

REAGENTES E REAÇÕES INTERVENÇÃO EM PROBLEMAS TÉCNICOS

JOSÉ CARLOS BASQUES

Edição: 26/04/2010 • Revisão: 23/11/2016

Labtest 

Introdução	03
Reagentes para Pesquisa Visual ou Qualitativa	03
Reagentes para Análise Quantitativa	03
A Água como Reagente	04
Destilação	04
Deionização	04
Osiose Reversa	04
Filtração através de Carvão Ativado	05
Ultra filtração	05
Principais contaminantes e eficiência da purificação	05
Controle da Qualidade da Água	06
Armazenamento	06
Limpeza do Material de Laboratório	07
Reações	08
Reação de Aglutinação	08
Reação de Turvação e Precipitação	08
Reação Colorimétrica	08
Reação Ultra Violeta	08
Reação Ponto Final	08
Utilização do Branco de Reagente	09
Utilização do Branco de Amostra	10
Reação Cinética	10
Reação Cinética Contínua	10
Reação Cinética Tempo Fixo com medição em Ponto Final	10
Reação Cinética de dois pontos	11
Observações	11
Reação Crescente e Reação Decrescente	12
Modo de Leitura	12
Conclusões	12
Intervenção em Problemas Técnicos	13
Modelo Experimental	13
Fase pré Analítica	14
Fase Analítica	15
Analizador Manual e Semiautomático	15
Analizador Automático	16
Fase pós Analítica	16
Referências	17

INTRODUÇÃO

A determinação de um analito em amostra biológica se baseia primariamente na reação do analito que se deseja avaliar, qualitativa ou quantitativamente, com um ou mais reagentes, visando à formação de um produto, que pode ser identificado visualmente ou medido através de um analisador.

Os produtos formados podem ter as mais variadas apresentações, podendo ser uma aglutinação de partículas, turvação, formação de cor ou formação de um produto sem cor, que pode ser identificado ou medido através de fotômetros ou contadores de radiação. Portanto, o trabalho no Laboratório Clínico se baseia quase na sua totalidade, no uso de reagentes que produzem as reações desejadas, formando os produtos indicadores da reação.

Reagentes para Pesquisa Visual ou Qualitativa

Os reagentes utilizados para pesquisa visual podem ser partículas de látex, células (principalmente hemácias), onde são aderidos antígenos ou anticorpos, destinados a reagir com a substância cuja presença se deseja identificar. As partículas têm a função de mostrar visualmente a reação ocorrida, que se manifesta pela presença ou ausência de aglutinação.

Os reagentes podem ainda ser anticorpos específicos para antígenos que desejamos pesquisar ou quantificar e que desenvolvem reações cujo produto pode ser uma turvação ou uma precipitação em um meio sólido.

Outra forma de identificação visual consiste na coloração de células onde os corantes reagem com substâncias presentes dentro das células, mostrando cores diferentes em função das reações ocorridas.

A pesquisa visual utiliza também reagentes (antígenos ou anticorpos) imobilizados em membranas ou microplacas, que reagem com a substância a ser pesquisada. A ocorrência da reação antígeno-anticorpo é mostrada pela ação de reagentes auxiliares que desenvolvem cor, podendo até mesmo mostrar símbolos de fácil interpretação.

A cromatografia de coluna ou camada delgada é também um modelo de pesquisa visual, que permite a separação de vários componentes em uma amostra biológica. A identificação dos analitos é realizada através dos mais variados processos de coloração ou pode ser feita através da própria cor dos analitos separados, como na separação cromatográfica das hemoglobinas. Em muitos casos pode-se utilizar um instrumento para quantificar os analitos separados.

A pesquisa visual, quando qualitativa, é denominada genericamente como um "teste" que gera uma decisão de confirmar a ausência ou presença do analito. É um resultado em que a resposta é sim ou não, positivo ou negativo.

Reagentes para análise quantitativa

Na grande maioria das vezes, os reagentes utilizados na análise quantitativa devem gerar produtos, cuja quantidade pode ser medida com a utilização de um analisador. Os dados obtidos são comparados com padrões calibradores para se obter a concentração do analito presente na amostra. Durante muito tempo estes reagentes utilizaram somente substâncias químicas, orgânicas ou inorgânicas, capazes de gerar um produto mensurável.

O desenvolvimento de métodos eficientes de fermentação e separação permitiu a obtenção de enzimas purificadas de custo acessível, fazendo com que estas possam ser utilizadas como reagentes, substituindo os reagentes químicos em vários sistemas analíticos. As enzimas passaram a fazer parte da formulação de um número cada vez maior de sistemas analíticos com as seguintes vantagens operacionais:

- a) Emprego de reagentes pouco agressivos e de fácil utilização;
- b) Facilidade para utilização monorreagente ou birreagente em analisadores semiautomáticos e automáticos;
- c) Custos operacionais totais similares aos dos reagentes químicos, porque reduzem as operações manuais e são facilmente automatizados.

As enzimas são também produtos químicos, mas devido a características próprias destes reagentes, os sistemas analíticos utilizando enzimas são denominados enzimáticos. Os usuários dos reagentes enzimáticos sentiram a necessidade de distinguir estes reagentes dos reagentes químicos e criou-se então a denominação de reagentes colorimétricos para os reagentes químicos e de reagentes enzimáticos para aqueles utilizando enzimas. Entretanto, muitos reagentes enzimáticos formam produtos coloridos, sendo colorimétricos também.

