

Artigo de conclusão do curso de pós-graduação *lato sensu* em hematologia e banco de sangue

A.C & T - Academia de Ciéncia e Tecnologia de São José do Rio Preto, abril 2010.

Controle da qualidade em hematologia automatizada

José Garcia de Araujo Junior

Controle da qualidade em hematologia automatizada
José Garcia de Araujo Junior

Resumo

Com o grande numero de pacientes em laboratórios de análises clínicas, existe a necessidade da utilização do avanço da tecnologia, e o setor de hematologia está incluída neste avanço. O setor de hematologia do laboratório Sabin de análises clínicas de Brasília-DF realiza aproximadamente 2.000 hemogramas por dia. Estes exames são realizados por quatro equipamentos automatizados (XE 2100-Sysmex) e feita a contagem diferencial e análise morfológica dos alterados. Entretanto, mesmo com aparelhos modernos a calibração e o controle de qualidade devem ser utilizados para monitorar o cumprimento dos requisitos da qualidade. O programa de controle interno e externo da qualidade do setor de Hematologia deve estar bem definido e documentado. O controle interno é realizado através de um controle comercial e um controle de amostra de paciente para avaliar a reprodutibilidade dos equipamentos. O controle externo é realizado através de uma instituição de padrão nacional, que coordena o envio de amostras e análise dos resultados que são comparados entre outros laboratórios. O laboratório Sabin participa do PELM (programa de exceléncia para laboratórios médicos). Esses controles de qualidade devem ser avaliados por profissionais altamente capacitados, mostrando que, mesmo com o aumento da automação a participação do homem nesse processo é imprescindível, ao homem foi dado o dom do “Pensar”, partindo daí a avaliação crítica e determinante para o fundamental nos controles de qualidade, o monitoramento contínuo e consequente exatidão dos resultados.

Palavras-Chave: controle de qualidade, hemograma, automação, calibração.

Artigo de conclusão do curso de pós-graduação *Lato Sensu* em Hematologia e Banco de Sangue (março de 2009 a abril de 2010).

Endereço para correspondência: SHIN CA 05 bloco I apto 321, Lago Norte, 71503-505, Brasília, DF
e-mail: j.garcia.junior@uol.com.br

INTRODUÇÃO

Controle de qualidade é um sistema que mantém um padrão de qualidade em um produto ou em um processo. Para que o controle de qualidade seja aceitável é necessário que sejam realizados auditórias que verifiquem a precisão e exatidão do equipamento, a técnica e os exames.

A Garantia da Qualidade na Hematologia tem o objetivo de assegurar a confiabilidade dos testes hematológicos, no caso, o Hemograma Automatizado, em todas as fases (pré-analítica, analítica e pós-analítica). Em relação à fase analítica, é necessário obter imprecisão e inexactidão aceitáveis. A exatidão relaciona-se com a aproximação do valor obtido em relação ao valor considerado real da amostra. A precisão relaciona-se com a reproducibilidade de um resultado, seja ele exato ou não. Com a tecnologia atual, a validação do Hemograma Automatizado deve ser obtida por meio de programa de Garantia da Qualidade permanente e rigoroso. Para que este programa seja efetivo, é essencial determinar tarefas e responsabilidades, ter acesso a informações clínicas de pacientes e revisar continuamente os dados disponíveis. Os procedimentos que devem ser incluídos em um programa de garantia da qualidade abrangente variam com os testes realizados, os instrumentos usados, o porte do laboratório e o número de amostras, o sistema de informática laboratorial e a quantidade de tempo que pode ser disponibilizada para o programa. As atividades são:

- Calibração de equipamentos (a intervalos, alguns diários, outros semanais, outros após atividades de manutenção)
- Testes em materiais de controle (diário): Amostras controle analisadas em cada batelada de amostras, gráfico de Levey-Jennings e regras múltiplas (ex: Westgard).
- Análise estatística de dados de pacientes (diário): média de VCM, HCM e CHCM.
- Programas de proficiência.

Segundo as normas do PALC (SBPC/ML) e da Vigilância Sanitária, o programa de controle interno e externo da qualidade do setor de Hematologia deve estar bem definido e documentado. O programa deve garantir a qualidade das análises em todas as fases (pré-analítica, analítica e pós-analítica), incluindo a identificação e preparo dos pacientes, a identificação, a conservação, o transporte e o processamento das amostras e a liberação de laudos acurados no prazo adequado. O programa deve possibilitar a detecção de problemas nos sistemas analíticos e a identificação de oportunidades de melhoria. O laboratório deve ser capaz de desenvolver planos de ações corretivas e preventivas com base nos dados observados.

Os procedimentos que devem ser incluídos em um programa de garantia da qualidade abrangente variam com os testes realizados, os instrumentos usados (especialmente aqueles que incluem a realização de diferencial de leucócitos), o porte do laboratório e o número de amostras, o sistema de informática laboratorial e a quantidade de tempo que pode ser disponibilizada para o programa. As atividades são:

- Calibração de equipamentos (a intervalos, alguns diários, outros semanais, outros após atividades de manutenção): por meio de preparações de referência

e padrões; ex. preparações de referência de HiCN, sangue preservado (em ACD ou CPD), padrões de células estabilizadas, calibradores com valores certificados.

