estável, de fácil coleta, acondicionamento e envio. O armazenamento também tem baixo custo. A janela de detecção é bastante longa, podendo chegar a 1 ano.

Porém, para conseguir um nível de detecção eficiente, o padrão de uso da droga deve ser grande, pois apenas com quantidades razoáveis e/ou uso frequente ocorre um acúmulo detectável no cabelo. Outro ponto a ser levantado corresponde à ve-

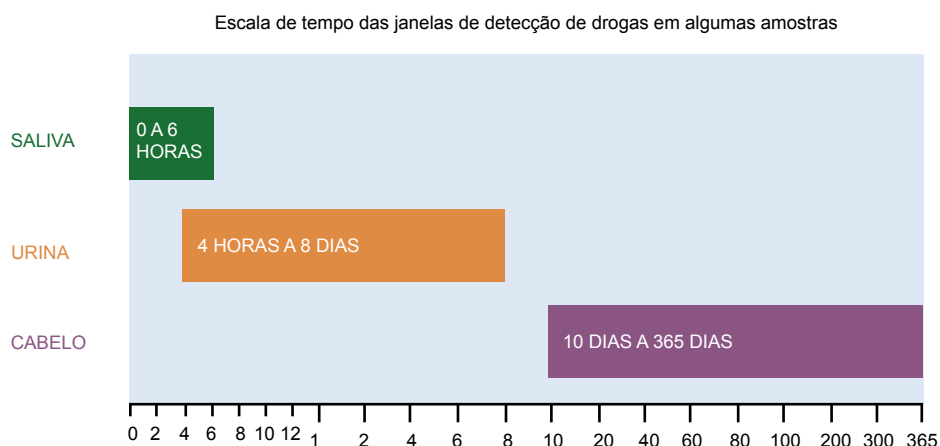


FIGURA 1 Limitações das amostras no tempo.

Fonte: adaptada de <www.dna-worldwide.com/hair-drug-and-alcohol-testing/hair-drug-testing>.

locidade de crescimento do cabelo, de aproximadamente de 1 cm por mês. Assim, a amostra de cabelo utilizada mostra o uso com atraso de mínimo de 1 mês, o tempo necessário para o cabelo emergir do bulbo piloso. Por fim, é uma técnica mais trabalhosa e não está disponível na maioria dos laboratórios.

Fluido oral (*saliva*) é fácil de coletar, não invasivo e é improvável de adulterar. O teste de saliva ainda evita o constrangimento de observar os pacientes que fornecem uma amostra de urina. Isso é particularmente importante se um observador do gênero adequado não está disponível para testemunhar a coleta de urina.

As drogas-mãe, e não os seus metabólitos, estão presentes na saliva e a janela de detecção é diferente do que aquele para a urina. Por essa razão, as drogas podem ser detectadas mais cedo na saliva do que na urina. Assim, os resultados obtidos a partir de saliva podem refletir melhor o comprometimento atual do paciente.

Vários dispositivos de coleta de saliva estão disponíveis no mercado e não há diferença, *a priori*, entre eles quanto ao desempenho.

Porém, testes baseados em saliva têm várias desvantagens. O rastreamento de drogas na saliva pode ser analiticamente difícil porque os analitos estão presentes em concentrações mais baixas e os volumes de amostra são menores. Por exemplo, o fluido oral é um espécime pobre para a detecção de canabinoides. Há, também, os efeitos da contaminação oral e do pH que poderiam influenciar os resultados do teste na saliva; portanto, as variáveis pré-analíticas devem ser cuidadosamente consideradas. Em alguns casos, pacientes que abusam de estimulantes, como anfetaminas ou *ecstasy*, podem não ser capazes de fornecer uma amostra adequada. Finalmente, há pouca informação sobre interferências observadas em testes baseados em saliva. A Tabela 1 compara as amostras resumindo suas diferenças.

TABELA 1 Comparação das características analíticas dos diferentes tipos de amostras para análise de drogas de abuso

Parâmetro	Saliva	Urina	Sangue	Cabelo
Coleta	Não invasiva	Fere a privacidade	Invasiva	Não invasiva
Analito principal	Droga-mãe	Metabólito	Droga-mãe e metabólito	Metabólito
Concentração analito	Baixa	Moderada a alta	Moderada	Baixa
Problemas potenciais	Contaminação oral	Tentativa de adulteração	Janela curta de detecção	Necessita de grande uso
Influência do pH	Sim	Sim	Não	Não

Outros tipos de amostras potenciais para testes drogas de abuso incluem suor, unha e mecnônio.

A coleta de suor é pouco prática. Eliminação de drogas pela pele pode se arrastar por muitos dias, e a coleta é propensa à contaminação externa. Ainda, as concentrações podem variar conforme o local de coleta.