Água como Reagente

A água é o suprimento do Laboratório Clínico de menor custo. Talvez, por este motivo, sua qualidade seja tão negligenciada, apesar de ser um reagente importante e o mais utilizado.

A classificação de água "PURA" pode ter diferentes significados, dependendo da situação.

Água **PURA** para uso doméstico significa que ela é livre de microrganismos patogênicos e agentes tóxicos, sendo própria para o consumo humano.

Água **PURA** para uso farmacêutico significa principalmente que ela é livre de pirogenios e microrganismos.

No Laboratório Clínico, a água é utilizada como reagente químico e por isto a denominação água **PURA** significa que ela deve conter uma quantidade mínima de contaminantes (íons, matéria orgânica e microrganismos), capaz de atender a diferentes aplicações.

Traços de íons ou metais aceleram ou inibem várias reações, principalmente as mediadas por enzimas e prejudicam o desempenho de vários reagentes, controles e calibradores.

O efeito das impurezas da água nos diversos testes de laboratório tem sido estudado sistematicamente e existem evidências de numerosas causas de erro. O cloro utilizado na água servida à população, na concentração em torno de 1,0 mg/L, pode introduzir erros de até 25% na determinação de cloretos e interfere com vários procedimentos em bacteriologia e enzimologia. Traços de metais aceleram ou inibem várias reações e podem introduzir erros significativos nas medições de atividades enzimáticas ou em procedimentos que utilizam enzimas como reagentes. A dimensão do erro gerado pela impureza da água depende em muito da concentração do analito. Um miligrama de sódio por litro de água pode introduzir um aumento de 4,3 mEq/L na determinação de sódio se a diluição utilizada for de 1:100, representando um erro de 3,1%, em uma concentração de sódio de 140 mEq/L. Por outro lado, 1,0 mg de potássio por litro de água introduz um aumento de 2,5 mEq/L. Em uma amostra com potássio de 4,0 mEq/L, o erro é de 62%. Assim, a água a ser utilizada no laboratório deve ser purificada para que não produza interferências nos testes ou ensaios. Vários são os processos de purificação que estão disponíveis para utilização no laboratório. Esta purificação consiste na eliminação de todas as substâncias dissolvidas e suspensas na água.

Destilação: Processo de vaporização e condensação de um líquido para purificar ou concentrar uma substância ou para separar uma substância volátil de outras substâncias menos voláteis. É o método mais antigo de purificação da água.

Deionização: Neste processo a água passa por um sistema contendo resinas insolúveis, aniônicas e catiônicas, onde os íons presentes na água são trocados pelos íons presentes nessas resinas.

No caso das resinas de troca catiônica, esta trocará seus íons hidrogênio (H^+) por contaminantes catiônicos, como cálcio, magnésio, ferro, alumínio, manganês, cobre, zinco, cromo, níquel e outros cátions metálicos e cátions diversos.

As resinas aniônicas por sua vez trocam seus íons hidroxila (OH^-) pelos contaminantes aniônicos, como clorato, clorito, cloreto, sulfato, sulfito, sulfeto, nitrato, nitrito, fosfato, fluoreto e outros ânions, além da sílica.

Osmose Reversa: Processo pelo qual a água é forçada a passar por uma membrana semipermeável que age como um filtro molecular. A membrana remove de 90 a 99% das impurezas da água.

Devido a sua capacidade de remoção de bactérias e pirogênios, a osmose reversa é frequentemente combinada com a deionização de modo a reduzir a frequência de regeneração das resinas de troca iônica.

Filtração com carvão ativado: Este processo remove o cloro por quimioabsorção e as substâncias orgânicas dissolvidas por adsorção. Geralmente o filtro de carvão ativado é colocado nos sistemas de purificação da água antes da osmose reversa e antes da deionização.

Ultrafiltração: Utiliza uma membrana com poros ligeiramente maiores que os da membrana de osmose reversa. É utilizado para remover pirogênios da água purificada.

A tabela 1 relaciona os vários procedimentos de purificação da água e sua eficiência na remoção dos principais interferentes.

	Sólidos Ionizados	Gases Ionizados	Matéria Orgânica	Partículas	Bactérias
Destilação	E/B	P	B	E	E
Deionização	E	E	P	P	P
Osmose Reversa	B	P	B	E	E
Carvão Ativado	P	P	E/B	P	P
Ultra filtração	P	P	B	E	E

Tabela 1: E = excelente; B = boa; P = pobre (remoção pequena ou nula)

Uma combinação dos processos de purificação da água para uso no Laboratório Clínico consiste de: Filtro inicial para reter partículas e bactérias; Filtro de carvão ativado para eliminar matérias orgânicas e Sistema deionizador de leito misto ou separado para reter íons, acoplado ou não a um sistema de osmose reversa.

O processo de deionização e de osmose reversa, tem aplicação muito comum nos Laboratórios Clínicos, mas o sistema deve ser monitorado para que possíveis problemas sejam sanados. A pequena sensibilidade no sistema de informação da qualidade da água processada acarreta na utilização de água imprópria. Contaminação com bactérias podendo deteriorar o sistema (resinas e membranas). Liberação de silicatos, substâncias alcalinas e potentes oxidantes, que interferem nas reações, principalmente as enzimáticas.