- Calibração de pipetas e sistemas de diluição (inicialmente e a intervalos quando indicado).
- Testes em materiais de controle (diário): Amostras controle analisadas em cada batelada de amostras, gráfico de Levey-Jennings e regras múltiplas (ex: Westgard), CUSUM, medidas em duplicata de amostras de pacientes.
- Análise estatística de dados de pacientes (diário): média de VCM, HCM e CHCM.
- Levantamentos interlaboratoriais (a intervalos, geralmente mensais ou trimestrais).
- Avaliação de correlação clínico-patológica (todo o tempo): relatórios de dados cumulativos de pacientes, análise de esfregaços e dados numéricos, dados clínicos.
- Programas de proficiênci a.

DESENVOLVIMENTO

No estudo do controle de qualidade faz-se necessário reforçar a definição de precisão e exatidão, já que o objetivo do controle de qualidade é garantir a efetividade no processo analítico:

- Precisão: habilidade de repetir o mesmo resultado
- Exatidão: quão próximo do valor verdadeiro estão os resultados

Resultado pode ser preciso mas não necessariamente exato, mas a exatidão é questionável sem a precisão. **Fontes de erro**

- Erros da amostra: manipulação inadequada da amostra, hemólise, mal acondicionamento da amostra, etc.
- Erros do operador: erros na identificação da amostra, técnica incorreta, leitura ou interpretação inadequada dos resultados da amostra, má homogeneização da amostra
- Erros técnicos:
 - Sistemáticos: relacionados com reativos e apareceriam constantes
 - Aleatórios: flutuações no instrumento ou no ambiente de trabalho

Ações preventivas

- Prestar atenção
- Prestar atenção aos detalhes
- Importante é ter uma calibração adequada e completa, manutenção rigorosa e o uso dos equipamentos seguindo as instruções do fabricante

Controles comerciais

Tendências

- Os controles comerciais não permanecem estabilizados por toda vida útil do produto
- Isso é importante quando se avalia os problemas dos equipamentos, no ajuste dos limites dos controles e os gráficos
- Parâmetros que diminuem

Mono	- 5%
DIFF-Y	- 15%
IRF	- 20%
HFR	- 25% a -35%
MFR	- 15% a -20%
RBC-X	- 10%

- Parâmetros que aumentam

MCV	+ 1% a 2%
RDW-SD	+ 1% a 2%
LFR	+ 5% a 16%

Fonte: reporte dos participantes QAP (7-23-2004)

Média do lote

- Usualmente a média do lote impressa nas bulas que acompanham o controle são obtidas seguindo procedimentos indicados pela instrução do fabricante e através de amostras que representam o lote;
- O range esperado da média reflete a variação que pode ocorrer entre laboratórios devido a diferenças em:
 - Técnicas
 - Equipamentos
 - Reativos, etc.

Estabelecimento da média e desvio padrão

- Cada laboratório deve estabelecer sua própria média e desvio padrão
- A média pode ser obtida correndo os níveis de controle de qualidade 10 ou 20 vezes, não consecutivamente

Limites históricos

- Para cada parâmetro de cada nível deve ser estabelecido um range ao redor da média
- Este range chamado limite % estará baseado em como o instrumento se comporta historicamente
- Este limite é calculado utilizando a média dos CV% dos últimos 3 lotes
- **Coeficiente de variação**
- O coeficiente de variação também é uma medida de variabilidade devido a precisão do instrumento e a estabilidade do controle
- A variação é expressa como **porcentagem** não como um valor absoluto
- Pode ser aplicado qualquer média
- $CV = [DE \times 100] / \text{Média}$

Controle Externo da Qualidade

Ensaios de proficiência

O laboratório clínico deve participar do Programa de Ensaios de Proficiência XXX, oferecido pelo provedor XXX, precisa ser definido os analitos que estarão inclusos nesse programa, seguindo uma tabela conforme abaixo:

Tabela 1 – Programas de Proficiência

Analito	Ensaios de proficiência	Frequência

Os ensaios de proficiência (EP) e as avaliações alternativas da qualidade são integradas à rotina do laboratório. Não há comunicação entre laboratórios acerca de ensaios de proficiência. No caso da análise de imagens (lâminas, slides, etc), ela é feita por um único indivíduo que a

realize rotineiramente em pacientes. A responsabilidade por essa análise é distribuída, a cada rodada da proficiência, em rodízio por todos os que a realizam. Há registros dessas análises em rodízio. Revisões em grupo eu em consenso só são permitidas para casos não rotineiros, onde isso seria feito também para os pacientes.

Nota: A análise em replicata para amostras de ensaios de proficiência só é aceitável se os pacientes também são analisados em replicata. Caso o laboratório use múltiplos sistemas analíticos para o mesmo analito, o EP deve ser analisado pelo sistema analítico principal.

Controle externo alternativo

Para analitos do Setor de Hematologia para os quais não há ensaios de proficiência o laboratório realiza avaliações com periodicidade mínima semestral por outros métodos como:

- participação em comparações interlaboratoriais de fabricantes;
- amostra dividida com laboratório de referência, um laboratório acreditado ou outro parceiro qualificado;
- amostra dividida com método de referência, próprio;
- análise de material padrão certificado;
- análise de pools regionais;
- validação clínica;
- outros métodos adequados e documentados.

