

CONTROLE DE QUALIDADE INTERLABORATORIAL DOS MÉTODOS UTILIZADOS EM BIOQUÍMICA CLÍNICA, NA REDE DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ*

Heidi Pinto MARTINS**
Kioka ARIOSHI**
Luzia SHUNDO**
Mariza Menezes ROMÃO**
Regina C.A. STANCARI**
Regina Martins de OLIVEIRA**
Rosa M. M. FERREIRA**
Valter RUVIERI**

RIALA6/705

MARTINS, H.P.; ARIOSHI, K.; SHUNDO, L.; ROMÃO, M.M.; STANCARI, R.C.A.; OLIVEIRA, R.M.; FERREIRA, R.M.M.; RUVIERI, V. — Controle de Qualidade Interlaboratorial dos Métodos Utilizados em Bioquímica Clínica, na Rede do Instituto Adolfo Lutz. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):31-36, 1991.

RESUMO: Este trabalho propõe a utilização de um "pool" de soro controle normal (SCN) e de um alterado (SCA) preparado pela adição de quantidades de substâncias químicas a serem analisadas. A concentração dos constituintes em cada "pool" foi estabelecida pela mensuração em diferentes laboratórios clínicos. Estes "pools" foram usados como um sistema controle para o estudo da precisão e exatidão, servindo para indicar a presença de erros, podendo alertar os analistas para falhas existentes na metodologia e aparelhagem.

DESCRIPTORIOS: Bioquímica Clínica; Soro Controle; Controle de Qualidade Interlaboratorial; Precisão e Exatidão.

INTRODUÇÃO

Os sistemas de controle de qualidade fornecem tanto ao analista como ao clínico critérios objetivos para avaliar o andamento laboratorial^{3,5,13,14}. Distinguem-se duas facetas no controle de qualidade total:

INTERNO: análise diária de amostras controle para avaliar a precisão do método (Intralaboratorial).

EXTERNOS: análise de amostras controle recebidas de fonte externa para comparar o nível de exatidão em diferentes laboratórios (Interlaboratorial).

É recomendável que, antes de iniciar um programa de controle, salientar o seguinte:

a) pessoal técnico adequadamente treinado

b) equipamentos de boa procedência e com calibração e manutenção periódicas

c) reagentes de boa qualidade

d) coleta e conservação de amostra segundo metodologia requisitada

e) pipetadores e vidrarias limpos

f) existência de boas condições de trabalho

g) padrões e substâncias controles preparados utilizando-se substâncias puras (solutos e solventes) de composição conhecida (tais como NaCl puro e água destilada); ou particularmente substâncias purificadas (tais como enzimas e proteínas); ou produtos biológicos bem conservados (tais como soro humano ou bovino). Comumente, estes materiais são combinados ou tratados para obtenção de concentrações adequadas das substâncias a analisar.

* Realizado na Seção de Análises Clínicas Auxiliares e unidades regionais do Instituto Adolfo Lutz.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

A seleção do material depende de julgamento do analista baseado no conhecimento dos efeitos do processo bioquímico, interferentes, concentrações analíticas desejadas, estabilidade, etc.

O soro humano pode ser obtido de doadores selecionados, por plasmáfereze ou como no presente trabalho de espécimes laboratoriais coletados sem contaminação microbiológica^{2,13}.

O objetivo primário no uso de materiais controles diários é alertar a equipe técnica para erros sistemáticos ou casuais. Contudo o aspecto mais crítico para qualquer programa controle não é o mecanismo usado para descobrir problemas potenciais mas ao contrário, as ações originadas como resultado destas informações.

Este trabalho descreve um sistema de controle que foi utilizado entre os laboratórios da rede Adolfo Lutz, elaborado pelos integrantes da Comissão Técnica de Bioquímica (D.O. n° 98, 28/5/88, p.21)

Inicialmente realizou-se monitoramento das principais reações bioquímicas de nossos laboratórios com a finalidade de mútuo auxílio na interpretação dos resultados obtidos nas mais diferentes regiões do Estado de São Paulo entretanto, com o decorrer das reuniões de discussão percebemos que, de fato, estava-se iniciando um programa de controle de qualidade interlaboratorial.