A água purificada para uso no Laboratório Clínico, deve ser submetida ao controle da qualidade devendo ser testada todas as vezes em que se obtiver um novo lote.

A água de uso no laboratório pode ser classificada em função da concentração de contaminantes mais importantes.

Especificações estabelecidas no momento da produção da água:

	NCCLS			CLSI
	Tipo I	Tipo II	Tipo III	ARLC
Bactérias Heterotróficas (ufc/mL)	< 10	< 1000	-	< 10
Resistividade (MΩ/cm a 25 °C)	> 10	> 1	> 0,1	≥ 10
Condutividade (mS/cm a 25 °C)	< 0,1	< 1	< 10	≤ 0,1
Silicatos (mg/L)	< 0,05	< 0,1	< 1	-
Carbono orgânico total (TOC) ng/g (ppb)	-	-	-	< 500
Partículas (micra)	< 0,22μ	-	-	< 0,22μ
Armazenamento / Recipiente	NI	-	-	NI

Tabela 2: ufc - unidade formadora de colônias; mΩ - megaohms; μS - microsiemens; NI – Não Indicado; ARLC = Água Reagente para Laboratório Clínico

Existe ainda uma especificação para a água que é usada em HPLC, cultura de células e tecidos, análise de cromossomas e testes de HLA, que é denominada água tipo "Especial".

Cuidados devem ser tomados após obtenção de água destilada ou deionizada, pois não tem sentido obter uma água de boa qualidade e contaminá-la durante o processo armazenamento.

A água de tipo I só existe nesta forma no momento de sua produção. Portanto, quando um reagente requerer este tipo de água, ele deve ser preparado imediatamente após a produção da água purificada.

De modo geral, a água deionizada se encontra em um estado antinatural e tem a tendência a adquirir um estado intermediário entre o estado inicial e a purificação.

Os sistemas de armazenamento da água de tipos II e III devem ser construídos com materiais que não facilitem a contaminação química ou bacteriana.

O laboratório deve seguir a RDC 302/2005 da ANVISA, que no item 6.2.7 descreve: “O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem definir o **grau de pureza** da água reagente utilizada nas suas análises, **a forma de obtenção, o controle da qualidade.**”

Controle da Qualidade da Água

A sílica (contaminante fracamente ionizado) é uma das primeiras substâncias que podem eluir dos leitos de resina de troca iônica quando se aproximam da saturação. A liberação de substâncias fortemente ionizadas ocorre em seguida, aumentando a condutividade.

Para realizar o controle da qualidade da água para uso no laboratório, são indicados alguns testes:

1. **Determinar a quantidade de silicato presente na água.** O silicato é o primeiro elemento a aparecer na água quando a coluna está atingindo seu ponto de saturação e começa a se tornar imprópria para utilização. Para determinação qualitativa de silicatos na água, a Labtest disponibiliza o produto **Silicato MA Ref. 603**.
2. **Medir a condutividade da água.** Condutividade é a capacidade que a água possui em conduzir corrente elétrica, quanto maior a condutividade, maior a quantidade de íons presentes na água. A medida da condutividade deve ser realizada com um condutivímetro. Unidade: μS = microsiemens.
3. **Realizar o controle microbiológico da água.** Deverá ser feito mensalmente e sempre após manutenção do equipamento. O controle microbiológico da água é definido como Unidades Formadoras de Colônia por mL de água (UFC/mL). Cada laboratório deverá ter seu procedimento de coleta e medida

Para obter uma água que contenha somente partículas menores que 0,22 μ , utilizar um filtro com poro de diâmetro nominal igual a 0,22 μ .

Criar um sistema de registro da condutividade, da absorbância encontrada no teste do **Silicato MA** e do controle microbiológico com as datas de realização. Repetir este teste de controle da qualidade da água, no mínimo semanalmente. Registrar todas as ações tomadas quando um dos parâmetros se mostrar fora da especificação desejada.

Armazenamento

De modo geral, como a água purificada se encontra em um estado antinatural e tem tendência a retornar ao estado anterior à purificação, devem-se tomar cuidados no armazenamento. É recomendável obter a água purificada na quantidade suficiente para um dia de trabalho.

Limpeza do Material de Laboratório

A utilização de material limpo é fundamental para a qualidade dos resultados, pois a introdução de contaminantes pode inibir ou potencializar as reações de modo indesejável. Contaminantes presentes no material de trabalho poderão atuar como reagentes adicionais, que irão agir como inibidores ou ativadores e até mesmo podem ser da mesma qualidade do analito, produzindo resultados falsamente elevados.

Os diversos procedimentos no laboratório podem requerer formas distintas de limpeza do material. Assim, na determinação de traços de elementos como cálcio, ferro, cobre e outros, tratar a vidraria com ácido clorídrico a 50% ou ácido nítrico a 30%, enxaguar com água de torneira e em seguida com água destilada ou deionizada.

Entretanto, um modelo básico que tem aplicação geral no laboratório pode ser proposto. Em primeiro lugar devemos nos preocupar com a prevenção, para impedir que reagentes e proteínas fiquem aderidos a pipetas, tubos de ensaio e outros materiais.