USO DE SUBSTÂNCIAS PRÉVIAS

Ao coletar amostras para avaliação toxicológica, é preciso ter em vista que inúmeras substâncias podem interferir nos resultados; porém, nem sempre associadas a uso ilícito. Assim, uma história clínica mais apurada deve ser obtida pela assessoria do laboratório antes da liberação de um resultado “positivo”, que, na verdade, seria um falso-positivo.

Entre as inúmeras substâncias a serem questionadas, deve-se verificar se há um quadro clínico ou prescrição médica que justifique tal achado laboratorial. A Tabela 2 traz alguns exemplos.

TABELA 2 Principais interferentes pré-analíticos nos exames de detecção de drogas de abuso

Grupos encontrados na amostra	Medicamentos que podem causar reação cruzada
Anfetaminas	Antigripais, antialérgicos, emagrecedores, tratamentos de transtorno do déficit de atenção e hiperatividade
Canabinoides	Canabidiol, estimuladores de apetite
Opioides	Analgésicos potentes, quinolonas
Benzodiazepínicos e barbitúricos	Anticonvulsivantes, psicotrópicos

ETANOL

A coleta para verificação de uso de etanol vem crescendo de modo constante nos últimos tempos em virtude do endurecimento da legislação no Brasil. Assim, algumas considerações particulares devem ser feitas.

A primeira é que a assepsia para coleta de amostra de sangue não deve ser feita com álcool, pois pode haver contaminação da amostra, com eventual resultado falso-positivo.

Os frascos devem ser lacrados e, depois, não mais abertos, sob pena de violar a cadeia de custódia (ver a seguir), bem como haver perdas por evaporação, pela volatilidade da amostra, podendo promover resultados falso-negativos.

As amostras de eleição para determinação de embriaguez são: ar expirado, item explorado em outra obra da SBPC sobre Testes Laboratoriais Remotos; e o sangue, cujos cuidados de coleta foram anteriormente descritos.

A urina pode ser usada para dosar etanol, mas, além de sofrer influência da capacidade de metabolização do indivíduo, a relação etanol urina/sangue não é muito precisa, girando em torno de 1,3 no ápice da circulação do etanol no sangue.

A oportunidade de coleta é fundamental, pois a janela de detenção do etanol no sangue e ar expirado é curta, no máximo 6 horas. Depois disso, pode-se não conseguir comprovar níveis séricos de etanol.

ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS | CADEIA DE CUSTÓDIA

A identificação do paciente a ser submetido a testes de drogas de abuso deve ser a mais cuidadosa possível. É preciso sempre proceder à identificação positiva, que, na prática, constitui a confrontação do paciente com documento legível, em bom estado e com foto recente.

Muitas vezes, em processos de coleta de exame, por exigência de norma legal, exige-se a coleta sob procedimentos de *cadeia de custódia*, constituída de um conjunto de procedimentos que visam a manter a integridade e a inviolabilidade da amostra durante todo o seu processo de análise. Começa na coleta e termina na liberação dos laudos e armazenamento de dados.

O conjunto de coleta (*kit*) deve conter minimamente:

- 2 frascos plásticos de cristal branco de 30 mL com tampas invioláveis;
- Fitas de lacre (duas cores diferentes – uma para ser usada como prova e outra eventual contraprova);
- Copo coletor de 100 mL;
- Documento de custódia em duas vias;
- Envelope de transporte das amostras com lacre.

Os procedimentos de coleta são:

1. O coletador deve ser do mesmo sexo do doador da amostra;
2. Designar previamente o local da coleta de urina ou de outro material biológico; de preferência, um local sem acesso a fontes de água (torneiras, vasos sanitários etc.);
3. O doador da amostra não deve entrar nesse local com jaquetas, paletós etc., assim como com carteiras e bolsas;
4. Verificar a identidade do doador da amostra por meio de documento oficial com foto;
5. Orientar sobre o procedimento e entregar o *kit* de coleta lacrado ao doador para que ele comprove que não houve violação prévia deste;
6. Preencher os campos do documento de custódia, não se esquecendo de nenhum campo;
7. Orientar para que a coleta da urina seja feita no frasco coletor;

8. Para a coleta de urina, deve ser solicitado que o doador da amostra se dispa das vestes até o meio da coxa e no tronco até o sulco inframamário;
9. O responsável pela coleta deve assistir atentamente à coleta;
10. Solicitar que o doador da amostra transfira o volume de urina do frasco coletor para os dois frascos etiquetados, coloque a tampa inviolável nos dois frascos plásticos e, por fim, coloque a fita de lacre nos dois frascos plásticos;
11. No caso da coleta de cabelo, medir a extensão da amostra coletada e acondicionar no envelope adequado, sempre prestando atenção ao posicionamento dos fios, indicando a posição do bulbo (próxima à raiz);
12. É importante ressaltar que não se deve tentar abrir o frasco nem remover a fita de lacre da amostra depois de fechada e lacrada sob o risco de violar a embalagem;
13. Acondicionar a amostra para envio e encaminhar a amostra o mais rápido possível para o laboratório.

