LIGIA MARIA GIONGO FEDELI

**Implementação do biobanco e do laboratório
central e validação do protocolo de laboratório
do ELSA-Brasil**

Dissertação apresentada à Faculdade Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Professora Doutora Isabela Judith
Martins Benseñor

São Paulo
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fedeli, Ligia Maria Giongo

Implementação do biocanco e do laboratório central e validação do protocolo de laboratório do ELSA-Brasil / Ligia Maria Giongo Fedeli. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientadora: Isabela Judith Martins Benseñor.

Descritores: 1.Banco de espécimes biológicos 2.Criopreservação 3.Congelamento 4.Laboratório clínico 5.Estudos de validação

USP/FM/DBD-064/13

Dedico esta dissertação aos meus pais, meus primeiros orientadores na minha vida, e aos meus filhos que são a razão para eu nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a minha orientadora pelo apoio e incentivo.

Aos Professores Doutores Paulo Lotufo e Isabela Benseñor pela confiança depositada no meu trabalho no Projeto Elsa e Profa. Marina Baquerizzo Martinez pela oportunidade ao me designar para coordenar as atividades dos projetos de pesquisa no Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário, o que proporcionou meu desenvolvimento profissional.

Ao Dr Alexandre Pereira, meu parceiro na implementação do laboratório do ELSA-Brasil, pelo apoio nas etapas de implantação do laboratório e orientação na solução de problemas.

A equipe de laboratório do ELSA – Brasil, pela parceria e confiança depositada, e particularmente a equipe do laboratório do Centro de Investigação ELSA-SP, pelo esforço e dedicação que permitiram o sucesso do trabalho realizado.

A toda a equipe do ELSA - São Paulo pelo apoio nos momentos difíceis e por compartilhar cada vitória nesta trajetória.

Aos meus colegas do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP, pelo acolhimento, companheirismo e esforço que permitiu absorver a demanda de trabalho do ELSA-Brasil.

A minha amiga Angelita e seu marido Ygor pela ajuda inestimável na finalização deste trabalho.

E aos meus filhos que sempre me incentivam e apoiam em todos os momentos.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de símbolos

Lista de siglas

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. MÉTODOS	7
3.1. O Laboratório do ELSA-Brasil	7
3.2. Exames realizados	8
3.3. Preparo dos participantes para a coleta das amostras biológicas	12
3.4. Condições que exigiam remarcar a visita ao CI	13
3.5. Coleta das amostras biológicas	13
3.6. Estratégia de identificação de amostras	17
3.7. Processamento das amostras biológicas	19
3.8. Armazenamento e transporte das alíquotas de exames	22

3.9. Implementação do biobanco ELSA	23
3.10. Validação do protocolo	32
3.11 Análise estatística	35
4. RESULTADOS	38
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÃO	83
ANEXOS	87
REFERÊNCIAS	215

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
g	grama
h	hora
K	potássio
Kcal	quilocaloria
mEq/L	miliequivalentes por litro
mg/dL	miligramas por decilitro
min	minuto
mL	mililitro
Na	Sódio
rpm	rotações por minuto
U/L	Unidades internacionais por litro
µg/min	microgramas por minuto
µL	microlitro
µUI/mL	micro unidades internacionais por mililitro
%	percentual

LISTA DE SIGLAS

ALT	Alanina Amino Transferase
AST	Aspartato Amino Transferase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CI	Centro de Investigação
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CV	Coeficiente de variação
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ELSA	Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto
Gama GT	Gama-glutamil Transferase

HbA1C	Hemoglobina glicada
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IATA	<i>International Air Transport Association</i>
IFCC	<i>International Federation of Clinical Chemistry</i>
ISO	<i>International Standardization Organization</i>
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
PALC	Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos
PCR	Proteína C Reativa
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SD	Desvio padrão
SP	São Paulo
T4 livre	Tireotropina livre
TSH	<i>Thyroid-Stimulating Hormone</i>
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exames, metodologia, equipamentos, material biológico e valores de referência utilizados.	10
Tabela 2 - Tubos coletados na coleta de sangue em jejum	15
Tabela 3 - Tubos coletados na coleta de sangue pós carga	15
Tabela 4 - Códigos de Identificação utilizados	18
Tabela 5 - Tubos coletados, alíquotas realizadas e exames relacionados . . .	20
Tabela 6 - Alíquotas armazenadas por participantes nos biobancos na linha de base do ELSA	30
Tabela 7 - Estabilidade das amostras biológicas para os analitos quantificados na linha de base do ELSA	32
Tabela 8 - Distribuição de por gênero e faixa etária dos voluntários dos estudos pilotos	34

Tabela 9 - Resultados do pré-teste de congelamento das amostras por trinta dias.	38
Tabela 10 - Resultados do pré-teste de congelamento das amostras por um dia	39
Tabela 11 - Resultados do teste t para amostras pareadas.	40
Tabela 12 - Resultados obtidos no pré-teste de congelamento das amostras por um, três, cinco, sete, catorze, vinte e um e trinta dias	41
Tabela 13 - Comparação entre o coeficiente de variação (CV) observado com os CV do laboratório central	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Dispersão dos resultados de glicose antes e após trinta dias do congelamento das amostras.	43
Gráfico 2 - Dispersão dos resultados de glicose antes e após um dia do congelamento das amostras	43
Gráfico 3 - Dispersão dos resultados de HbA1C antes e após trinta dias do congelamento das amostras	44
Gráfico 4 - Dispersão dos resultados de HbA1C antes e após um dia do congelamento das amostras	44
Gráfico 5 - Dispersão dos resultados de ácido úrico antes e após trinta dias do congelamento das amostras	45
Gráfico 6 - Dispersão dos resultados de ácido úrico antes e após um dia do congelamento das amostras	45
Gráfico 7 - Dispersão dos resultados de creatinina sérica antes e após trinta dias do congelamento das amostras	46
Gráfico 8 - Dispersão dos resultados de creatinina sérica antes e após um dia do congelamento das amostras	46
Gráfico 9 - Dispersão dos resultados de ALT antes e após trinta dias do congelamento das amostras	47
Gráfico 10 - Dispersão dos resultados de ALT antes e após um dia do congelamento das amostras	47