Logo após o uso desprezar o resíduo e imergir a vidraria em uma solução de detergente (próprio para uso em laboratórios) a 0,5% ou, no máximo, a 1,0%. Soluções de detergentes muito concentradas dificultam sua remoção da vidraria e os detergentes aderidos podem atuar como inibidores ou ativadores de outras reações. A vidraria deverá ficar imersa na solução de detergente por aproximadamente 2 horas. O material deve ser enxaguado com água de torneira e passado pelo menos duas vezes em água purificada. Secar em estufa.

Em analisadores semiautomáticos com cubeta de fluxo, aspirar no final da rotina diária uma solução de detergente a 0,5% e deixar agir. Antes do início da nova rotina, enxaguar bem com água purificada. Quinzenalmente aspirar para a cubeta 10 mL de uma solução de hipoclorito de sódio a 2,5%. Deixar agir por 20 minutos e enxaguar em seguida com água purificada. O hipoclorito de sódio não é indicado para uso em metais por sua ação corrosiva. Seguir as orientações do fabricante do analisador.

As multicubetas dos analisadores automáticos após o uso devem ser imediatamente esvaziadas e colocadas em solução de detergente a 0,5% por aproximadamente 1 hora, lavados então com água de torneira e enxaguadas com água destilada ou deionizada. Secar em estufa a 37 °C. Seguir as orientações do fabricante do analisador.

Reações

As reações correspondem ao resultado da atuação de um ou mais reagentes sobre o analito para formar o produto. Existem vários modelos de reação e aquele a ser escolhido para determinado sistema analítico irá depender dos reagentes a serem utilizados ou disponíveis e das facilidades instrumentais.

Reação de Aglutinação: São utilizadas partículas ligadas a antígenos ou anticorpos que reagem com um analito produzindo uma reação visível a olho nu ou ao microscópio. Na maioria dos formatos analíticos as reações positivas se manifestam por presença de aglutinação. Em algumas reações de aglutinação utiliza-se o modelo da inibição de aglutinação e as reações positivas se manifestam pela ausência de aglutinação.

Reação de turvação e precipitação: As reações de turvação ocorrem por precipitação de um analito, na maioria das vezes uma proteína, por ação de um reagente que pode ser um anticorpo e o precipitado permanece na forma de suspensão que será quantificado por espectrofotometria. O comportamento cinético dessas reações normalmente é de ponto final, ou seja, o produto formado atinge o seu ponto máximo de detecção e permanece inalterado por um determinado tempo em função de sua estabilidade.

Reação Colorimétrica: Reação Colorimétrica é aquela em que o produto formado tem uma cor e a intensidade da cor é medida na faixa visível do espectro (380 - 680 nm).

Reação Ultravioleta (UV): São reações cujos produtos formados absorvem energia radiante ("luz") na porção do ultravioleta próximo, mais especificamente em 340 ou 365 nm.

A reação colorimétrica ou a reação ultravioleta pode ser utilizada em vários modelos, como reação de ponto final e reação cinética.

Reação de Ponto Final

As reações de aglutinação, turvação ou precipitação são, em muitas situações, reações de ponto final, mas o termo é especialmente dedicado àquelas reações que formam um produto cuja concentração chega a um ponto máximo, permanecendo inalterada por um determinado tempo em função da estabilidade do produto formado. Estas reações podem ser colorimétrica ou ultravioleta. Um número bastante elevado de ensaios utiliza as reações de ponto final onde a concentração do produto formado é medida fotometricamente. Podemos mencionar alguns exemplos, como as determinações químicas ou enzimáticas de albumina, colesterol, glicose e triglicérides.

A Figura 1 mostra graficamente uma reação de ponto final. A divisão em três etapas mostra o início e incremento na formação do produto, a etapa de estabilidade, e o decaimento do produto por perda da estabilidade.

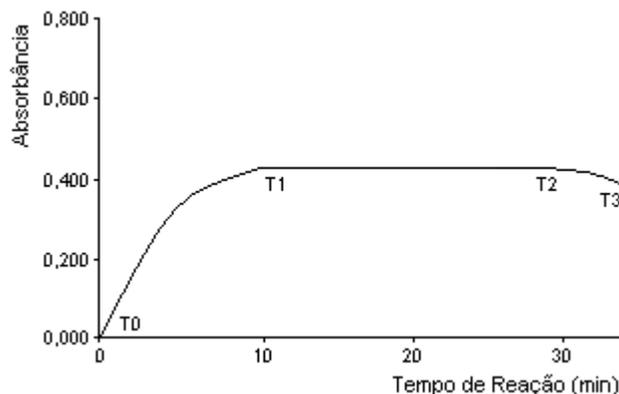


Figura 1: T0 - T1 – Tempo de formação do produto. T1 - T2 - Tempo em que a reação se completou e permanece estável. Neste intervalo será realizada a medição da quantidade de produto da reação. T2 - T3 - Perda da estabilidade do produto formado.

Utilização do Branco de Reagente

É necessário utilizar o Branco do Reagente como referência sempre que a absorvância da mistura de reagentes no comprimento de onda utilizado, for diferente da absorvância da água.

No teste de Proteínas Totais, por exemplo, vemos que em 545 nm o reagente tem uma absorvância. Ao utilizarmos o reagente como Branco, para zerar o equipamento, estamos eliminando a contribuição desta absorvância nos resultados.