O registro do processo deve documentar não somente o que foi feito, mas também quem o realizou. O acesso ao processo deve ser restrito, sendo permitido somente aos funcionários treinados e designados.

Uma questão importante é que esteja bem claro o objetivo do exame: avaliação com finalidade pericial ou clínica. Se o objetivo for somente clínico no acompanhamento de pacientes, os procedimentos de cadeia de custódia podem ser dispensados. Porém, nesse cenário (coletas com objetivo clínico), não se permite a liberação com finalidade pericial, fato que deve ser apontado no laudo, deixando claro que aquele laudo não se presta a tal fim.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. Parecer 26/12. Disponível em: <<http://bit.ly/PzUI72>>. Acesso em: maio de 2018.

JONES AW. Lack of association between urinary creatinine and ethanol concentrations and urine/blood ratio of ethanol in two successive voids from drinking drivers. *J Anal Toxicol.* 1998 May-Jun;22(3):184-90.

JONES AW. Reference limits for urine/blood ratios of ethanol in two successive voids from drinking drivers. *J Anal Toxicol.* 2002 Sep;26(6):333-9.

KLAASSEN CD, WATKINS JB. Fundamentos de toxicologia de Casarett e Doull (Lange). 2. ed. Porto Alegre: AMGH; 2012.

OGA S. Fundamentos de toxicologia. 2. ed. São Paulo: Atheneu; 1996.

PINCUS MR, ABRAHAM NZ. Toxicologia e monitoramento de drogas terapêuticas. In: Henry JB. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 20. ed. Barueri: Manole; 2008.

PORTER WH. Toxicologia clínica. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz, Fundamentos de química clínica. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

PULCHINELLI JR A, ANDRIOLO A. Toxicologia. In: Andriolo A. Medicina laboratorial. 2. ed. Barueri: Manole; 2008.

35 A assessoria médica como ferramenta para discussão dos erros pré-analíticos e interferentes no laboratório clínico

Algumas vezes, vê-se surpreendido com resultados aparentemente discrepantes e que, apesar de confirmados na mesma amostra, ou mesmo em outra amostra, continuam discrepantes. O que observamos em muitos casos, sobretudo em pacientes ambulatoriais, é de que os dados fornecidos pelo médico-assistente são poucos, estão incompletos ou podem não ajudar no encaminhamento de uma averiguação voltada a esclarecer a discrepância observada. Nessas ocasiões, a assessoria médica compreende uma ferramenta importante para contato com o médico-assistente e, dessa maneira, discutir e estabelecer prováveis causas da inconsistência clínica observada no resultado daquele exame. Muitos são os fatores capazes de alterar o resultado de um exame laboratorial; apenas um bom relacionamento profissional entre o médico e o laboratório pode oferecer a melhor solução para o problema, decidindo pela repetição ou correlacionando com os dados clínicos observados pelo médico.

Deve-se lembrar que muitas interferências analíticas podem estar vinculadas à fase pré-analítica, envolvendo cadastro, condições de jejum, atendimento aos critérios de preparo para o exame, coleta, transporte do material etc.

A assessoria médica é um ponto importante nessa ligação para comunicação de resultados críticos, resultados relevantes ou, ainda, discussão de resultados que muitas vezes parecem incoerentes quando analisados à luz das condições clínicas, pela obtenção da amostra pelo paciente, pelo laboratório ou ainda pelo uso de medicamentos que possam ser responsabilizados pela interferência, que pode ser *in vitro*, ou seja, atuando na metodologia. Um medicamento ou seu metabólito pode interferir em determinado método analítico e não necessariamente com outro método de análise. Assim, é necessário que a especificidade dos métodos analíticos seja conhecida. Pequenas diferenças na técnica podem ser decisivas no grau de in-

terferência do medicamento. Isso se aplica, por exemplo, à determinação da creatinina, que pode ser afetada por medicamentos, como ácido ascórbico ou metildopa. É importante ressaltar que aprimoramentos obtidos nas metodologias de análise nos últimos anos reduziram consideravelmente essas interferências. As dosagens dos hormônios da tireoide, por exemplo, atualmente realizados por imunoensaios, entre outras técnicas, substituíram os exames de iodo com ligação proteica. A determinação da glicose sanguínea foi substituída por métodos enzimáticos, mais específicos que os colorimétricos.

A verificação da presença de glicose e hemoglobina no exame simples de urina, em que a pesquisa é realizada por meio de tiras reagentes, cuja reação é enzima-dependente, pode ser afetada pela existência de ácido ascórbico. Dessa maneira, o paciente deve evitar ingerir altas doses de ácido ascórbico 24 horas antes da realização do exame. O próprio teste do nitrito na avaliação da bacteriúria pode ser afetado pelo uso da mesma medicação.