O maior problema dos integrantes do grupo se baseava no controle técnico das reações e na dificuldade de acesso a informações técnicas.

Nas primeiras reuniões foi discutido sobre qual o melhor caminho para conseguirmos uma uniformização técnica mas, com o decorrer do tempo, notamos não ser este o objetivo mais urgente. Os próprios elementos revelavam suas experiências com determinados tipos de reagentes elaborados por firmas (kits) e resultando daí uma seleção natural e um controle de qualidade dos próprios reativos adquiridos.

MATERIAL E MÉTODOS

Técnicas de controle:

Baseando nossos estudos na Provisional Recommendation on Quality Control in Clinical Chemistry^{4,14} estabelecemos que em cada laboratório regional integrante da Comissão haveria um responsável pelo preparo de soros controles normais (SCN) e alterados (SCA) para as diversas reações:

Marília — fosfatase alcalina
Pres. Prudente — glicose
Santo André — uréia
Sorocaba — transaminases
Araçatuba — triglicérides
Central — bilirrubinas, creatinina e ácido úrico

Os soros controles foram distribuídos aos integrantes do grupo que se incumbiram de realizar a determinação diária; os resultados foram posteriormente enviados ao laboratório central para a análise estatística.

Soros controles normais (SCN):

Os soros controles normais (SCN) foram coletados nos laboratórios da rede, formando-se um "pool". Foram excluídos os soros ictericos, os de composição organolépticas alteradas (hemolisados e lipêmicos) e com presença de contaminação bacteriana (fermentação). Diariamente, os soros coletados foram congelados em frascos de polietileno até se atingir o volume ideal. Após descongelamento e acerto do pH (7,2) foram distribuídos em frascos de vidro tipo penicilina, previamente autoclavados, e então congelados a -18°C . Não foram adicionados conservantes e/ou aditivos.

Soros controles alterados (SCA):

Os SCA para creatinina, ácido úrico, uréia e glicose foram preparados adicionando-se quantidades conhecidas de massa fria seguindo a mesma metodologia do preparo do SCN. No caso da fosfatase alcalina utilizou-se leite não pasteurizado adicionado ao SCN. Neste caso foi necessário escolher a amostra adequada de leite pois apesar da não pasteurização algumas não apresentaram um nível elevado de fosfatase alcalina. O SCA para bilirrubinas seguiu a seguinte técnica: foi preparada uma solução estoque contendo 5mg de bilirrubina (Sigma) e 6,25 ml de NaCO_3 a 1% (Merck). Esta solução após agitação foi mantida em frasco escuro ao abrigo da luz.

A solução de uso foi preparada no momento da reação da seguinte maneira: a 7 ml de SCN foi adicionado 1 ml de solução estoque de bilirrubina e 50 ml de Ácido Acético PA (Merck). Esta solução corresponde a cerca de 7 mg% de bilirrubina total. Por este método de preparo se obtém 90% de bilirrubina indireta.

Técnicas de doseamento:

Na tabela I encontramos os métodos e equipamentos utilizados, bem como as médias obtidas nos diferentes laboratórios da rede.

Para a determinação da glicemia foram utilizadas as reações da hexoquinase¹⁵ e glicoseoxidase¹¹. No caso da uréia dois métodos foram comparados urease¹² e diacetilmonoxima¹⁶.

Para o doseamento de triglicérides¹⁷, creatinina⁹, fosfatase alcalina¹, transaminases⁸ e bilirrubinas¹⁰ as técnicas foram as mesmas para todos os laboratórios da rede. Foi empregada metodologia diferente na determinação da uricemia, sendo que o laboratório central utilizou a uricase⁷ e os demais o tradicional método de Caraway⁶.

Análise estatística:

Foi utilizado o programa Stathgraphics versão 1.0 em microcomputador Prológica SP 16286, IBM compatível, sendo calculados a média, desvio padrão, limites e coeficiente de correlação.