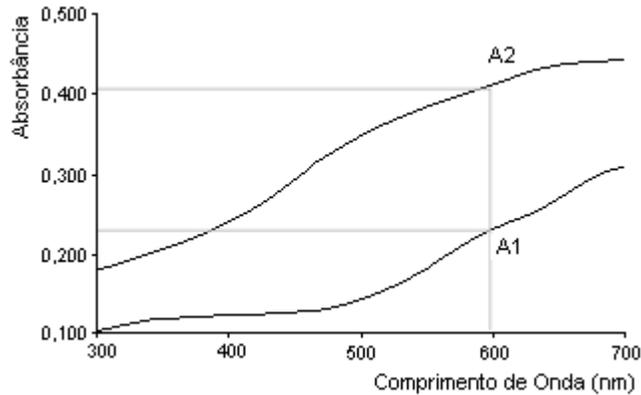


Figura 2: A1 - Absorvância do Reagente (Branco da Reação); A2 - Absorvância do Padrão (Amostra); $A2 - A1 =$ Absorvância da Reação

Utilização do Branco de Amostra

É indicado quando a contribuição fotométrica da amostra no comprimento de onda utilizado altera significativamente o resultado final.

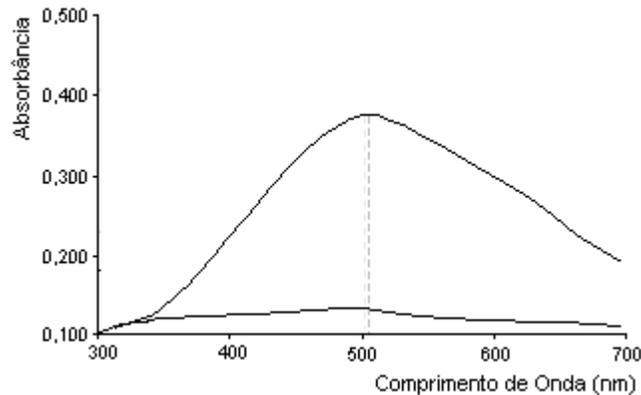


Figura 3: A1 – Absorvância do branco da amostra (mistura do 1º reagente com a amostra); A2 – Absorvância da Reação mais absorvância do branco da amostra;
 $A2 \text{ menos } A1 =$ Absorvância corrigida da Reação

Reação Cinética

São reações onde a velocidade da formação do produto é medida durante um intervalo de tempo, que pode ser horas, minutos ou segundos e a denominação cinética é decorrente do relacionamento da reação com o tempo. Muitos consideram que as reações cinéticas são aquelas em que se mede a formação de produto usando pequenos intervalos de tempo, minuto a minuto, na faixa ultravioleta do espectro (340 ou 365 nm). Estas reações, sem dúvida, são cinéticas, mas também o são aquelas reações em que se mede a formação de um produto em 5, 10 ou 30 minutos de incubação. As medições da atividade da fosfatase alcalina e amilase, entre outras, são realizadas utilizando reações cinéticas.

Reação Cinética Contínua

As reações que utilizam medidas contínuas da formação de produtos são denominadas "reações de cinética contínua".

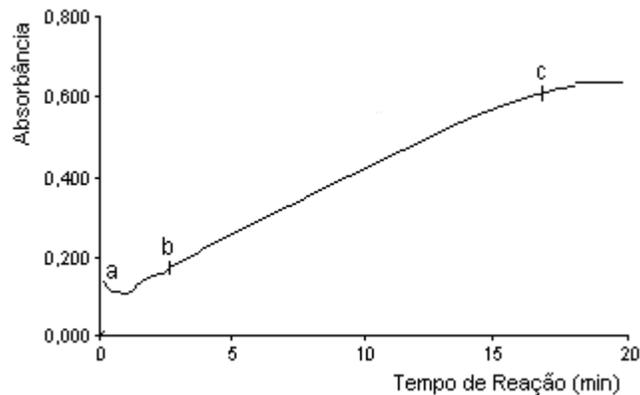


Figura 4: *a-b* - fase inicial da reação onde a velocidade não é constante; *b-c* - reação com velocidade constante onde são obtidas as diferenças de absorbância/minuto ($\Delta abs/min$), usadas para calcular o resultado; *c* - redução da velocidade de reação por esgotamento do substrato.

Na reação de cinética contínua quando não se dispõe de um fotômetro com temperatura controlada, deve-se utilizar reação cinética de tempo fixo.

Reação Cinética de Tempo Fixo com medição em Ponto Final

As reações cinéticas de tempo fixo com medição em ponto final requerem um rigoroso controle do tempo e da temperatura de incubação, para que os resultados tenham a qualidade esperada. Um dos erros mais comuns neste tipo de reação ocorre no controle do tempo de incubação. Deve-se marcar o tempo no momento em que a amostra entra em contato com o substrato, que já deve estar na temperatura de incubação, isto é, dentro do banho-maria. Quando houver várias amostras a serem dosadas, pipetá-las com intervalos de tempo, 10 a 15 segundos. Quando o tempo se completar, interromper a reação com os mesmos intervalos.