Gráfico 11 - Dispersão dos resultados de AST antes e após trinta dias do congelamento das amostras	48
Gráfico 12 - Dispersão dos resultados de AST antes e após um dia do congelamento das amostras	48
Gráfico 13 - Dispersão dos resultados de Gama GT antes e após trinta dias do congelamento das amostras	49
Gráfico 14 - Dispersão dos resultados de Gama GT antes e após um dia do congelamento das amostras	49
Gráfico 15 - Dispersão dos resultados de Colesterol total antes e após trinta dias do congelamento das amostras	50
Gráfico 16 - Dispersão dos resultados de Colesterol total antes e após um dia do congelamento das amostras	50
Gráfico 17 - Dispersão dos resultados de HDL Colesterol antes e após trinta dias do congelamento das	51
Gráfico 18 - Dispersão dos resultados de HDL Colesterol antes e após um dia do congelamento das amostras	51
Gráfico 19 - Dispersão dos resultados de triglicérides antes e após trinta dias do congelamento das amostras	52
Gráfico 20 - Dispersão dos resultados de triglicérides antes e após um dia do congelamento das amostras	52
Gráfico 21 - Dispersão dos resultados de insulina antes e após trinta dias do congelamento das amostras	53
Gráfico 22 - Dispersão dos resultados de insulina antes e após um dia do congelamento das amostras	53
Gráfico 23 - Dispersão dos resultados de TSH antes e após trinta dias do congelamento das amostras	54
Gráfico 24 - Dispersão dos resultados de TSH antes e após um dia do congelamento das amostras	54
Gráfico 25 - Dispersão dos resultados de PCR antes e após trinta dias do congelamento das amostras	55
Gráfico 26 - Dispersão dos resultados de PCR antes e após um dia do congelamento das amostras	55

Gráfico 27 - Dispersão dos resultados de microalbuminúria antes e após trinta dias do congelamento das amostras	56
Gráfico 28 - Dispersão dos resultados de microalbuminúria antes e após um dia do congelamento das amostras	56
Gráfico 29 - Dispersão dos resultados de creatinina urinária antes e após trinta dias do congelamento das amostras	57
Gráfico 30 - Dispersão dos resultados de creatinina urinária antes e após um dia do congelamento das amostras	57
Gráfico 31 - Dispersão dos resultados de cálcio urinário antes e após trinta dias do congelamento das amostras	58
Gráfico 32 - Dispersão dos resultados de cálcio urinário antes e após um dia do congelamento das amostras	58
Gráfico 33 - Dispersão dos resultados de sódio urinário antes e após trinta dias do congelamento das amostras	59
Gráfico 34 - Dispersão dos resultados de sódio urinário antes e após um dia do congelamento das amostras	59
Gráfico 35 - Dispersão dos resultados de potássio urinário antes e após trinta dias do congelamento das amostras	60
Gráfico 36 - Dispersão dos resultados de potássio urinário antes e após um dia do congelamento das amostras	60
Gráfico 37 - Dispersão dos resultados de sódio sérico antes e após um dia do congelamento das amostras	61
Gráfico 38 - Dispersão dos resultados de potássio sérico antes e após um dia do congelamento das amostras	61
Gráfico 39 - Dispersão dos resultados de ácido úrico no teste de congelamento das amostras por até trinta dias	69
Gráfico 40 - Dispersão dos resultados de creatinina sérica no teste de congelamento das amostras por até trinta dias	69
Gráfico 41 - Dispersão dos resultados de ALT no teste de congelamento das amostras por até trinta dias	70
Gráfico 42 - Dispersão dos resultados de AST no teste de congelamento das amostras por até trinta dias	70

Gráfico 43 - Dispersão dos resultados de gama GT no teste de congelamento das amostras por até trinta dias	71
Gráfico 44 - Dispersão dos resultados de colesterol total no teste de congelamento das amostras por até trinta dias	71
Gráfico 45 - Dispersão dos resultados de HDL colesterol no teste de congelamento das amostras por até trinta dias	72
Gráfico 46 - Dispersão dos resultados de triglicérides no teste de congelamento das amostras por até trinta dias	72
Gráfico 47 - Dispersão dos resultados de creatinina urinária no teste de congelamento das amostras por até trinta dias	73
Gráfico 48 - Dispersão dos resultados de cálcio urinário no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.	73
Gráfico 49 - Dispersão dos resultados de sódio urinário no teste de congelamento das amostras por até trinta dias	74
Gráfico 50 - Dispersão dos resultados de potássio urinário no teste de congelamento das amostras por até trinta dias	74
Gráfico 51 - Dispersão dos resultados de sódio sérico no teste de congelamento das amostras por até trinta dias	75
Gráfico 52 - Dispersão dos resultados de potássio sérico no teste de congelamento das amostras por até trinta dias	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de armazenamento nos bancos locais	26
Figura 2 - Tanques de armazenamento em nitrogênio	28
Figura 3 - Palhetas utilizadas nos biobancos centrais	29

RESUMO

Fedeli LMG: Implementação do biobanco e do laboratório central e validação do protocolo de laboratório do ELSA-Brasil (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: O Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto é um estudo de coorte multicêntrico com o objetivo de identificar os fatores de risco associados ao diabetes tipo 2 e à doença cardiovascular na população brasileira. Nosso principal objetivo é explicar a concepção e implementação das rotinas do laboratório central e biobanco do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil); destacando as forças e limitações do protocolo. O segundo objetivo é descrever os pré-testes usados para validar o protocolo de antes do início do estudo. **Métodos:** O estudo optou pela centralização dos exames em um laboratório central no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP), Com base em dados recentes que confirma a estabilidade da glicose em amostras congeladas, até os testes de glicose no sangue foram centralizadas. Porém o processamento das amostras foi realizado nos laboratórios locais o que reduziu os custos do transporte das amostras para o laboratório central. A estratégia implicou na necessidade de implementação de equipes nos laboratórios em cada Centro de Investigação para coletar e processar as amostras antes do transporte. O estudo incluiu exames para a avaliação do metabolismo da glicose, resistência à insulina, perfil lipídico, eletrólitos, ácido úrico, hormônios da tireóide, função hepática e contagem total de células do sangue. Além disso, as amostras de DNA, urina plasma, e de soro foram colhidas e Além desses exames, o estudo também extraiu DNA de leucócitos, colheu e estocou amostras de urina, plasma e soro. Para garantir a homogeneidade do protocolo todos os membros das equipes locais passaram por treinamento e certificação centralizado, com visitas cruzadas entre os centros durante o campo para controle de qualidade. **Resultados:** A opção por um laboratório central garantiu a uniformidade da metodologia utilizada para a realização dos exames, evitando as variações inevitáveis entre laboratórios.

Durante 26 meses, cerca de 375.000 testes foram realizados no laboratório central. Não houve perda de amostras biológicas durante o estudo. A implementação do biobanco usando palhetas armazenados em repositórios de nitrogênio foi realizada sem problemas importantes desde 2008 até agora.

Conclusão: O ELSA-Brasil mostrou a exequibilidade de exames multicêntricos no Brasil com todos os exames realizados em um laboratório central, de uma maneira custo-efetiva. A logística de armazenamento de amostras biológicas foi feito com custos aceitáveis e de qualidade, sendo um modelo para estudos futuros.

DESCRIPTORES: Banco de espécimes Biológicos, Criopreservação, Congelamento, Laboratório Clínico, Estudos de validação.