Tabela 2 – Controle Externo Alternativo

Analito	CEQ Alternativo	Frequência	Critérios de Aceitabilidade

Gestão do CEQ

A responsabilidade pela definição dos procedimentos de CEQ, de acordo com boas práticas de laboratório e científicas, é da Direção do Laboratório ou do responsável formalmente delegado. Os resultados inadequados em ensaios de proficiência e de avaliação externa alternativa são analisados criticamente e, se necessário, são tomadas ações corretivas adequadas. Isso é feito dentro de um mês após o recebimento das avaliações. Os ensaios de proficiência (EP) e as avaliações alternativas da qualidade são integradas à rotina do laboratório. A análise em replicata para amostras de ensaios de proficiência só é aceitável se os pacientes também são analisados em replicata. Caso o laboratório use múltiplos sistemas analíticos para o mesmo analito, o EP é analisado pelo sistema analítico principal. Não há comunicação entre laboratórios acerca de ensaios de proficiência. No caso da análise de imagens (lâminas, slides, etc), ela é feita por um único indivíduo que a realize rotineiramente em pacientes. A responsabilidade por essa análise é distribuída, a cada rodada da proficiência, em rodízio por todos os que a realizam. Há registros dessas análises em rodízio. Revisões em grupo eu em consenso só são permitidas para casos não rotineiros, onde isso seria feito também para os pacientes.

A Direção do Laboratório ou pessoa designada é responsável pelo acompanhamento dos resultados dos ensaios de proficiência e das avaliações alternativas da qualidade.

Controle interno da qualidade

Antes da liberação de resultados de pacientes, os dados de CIQ são julgados aceitáveis e há registros dessa atividade. A Direção do Laboratório revê os dados de QC pelo menos mensalmente.

Precisa-se descrever a garantia da qualidade da fase pré-analítica, contendo as sistemáticas para:

- Identificação do paciente;
- Preparo do paciente;
- Coleta e identificação das amostras;
- Conservação das amostras;
- Condições para transporte e armazenamento das amostras.

Limites de aceitabilidade para os controles usados em procedimentos qualitativos e quantitativos são estabelecidos para todas as análises da hematologia. O objetivo é contar com limites lógicos e cientificamente válidos para a tomada de ações corretivas adequadas por parte do pessoal técnico encarregado, antes da liberação de resultados de pacientes. O laboratório calcula a imprecisão das análises quantitativas com base nos resultados do CIQ (ex, DP e CV) a intervalos especificados (um bom intervalo é o mensal). Para os dados do Hemograma, quando não se usa sangue controle estabilizado, essas estatísticas são calculadas através dos dados obtidos com a análise de amostras retidas, usando os DP de cada replicata.

É importante que seja realizada a revisão mensal dos dados estatísticos referentes à imprecisão das análises quantitativas e realiza-se uma investigação quando se observa desvio significativo com relação aos dados anteriores.

As amostras controle são testadas da mesma maneira que as amostras de pacientes. E mais, as amostras controle são analisadas pelo mesmo pessoal que realiza os testes de rotina. Isso não implica que cada operador realize o CIQ todos os dias, mas de forma que cada sistema analítico tenha seu CIQ realizado na freqüência indicada. Na medida do possível, procura-se implantar controles para todos os passos das análises, sabendo-se, contudo, que as etapas pré- e pós-analíticas podem diferir consideravelmente entre os controles e os pacientes. Os resultados dos controles são avaliados quanto à sua aceitabilidade antes de se relatar resultados de pacientes.

Há uma sistemática documentada e contínua para a avaliação da função e para a manutenção de equipamentos críticos e também para a detecção e a correção de erros de transcrição que possam afetar os pacientes. Há uma sistemática documentada para a verificação de resultados incomumente aumentados ou diminuídos para cada sistema analítico, que não implica, contudo, em que haja verificação de todos os resultados fora da faixa normal. Há uma sistemática documentada para a

detecção de erros de transcrição, interferências e erros analíticos, e resultados pouco comuns ou pouco prováveis que permite a correção de resultados errôneos em prazo adequado. As correções feitas após a liberação e/ou uso de laudos são feitas, contudo sabendo-se que não têm o menor valor clínico.

É necessário que haja uma sistemática documentada para a detecção e correção de erros ou interferências analíticas significativas para cada sistema analítico. Na Hematologia deve existir uma listagem das situações mais comumente associadas a resultados com perda de acurácia e das ações recomendadas para sua prevenção e correção, quando possível, incluindo o uso de sistemas alternativos ou a não-liberação de resultados.

Fase pré-analítica

As amostras coletadas em anticoagulante para estudos hematológicos são homogeneizadas adequadamente imediatamente antes da análise.

É importante que haja estudos e documentação de que a técnica de homogeneização usada (rotatória, amostrador automático, inversões manuais) sejam suficientes para assegurar a reproduzibilidade dos resultados de hemograma. Algumas plataformas tipo agitação podem ser adequadas para manter uma amostra previamente homogeneizada satisfatória por algum tempo, mas podem ser incapazes de homogeneizar uma amostra sedimentada.

As amostras para a rotina hematológica (ex: hemograma, diferencial de leucócitos) é coletada em plasma colhido em EDTA potássico para a minização das alterações das características celulares.