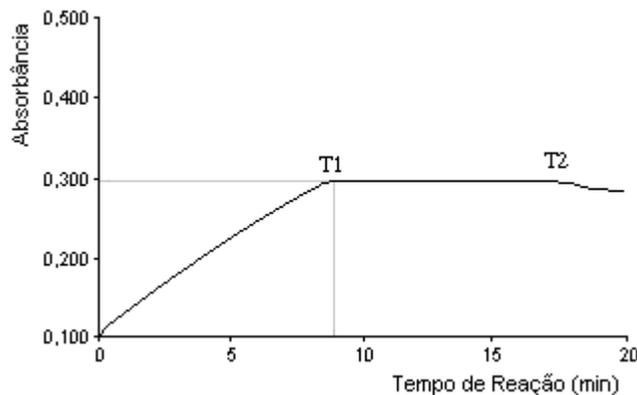


Figura 5: *T0 - T1* - Intervalo de tempo onde ocorre a reação; *T1* - Interrupção da reação enzimática; *T1 - T2* - Intervalo de estabilidade do produto da reação

Um mesmo analito pode ser determinado tanto por uma reação cinética contínua como por uma reação de cinética de tempo fixo e podemos citar como exemplo a determinação da Gama Glutamil Transferase.

Reação Cinética de Dois Pontos

As reações cinéticas são geralmente aplicadas nas determinações de atividade de enzimas, mas podem ser utilizadas para determinação de analitos, habitualmente ensaiados por reações de ponto final. A creatinina é comumente dosada com uma reação de ponto final, mas pode-se também utilizar uma reação cinética de dois pontos. Neste caso, a reação de ponto final é aplicada em metodologias manuais e a reação cinética é utilizada, principalmente, em metodologias automatizadas.

Quando se dispõe de facilidades instrumentais para medidas fotométricas contínuas em tempos reduzidos, pode-se medir em modo cinético de dois pontos vários analitos habitualmente ensaiados por reações de ponto final. Se uma determinação de glicose, usando a enzima glicose oxidase, é medida em 10 minutos na reação de ponto final, pode-se realizar a mesma determinação usando um instrumento capaz de medir a reação em um tempo de 5 minutos ou menos, quando se tem a certeza de que as medições das amostras desconhecidas, calibradores e controles serão realizadas no mesmo tempo de reação e que a velocidade de reação é a mesma para amostras, controles e calibradores.

As reações cinéticas de dois pontos podem ser utilizadas para diminuir o tempo de reação, minimizar a ação de interferentes ou estender a linearidade do sistema analítico. Comumente, as reações cinéticas de dois pontos utilizam a fase inicial da reação com uma medição aos 30 segundos, que servirá como branco, e outra medição aos 90 segundos. Utiliza-se então o delta da reação para calcular a concentração do analito.

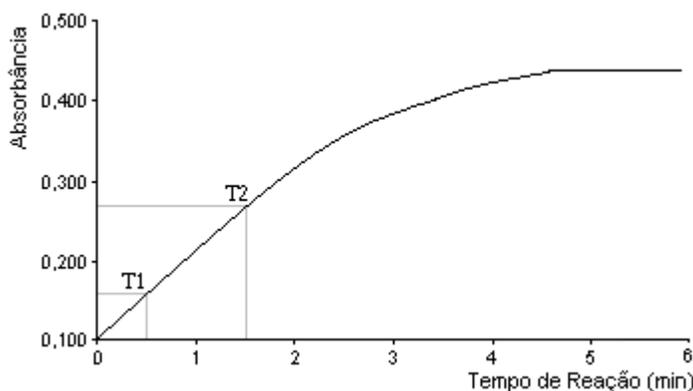


Figura 6: A diferença de absorbância: $(T2-T1)$ é usada para cálculo do resultado.

A escolha do intervalo de medição mais adequado irá depender da melhor linearidade, da eliminação de interferentes ou da melhor sensibilidade. Observar que a velocidade da reação é maior nos tempos iniciais, onde logicamente a sensibilidade é maior.

Existem reações cinéticas de dois pontos em que os intervalos são maiores, como no caso da frutossamina, quando é necessário um tempo mais longo na fase inicial para maximizar a eliminação de interferentes. Deve-se enfatizar que o controle da temperatura também é fundamental nas reações cinéticas de dois pontos.

Observações

Na reação Cinética Contínua e Cinética de 2 Pontos, é importante que o equipamento tenha cubeta termostalizada.

Na reação Cinética de Tempo Fixo é imprescindível um rigoroso controle da temperatura e do tempo de incubação.

Reação Crescente e Reação Decrescente

Reação Crescente – São caracterizadas pelo aumento da concentração do produto formado ou de um dos reagentes.

Reação Decrescente – São caracterizadas pela diminuição da concentração do produto ou de um dos reagentes.

Modo de Leitura

Monocromática - A absorbância utilizada para cálculo é o resultado da leitura realizada em um único comprimento de onda.

Bicromática – A absorbância utilizada para cálculo é o resultado da diferença entre as leituras realizadas no comprimento de onda primário e no comprimento de onda secundário. As leituras bicromáticas são utilizadas para minimizar a ação de interferentes, principalmente a lipemia.

Conclusão

As reações representam a base do trabalho no Laboratório Clínico e o conhecimento dos vários modelos é relevante para uma atuação adequada e intervenção em muitas dificuldades técnicas encontradas no dia a dia do trabalho.