Os efeitos biológicos dos medicamentos com influências na interpretação dos resultados laboratoriais – as interferências *in vivo* – podem ser encontrados:

- Regularmente, em todas as pessoas tratadas com certa medicação;
- Irregularmente, em poucas pessoas em virtude das idiosincrasias.

Os hormônios sexuais têm, frequentemente, consideráveis efeitos metabólicos e causam significativas mudanças no padrão das proteínas plasmáticas, provocando alteração – traduzida por aumento ou diminuição em certos parâmetros bioquímicos.

São comuns os questionamentos sobre os resultados de exame simples de urina (EAS) e urinocultura. As aparentes discrepâncias são advindas de muitos interferentes e as questões são frequentemente voltadas para alterações no EAS com culturas negativas, ou vice-versa.

Alguns exames laboratoriais, apesar de ainda solicitados, são difíceis de padronizar. É o caso do tempo de sangramento, inicialmente introduzido como ferramenta para avaliação da função plaquetária, que deixou de ser realizado em muitos países (p. ex., nos Estados Unidos), visto a difícil padronização do teste e, conseqüentemente, a baixa sensibilidade e especificidade e o comprometimento da reprodutibilidade do teste relacionados à habilidade do técnico. Durante muito tempo, usou-se nos Estados Unidos uma lanceta padronizada na busca de melhor reprodutibilidade, a lanceta de Ivy, de custo muito alto e não utilizada pelos laboratórios no Brasil. Além de todas as questões apresentadas, têm-se, ainda, condições inerentes ao indivíduo, como a redução de plaquetas funcionalmente ativas, além do uso de medicamentos que podem interferir na função plaquetária (p. ex., uso de ácido acetilsalicílico). Este pode ter efeitos adversos não encontrados com

outros salicilatos, como leucopenia, tempo de sangramento prolongado e trombocitopenia. Desse modo, o uso de ácido acetilsalicílico e de anti-inflamatórios não esteroidais afeta a função plaquetária, provocando uma interferência significativa no resultado de testes de função plaquetária e no tempo de sangramento.

Considerando que não existe um exame para substituir o tempo de sangramento (TS) na avaliação pré-cirúrgica do risco hemorrágico, a investigação adicional deve ser direcionada pela história pessoal e história patológica pregressa de sangramento. Desse modo, existindo referências anteriores ou familiares, pode-se complementar a avaliação pré-cirúrgica com teste de agregação plaquetária, na suspeita de plaquetopenias hereditárias ou até mesmo provas que avaliam a função das plaquetas, como o PFA-100, na hipótese de alteração medicamentosa ou de doença de von Willebrand.

O uso da biotina exógena, presente em compostos polivitamínicos e fórmulas para cuidados com cabelos e unhas, pode provocar interferência, considerando que algumas dosagens realizadas no laboratório, principalmente as hormonais, utilizam a biotina na reação. Desde 2012, a literatura evidencia trabalhos que apontam tal interferência, principalmente em dosagens hormonais, ganhando reforço a partir de 2018, com várias publicações que mostram essas alterações nos exames de avaliação da função tireoidiana (TSH, T4 livre e T3). Testes de pacientes que usavam altas doses de biotina apresentaram resultados falsamente elevados dos hormônios tireoidianos e resultados com valores baixos de TSH sem nenhuma manifestação clínica. Ensaios como FSH, LH, testosterona, ferritina e marcadores tumorais, entre outros que empregam a biotina, podem ter resultados alterados. Deve-se considerar, portanto, que resultados nesses testes devem ser repetidos após a suspensão da substância. Esses comentários têm o propósito de levar a uma questão considerada importante na relação laboratório *versus* médico-assistente: como este age diante de um resultado aparentemente discrepante? É importante estabelecer um contato com o laboratório e ouvir a opinião e parecer do seu colega patologista clínico ou do profissional habilitado no laboratório. É essencial o diálogo entre o médico-assistente e o laboratório. O autor deste capítulo parte da premissa de que esse diálogo é salutar, visto apresentar aspectos muito importantes e que pode ser conduzido pela assessoria médica não somente na comunicação de resultados críticos, relevantes, mas também na correlação clínico-laboratorial:

1. Deflagra uma relação conflitante entre os profissionais e o contato que pode evidenciar capacidades na administração desses conflitos;
2. Mobiliza o laboratório para certificar-se de seus resultados e rastrear as ações desde a coleta até a emissão do laudo na procura de falhas pré-analíticas;
3. Complementa informações necessárias para ambos com relação a possíveis interferentes pré-analíticos realizados pelo cliente, ou obtenção de amostra em

situação não conforme por parte do cliente, instruções erradas quanto a necessidade de jejum, repouso, dietas, suspensão de medicamentos e informações do uso de medicamentos que interferiram na análise e na interpretação dos resultados etc.;

4. Durante os exames laboratoriais, podem surgir evidências de outras patologias associadas à patologia de base e que somente são evidenciadas nos exames laboratoriais e, ainda, não ter expressão clínica evidente. Nesses casos, o médico poderá ficar atento para uma nova abordagem com o paciente;

5. Estimula a busca da qualidade que ambos os profissionais querem alcançar e que tem como beneficiário mais importante do processo o próprio paciente;

6. A confirmação das alterações observadas nos exames laboratoriais aguça os profissionais para a busca de explicações que possam elucidar essas alterações.