É importante lembrar que: *O oxalato pode causar alterações morfológicas inadequadas como vacuolização citoplasmática, cristais citoplasmáticos e lobulação nuclear irregular. A heparina pode causar aglutinação (especialmente de plaquetas), pseudoleucocitose com pseudotrombocitopenia (em alguns contadores) e coloração de fundo azulada (coloração tipo Wright). O citrato pode ser útil em alguns casos de aglutinação de plaquetas devido ao EDTA, mas os dados referentes à contagem de células deve ser corrigida quanto aos efeitos da diluição.*

Há critérios documentados para a rejeição de amostras inadequadas e para a aceitação de amostras subótimas. Há uma sistemática para notificação ao médico solicitante, e para a informação da situação da amostra no laudo quando o médico opta pela notificação do resultado. O laboratório registra os resultados do diálogo com o médico, quando necessário.

As amostras coletadas em tubos capilares tipo micro-hematórito ou sistemas similares são obtidas em duplicata sempre que possível e são adequadamente identificadas durante toda a seqüência analítica. Os recipientes de microcoleta não precisam ser coletados em duplicata. Devido ao risco de acidentes de trabalho, evita-se utilizar tubos capilares de vidro.

As amostras para hemograma são inspecionadas quanto à presença de coágulos antes da liberação dos laudos. Visualmente, com o uso de bastões ou

por analise do histograma/flags, ou à inspeção de esfregaços (agregados de fibrina ou de plaquetas).

As amostras para hemograma são inspecionadas para a presença de hemólise significativa, a qual pode resultar em níveis falsamente diminuídos de eritrócitos e de hematocrito, bem como falsa elevação das plaquetas a partir do estroma eritrocitário. Plasma visivelmente avermelhado em um tubo anticoagulado com EDTA após sedimentação ou centrifugação pode originar uma investigação de hemólise in vivo (na qual os resultados de hemograma são válidos) contra uma hemólise in vitro (na qual alguns ou todos os parâmetros poderão não ser válidos. A lipemia interferente também deve ser verificada antes da liberação dos resultados, uma vez que pode afetar adversamente a concentração de hemoglobina e a contagem de leucócitos).

O laboratório definiu as condições de armazenamento e estabilidade para todos os parâmetros hematológicos, uma vez que alterações dependentes de tempo e temperatura podem ocorrer, criando resultados espúrios.

Fase analítica

Reagentes

A verificação documentada do desempenho dos reagentes é um requisito. A verificação pode ser realizada usando-se uma das seguintes estratégias: análise direta contra materiais de referência, testes em paralelos entre os reagentes novos e os reagentes em uso, verificação dos resultados de controles, com o objetivo de se verificar o reagente antes que o mesmo seja posto em uso na rotina de pacientes. Para os testes qualitativos, a verificação cruzada mínima inclui retestar pelo menos uma amostra de paciente positiva e outra negativa, de forma a assegurar que o novo lote gera resultados equivalentes. O uso de amostras fracamente positivas pode ser indicado para alguns sistemas.

Os reagentes e soluções são adequadamente rotulados, quando aplicável e apropriado, com os seguintes elementos:

- Conteúdo e quantidade, concentração ou título;
- Condições de armazenamento;
- Data de preparo ou de reconstituição;
- Data de expiração
- Alertas de segurança

As informações listadas podem estar registradas em forma de fichas em papel ou eletrônicas, em vez de nos próprios recipientes, desde que todos os recipientes estejam identificados de forma a garantir a rastreabilidade das informações. A data de recebimento é útil, mas não é um requisito obrigatório. A data de abertura é registrada caso leve a uma nova data de expiração e/ou a alterações das condições de armazenamento. Todos os reagentes são usados dentro do período de validade.

Equipamentos e instrumentos

Os microscópios têm uma sistemática documentada de limpeza e de manutenção preventiva. Os microscópios são mantidos limpos, oticamente alinhados, e com a iluminação de Koehler adequada. Utiliza-se a microscopia de contraste de fase para a contagem manual de plaquetas.

Os registros das manutenções, das ordens de serviço e dos consertos (ou suas cópias) são mantidos de forma a estarem prontamente disponíveis para os operadores.

Contadores hematológicos

Calibração

As possíveis técnicas de calibração incluem:

- o uso de múltiplas amostras de sangue nativas, recentes; e
- o uso de preparações comerciais, estabilizadas, de eritrócitos, leucócitos (ou seus substitutos) e plaquetas (ou suas substitutas).

Em geral, o laboratório adota uma dessas metodologias como técnica primária de calibração e a outra para “backup” ou para verificação da calibração primária ou em uma situação de emergência. Todas as técnicas de calibração devem incluir verificações periódicas das dosagens de hemoglobina contra um padrão certificado (ex. ICSH/WHO international haemiglobincyanide standard), ou outro material que tenha sido certificado pelo fabricante como rastreável ao padrão de cianeto de hemoglobina com o uso de procedimentos de referência. Materiais comuns, usados para controle da qualidade, não são adequados para uso na calibração. Quando o laboratório utilizar contadores hematológicos pré-calibrados pelo fabricante e que não possam ser ajustados pelo laboratório, deve haver uma sistemática para a verificação da calibração com materiais de controle adequados ao sistema.