SUMMARY

Fedeli LMG: Implementation of the biobank and the central laboratory and validation of laboratory protocol ELSA-Brazil (dissertation). São Paulo: Medical School, University of São Paulo; 2013.

Background: The Longitudinal Study of Adult Health is a multicenter cohort study aimed to identify risk factors associated with type 2 diabetes and cardiovascular disease in Brazilian population. Our main objective is to explain the conception and implementation of the routines of the central laboratory and biobank of the Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil) highlighting the strength and the limitations of the protocol. The second objective is to describe the pre-tests used to validate the protocol before the start of the study.

Methods: The study made an option to centralize the exams in one central laboratory at the University Hospital, São Paulo University ("USP"). Based on recent data that confirms the stability of glucose in freeze samples, even blood glucose tests were centralized. However, biological samples were processed in the local laboratories, reducing the weight of the material to be transported, and diminishing costs of transportation to the central lab. Especially trained local teams collected and processed biological samples before transportation. The study included tests for glucose metabolism, insulin resistance, lipid profile, electrolytes, uric acid, thyroid hormones, hepatic function, and total blood cell count. In addition, DNA, urine, plasma and serum samples were collected and stored. In order to guarantee protocol homogeneity, all team members underwent centralized training and certification, and cross-visits in each research center were done. **Results:** The choice of a central laboratory assured uniformity of the methodology used for the exams, avoiding the variations between laboratories. During 26 months, approximately 375,000 tests were done in the central– laboratory. There was no loss of biological samples during the study. The implementation of the biobank using straws stored in nitrogen repositories was performed without important problems since 2008 until now. **Conclusion:** The ELSA-Brazil showed the feasibility of a multicenter study in Brazil with all the analyses performed in a central laboratory, in a cost-effective

way. The logistic of storage of biological samples was done with acceptable costs and quality being a model for future studies.

DESCRIPTORS: Biological specimen banks, Cryopreservation, Freezing, Clinical laboratory, Validation studies.

1. INTRODUÇÃO

A prevenção das doenças crônicas não transmissíveis é uma das prioridades da maioria dos países devido ao seu impacto na mortalidade, na morbidade e nos custos decorrentes da assistência médica¹. No Brasil, ainda hoje se desconhece a incidência dessa parcela de doenças e os fatores de risco a ela associados em população brasileira. Estas informações são essenciais para o desenvolvimento de programas preventivos e para a formulação de políticas públicas capazes de reduzir o impacto dessas doenças no país.

Em outros países, o conhecimento sobre essas doenças foi obtido com a realização de inúmeros estudos de coorte prospectivos, onde se destacam o *Framingham Heart Study* iniciado em 1948 nos Estados Unidos², o *Whitehall Study* no Reino Unido³, o *Nurses' Health Study*⁴, o *Atherosclerosis Risk in Community Study* (ARIC)⁵ e o *Multi Ethnic Study of Atherosclerosis* (MESA)⁶, realizados também nos Estados Unidos. A importância desses estudos é tão grande que populações diferentes das observadas nestas pesquisas são assistidas, sem qualquer crítica, com a aplicação de escores de risco cardiovascular provenientes da coorte de Framingham que estudou uma população americana em meados do século passado.

O Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil) é um estudo de coorte de 15.105 funcionários públicos de cinco universidades e um instituto de pesquisa de diferentes regiões do país: as universidades federais da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, e Rio Grande do Sul, a Universidade de São Paulo e a Fundação Oswaldo Cruz. Entre os principais objetivos do ELSA-Brasil destacam-se investigar a incidência e a progressão de diabetes e da doença cardiovascular e os fatores biológicos, ambientais, comportamentais, psicológicos e sociais a eles associados. Todos os funcionários ativos e aposentados com idade entre 35 e 74 anos foram

elegíveis para o estudo, cujos critérios de exclusão eram gravidez atual ou recente (menos de quatro meses antes da primeira entrevista), intenção de parar de trabalhar na instituição no futuro próximo, problema cognitivo grave ou dificuldade de comunicação e aposentados residentes fora da região metropolitana do centro de estudo. A linha de base do estudo foi realizada entre 2008 e 2010. A coleta de dados da linha desta etapa do ELSA-Brasil foi obtida em duas fases; a primeira, com duração de aproximadamente 1 hora, incluiu a obtenção do consentimento informado e uma entrevista inicial realizada no local de trabalho do participante, a segunda, com duração de aproximadamente 6 horas compreendeu entrevistas e exames adicionais e foi realizada em uma clínica do estudo⁷.

A estrutura do ELSA é semelhante à de grandes estudos de coorte como o *Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)* e o *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)*, onde o participante comparece ao Centro de Investigação para realização da entrevista e de procedimentos, incluindo a coleta de sangue para a realização de exames e estocagem de material biológico para futura utilização em estudos de caso-coorte e caso-controle aninhado.

O projeto ELSA foi aprovado pelos Comitês de Ética e Pesquisa dos Centros de Investigação (CEPs). O ELSA atende a todos os requisitos éticos necessários a uma pesquisa científica realizada em seres humanos, tais como a participação voluntária, o respeito à privacidade dos participantes e à confidencialidade de informações. Os participantes também assinam um termo autorizando o armazenamento de amostras biológicas.

Em 2006 foi criado o Banco de Materiais Biológicos (anexo A), em conformidade com os princípios legais e éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Saúde na Resolução 347 em 13 de janeiro de 2005 (anexo B); em 12 de maio de 2011, o Conselho Nacional de Saúde aprovou a RDC 441(anexo C) em substituição à RDC 347; esta nova resolução estabelece duas categorias de armazenamento de material biológico humano, o

”biorrepositório” que é definido como “toda coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais” e o “biobanco” definido como “coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para fins de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais”. Após consulta à CONEP, apesar da guarda do material biológico coletado no ELSA-Brasil estar sob o gerenciamento dos pesquisadores do projeto, este foi classificado como Biobanco pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), por se tratar de um banco de materiais biológicos vinculado a projeto epidemiológico de longa duração.

Para garantir que seus resultados possam ser comparados, o ELSA utiliza um protocolo único realizado da mesma forma nos seis centros de investigação, e para garantir a uniformidade das metodologias e evitar as variações entre laboratórios optou-se por realizar os exames em um único laboratório, denominado laboratório central.

2. OBJETIVOS

Os objetivos desta dissertação são:

1. Detalhar todos os procedimentos realizados como parte da rotina do laboratório ELSA-Brasil, incluindo a implementação do laboratório central;
2. Detalhar todos os procedimentos realizados como parte da rotina do biobanco do estudo, incluindo sua implantação e manutenção;
3. Descrever as análises feitas para validação do protocolo, antes do início do estudo.
4. Apresentar e discutir as principais dificuldades e acertos na criação do protocolo do estudo.