Cuidados operacionais.

Quando da coleta de soros para o preparo dos "pools" deve-se levar em conta o alto risco a que está sujeito o operador, uma vez que o vírus da hepatite infecciosa é normalmente encontrado nas populações hospitalares e na rede de saúde pública. Bowers e colaboradores (2) recomendam extremo cuidado com soros humanos pois mais da metade dos soros encaminhados aos laboratórios são HBsAg positivos.

Além disso, também há o risco de contaminação com amostras de sangue que apresentam positividade para o HIV (vírus da imunodeficiência hu-

mana). Sugere-se a utilização de repipetadores automáticos, principalmente na hora de distribuir o soro controle em frascinhos e ao armazená-los no congelador sempre manter visível a targeta de "CUIDADOS ESPECIAIS".

RESULTADOS:

Os soros controles normal e alterado foram usados como parâmetros para controle da exatidão e precisão. Quando mais de 20% dos resultados se aproximam dos limites ± 2 d.p. (desvio padrão), configura-se a perda de exatidão que geralmente, é provocada por erros sistemáticos, como por exemplo, controles fora de especificação, reagentes mal preparados, variações de temperatura, não observância dos períodos de incubação dos métodos, leitura em comprimentos de onda fora dos recomendados, etc. A perda da precisão acontece quando a maioria dos pontos estão próximos dos

TABELA I

Resultados obtidos (média \pm dp) nas reações estudadas, nos diferentes laboratórios do Instituto Adolfo Lutz

	Central	Araçatuba	Bauru	Pres. Prudente	Sto. André	Campinas	Marília	Taubaté
Glicose	93,21 \pm 1,12	87,07 \pm 3,58	90,85 \pm 2,65	90 *	103 *	—	—	—
Normal (mg/dL)	Aba—100	Spectronic hexoquinase	Micronal glic. oxid.	Micronal glic. oxid.	Celm E210D glic. oxid.	—	—	—
Glicose	353,26 \pm 5,16	283,26 \pm 11,2	350,16 \pm 23,2	331 *	354 *	—	350*	—
Akterada (mg/dL)	Aba-100	Spectronic hexoquinase	Micronal glic. oxid.	Micronal glic. oxid.	Celm E210D glic. oxid.	—	Celm E210D glic. oxid	—
Triglicerídeos	444,04 \pm 11,59	428,61 \pm 27,7	443,61 \pm 16,7	421 *	353 *	—	439*	—
Alterado (mg/dL)	Aba—100	Spectronic cinético	Micronal enzimático	Micronal pap	Celm E210D enzimático	—	Celm E210D enzimático	—
Uréia	90,41 \pm 2,04	85,00 \pm 6,76	96,79 \pm 3,21	87 *	84 *	—	—	—
Alterado (mg/dL)	Aba—100	Spectronic urease	Micronal DAmoxima	Spectronic urease	Celm E210D urease	—	—	—
Bilir total	9,15 \pm 0,56	3,56 \pm 0,32	—	—	—	—	—	—
Alterado (mg/dL)	Aba—100	Spectronic Malloy Ev	—	—	—	—	—	—
Bilir direta	1,01 \pm 0,17	0,10 \pm 0	—	—	—	—	—	—
Normal (mg/dL)	Aba—100	Spectronic Malloy Ev	—	—	—	—	—	—
Ácido úrico	19,74 \pm 0,51	19,57 \pm 1,08	—	—	—	19,98 \pm 0,86	—	13,99 \pm 1,19
Alterado (mg/dL)	Aba—100	Spectronic uricase	—	—	—	Spectronic Caraway	—	Micronal Caraway
Creatinina	2,66 \pm 0,11	2,69 \pm 0,13	—	—	—	2,31 \pm 0,20	—	2,70 \pm 0,31
Alterado (mg/dL)	Spectronic Folin	Spectronic Folin	—	—	—	Spectronic Folin	—	Spectronic Folin
Fosf. alcalina	228,63 \pm 16,28	—	—	—	—	404,2 \pm 27,06	—	41,80 \pm 8,50
Alterado (U/L)	Aba—100	—	—	—	—	Spectronic Reatoclin	—	Spectronic Reatoclin
TGP	—	—	800*	750*	—	—	780*	—
Alterado (U/L)	—	—	Micronal enzimático	Spectronic cinético	—	—	Celm E210D cinético	—
TGO	—	—	245*	152*	—	—	112*	—
Alterado (U/L)	—	—	Micronal enzimático	Spectronic cinético	—	—	Celm E210D cinético	—