Calibração com amostra recente de sangue total

Está definido e documentado o procedimento passo a passo para a calibração periódica do contador hematológico por meio de amostras recentes de sangue total, multiplamente analisadas, com indicações claras para a necessidade de recalibração com base nos dados do controle interno da qualidade.

A calibração inicial ou a calibração do equipamento primário (sistema analítico principal) envolve a análise em duplicata de pelo menos 10 amostras por um sistema (método) de referência. O procedimento é estabelecido de acordo com as instruções do fabricante.

Foram estabelecidos critérios para a verificação da calibração, os quais incluem:

- Ao haver troca completa de reagentes (ex: mudança de fornecedor ou mudança de reagente pelo mesmo fornecedor);
- Quando indicado pelos dados do controle interno da qualidade;
- Após manutenção ou conserto de grande monta;
- Quando recomendado pelo fabricante;
- Pelo menos uma vez a cada seis meses.

Importante : Um método de verificação da calibração usado comumente envolve a análise de calibrador comercial e a comparação dos resultados com os resultados publicados pelo fabricante. Quando os critérios de verificação da calibração são violados, faz-se outra calibração. Estudos de linearidade não são necessários.

O procedimento de recalibração de contadores hematológicos usando sangue total fresco requer uma de duas abordagens:

- Comparação de resultados de 10 amostras analisadas em duplicata entre o equipamento que está sendo verificado e um equipamento que se saiba que está adequadamente calibrado; ou
- Análise em duplicata de pelo menos 10 amostras contra um método de referência.

Em qualquer caso, seguem-se as recomendações do fabricante.

As amostras selecionadas devem:

- Ser diferentes entre si;
- Ter valores cobrindo a faixa de operação para o analito;
- Não devem gerar flags de possíveis anormalidades.

Após a calibração com uso de sangue total, o laboratório valida e registra esse procedimento.

Calibradores comerciais

Os calibradores comerciais representam uma maneira prática de assegurar a exatidão dos contadores hematológicos. Uma vez que há diferenças de acordo com a metodologia, os calibradores usados são aqueles específicos para o sistema analítico. Os calibradores comerciais têm seus valores assinalados com mais rigor do que os materiais de controle habituais, os quais não são usados na rotina como calibradores.

Quando sangue total estabilizado ou outros materiais comerciais têm que ser usados na recalibração periódica dos contadores automatizados, os valores alvo dos parâmetros são estabelecidos por métodos de referência. O laboratório pode tanto estabelecer esses valores como pode usar os valores certificados pelo fabricante.

Estão estabelecidos critérios para a verificação da calibração, os quais incluem:

- Ao haver troca completa de reagentes (ex: mudança de fornecedor ou mudança de reagente pelo mesmo fornecedor);
- Quando indicado pelos dados do controle interno da qualidade;
- Após manutenção ou conserto de grande monta;

- Quando recomendado pelo fabricante;
- Pelo menos uma vez a cada seis meses.

Um método de verificação da calibração que pode ser usado envolve a análise de replicatas de um calibrador comercial e a comparação dos resultados obtidos com os resultados publicados pelo fabricante. Quando os critérios de verificação da calibração são violados, faz-se outra calibração. Outro procedimento para a calibração dos contadores hematológicos exige a análise de sangue total estabilizado ou de outros materiais comerciais (“calibrador” comercial), com parâmetros certificados pelo fabricante. Uma vez realizada a calibração com os calibradores comerciais, o laboratório mantém registros da verificação do êxito da calibração, isto é, que foram estabelecidos resultados acurados.

Controle da qualidade dos contadores hematológicos

O processo longitudinal de controle da qualidade (CQ), ou seja, os procedimentos para controle dos equipamentos individuais e para a comparação entre eles incluem uma combinação de:

1. Uso de sangue total controle estabilizado ou preservado;
2. monitorização das médias móveis;
3. análise de amostras retidas de pacientes.

O laboratório calcula as suas próprias estatísticas de imprecisão para cada equipamento.

Segundo a CLIA-88, pelo menos dois controles de níveis diferentes devem ser analisados e avaliados a cada 24 horas. Para cada procedimento de CQ utilizado, o laboratório deve estabelecer os limites adequados. Por exemplo, os intervalos de valores esperados do sangue controle informados pelo fabricante não são sinônimos do DP intercorridas próprio e são provavelmente muito amplos para uso na rotina.

Controles estabilizados

Os materiais de controle estabilizados (sangue controle) são usados em dois níveis diferentes (ex: “normal” e “elevado”). O uso de três níveis de controle é uma derivação conceitual da química clínica e não se aplica aos contadores de partículas hematológicos. Amostras diluídas, de níveis baixos, “controles oncológicos” (ex: leucopênicas e trombocitopênicas) são menos informativas como indicadores do estado de calibração e não são nem necessárias nem recomendadas. Por exemplo, um bias de calibração de 10% será mais evidente, em termos numéricos, no nível alto de controle, menos evidente no nível normal e quase inaparente no nível baixo, sendo muito improvável que o nível baixo revele um problema que não tenha sido percebido nos outros níveis.

Há uma relação entre a freqüência dos controles e o número de amostras de pacientes analisadas. Quando a freqüência de uso do controle comercial for inferior a 2 por 24 horas, um ou mais

procedimentos adicionais de QC são adicionados para que se gere pelo menos dois pontos a cada 24 horas.