3. MÉTODOS

3.1. O Laboratório do ELSA-Brasil

A construção da metodologia a ser utilizada de forma rotineira nas atividades do laboratório central do ELSA-Brasil foi um dos objetivos desta dissertação e será descrita a seguir. Embora faça parte da seção de métodos, não deixa de ser também parte dos resultados do estudo já que um dos produtos da dissertação foi a criação do protocolo do laboratório central e do biobanco. Optamos por apresentar na seção de resultados os frutos dos pré-testes realizados antes do início do estudo.

O laboratório ELSA foi coordenado pelo Centro de Investigação (CI) em São Paulo, visto que dos seis centros do estudo é o que possui maior tradição na área de análises clínicas, sendo localizado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP). Vários pesquisadores do CI em São Paulo já eram usuários do laboratório em outros projetos de pesquisa com bons resultados. Além da base clínica, o Hospital Universitário passava por um excelente momento político que buscava a inserção do hospital não só como local de assistência e ensino, mas também como local de pesquisa.

O laboratório central padronizou todos os procedimentos laboratoriais incluindo a orientação de preparo do participante para a coleta de sangue, orientação de coleta de urina de 12 horas noturnas, coleta e processamento das amostras, padronização da metodologia utilizada para a extração de DNA, transporte e armazenamento de amostras biológicas. Para garantir a uniformidade dos procedimentos nos seis Centros de Investigação (CI) ELSA, todos os procedimentos foram descritos detalhadamente em manuais específicos de coleta (anexo D), processamento (anexo E), exames e metodologias (anexo F), armazenamento e transporte de amostras biológicas (anexo G).

Com a finalidade de evitar as variações entre laboratórios e garantir a uniformidade das metodologias utilizadas, optou-se por realizar todos os exames dos participantes em um único laboratório central, à exceção do hemograma que por questões técnicas relativas à estabilidade da amostra foi realizado localmente em cada centro.

O laboratório Central do ELSA é o Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, que possui um Sistema de Gestão da Qualidade certificado pela ISO 9001/2000 desde abril de 2006, e no seu programa de controle de qualidade interno utiliza pelo menos dois níveis de controle interno para cada analito. Foi acreditado pelo Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC) em dezembro de 2009 e participa do Programa de Proficiência Laboratorial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. A participação em programas de proficiência e o uso de pelo menos dois níveis de controle de qualidade interno a cada 24 horas foram os requisitos mínimo exigidos dos laboratórios locais para execução dos hemogramas.

Um Sistema informatizado foi desenvolvido pelo CI ELSA São Paulo para garantir o rastreamento de todo o processo de coleta e processamento das amostras até o resultado final dos exames realizados (Sistema de exames ELSA).

3.2. Exames realizados

Na linha de base do ELSA foram priorizados os exames relacionados ao diagnóstico de diabetes (glicemia em jejum e após sobrecarga e hemoglobina glicada), exames relacionados a desfechos renais (creatinina sérica e urinária e microalbuminúria); resistência à insulina (insulina em jejum e após sobrecarga); e os exames relacionados a fatores de risco para a doença cardiovascular (colesterol total, frações HDL e LDL do colesterol, triglicérides e proteína C reativa ultrasensível), e para avaliar o consumo de

sal foram realizadas as dosagens de sódio e potássio em urina de 12 horas noturna.

Também foram realizados exames possivelmente relacionados à doença cardiovascular ou que auxiliam no diagnóstico diferencial de algumas exposições incluídas no estudo, como a dosagem de tireotropina e tiroxina livre para os participantes com alterações nos níveis de tireotropina, ácido úrico e o hemograma. Para avaliar a função hepática e a exposição ao álcool foram realizadas as determinações da atividade da aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT) e da gama-glutamil transferase (gama GT); foram ainda incluídos as dosagens de cálcio urinário para avaliação do metabolismo de cálcio e sorologia para Chagas.

As metodologias, equipamentos e valores de referência, utilizados no laboratório central para a realização dos exames da linha de base do ELSA estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Exames, metodologia, equipamentos, material biológico e valores de referência utilizados.

Analito	Método	Equipamento	Material biológico e Valores de referência
Glicose	Hexoquinase ⁸	Advia Siemens®	1200 Plasma jejum: 70 a 99mg/dL Plasma 120 min após 75g de glicose: <140mg/dL tolerância normal à glicose 140 a 199mg/dL Intolerância á glicose ≥200 mg/dL Diabetes
Colesterol total	Colesterol oxidase ⁹	Advia Siemens®	1200 Soro Desejável: <200 mg/dL Limítrofe: 200 a 239 mg/dL Elevado: > 240 mg/dL
HDL Colesterol	Colorimétrico homogêneo precipitação ¹⁰	Advia Siemens®	1200 Soro: Desejável para: Não diabéticos: > 40 mg/dL Diabéticos: > 45 mg/dL
LDL Colesterol usado se triglicérides < 400 mg/dL	Cálculo Friedwald ¹¹	de Não se aplica	Soro Desejável para: Pacientes de baixo risco: <160 mg/dL
LDL Colesterol usado se triglicérides > 400 mg/dL	Enzimático colorimétrico precipitação ¹²	Advia Siemens®	1200 Pacientes de médio risco: < 130 mg/dL Pacientes de alto risco: < 100 mg/dL
Triglicérides	Glicerol fosfato peroxidase segundo Trinder ¹³	Advia Siemens®	1200 Soro: < 150 mg/dL
Creatinina	Jaffé ¹⁴	ADVIA Siemens®	1200 Soro: 0,4 a 1,3 mg/dL
Ácido úrico	Uricase ¹⁵	ADVIA Siemens®	1200 Urina de 12 horas: Não estabelecido Soro: Homens: 3,5 a 7,2 mg/dL Mulheres: 2,6 a 6,0 mg/dL
Aspartato transaminase (AST)	IFCC modificado ¹⁶	ADVIA Siemens®	1200 Soro: Homens: 10 a 35 U/L Mulheres: 10 a 31 U/L