* Médias enviadas ao laboratório central, não foi possível a comparação estatística.

MARTINS, H.P.; ARIOSHI, K.; SHUNDO, L.; ROMÃO, M.M.; STANCARI, R.C.A.; OLIVEIRA, R.M.; FERREIRA, R.M.M.; RUVIERI, V. — Controle de Qualidade Interlaboratorial dos Métodos Utilizados em Bioquímica Clínica, na Rede do Instituto Adolfo Lutz. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2):31-36, 1991.

TABELA II

Test t-Student e coeficiente de correlação obtidos nas determinações efetuadas nos laboratórios do IAL.

	coeficiente de correlação							
	Campinas vs Araçatuba	Campinas vs Central	Araçatuba vs Central	Bauru vs Araçatuba	Bauru vs Campinas	Araçatuba vs Bauru	Pres. Prud. vs Taubaté	Araçatuba vs
Glicose SCN	—	—	0,9863*	0,9946	0,9857	—	—	—
Glicose SCA	—	—	0,9857*	0,9658	0,9656*	—	—	—
Triglic SCA	—	—	0,9383*	0,9753	0,9436	—	—	—
Uréia SCA	—	—	0,9274*	0,9813*	0,9223*	—	—	—
FOSF ALC SCA	—	0,9112*	—	—	—	—	—	—
Ac úrico SCA	0,9336	0,9346	0,9916	—	—	0,9341	—	0,7111*
Creatin SCA	0,7136*	0,7310*	0,9318	—	—	—	0,9341	—
BIL TOT SCA	—	—	0,6734*	—	—	—	—	—
BIL DIR SCN	—	—	0,7643*	—	—	—	—	—
TGO SCA	—	—	—	—	—	—	0,4567	—
TGP SCA	—	—	—	—	—	—	0,5674*	—

* = Análise estatística significativa (Test t-Student, $p < 0,05$)

TABELA III

Estudo da Exatidão e precisão. Limites aceitáveis de Erro.

	Central	Araçatuba	Bauru	Campinas	Taubaté	Pres. Prudente	Sto. André	Marília
Glicose Normal	L 95-91 n 14 F 0	94-80 14 0	96-86 14 0	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Glicose Alterada	L 363-343 n 15 F 1	306-260 15 1	396-304 15 1	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Triglicerídes Alterado	L 466-411 n 21 F 1	484-372 21 2	476-410 21 2	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Uréia Alterada	L 92-88 n 24 F 5	98-72 24 0	103-91 24 2	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Bilir. total Alterada	L 10-8 n 13 F 1	4,2-2,9 13 0	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Bilir. direta Normal	L 1,3-0,7 n 12 F 1	0,1-0,1 12 0	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Ácido úrico Alterado	L 21,7-17 n 34 F 0	21,7-17 10 0	— — —	22-28 10 0	16,8-11 10 0	— — —	— — —	— — —
Creatinina Alterada	L 2,9-2,4 n 9 F 0	2,9-2,4 10 0	— — —	2,7-1,7 10 0	1,9-2,5 10 6	— — —	— — —	— — —
Fosf. alcalina Alterada	L 261-197 n 22 F 1	— — —	— — —	458-350 10 0	59-25 10 1	— — —	— — —	— — —

L = Limite aceitável (média + 2dp a média - 2dp)

n = Número de amostras

F = Número de resultados fora do limite aceitável

limites ± 2 d.p. e poucos ao redor da média. Isto se deve a pipetagem inexata das amostras e padrões, agitação imprópria dos tubos, material sujo, falhas na calibração dos aparelhos (analisadores automáticos), etc. Bowers e colaboradores (2) sugerem que se depois de revistos todos os itens do método, o problema persistir, o operador e/ou o método devem ser trocados.