Para os controles ensaiados usados nos contadores hematológicos, os valores dos controles correspondem à metodologia usada e os valores alvo (média e intervalos) são verificados para a obtenção de valores próprios do laboratório. Para os controles não –ensaiados, o laboratório estabelece a média e intervalo para os valores-alvo de forma estatisticamente válida, por meio de 5 a 10 replicatas feitas em paralelo com o material em uso.

Médias móveis

O laboratório usa o controle por meio de médias móveis como descrito pelo fabricante dos equipamentos. A técnica de médias móveis (“weighed moving averages” ou Bull ou XB) é derivada de análises de amostras de pacientes em várias corridas analíticas e é uma técnica sensível para auxiliar na detecção de desvios ou alterações da calibração dos contadores hematológicos,. Sendo uma rotina de CQ complementar à rotina de uso de sanguess-controle e de amostras retidas de pacientes. O controle por meio da análise de amostras retidas (usado simultaneamente) auxilia na detecção de erros aleatórios e na detecção de bias quando as médias móveis são mascaradas por eventuais características de subpopulações de pacientes. Os limites estabelecidos para as médias móveis são sensíveis o bastante para a detecção de alterações da calibração de importância clínica. A recalibração não é necessária quando as variações são de pequena monta. Em outras palavras, deve haver uma alta probabilidade de detecção de erros e um baixo índice de rejeição falsa nos limites estabelecidos para as médias móveis.

Amostras retidas de pacientes

O laboratório usa o controle por meio de amostras retidas como meio de CQ complementar. O laboratório estabeleceu claramente, utilizando estatísticas válidas, os intervalos para concordância entre os resultados de replicatas de amostras retidas para a finalidade de controle da qualidade. Foram levadas em conta eventuais alterações decorrentes do intervalo de tempo entre as análises de parâmetros lábeis.

Determinação de comutatividade entre equipamentos

Quando o laboratório utiliza mais de um equipamento para a realização de contagens hematológicas ou testes de coagulação (do mesmo modelo e fabricante ou não), é realizada uma correlação entre seus resultados pelo menos a cada seis meses. O laboratório definiu claramente os critérios numéricos para a correlação entre os sistemas, usando critérios estatisticamente válidos. Os dados incluem a comparação periódica de todos os parâmetros, incluindo as diferenciais de leucócitos e os modos de aspiração abertos e fechados.

Detecção e verificação de erros

O laboratório consultou as informações do fabricante referentes a erros de detecção e de contagem de partículas e a resultados espúrios e

os documentou, sendo os operadores aptos a realizar essa detecção na rotina.

Os índices hematimétricos das amostras de pacientes (Índices de Wintrobe ou VCM, HCM e CHCM) são monitorizados rotineiramente para a detecção de erros aleatórios, disfunção de equipamentos ou resultados espúrios. O CHCM é o parâmetro mais útil para a verificação da acurácia dos resultados da série vermelha de uma amostra individual, uma vez que o CHCM varia normalmente dentro de uma faixa estreita. Um CHCM anormal é um bom flag para resultados espúrios na série vermelha. Resultados verdadeiramente aumentados de CHCM estão relacionados a esferocitose, ao passo que resultados diminuídos acompanham o VCM na deficiéncia de ferro grave. Quando esses parâmetros não se encontram alterados junto com a alteração do CHCM, uma ou mais das medições dos parâmetros dos glóbulos vermelhos está provavelmente errada. Os dados incorretos podem se dever a disfunções do equipamento ou a problemas com a amostra: elevação espúria de VCM e CHCM devida a crioaglutininas, CHCM falsamente elevado devido a lipemia e paraproteínas, CHCM espuriamente baixo acompanhado devido a leucocitose e efeitos osmóticos de hiperglicemia (alterando o VCM).

Importante : *O laboratório deve descrever uma sistemática para detecção e correção de erros e resultados espúrios ou então referenciar o respectivo documento. O VCM e o HCM são bastante constantes para cada paciente e a sua monitorização por meio de delta check pode propiciar uma rápida detecção de erros do tipo defeitos do equipamento e troca de amostras.*

Alguns erros possíveis:

- *Inclusão de partículas nucleadas junto com “leucócitos” na contagem global. Deve haver uma sistemática documentada para a correção das contagens automáticas em presença de eritroblastos e megacariócitos identificados, por exemplo, histograficamente ou citograficamente e por análise do esfregaço corado.*
- *Pseudomacrocitose devida a microcoágulos, aglutininas frias, rouleaux ou efeitos osmóticos de matriz.*
- *Pseudoleucocitose devida a aglutinação de plaquetas, plaquetas gigantes, eritrócitos não-lisados, eritrócitos nucleados, megacariócitos, inclusões dos eritrócitos, crioproteínas e mucinas circulantes.*
- *Hemoglobina e Índices hematimétricos errôneos devido a lipemia e leucocitose.*
- *Diminuição falsa dos eritrócitos e do hematócrito devido a hemólise in vitro ou microcitose extrema.*
- *Resultados falsamente diminuídos devidos a coágulos.*

Concentrações de analitos que estejam aparentemente abaixo ou acima da faixa de trabalho são relatadas como “inferiores a” ou “superiores a”. Alternativamente, quando adequado do ponto de vista clínico, as amostras cujos resultados excedem o limite superior da faixa de trabalho são diluídas de forma a que os valores obtidos caiam dentro da faixa analítica e os multiplicadores adequados são então aplicados.