Analito	Método	Equipamento	Material biológico e Valores de referência
Alanina Transaminase (ALT)	IFCC modificado ¹⁷	ADVIA1200 Siemens®	Soro: Homens: 9 a 46 U/L Mulheres: 9 a 36 U/L
Gama Glutamil transferase (Gama GT)	Szasz Persijn ¹⁸	ADVIA 1200 Siemens®	Soro Homens: 2 a 30 U/L Mulheres: 1 a 24 U/L Hemácias lisadas
Hemoglobina glicada	Cromatográfico de alta pressão (HPLC) ²⁰	Variant Bio Rad®	<5,7%: tolerância normal à glicose 5,7 a 6,4%: Intolerância á glicose ≥6,5%: Diabetes
Hormônio tireoestimulante (TSH)	Imunoenzimático com pérolas ²¹	Centaur Siemens®	Soro 0,55 a 4,78 µUI/mL
Tireotropina livre (T4 livre)	Imunoenzimático com pérolas ²²	Centaur Siemens®	Soro 0,89 a 1,76 µUI/mL
Insulina	Imunoenzimático com pérolas ²²	Centaur Siemens®	Soro jejum 3,0 a 25,0 µUI/mL Soro 120 min. após sobrecarga Não estabelecido
Sódio	Potenciométrico com eletrodo íon seletivo (ISE) ²³	Advia Siemens®	1200 Soro: 136 a 146 mEq/L Urina de 12 horas Não estabelecido
Potássio	Potenciométrico com eletrodo íon seletivo (ISE) ²³	Advia Siemens®	1200 Soro 3,5 a 5,0 mEq/L Urina de 12 horas Não estabelecido
Sorologia para Chagas	ELISA com fase em sólida microplaca ²⁴	Lavadora, incubadora e leitora de microplacas	Soro: Não reagente
Cálcio	Cresolftaleína ²⁵	Advia Siemens®	1200 Urina de 12 horas: Não estabelecido
Microalbuminúria	Nefelométrico ²⁶	BN II Siemens®	Urina de 12 horas Normal: <20 µg/min Microalbuminúria: 20 a 200 µg/min Mcroalbuminúria: >200µg/min

3.3. Preparo dos participantes para a coleta das amostras biológicas

3.3.1. Orientações para a coleta de sangue

Os participantes do ELSA foram orientados a alimentar-se como de costume na véspera da sua visita ao CI ELSA, e a iniciar o jejum 12 horas antes do horário agendado, podendo ingerir, durante o período de jejum, apenas água e medicamentos prescritos; os participantes diabéticos foram orientados a não utilizar os medicamentos para o tratamento do diabetes (insulina ou hipoglicemiantes orais) na manhã do dia da visita ao CI, e a levar estes medicamentos para serem utilizados após o término das coletas de sangue.

Todos foram orientados a interromper o uso de polivitamínicos, vitamina C e anti-gripais, não fazer uso de bebidas alcoólicas antes de comparecer ao CI e também a evitar exercícios físicos rigorosos pelo menos nas doze horas anteriores à ida ao CI.

Também foram orientados a levar ao CI todos os medicamentos em uso, prescritos ou não, nas duas semanas que antecederam a coleta de sangue.

3.3.2. Orientações para a coleta da urina

Para a coleta da urina de 12 horas noturna, os participantes foram orientados a iniciar a coleta às 19 horas da véspera da sua visita ao CI ELSA, esvaziando a bexiga no vaso sanitário e anotando este horário no formulário recebido junto com o frasco de coleta da urina que marca o início da coleta; a partir deste momento, toda a urina produzida deveria ser coletada no frasco e por volta de 7 horas da manhã do dia seguinte. Os participantes foram orientados a esvaziar novamente a bexiga coletando a amostra no frasco fornecido durante a primeira fase após a assinatura do termo de consentimento. Para evitar contaminação da amostra, todos foram orientados a não utilizar talcos ou cremes na região genital, evitar o uso de

laxantes 24 horas antes da visita ao CI, e a manter o frasco com a urina sob refrigeração.

O formulário utilizado para instruir o participante para a coleta da urina de 12 horas noturnas também trazia orientações sobre o preparo dos participantes para a coleta de sangue (anexo H).

3.4. Condições que exigiam remarcar a visita ao CI

A visita ao CI ELSA foi remarcada quando o participante apresentava tosse frequente, febre e também nas mulheres menstruadas ou que apresentavam sangramento vaginal.

3.5. Coleta das amostras biológicas

3.5.1. Coleta de sangue venoso

Os procedimentos de coleta das amostras biológicas no Projeto ELSA foram padronizados seguindo as Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso (2005). A coleta de sangue foi dividida em duas etapas, com a primeira coleta em jejum e a segunda após a ingestão de uma sobrecarga de glicose como parte de um teste de tolerância oral à glicose nos participantes não diabéticos ou de uma carga alimentar nos participantes diabéticos.

As coletas de sangue foram feitas por punção venosa com escalpe a vácuo, sendo estabelecido um máximo de duas punções em cada coleta; após a coleta em jejum, o voluntário não diabético recebia uma solução aromatizada de 75g de glicose sendo orientado a ingerir esta solução em até 5 minutos. Os participantes diabéticos receberam uma carga alimentar padronizada na forma de um lanche, com valor energético total de 435Kcal, incluindo 24g de gorduras sendo, 14g de gordura saturada e 47g de carboidratos, composto por alimentos industrializados incluindo quatro

torradas (15g cada), quatro cubos de queijo processado e um suco de laranja no volume de 200ml. A opção por alimentos industrializados deve-se ao fato de não necessitar refrigeração, apresentarem uma validade relativamente longa, não haver necessidade de preparo no centro de pesquisa e poderem ser comprados com a mesma facilidade em todos os centros. Após duas horas da ingestão da carga alimentar ou glicêmica era feita uma nova coleta de sangue venoso para dosagem de glicose e insulina para os participantes não diabéticos e glicose e triglicérides para os voluntários diabéticos.

A ideia de uma carga alimentar nos diabéticos baseou-se em evidências de que as alterações do período pós-prandial são fatores importantes no desenvolvimento da aterosclerose²⁷ e que a hiperglicemia pós-prandial pode ser um fator de risco independente para o desenvolvimento da doença cardiovascular em diabéticos²⁸, enquanto a hipertrigliceridemia pós-prandial pode ser um fator de risco para a doença cardiovascular nos não diabéticos²⁹.

Na coleta em jejum foram utilizados três tubos com gel ativador da coagulação de 8,5mL, três tubos contendo EDTA de 4mL, um tubo contendo fluoreto/oxalato de 2,0mL, três tubos contendo citrato com capacidade de 4,5mL e um tubo contendo heparina lítica balanceada com capacidade de 4,0mL. O volume total de sangue coletado em jejum foi de 52,5mL. (tabela 2) Para a coleta após sobrecarga, foi coletado um tubo com gel ativador da coagulação de 8,5mL, um tubo fluoreto/oxalato de 2,0mL e um tubo contendo heparina lítica balanceada de 4,0mL. O volume total de sangue coletado após a sobrecarga foi de 14,5mL conforme descrito na tabela 3

Tabela 2 - Tubos coletados na coleta em jejum.

PRIMEIRA COLETA (JEJUM)		
Tipo de tubo	Volume de aspiração (mL)	Número de tubos coletados
Tubo com gel ativador da coagulação	8,5	3
Tubo fluoreto/EDTA	2,0	1
Tubo EDTA	4,0	3
Tubo Citrato	4,5	2
Tubo com heparina lítica balanceada	4,0	1
Total coletado em jejum	54,5	10

Tabela 3 - Tubos coletados na coleta de sangue pós carga.