Na tabela I são apresentados os resultados obtidos nos diferentes laboratórios (média \pm d.p.), através dos vários métodos e aparelhos utilizados. Os resultados com * representam as médias enviadas ao laboratório central e não foi possível calcular o desvio padrão. Observa-se que os métodos enzimáticos são os que apresentam resultados dispar-

Na tabela II encontram-se a comparação dos métodos intralaboratoriais, o coeficiente de correlação e o resultado do teste "t" que permitiu estabelecer a significância ou não da comparação dos resultados. Foi escolhido o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Na tabela III encontra-se os limites aceitáveis de erro estabelecidos pelo uso da média ± 2 d.p. e critério de Chevenet (5) o que nos permite analisar os métodos e estudar as tendências.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES:

Os sistemas de controle estudados serviram como instrumentos de comparação entre os resultados obtidos nos diferentes laboratórios (precisão e exatidão).

A precisão foi estudada analisando-se os resultados diários enviados pelos analistas, sendo que a análise estatística foi feita por uma só pessoa. O soro controle foi processado como os desconhecidos (soro de paciente) para evitar vícios nos resultados.

Para os soros controles seguiu-se a mesma técnica na preparação evitando-se coletar soros lipêmicos, ictericos e/ou hemolisados que interferem na determinação de vários componentes bioquímicos. O acerto do pH para 7,2 torna-se necessário pela acidificação da amostra em função da perda

de CO_2 durante o congelamento.

Bowers e cols.(2) relacionam uma lista de interferentes nas diversas reações bioquímicas, e entre eles podemos citar: o efeito de outras substâncias redutoras no sangue e na urina diferentes da glicose na determinação desse componente pelos métodos de redução do cobre; também os efeitos físicos devem ser levados em conta tais como, a viscosidade e a tensão superficial da amostra; a hemodiluição em sangue de diabéticos descompensados; a liofilização pode produzir alterações na composição do material, podendo se verificar a diminuição da estabilidade das lipoproteínas. Os soros controles para bilirrubinas apresentam dois inconvenientes, a alteração pela luz (fotossensibilidade) e pela presença das proteínas séricas que podem alterar os resultados.

Os métodos químicos de doseamento mostraram pouca variação entre os resultados dos diferentes laboratórios da rede, ainda que os reativos sejam diferentemente preparados ou adquiridos de fonte externa. A determinação do ácido úrico foi a mais exata e precisa mesmo quando comparados os métodos enzimático (7) e o tradicional Caraway (6). O estudo da precisão indica que em três laboratórios analisados (Central, Campinas e Araçatuba) tivemos os mesmos limites (21,8 -17,8). Isto sugere que não existe método especial, mas que o conhecimento do método e dos equipamentos utilizados pode ser de grande ajuda no laboratório, para evitar erros sistemáticos e reagentes fora de controle.

Entre os diferentes métodos estudados, os que apresentaram variações mais significativas dos resultados foram os enzimáticos (fosfatase e transaminase) e/ou aqueles que sofrem alterações pelo próprio preparo dos controles (bilirrubinas). Os doseamentos das transaminases (GPT e GOT), bilirrubinas e fosfatase alcalina foram os que apresentaram as maiores instabilidades, tanto na determinação da precisão como da exatidão.

Conclui-se assim, que há necessidade de um tratamento especial para os soros controles que são utilizados para todas as reações. Um estudo incluindo o uso de aditivos especiais como por exemplo a glicerina será objetivo de próximas publicações.