Ao iniciar o uso de um sistema analítico, o laboratório estabelece ou verifica a faixa de trabalho(relatável) de cada parâmetro liberado por contadores (automáticos ou semi-automáticos). Em especial, o laboratório tem dados relativos à acurácia das contagens de amostras trombocitopênicas e plaquetopênicas. As amostras cuja contagem de plaquetas caem abaixo de *** (especificar) são reanalisadas por um segundo método: *** (especificar. Ex.: hemocitometria manual, estimativa semiquantitativa em esfregaço corado, citometria de fluxo fluorescente usando anticorpos monoclonais específicos para plaquetas). Ao se suspeitar de satelitose plaquetária (satelitismo), de número aumentado de plaquetas gigantes ou de agregados de plaquetas ao cito/histograma ou por flag do equipamento, a concentração de plaquetas é verificada de forma independente e por meio da análise de um esfregaço corado. Quando as plaquetas mostram-se agregadas após a coleta em EDTA, isso pode representar alterações induzidas pelo anticoagulante. Nesse caso as plaquetas são quantificadas em sangue coletado diretamente em diluente de contagem ou por meio do uso de um anticoagulante diferente (ex: citrato de sódio líquido com correção da diluição) ou por meio de sua estimativa usando um esfregaço sem anticoagulante.

Quando se suspeita de hemácias não-lisadas, satelitose plaquetária, número significativo de plaquetas gigantes ou de grumos de plaquetas por meio da análise dos histogramas ou rejeição dos resultados de plaquetas, a contagem de leucócitos global é verificada manualmente: por meio:

- 1) de contagem automatizada de amostra coletada em outro anticoagulante, ou
- 2) contagem automatizada em modo resistente à lise ou
- 3) avaliação semiquantitativa do esfregaço corado. Esse procedimento visa evitar a liberação de contagem falsamente elevada de leucócitos.

Quando um número significativo de partículas interferentes é identificado nos limiares de contagem inferior ou superior das plaquetas (por inspeção do histograma de plaquetas ou por flag), a concentração de plaquetas é verificada por um método alternativo: 1) instrumento diferente ou 2) hemocitometria ou 3) análise do esfregaço corado.

Manutenção

Há uma sistemática de rotina para a verificação das funções dos equipamentos e para a sua manutenção preventiva. Os resultados das verificações e manutenções são registrados. Os limites de tolerância para o desempenho adequado estão estabelecidos para todos os equipamentos, componentes ou procedimentos utilizados.

Contagem diferencial automatizada

A introdução de um novo contador hematológico com diferencial (tipo reconhecimento de padrão ou tipo fluxo) é avaliada pelo laboratório contra método de referência ou contra o método manual antes de ser colocado na rotina. O laboratório não necessita verificar os estudos do fabricante quanto aos flags de células anormais, contudo procura-se avaliar o

desempenho do equipamento com relação à população do laboratório. Os resultados dessa avaliação são registrados.

Deve ser estabelecida uma sistemática para o controle longitudinal do processo da contagem diferencial por meio da contagem automatizada.

Para os sistemas que se baseiam no reconhecimento de padrões microscópicos, isso é feito por meio da análise periódica de lâminas padrão conhecidas e análise de gráficos de Levey-Jennings. Para os sistemas de fluxo, pelo menos duas abordagens são razoáveis:

- comparação das diferenciais dos equipamentos realizadas em amostras nativas recentes com a diferencial manual convencional.
- Uso de material de controle comercial estabilizado composto de leucócitos ou partículas substitutas.

O equipamento automatizado e as determinações de referência devem ser tratados como replicatas das diferenciais manuais e devem ser avaliadas usando os critérios de concordância de ± 2 or 3 D.P. de Rümke.

O material de controle comercial contém partículas reais ou simuladas correspondentes a neutrófilos totais, granulócitos totais, células linfóides totais, monócitos, eosinófilos e basófilos, quando essas partículas são também enumeradas pelo contador hematológico e liberadas pelo laboratório. Quando são excedidos os limites e/ou critérios de aceitabilidade dos materiais de controle, há análise crítica das violações e, se apropriado, ações corretivas correspondentes documentadas. O registro das ações corretivas inclui a descrição sumária do problema, a causa presumida, a reanálise dos controles indicando a correção do problema.

O laboratório tem protocolos definidos para a validação e revisão de contagem diferencial de leucócitos automatizada para todos os achados clinicamente relevantes, inclusive de quantidades patológicas de células normais e anormais. Os mecanismos de “flag”(alerta) definidos incluem os próprios do equipamento, a inspeção visual dos citogramas/histogramas, critérios próprios do laboratório com base na sua experiência e com base em dados da literatura.

O laboratório deve descrever sua política e os procedimentos relacionados à diferencial de leucócitos automatizada ou então referenciar o respectivo documento Para o uso de controles comerciais, subclasses mistas de leucócitos (ex. “mononuclear “ou “large unclassified cells”- LUC) ou frações “remanescentes” não precisam ser avaliadas por procedimentos de CQ. Quando o equipamento usado identificadas e enumeradas discretas populações de células anormais pelo contador (ex: eritroblastos, blastos) o material de controle deve conter essas partículas ou suas simulações para a avaliação da acurácia da sua contagem.