SEGUNDA COLETA (2 HORAS APÓS CARGA)		
Tipo de tubo	Volume de aspiração (mL)	Número de tubos coletados
Tubo com gel ativador da coagulação	8,8	1
Tubo fluoreto/EDTA	2,0	1
Tubo com heparina lítica balanceada	4,0	1
Total coletado em jejum	14,5	3

Para assegurar a diversidade de materiais para o biobanco, o laboratório ELSA estipulou uma sequência de tubos padronizada na coleta de forma que com os primeiros três tubos coletados era possível realizar todos os exames previstos sendo os demais reservados apenas para as

alíquotas do biobanco; a sequência utilizada está descrita nos anexos I e J (formulário de coleta de sangue em jejum e após sobrecarga).

No caso do participante não autorizar o armazenamento do material biológico, além da amostra de 12 horas noturnas, eram coletados em jejum: um tubo com gel ativador da coagulação de 8,5mL, um tubo EDTA de 4mL, um tubo fluoreto/oxalato de 2mL, um tubo com gel ativador da coagulação de 8,5mL e um tubo fluoreto/EDTA de 2mL, utilizados para o preparo das alíquotas de exames.

Para garantir a qualidade das amostras foram registrados os horários do início e fim da coleta das amostras de sangue venoso, o tipo de sobrecarga recebida pelo participante (glicêmica ou alimentar), o horário do início e fim da ingestão da sobrecarga.

3.5.2. Coleta de urina de 12 horas noturna

A coleta urinária no ELSA foi planejada visando avaliar a filtração glomerular pelo *clearance* da creatinina e estimar a ingestão de eletrólitos (Na, K) pela excreção renal. Na literatura estes parâmetros são estimados a partir de coletas urinárias de 24 h. Isso se torna difícil em estudos epidemiológicos e populações saudáveis por exigirem coleta e armazenamento de urina em ambiente de trabalho. Portanto, no ELSA a coleta urinária foi feita por 12 horas no período noturno, quando a maioria das pessoas encontra-se em casa, reduzindo erros de coleta e aumentando a adesão. À noite a temperatura é mais baixa, reduzindo as perdas de eletrólitos pelo suor. Estudo paralelo em população similar ao ELSA analisou a correlação entre a urina coletada por 24 h e por 12 h (19 h às 7 h), tendo-se verificado que o *clearance* de creatinina foi similar nos dois períodos³⁰.

O participante realizou a coleta de urina de 12 horas noturnas na sua residência após ser orientado verbalmente e por escrito para realizar o procedimento; ao chegar ao CI ELSA, um profissional de enfermagem

responsável pelo recebimento desta amostra conferia os dados do participante, o período em que a amostra foi coletada, questionava a ocorrência de perdas de urina durante o período da coleta e as condições de armazenamento e transporte do material; todas estas informações foram registradas para a validação da amostra.

No caso do participante não ter coletado a amostra de urina na véspera da sua visita ao CI ELSA, era dado novo prazo para a entrega posterior da urina de 12 horas.

3.6. Estratégia de identificação de amostras

Com a finalidade de garantir o sigilo do participante, todos os frascos com material biológico utilizados no laboratório foram identificados por código de barras. Este código continha uma sequência numérica de dez ou sete dígitos (identificação das caixas dos freezers); o primeiro dígito identificou a fase do Projeto, o segundo dígito o Centro de investigação ELSA, o terceiro o tipo de recipiente que contém o material biológico e os demais dígitos são uma sequência numérica, desta forma todos os frascos receberam uma numeração única que nunca se repetiu. Os códigos utilizados para a identificação dos materiais estão descritos na tabela 4.

Para garantir a perpetuação das identificações utilizadas, os criotubos e as caixas dos freezers foram identificados com etiquetas confeccionadas com material resistente à temperatura de - 80°C, os cilindros receberam etiquetas resistentes a -180°C, e, nas palhetas, o código foi impresso, sendo também resistente a -180°C.

Tabela 4 - Códigos de Identificação utilizados.

Dígito	Identificador
Primeiro dígito	Fase do estudo
Segundo dígito	Centro de investigação
Terceiro dígito	Material
Demais dígitos	Sequência numérica
Identificação da fase do estudo	
Zero	Linha de base
Identificação do centro de Investigação	
1	CI Ba
2	CI ES
3	CI MG
4	CI RJ
5	CI RS
6	CI SP
Identificação dos materiais	
1	Tubo de coleta
2	Cilindro
3	Criotubo
4	Palheta
5	Caixa do freezer

3.7. Processamento das amostras biológicas

3.7.1. Centrifugação dos tubos de sangue coletados

Todos os tubos de sangue coletados, com exceção de um tubo EDTA da coleta basal que foi utilizado para a execução do hemograma, foram centrifugados 30 minutos após o final da coleta, a 3000 rpm, por 15 minutos a 5°C em centrífuga refrigerada e calibrada anualmente. Após a centrifugação todos os tubos foram mantidos sob refrigeração em banho de gelo ou geladeira até o final do processamento.

3.7.2. Cuidados gerais com o material coletado e as alíquotas realizadas

Após a centrifugação dos tubos primários coletados, todo o processamento foi realizado com as amostras mantidas sob refrigeração (geladeira ou banho de gelo). A tabela 5 descreve os tubos coletados, os exames relacionados e as alíquotas realizadas na linha de base do ELSA.

Todas as informações sobre os tubos primários e as alíquotas de exames geradas foram registradas em formulário próprio e no Sistema de exames ELSA (anexo K – Formulário de alíquotas de exames)

Tabela 5 - Tubos coletados, alíquotas realizadas e exames relacionados.

Tubo	Material biológico obtido	Exames relacionados	Nome da alíquota
Tubo EDTA (coleta basal)	Sangue total	Hemograma	Não se aplica
	Hemácias lisadas	Hemoglobina glicada	HbA1C
Tubo com gel ativador da coagulação (coleta basal)	Soro jejum	Insulina em jejum	Hormônios jejum
		TSH	
		Proteína C reativa	Imunologia
		Sorologia para chagas	
		Creatinina	Bioquímica de Soro
		Ácido úrico	
		Colesterol total	
		HDL colesterol	
		LDL colesterol	
		Triglicérides	
		AST	
		ALT	
		Gama GT	
		Sódio	
		Potássio	
Tubo Fluoreto EDTA (coleta basal)	Plasma Fluoretp jejum	Glicemia em jejum	Glicemia jejum
Tubo Fluoreto EDTA (pós carga)	Plasma fluoreto pós carga	Glicemia 120 min. após carga	Glicemia pós carga
Tubo com gel ativador da coagulação (pós carga)	Soro pós carga	Insulina 120 min. pós carga (não diabéticos)	Insulina pós carga
		Triglicérides pós carga (diabéticos)	Triglicérides pós carga
Frasco de urina (grandes volumes)	Urina de 12 horas	Microalbuminúria	Microalbuminúria
		Creatinina urinária	Bioquímica de urina
		Sódio urinário	
		Potássio urinário	
	Urina de 12 horas acidificada ³³	Cálcio urinário	Cálcio