Considerando que são muitas as possibilidades de alterações nos exames, representadas por interferências pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas, o diálogo é a oportunidade que terá o profissional do laboratório de rever seus métodos e protocolos e se constituirá em uma oportunidade de reavaliação do processo. Se assim for, convém assumir que a vulnerabilidade está em ambos os lados porque, ao se partir da afirmativa de que sempre se está certo, não haverá diálogo. Por fim, vale sempre a pena esse diálogo quando se tem à frente o motivo pelo qual se mobilizam as emoções.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

GUDER WG, NARAYANAN S, WISSER HT (EDS.). *Samples: from the patient to the laboratory. The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results.* 2. ed. Darmstadt, Git Verlag GMBH; 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL (SBPC/ML). *Gestão da Fase Pré-Analítica: Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).* 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL (SBPC/ML). *Notícias: Medicina Laboratorial. Revista Informativa da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial.* 2016;7(85).

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL (SBPC/ML). *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): coleta e preparo da amostra biológica – Barueri: Manole/Minha Editora; 2014.*

YOUNG DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests.* 3. ed. Washington: AACC Press; 1991.

* O conteúdo descrito no material informativo a seguir é de responsabilidade da empresa que o produziu e não representa necessariamente a opinião ou uma recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).



AlinIQ



TRANSFORME O SEU LABORATÓRIO EM UM CENTRO DE SUPORTE À DECISÃO

O SEU LABORATÓRIO ESTÁ PREPARADO PARA O FUTURO?

AlinIQ Impulsiona você a transformar o seu laboratório em um centro de suporte à decisão e a atingir, de forma mensurável, uma melhor performance na área da saúde.

Acesse AbbottDiagnostics.com/AlinIQ

CHOOSE TRANSFORMATION™

MP12JUL2018D - Exp. Date: 11 de Julho de 2020

Índice remissivo

A

Anticorpos antimurinos detectados em humanos (HAMA) 182, 183
ELISA 188

Anticorpos antinucleares 174

anti-DNA 175, 176

anti-Sm 176

FAN HEp-2 175

fator antinuclear (FAN)

imunofluorescência indireta 175

lúpus eritematoso sistêmico (LES) 175

parvovírus B19 175

síndrome lúpus-*like* 175

Anticorpos

antinucleares (ANA) 167

heterofílicos 181

heterófilos 180, 182

monoclonais 182, 184, 188

Assessoria médica 416

erros pré-analíticos 416

fase pré-analítica 416

interferência

in vitro 416

in vivo 417

- uso de medicamentos 417
 - ácido acetilsalicílico 417
 - biotina 418
 - trombocitopenia 418
- Autoanticorpos 167

B

- Biotina 135, 155
 - alterações laboratoriais 142
 - imunoensaios 138
 - interferência 138, 144, 155
 - hipertireoidismo 156

C

- Células HEp-2 168
- Coletas 8
- Controle de qualidade 31
 - controle interno (CI) 31
 - ensaio de proficiência (EP) 31
 - erros 31, 32, 33, 34, 38, 45
 - inadequação 32, 33, 40, 41
 - material de controle 35, 36, 40, 41, 42, 43, 44, 46
 - programas de 32
- Cultura geral 365
 - coleta 366
 - condições pré-analíticas 366
 - estabilidade das amostras 368
 - exames microbiológicos 365
 - qualidade dos resultados 367
 - segurança 367
 - temperatura 368
 - transporte 368

D

- Diabetes melito (DM) 205
 - insulina 205, 210
 - teste laboratorial remoto (TLR) 206

- glicose 206
- glicosímetro 206
 - glicemia capilar 206
- interferentes 210
- Diagnóstico molecular 310
 - ácidos nucleicos 311
 - anticoagulantes 314
 - compartimentos 311
 - controles de processo 319
 - DNAses 313
 - interferentes 314
 - RNAses 313
 - temperatura de armazenamento 316
 - temperatura de transporte 316
 - tempo entre a coleta e a realização dos exames 316
- Dímero D (DD) 269
 - fator XIII 269
 - fibrinólise 269
 - plasmina 269
 - produtos de degradação da fibrina 272
 - trombina 269
- Doenças hematológicas 275
 - citometria de fluxo 275
 - cuidados pré-analíticos 275
 - estabilidade 276, 277, 278
 - imunofenotipagem 275, 278, 283
 - materiais nobres 275, 277, 278, 279
 - medula óssea 275, 276, 277, 278, 279, 282
 - mieloma 277, 282, 283
- Doenças infecciosas 161
 - sorologia 161
 - biotina 164
 - especificidade 162
 - imunoglobulina A (IgA) 162
 - imunoglobulina M (IgM) 162
 - reatividade cruzada 162, 163