RIALA6/705

MARTINS, H.P.; ARIOSHI, K.; SHUNDO, L.; ROMÃO, M. M.; STANCAR, R. C. A.; OLIVEIRA, R. M. de; FERREIRA, R. M. M. e RUVIERI V. A interlaboratorial quality control of the utilized methods in clinical biochemistry, in the Adolfo Lutz Institute branch. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51 (1/2): 31-36, 1991.

ABSTRACT: This paper describes the preparation of the serum normal pool and altered pool made from this base by volumetric additions of analyte. The concentration of each constituent in each pool is established from measurement in the several clinical laboratories.

This substance has been used like control system to study precision and accuracy and alerts one to the existence of problems. Moreover, such a system can provide the analyst with a valuable decision-making tool to help guide him in considering new methodology of instrumentation.

DESCRIPTORS: Clinical Biochemistry, Serum Control, Quality Control, Precision and Accuracy.

AGRADECIMENTOS

As colegas Marina Y.N. Oda, Lucia N. Castilho e Jusiara A.H. Gurgel pela valiosa colaboração neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BESSEY, O.A.; LOWRY, O.H. & BROCK, M.J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164:321-9, 1946.
2. BOWERS, G.N.; BURNETT, R.W. & MCLOMB, R.B. Preparation and use of human serum control materials for monitoring precision in clinical chemistry. *Clin. Chem.* 21(12):1830-6, 1975.
3. BUTTNER, J.; BORTH, R.; BOUTWELL, J.H. & BROUGHTON, P.M.G. Provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. Part I General principles and terminology. *Clin. Chem.* 22(4):532-40, 1976.
4. BUTTNER, J.; BORTH, R.; BOUTWELL, J.H.; BROUGHTON, P.M.G. & BOWYER, R.C. Provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. *Clin. Chem.* 23(9):1784-9, 1977.
5. CALI, J.P. International criteria for reference materials. In: Quality Control in Clinical Chemistry. Transactions of the 6th international Symposium, Geneva, April 23-5, 1975. W.de Gruyter, Berlin — New York.
6. CARAWAY, W.T. Determination of uric acid in serum by a carbonate method. *Am. J. Clin. Pathol.* 25: 848 -55, 1965.
7. FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. & BERTI, G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid / 4-aminophurason chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin. Chem.* 26 : 227-31, 1980.
8. HENRY, R.J.; CHIAMORI, N.; JOLUB, O.J. & BERKMAN, S. Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase and lactic deshydrogenase. *Am. J. Clin. Pathol.* 34: 381-90 1960.
9. LARSEN, K. Creatinine assay by a reaction kinetic principle. *Clin. Chim. Acta.* 41: 209-17, 1972.
10. MALLOY, H.T. & EVELYN, K.A. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol. Chem.* 119:481-90, 1937.
11. ROBIM, M. & SAIFER, A. Determination of glucose in biologic fluids with an automated enzymatic procedure. *Clin. Chem.* 11(9): 840-5, 1985.
12. SITLER, J.L. & ELSER, R.C. An improved method for the measurement of urea using a urease/glutamate dehydrogenase reagent and an Abbott ABA-100 analyser. *Clin. Chem.* 25(6):1125, 1979.
13. STAMM, D. Calibration and quality control materials. *Z. Klin. Chem Klin. Biochem.* 12: 137-45, 1974.
14. YOUNG, D.S. & MEARS, T.W. Measurement and standard reference materials in Clinical Chemistry. *Clin. Chem.* 14: 929-43, 1968.
15. WESTWOOD, A.; BUTLOCK, D.G. & WHITEHEAD, T.P. An examination of the hexokinase method for serum glucose assay using external quality assessment data. *Ann. Clin. Biochem.* 23: 92-6, 1986.
16. WYBENGA, D.C.; GIORGIO, J. & PILEGGI, G. Manual and automatic methods for urea nitrogen measurement in whole serum. *Clin. Chem.* 17: 891-5, 1971.
17. ZYBGENHORN, J. Improved method for enzymatic determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* 21(11): 1627-9, 1975.

Recebido para publicação em 04 de julho de 1990.