3.7.3. Processamento da amostra obtida no tubo EDTA utilizado para a execução do hemograma

O tubo EDTA da coleta basal reservado para execução do hemograma foi mantido sob-homogeneização e, antes do seu envio ao laboratório local foi realizada uma alíquota de hemácias hemolisadas para a determinação da hemoglobina glicada. Esta alíquota foi preparada pela transferência de cinco (5,0) microlitros do sangue total obtido para um criotubo contendo um (1,0) mL da solução hemolisante enviada pelo laboratório central aos CIs, após homogeneizar esta alíquota, o código de barras do criotubo era informado no sistema de laboratório, o tubo EDTA era então enviado ao laboratório para a execução do hemograma; no caso do laboratório local permitir o retorno deste tubo ao CI ELSA antes do término do processamento das amostras do participante, o mesmo pôde ser centrifugado nas condições citadas acima para obtenção de plasma para armazenamento.

3.7.4 Processamento das demais amostras de sangue coletadas para a realização de exames

As alíquotas de soro e plasma para a realização dos exames de bioquímica de soro, hormônios jejum, imunologia, glicemia e insulina jejum e após carga, foram realizadas com 500µL, utilizando criotubos pré-etiquetados, o código destes criotubos foi informado no sistema de exames ELSA.

3.7.5 Processamento da amostra de urina para a realização dos exames

Após a homogeneização da amostra de urina, o volume total da amostra coletada foi verificado com o auxílio de proveta graduada, após informar o volume urinário no sistema do laboratório.

Uma alíquota de dez mL da amostra de urina foi transferida para um tubo cônico de 15 mL (tubo de falcon) e mantida sob-refrigeração para ser utilizada no preparo das alíquotas utilizadas nas dosagens em urina e para o biobanco; a partir desta alíquota, foram transferidos um (1,0) mL para dois criotubos previamente etiquetados, e tais alíquotas foram registradas no sistema do laboratório para a realização de microalbuminúria e dos exames de bioquímica de urina. Para preparar a alíquota de cálcio 5 mL da urina foi acidificada com uma gota (5µL) de ácido clorídrico PA e, em seguida, um mL desta amostra acidificada foi transferida para um criotubo pré etiquetado que foi registrado no sistema de exames ELSA.

3.8. Armazenamento e transporte das alíquotas de exames

Para viabilizar a implementação do laboratório central foi necessário criar uma estrutura de armazenamento em curto prazo e de transporte de material biológico dos vários centros para o laboratório central em São Paulo. O transporte era realizado uma vez por mês. Os criotubos contendo as alíquotas preparadas para a realização dos exames foram armazenados em de sacos plásticos herméticos com a identificação do tipo de amostra, e mantidos em freezer a -80°C até a data do seu envio para SP. As amostras foram mantidas congeladas durante o transporte pelo seu acondicionamento em caixas de transporte contendo gelo seco.

O transporte das amostras biológicas seguiu as normas de transporte aéreo de materiais perigosos, sendo procedimento este de alto custo, visto que o custo do primeiro quilo transportado é muito maior do que o custo dos quilos adicionais. Desta forma, foi mais vantajoso enviar ao laboratório central um volume maior de amostras em um único transporte em vez de fazer vários envios com poucas amostras. Outro fator a ser destacado é que o peso do material a ser transportado deve-se, na sua maior parte, ao gelo

seco, e a quantidade de gelo seco é fixa para completar uma caixa padrão. Transportar um saco de criotubos ou três sacos exige a mesma quantidade de gelo seco.

Com a finalidade de garantir que o processo de armazenamento e transporte das amostras não causaria viés entre os Centros de Investigação ELSA, o transporte das amostras foi realizado em datas pré-estabelecidas pelo Laboratório Central. As amostras coletadas em São Paulo também foram mantidas congeladas pelo mesmo período que as amostras coletadas nos demais centros. Ao chegar ao laboratório central as amostras eram armazenadas em freezers a -80°C até o dia de execução dos exames. No dia de seu descongelamento, as amostras eram descongeladas à temperatura ambiente, homogeneizadas e encaminhadas para análise.

3.9. Implementação do biobanco ELSA

Os biobancos têm como objetivo principal a coleta e estocagem de diferentes tipos de material biológico ligados às informações médicas individuais ou outras características de um grande número de participantes arrolados em um estudo ou uma instituição em particular³¹ com a finalidade de transmitir informações prospectivas para pesquisadores interessados em aspectos médicos/biológicos particulares e a centros de inovação tecnológica que geralmente fazem parte de complexos médicos/universidades. Nesse sentido, a implementação do biobanco é um importante facilitador das pesquisas futuras. O biobanco torna possível o delineamento de futuros estudos de caso-coorte que responderão a novas perguntas científicas.

Para alcançar esse objetivo, os biobancos devem seguir as boas práticas de estocagem e recuperação das amostras incluindo descongelamento adequado, ventilação, manutenção da temperatura, segurança, monitoramento adequado dos equipamentos, capacidade adequada de

“*back-ups*”, plano para situações de emergência, e sistemas de manutenção e conserto³².

Desde as primeiras reuniões da equipe do projeto decidiu-se pelo desenvolvimento de um biobanco que seria uma das principais características do estudo. Uma vez decidida essa questão, os pontos principais do protocolo foram colocados em discussão.

A necessidade de estocagem de diversos tipos de material biológico considerando a quantidade de sangue a ser coletada de cada participante nas melhores condições que garantissem a qualidade das amostras foi determinante para a implementação do biobanco.

O ELSA-Brasil decidiu instrumentar essa decisão por meio da constituição de um comitê responsável que idealizou os protocolos básicos do laboratório e do biobanco. Esse comitê foi composto por membros dos seis centros e começou a se reunir dois anos antes do início da coleta de dados da linha da base.

Os aspectos econômicos sempre foram forças direcionadoras importantes na modulação do protocolo do estudo estando presentes no delineamento e na implementação do biobanco. Em particular, decisões baseadas no número de amostras, tipos de materiais coletados, condições de estocagem, e desenvolvimento de um sistema de informações para monitorar a coleta, transporte e controle de qualidade sempre levaram em conta aspectos econômicos.

Foram considerados argumentos pró e contra a instituição de um biobanco central, e ao final, houve um consenso pela definição de um sistema híbrido composto por dois biobancos centrais e um biobanco local em cada centro. As justificativas para essa decisão foram muitas e incluíram o fato que a divisão das amostras minimizaria o risco de um evento catastrófico e que dois biobancos centrais aumentariam a flexibilidade nas determinações laboratoriais e nos recursos humanos disponíveis para as dosagens laboratoriais. Os biobancos locais foram desenhados para garantir a disponibilidade de amostras para projetos restritos aos centros locais (por exemplo, estudos sorológicos específicos em uma população em particular,

ou biomarcadores específicos de um centro em particular com tradição ou expertise na área).