Drogas de abuso 408
 anfetaminas 409, 410, 412, 413
 barbitúricos 413
 benzodiazepínicos 409, 413
 cadeia de custódia 408, 413, 414, 415
 canabinoides 409, 413
 cocaína 409
 etanol 413, 414
 opioides 413

E

Eletroforese 301
 imunoeletroforese 301
 imunofixação 301
 interferentes exógenos 305
 antifúngicos e antibióticos 305
 contrastes radiológicos 305
 terapias monoclonais 306
 daratumumab 306
 elotuzumab 306
 siltuximab 306
Eletroforese endógenos
 interferentes 303
 fibrinogênio 303
 hemólise 304
Exame de rotina de urina 339
 exame físico-químico 339
 sedimento urinário 342
 técnicas automatizadas 339
 técnicas manuais 339
 tiras reagentes 339, 340, 341
Exame de urina 330
 atividade física 331, 337
 coleta segura 336
 dieta 331, 337
 frascos de coleta 336

- instruções 332
- instruções de coleta 334
- preparo do paciente 330
- refrigeração 336
- tipos de amostras 332

F

- Fator antinuclear (FAN) 167
 - imunofluorescência indireta (IFI) 168
 - células HEp-2 168
 - interferentes 171
- Flexibilização do jejum 49
 - meta terapêutica 53
 - perfil lipídico 49, 53, 55
 - pós-prandial 49
 - risco cardiovascular 53
 - sem jejum 50, 51, 52
 - valores referenciais 53

G

- Gasometria 231
 - cálcio ionizado 238
 - CO-oximetria 234
 - heparina 232
 - lactato 236
 - P₅₀ 234
 - teste de Allen 233
- Gel separador 58
 - anel de células 66
 - fibrina 66
 - erros pré-analíticos 62, 63
 - fibrina 63, 66
 - filetes de fibrina 67
 - manchas 64
 - medicações terapêuticas 61
 - plasma 58, 59, 61, 65, 67, 68
 - soro 58, 59, 61, 63, 64, 65, 67

- tixotrópico 59
- tubos 65
 - coleta 58, 59, 61, 66
 - plasma 65
 - qualidade do soro ou plasma 65
 - soro 65
- tubos a vácuo 58
- Gestão 1
 - erros 1, 2, 3
 - pré-analíticos 1, 2
 - coleta 2, 4, 8
 - indicadores 10, 11
 - teste 3
 - qualidade 1

H

- Hemocultura 346
 - bacteremia 347
 - fase pré-analítica 349
 - coleta da amostra 350
 - infecções de corrente sanguínea (ICS) 346
- Hemograma 249
 - EDTA 253
 - fatores pré-analíticos 249
 - interferentes 252
 - coágulos 253
 - crioaglutinina 253
 - crioglobulina 253
 - eritrócitos não lisados 255
 - excesso de EDTA 253
 - fragmentos de leucócitos 255
 - hemácias microcíticas 255
 - hemólise
 - in vitro* 254
 - in vivo* 254

- heparina 254
- hiperglicemia 254
- leucocitose 254
- lipemia 254
- plaquetas gigantes 253
- proteínas monoclonais 255
- plaquetas 250, 251, 253
- problemas pré-analíticos 257

Hemólise 71

- cianometá-hemoglobina 75
- fase pré-analítica 71
- haptoglobina 79
- “índices séricos” 76
- intravascular 79
- in vitro* 72, 73
- in vivo* 72

I

Imunoensaios 178

Índice sérico 87

- bilirrubina 89
- hemólise 88
- interferência espectral 90
- interferência no processo analítico 89
- interferência óptica 89
- lipídios 90

Interferência dos anticorpos humanos circulantes reativos contra
proteínas animais (anticorpos antianimais) –
human anti-animal antibody (HAAA) 178

falso-positivos 178, 180

imunoensaios 181

- interferências analíticas 181

interferência

- antianimal 182

- heterofílica 182

Interferentes 21, 111

analítico 119, 122, 123
detecção 113, 117, 119, 123, 126
estudo 21, 22
 critérios de interpretação 24
 CLIA-88 (Clinical Laboratory Improvement Amendments) 24, 25
 desempenho aceitável 25
 erro sistemático 22, 23, 24
imunoenaios 111
interferências pré-analíticas 113
laboratoriais 21
redução 125, 126
remoção 115, 125, 126