Para finalizar, procuramos sintetizar nas duas figuras abaixo, as principais reações utilizadas no Laboratório, classificando-as de acordo com o produto formado ou o modelo da reação.

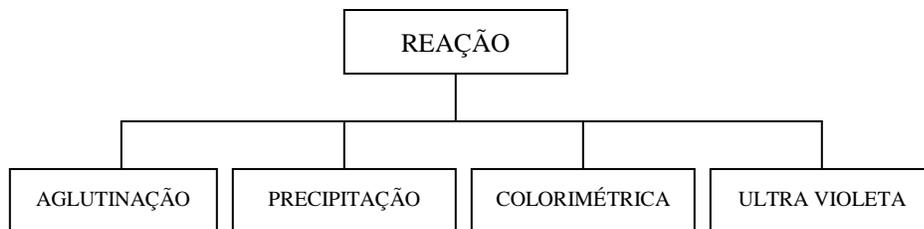


Figura 7: Reações segundo o produto formado

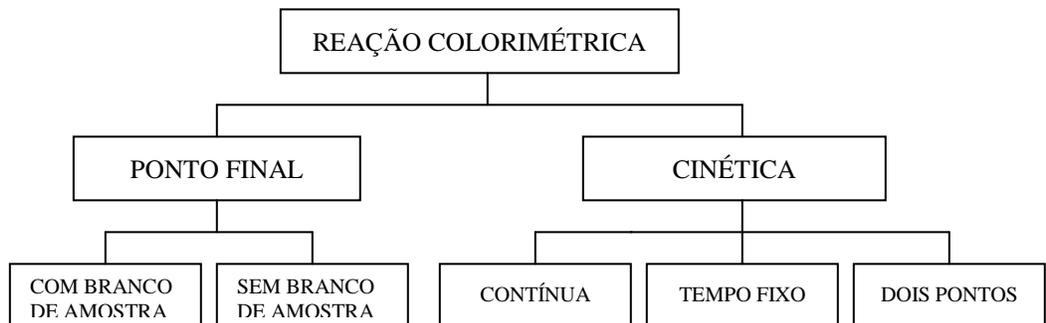


Figura 8: Reações segundo o modelo da reação ou o procedimento

INTERVENÇÃO EM PROBLEMAS TÉCNICOS

Um problema técnico ocorre quando existe uma dificuldade em se obter o resultado de um determinado ensaio ou quando a reação não se mostra com o desempenho adequado ou esperado.

A criação de um modelo de orientação, capaz de identificar todas as causas de problemas e com habilidades suficientes para indicar as formas de solução, é uma tarefa bastante difícil, pois são inúmeras as causas e fatores responsáveis por problemas técnicos. Entretanto, estas dificuldades não impedem a criação de um modelo experimental com possibilidades de fornecer ajuda efetiva.

Modelo experimental

A forma inicial para abordar um problema técnico consiste em caracterizar o erro que está ocorrendo.

Se a calibração ou os resultados de controles ou amostras de paciente apresentam uma variabilidade muito grande, seja nas determinações em duplicata ou no dia a dia, está ocorrendo um **Erro Aleatório**.

Este erro pode ser devido às seguintes causas: amostra inadequada, erros na medição da amostra, oscilação da temperatura ou tempos incorretos de incubação, técnica mal conduzida, vidraria contaminada, defeitos no fotômetro e água de má qualidade.

Se os resultados mostram valores consistentemente elevados ou diminuídos, está ocorrendo um **Erro Sistemático**, que tem como causas principais os seguintes fatores: amostras inadequadas seja por erros de medida, de conservação ou de preparo, temperatura ou tempo incorreto de incubação, erros de calibração, reagentes contaminados, inadequadamente conservados ou preparados de modo incorreto, defeito no fotômetro, bias do analista e água de má qualidade.

Ocorrendo um problema técnico, deve ser feita uma investigação para encontrar a causa e introduzir as medidas de correção.

Deve-se, em primeiro lugar, fazer uma revisão de todo o processo operacional, procurando as causas mais óbvias como: pipetas utilizadas, principalmente a usada na medida da amostra; volume correto de amostra e reagente; relação correta do volume amostra/reagente; omissão ou troca de reagentes; desempenho do fotômetro; protocolo adequado de acordo com orientação do fabricante e correção dos cálculos dos resultados.

É evidente que um conhecimento adequado da metodologia, das causas de erro e a experiência com a metodologia irão contribuir decisivamente para identificar as causas do problema e encontrar uma solução.

Deve ser criado um esquema de avaliação dos problemas, que, para conveniência, pode ser dividido em 3 subunidades: pré-analítica, analítica e pós-analítica.

A idéia é estabelecer pontos de verificação em cada passo da metodologia, visando identificar o erro e ajudar na solução do problema.

Cada método deve ter seu esquema próprio, pois eles diferem em etapas e procedimentos.

Relacionaremos a seguir um roteiro básico contemplando as três fases analíticas.

Fase pré-analítica

Não existem meios físicos de controlar a ação dos efeitos pré-analíticos como existem os materiais de controle para a fase analítica.

Para realizar esse controle deve-se basear em treinamento de pessoal, padronização dos procedimentos e registro das atividades.

Preparo do paciente

Definir procedimentos da adequação ao preparo do paciente.