Reticulócitos

Contagem automatizada de reticulócitos

A introdução de um novo método automatizado para a contagem de reticulócitos é precedida de estudos de validação por

comparação com um método de referência ou com a contagem manual.

O laboratório estabeleceu um procedimento para determinar a poténcia e a estabilidade dos corantes para reticulócitos.

A enumeração automatizada dos reticulócitos depende de corantes fluorescentes reveladores de RNA (ou DNA-RNA) como laranja de acridina, pironina Y, iodeto de propídio, tioflavina T, auramina O etc. A determinação acurada da ligação ao RNA (ou do DNA-RNA) depende das propriedades estequimétricas de cada corante. O corante deve ser usado na concentração saturante, e a sua concentração no tampão deve estar registrada no seu recipiente. A determinação da concentração saturante deve ser realizada por meio de estudos de correlação entre os resultados manuais e automatizados em amostras contendo concentrações diminuídas, normais e aumentadas de reticulócitos, com ênfase na detecção de concentrações diminuídas. Esse procedimento é dispensável para os kits comerciais registrados e usados de acordo com as instruções do fabricante.

O laboratório documentou os dados de reprodutibilidade (precisão) do método automatizado de contagem de reticulócitos, obtidos pela análise seriada de pelo menos 20 dosagens cada de dois níveis de material de controle estabilizado, com cálculo das respectivas médias e CV. O programa de controle da qualidade inclui a definição de limites de tolerância para os resultados de controle e há registro das ações corretivas quando os limites são violados.

O laboratório estabeleceu critérios para a identificação de amostras com possíveis resultados espúrios de contagem de reticulócitos pelo método automatizado. Uma vez que todas as células contendo DNA e RNA são coradas pelos reagentes fluorescentes, há uma sistemática documentada para identificar situações nas quais possa não ter havido boa discriminação entre os reticulócitos e outras partículas coradas.

O laboratório deve descrever a sistemática para a contagem automatizada de reticulócitos. Interferências potenciais incluem corpúsculos de Howell-Jolly, eritrócitos nucleados, corpúsculos de Heinz, hemácias basofílicas, macrotrombócitos, fragmentos de megacariócitos, grumos de plaquetas, e malária ou outros organismos intracelulares. A aglutinação de eritrócitos pode gerar resultados elevados espúrios, o que também pode ocorrer com leucocitose ou trombocitose acentuadas. As partículas interferentes variam, dependendo do equipamento, do corante e das condições de reação. Após a avaliação inicial do equipamento, o laboratório deve implementar os critérios para a detecção de resultados potencialmente errôneos. Isso pode ser efetivado por meio de algoritmos que incorporam os flags gerados pelo equipamento e pelo exame do esfregaço corado.

Fase pós-analítica

O laboratório procura adotar valores de referência determinados ou verificados pelo laboratório, idade e sexo específicos, sempre que apropriado e possível. Quando estudos formais dos intervalos de referência não são factíveis, os dados publicados são adotados após análise crítica documentada.

Os valores de referência acompanham os laudos dos resultados e há sinalização dos resultados anormais sempre que é factível. Para os Testes TP e TTPa, os valores de plasmas controle comerciais não são reportados externamente, uma vez que podem ser confundidos com resultados de pacientes.

Há critérios documentados estabelecidos para a imediata notificação aos médicos ou aos demais envolvidos quando resultados de alguns testes excedem os limites potencialmente críticos e podem gerar alterações imediatas de conduta médica. Os técnicos de bancada foram treinados para se familiarizarem com esses valores. As comunicações ou as tentativas mal sucedidas são registradas: paciente, resultado, data, hora e responsável pela comunicação, pessoa notificada.

O laboratório valoriza, em sua política da qualidade, a pontualidade. O período considerado razoável para o TAT de uma análise de rotina na Hematologia é de 4 a 8 horas. Resultados urgentes devem ser reportados até uma hora após sua entrada no laboratório.

CONCLUSÃO

O controle de qualidade tornou-se indispensável na rotina de qualquer laboratório, independente do porte e da tecnologia empregada, percebe-se que no estudo realizado quanto maior for a tecnologia implantada maiores são as necessidades do controle nos processos internos.

Confirmamos que independente da evolução tecnológica no setor de hematologia é necessário um programa de qualidade bem implantado e documentado, exigindo assim profissionais capacitados para execução e interpretação dos controles de qualidades.

Esse estudo bibliográfico reforçou a teoria estabelecida em controles de qualidade, bem como retratou a realidade prática dos laboratórios que utilizam tecnologia de ponta ou não.

Referêcia

1. College of American Pathologists - COMMISSION ON LABORATORY ACCREDITATION - LABORATORY ACCREDITATION PROGRAM - hematology - coagulation CHECKLIST – 2004.
2. Programa de garantia da Qualidade – Hematologia – Luizane Vieira – 2004
3. Procedimento Operacional Padrão – POP.HEMA.01 versão 08, Laboratório Sabin de Análises Clinicas
4. Procedimento Operacional de Apoio – POA.GQQ.05 versão 08, Laboratório Sabin de Análises Clinicas
5. Apresentação de slides – Laboratório Roche
6. Manual da Qualidade PALC, versão 04, Laboratório Sabin de Análises Clinicas