L

Líquido cefalorraquidiano (LCR) 285
 encefalite 292
 punção lombar 286
 anticoagulantes 287
 hematoma espinal 287
 hipertensão intracraniana 286
 meningite 288
Lúpus eritematoso sistêmico (LES) 167

M

Marcadores tumorais 376
 alfafetoproteína (AFP) 380
 antígeno carcinoembrionário (CEA) 380
 antígeno prostático específico (PSA) 381
 antígeno tumoral associado ao tumor de bexiga
 (*bladder tumor associated antigen* – BTA STAT) 384
 antígeno tumoral associado ao tumor de bexiga
 (*bladder tumor associated antigen* – BTA TRAK) 384
CA 15-3 380
CA 19-9 381
CA 125 381

- calcitonina 383
- CYFRA 21-1 383
- enolase neurônio-específica (NSE) 383
- gonadotrofina coriônica, fração beta (beta-HCG) 382
- proteína de membrana nuclear (*nuclear membrane protein* – NMP-22) 383
- Monitoramento terapêutico de medicamentos (TDM) 386
 - controle da qualidade 400
 - farmacocinética 386, 391
 - fase analítica 392
 - farmacocinética 392
 - fase pré-analítica 388
 - armazenamento 389
 - imunoensaios 397
 - LC-MS/MS 393, 394

T

- Temperatura 96
 - fase pré-analítica 97
 - glicose 100
 - hemograma 104
 - potássio 100
 - transporte de amostras 104
 - tubos pneumáticos 105
- Tempo de protrombina (TP) 294
 - citrato de sódio 295
 - hemostasia 294, 295
 - recém-nascidos 297
- Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) 294
 - ácido elágico 298
 - hemostasia 294
 - sílica 298
- Teste laboratorial remoto (TLR) 195
 - coleta 197
 - glicosímetros 201
 - identificação 196

- interferentes 199
- point of care* (POCT) 195
- preparo do paciente 197
- transporte das amostras 198
- Troponinas cardíacas 220
 - alta sensibilidade 220, 223
 - hemólise 223
 - infarto agudo do miocárdio (IAM) 220
 - interferentes analíticos 222
 - síndrome coronariana aguda (SCA) 220

U

- Urocultura 358
 - American Society for Microbiology (ASM) 359
 - contaminação 361
 - leucocitúria 362
 - micobactérias 360
 - recomendações pré-analíticas 359
 - taxa de contaminação 358

Conheça as vantagens de se associar à SBPC/ML



Nossos associados são médicos patologistas clínicos e de outras especialidades, farmacêuticos-bioquímicos, biomédicos, biólogos, técnicos e outros profissionais de laboratórios clínicos, estudantes de nível universitário e nível médio. Também podem se associar laboratórios clínicos e empresas fabricantes e distribuidoras de equipamentos, produtos e serviços para laboratórios.

Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

Sua participação pode ser gratuita no maior evento de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial da América Latina, com palestrantes brasileiros e estrangeiros e Exposição Técnico-científica, com produtos, equipamentos e serviços para laboratórios clínicos.

Eventos da SBPC/ML ou em parceria

Desconto na inscrição de Eventos científicos regionais realizados pela SBPC/ML ou em conjunto com outras instituições científicas.

Cursos presenciais PALC

Desconto na inscrição em cursos exclusivos para formação de auditores, internos e externos, do Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC) da SBPC/ML.

Outros produtos

PALC - Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos

Programa de Indicadores Laboratoriais

Ensaio de Proficiência

Labtests Online BR - labtestsonline.org.br

Mantido e atualizado pela SBPC/ML, sob licença da American Association for Clinical Chemistry (AACC).

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

Publicações Técnicas impressas

Receba as edições impressas anualmente sobre temas de interesse para profissionais de laboratórios clínicos e estudantes.

Ensino à Distância - ead.sbp.org.br

Associado SBPC/ML pode se manter atualizado, com inscrição gratuita nos cursos à distância.

Biblioteca Digital SBPC/ML - bibliotecasbp.org.br

Acesso a área exclusiva, com apresentações de congressos, aulas de EAD, vídeos etc.

Revista Notícias Medicina Laboratorial

Receba o periódico da SBPC/ML com reportagens, artigos e entrevistas que interessam aos profissionais de laboratórios clínicos.

Portal SBPC/ML

sbpc.org.br

Informativo SBPC/ML

Boletim eletrônico com notícias e informações de interesse para os profissionais de laboratórios e estudantes.

TEPAC Tradicional e Especial

Título de Especialista em Patologia Clínica/Medicina Laboratorial.

**Seja mais um
Associado da SBPC/ML.**

**Você só tem
a ganhar!**

**Para mais informações,
acesse: www.sbp.org.br**

Ferramenta de Ensino à Distância da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

EAD

educação continuada

.sbpc.org.br



Qualidade reconhecida

Os palestrantes são especialistas de renome em sua área de atuação.