1. Prática de exercício físico.
2. Jejum de acordo com a necessidade do analito a ser determinado.
3. Dieta.
4. Drogas Terapêuticas (Efeito Fisiológico **in vivo** e **in vitro**).
5. Postura.
6. Variação circadiana
7. Consumo de álcool.
8. Fumo

Coleta e Obtenção da amostra

1. Conferência da identificação do paciente.
2. Definição do momento correto para obtenção da amostra.
3. Uso do anticoagulante correto de acordo com o método a ser utilizado.
4. Preservação correta da amostra.

Processamento da amostra

1. Separação das células no tempo correto.
2. Atenção para necessidade de extração ou outro processo preparativo.
3. Armazenamento correto (temperatura de armazenamento, proteção da luz).
4. Condição da amostra e adequação para o teste: Amostra icterica, turva ou hemolisada.

ANALISADOR MANUAL E SEMIAUTOMÁTICO

Amostra (amostra de paciente, material calibrador e controle)

1. Certificar-se da correta limpeza da vidraria.
2. Conferir a pipeta utilizada de acordo com o volume requerido.
3. Usar ponteiras adequadas para a pipeta automática em uso.
4. Verificar o procedimento de pipetagem.
5. Criar mecanismos que impeçam a troca de amostras.
6. Verificar a condição das amostras (presença de interferentes).
7. Verificar condições de reconstituição, armazenamento e estabilidade de material calibrador e controles.

Reagente

1. Conferir o preparo de reagentes (quando for o caso).
2. Verificar se o reagente está dentro de sua validade e se foi armazenado corretamente.
3. Verificar modificações visuais no reagente (turvação, precipitação, mudança da cor).

Incubação

1. Monitorar o tempo e a temperatura de incubação.
2. Certificar-se de que a adição de amostra ao substrato seja efetuada na temperatura de incubação.
3. Na determinação de enzimas, após a mistura de amostra e substrato, observar o tempo crítico de incubação.
4. O nível de água no banho-maria deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio.

Procedimento

1. Certificar-se de que a manutenção preventiva do equipamento está adequada.
2. Verificar os Zeros mecânico e elétrico do equipamento.
3. A cubeta de medição deve estar íntegra, limpa e corretamente posicionada.
4. Verificar o volume mínimo de reagente necessário para a medição.
5. Utilizar a proporção amostra/reagente de acordo com o método em uso.
6. Conferir se o protocolo está correto, de acordo com as orientações do fabricante do reagente (modo de reação, filtro, volumes, tempo de incubação....).
7. Verificar se os valores dos controles estão dentro dos limites estabelecidos.
8. Analisar os mapas de controle verificando se existem tendências ou desvios.
9. Verificar se o Fator de Calibração está se mantendo (histórico de fatores).

ANALISADOR AUTOMÁTICO

Amostra (amostra de paciente, material calibrador e controle)

1. Verificar a condição das amostras (presença de interferentes).
2. Verificar condições de reconstituição, armazenamento e estabilidade de material calibrador e controles.

Reagente

1. Conferir o preparo correto de reagentes (quando for o caso).
2. Verificar se o reagente está dentro de sua validade e se foi armazenado corretamente.
3. Verificar modificações visuais no reagente (turvação, precipitação, modificação da cor).
4. Verificar a estabilidade do reagente "onboard".

Procedimento

1. Certificar-se de que a manutenção preventiva do equipamento está adequada.
2. Verificar se a manutenção diária foi realizada.
3. Certificar-se de que amostras e reagentes estão posicionados corretamente.
4. Certificar-se de que não há presença de bolhas de ar na superfície das amostras e dos reagentes colocados no analisador.
5. Conferir se o protocolo está correto, de acordo com as orientações do fabricante do reagente (modo de reação, filtro, volumes, tempo de incubação....).
6. Verificar se o Fator de Calibração está se mantendo (histórico de fatores).
7. Verificar se os valores dos controles estão dentro dos limites estabelecidos.
8. Analisar os mapas de controle verificando se existem tendências ou desvios.

Fase pós-analítica

Cálculos

1. Verificar conformidade dos cálculos.
2. Verificar se o resultado encontrado está dentro da linearidade do método.
3. Verificar se foi feita diluição da amostra e se a diluição foi considerada no momento dos cálculos.

Resultados ou relatórios

1. Liberar laudo legível, impedindo erros na interpretação.
2. Verificar se houve erros de transcrição.

Os problemas técnicos ocorrem em situações inesperadas, muitas vezes em metodologias que estão operando em condições estáveis no laboratório. Portanto, na ocorrência de uma dificuldade com determinado método, deve-se procurar uma das causas de erro mencionadas acima, para encontrar a solução para o problema.

Referencias

- 1- CLSI document C3-A4 – Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Fourth Edition.
- 2- Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Burtis CA, Ashood ER, 4a edição, The W.B. Saunders Co, Philadelphia, 2006
- 3- Critérios para Uso de Amostras – Informativo Labtest
- 4- Guia Técnico – Informativo Labtest

Labtest Diagnóstica S.A.

Av. Paulo Ferreira da Costa, 600, Vista Alegre
Lagoa Santa / MG - Brasil. CEP: 33400-000

Serviço de Assessoria Científica

DDG: 0800 031 3411

sac@labtest.com.br