Escolha o melhor horário

O vídeo com a aula gravada pode ser assistido ao longo do dia da transmissão, quantas vezes você quiser.



Uma palestra de Congresso

Cada curso tem de 45 a 75 minutos de duração, a mesma de uma atividade dos Congressos da SBPC/ML.

Leve e compatível com todos os navegadores e dispositivos como desktop, notebook, smartphone e tablet

**Associado SBPC/ML
pode se inscrever
gratuitamente**

O site Lab Tests Online BR auxilia a população leiga e os profissionais de saúde a conhecerem melhor os exames laboratoriais.

Há informações sobre os exames, sua finalidade, preparativos, tipo de amostra coletada e forma de coleta, além de estados clínicos e doenças relacionadas.

Lab Tests Online BR é desenvolvido e atualizado por médicos Patologistas Clínicos.

Lab Tests Online BR é mantido pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML), sob licença da American Association for Clinical Chemistry (AACC).

Lab Tests Online[®] BR

Cuidando da sua saúde, entendendo seus exames.

Uma fonte pública e gratuita sobre exames laboratoriais preparada por profissionais especialistas em medicina laboratorial

www.labtestsonline.org.br

Produzido por:



Coloque o link para **Lab Tests Online[®] BR** no site do seu laboratório.

É gratuito e você oferece um serviço a mais aos seus clientes.

Fale com a SBPC/ML:
imprensa@sbpc.org.br

JORNAL BRASILEIRO DE PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL

BRAZILIAN JOURNAL OF PATHOLOGY AND LABORATORY MEDICINE

Uma publicação conjunta das sociedades: SBPC/ML (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial), SBP (Sociedade Brasileira de Patologia) e SBC (Sociedade Brasileira de Citopatologia)

Edição eletrônica em um *site* exclusivo:

www.jbpml.org.br



O JBPM é uma publicação oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, da Sociedade Brasileira de Patologia e da Sociedade Brasileira de Citopatologia, sendo veículo de publicação de manuscritos relacionados com a medicina laboratorial. Possui indexação no LILACS, Periódica e no Chemical Abstracts e é integrante da base de dados SciELO.

Promovendo e divulgando trabalhos científicos da área de Medicina Laboratorial (Patologia Clínica, Patologia e Citopatologia) com qualidade técnica aprovada por pares competentes.

Mais informações: jbpml@sbpc.org.br
ou (21) 3077-1400 com Lidia Côrtes

Uma publicação conjunta das sociedades:



SOCIEDADE BRASILEIRA
DE CITOPATOLOGIA



Indexado por:



+ Suporte para suas
decisões médicas

+ Segurança para
seus pacientes

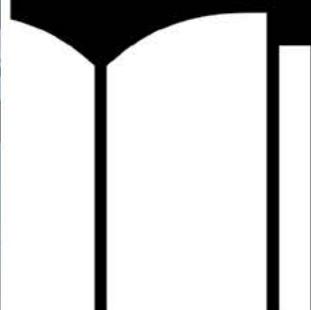
+ Confiança, respeito e
qualidade durante todo
o processo laboratorial



Laboratórios com selo de Acreditação PALC atendem a padrões técnicos reconhecidos por instituições internacionais.

A Norma PALC é certificada pela The International Society for Quality in Health Care (ISQua), a principal organização mundial que promove a melhoria da qualidade e a segurança na prestação de serviços de saúde.

A SBPC/ML é Entidade Acreditora reconhecida pela Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS).



BIBLIOTECA DIGITAL



Sociedade Brasileira
de Patologia Clínica
Medicina Laboratorial

bibliotecasbpc.org.br

Entre, consulte e fique à vontade

Aqui você encontra publicações da SBPC/ML, aulas de congressos e eventos científicos, vídeos de cursos à distância, legislação e normas que interessam aos profissionais de laboratórios clínicos e muito mais.

Associados
SBPC/ML

têm acesso
à conteúdo
exclusivo
do acervo

Realização:



Na prática laboratorial, os fatores pré-analíticos e os interferentes podem alterar significativamente os resultados dos testes laboratoriais. O profissional do laboratório clínico necessita estar atento para identificar e sanar ou encontrar soluções para minimizar esses problemas.

Nestas Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) são apresentados os fatores pré-analíticos e interferentes em ensaios laboratoriais mais comumente observados na rotina diária do laboratório, discutindo os mecanismos, as causas da interferência e as possíveis soluções.

Esta obra foi escrita por especialistas nacionais e internacionais com larga experiência na rotina do laboratório clínico.

Trata-se de um livro indispensável no laboratório clínico e que, certamente, irá proporcionar novos conhecimentos em prol da melhoria contínua do processo laboratorial.

O arquivo completo está disponível para livre *download* na Biblioteca Digital da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): www.bibliotecasbpc.org.br.

Apoios:



ISBN 978-85-7868-359-7