Uma vez estabelecido o consenso em relação aos pontos chave referentes à implementação do biobanco, a principal questão a ser resolvida pelo Comitê do Biobanco foi referente à necessidade de instituir um protocolo centralizado, que incluiria um biobanco central que poderia estocar não somente plasma, mas também soro, urina e DNA.

O protocolo estabelecido para o biobanco deveria ser suficientemente complexo para permitir a estocagem de uma coleção bastante diversificada de amostras biológicas considerando-se a quantidade de sangue a ser colhida de cada participante e, ao mesmo tempo, bastante simples para que centros sem grande expertise em laboratório pudessem seguir completamente o protocolo aprovado para o estudo. Isso inclui não somente a criação de uma expertise em coleta, aliquotagem e estocagem, mas também que as necessidades de um centro em particular não deveriam sobrepular a capacidade de o centro manter um fluxo regular de participantes.

O transporte de material biológico também foi uma preocupação central na criação do protocolo do biobanco. As amostras deveriam necessariamente ser transportadas para o laboratório central e/ou para o local de estocagem (biobanco), mas o tempo de estocagem deveria ser comparável entre as diversas amostras e os diferentes centros. Além disso, os custos do transporte deveriam ser baixos, sem comprometer os requerimentos de segurança a comparabilidade e a estabilidade das amostras.

Algumas decisões tomadas na fase de planejamento do estudo tiveram que ser revistas durante a sua implementação. A decisão inicial de gerar alíquotas até que fosse esgotado o material biológico teve que ser abandonada por falta de espaço nos freezers. Entretanto, um número maior de amostras foi estocado da amostra aleatória da coorte. A amostra aleatória da coorte corresponde a 10% dos participantes selecionados de forma aleatória pelo Centro de Dados. Desses participantes será colhida uma

quantidade maior de sangue porque eles serão utilizados como controle em futuras análises em estudos de caso-coorte.

A transferência das amostras congeladas em gelo seco de cada centro do estudo para o biobanco central em SP foi realizada mensalmente. Foram utilizadas nesses transportes caixas de isopor com gelo seco seguindo-se a regulamentação da IATA (*International Air Transport Association*). Para cada transporte eram monitorados o recebimento e as condições de chegada das amostras.

Nos biobancos locais foi armazenada parte das alíquotas recrutadas em cada centro, essas alíquotas foram acondicionadas em criotubos e estocadas em freezers a -80°C . As instalações para estocagem local de amostras a -80°C foram planejadas de forma segura para estocar as alíquotas de vários tipos de material biológico de cada participante de um centro em particular garantindo a continuidade das condições de estocagem e a integridade das amostras. As alíquotas mantidas nos biobancos locais foram mantidas em criotubos (Figura 01) e identificadas usando-se etiquetas de código de barras como descrito na seção 3.6. Cada Centro de investigação possui dois ou mais freezers com sistema de “*back-up*” elétricos e monitoramento à distância.

Figura 1 - modelo de armazenamento nos bancos locais.

Durante a fase de implementação dos biobancos locais houve muitos problemas tecnológicos e logísticos. A instabilidade da eletricidade e mesmo a falta de luz em quase todos os centros assim como as limitações no suporte de manutenção para os freezers foi uma preocupação importante durante toda a fase de coleta de dados. Na verdade, pequenas panes em alguns freezers mostraram a necessidade absoluta de um freezer backup e de monitoramento de todos os freezers em uso. Problemas decorrentes do aumento da temperatura e do nível de ruídos também foram identificados em alguns centros. Em relação aos problemas logísticos, os entraves para compra, a necessidade de alterações do orçamento, gerados pela burocracia do sistema disponível de compras de material permanente e de consumo para pesquisa requereram uma planejamento extra.

Além dos biobancos locais, o ELSA implementou um centro de criogenia completo centralizado com capacidade de estocar as amostras biológicas dos participantes do estudo.

São muitas as vantagens de um sistema de estocagem em nitrogênio líquido. A temperatura da estocagem em um nível significativamente mais estável (-196°C) proporciona uma rápida queda da temperatura e taxa de recuperação, e um custo de manutenção significativamente menor para o biobanco tamanha proporção como o do ELSA. Além disso, o sistema de nitrogênio líquido tem a vantagem de ser menos sensível às panes mecânicas/elétricas quando comparado com os freezers. Isso geralmente reduz as necessidades de intervenções constantes e torna a manutenção do sistema mais simples em longo prazo.

Apesar disso, grandes bancos utilizando nitrogênio líquido precisam ser cuidadosamente planejados para garantir que as amostras sejam mantidas em um meio ambiente adequado na estocagem em longo prazo e que a equipe que trabalha na instalação tenha condições seguras de trabalho.

Como parte do estudo, foi construído um centro completo de criogenia. A empresa Air Liquide foi comissionada para prover toda a infraestrutura do sistema, que incluiu: projeto, gerenciamento da obra, materiais necessários para a construção e instalação dos tanques, tanque externo, rede hidráulica

a vácuo com isolamento, tanques de alta capacidade para estocagem de amostras em longos períodos em nitrogênio líquido (Espace 661 - Figura 2) com sistema de abastecimento automático e todos os programas locais e para controle a distância necessários ao seu funcionamento.

Figura 2 -Tanques de armazenamento em nitrogênio

Uma vez que acomodar o maior número de amostras no menor espaço na central de criogenia era uma preocupação central da equipe, todas as amostras foram acondicionadas dentro desses tanques em pequenos canudos de polipropileno (Figura 3). As palhetas como são chamados os canudos tem várias vantagens em relação ao uso de criotubos no cenário particular da bioteca: economia de espaço impede a infiltração de nitrogênio nas amostras (o nitrogênio líquido penetra pela rosca dos criotubos, mas não consegue penetrar uma palheta selada). As palhetas possuem uma resina colorida na em uma das extremidades que a selam automaticamente quando é preenchida; e para garantir a qualidade das amostras armazenadas, a outra extremidade foi vedada utilizando-se uma seladora de palhetas. As resinas das palhetas estão disponíveis em várias cores permitindo a codificação do material estocado pela cor da palheta. As palhetas de cada participante foram guardadas juntas em cilindros que continham sete

palhetas e para cada participante do projeto foram guardados dois cilindros em cada biobanco central. Estão descritas na tabela 6 as alíquotas disponíveis para cada participante na linha de base do ELSA Brasil.

Figura 3 - Palhetas utilizadas nos biobancos centrais.

As principais restrições contra o uso das palhetas são o seu custo e a necessidade de comprar os equipamentos necessários para o enchimento e a selagem das palhetas para cada centro.

Tanto os biobancos locais quanto o central garantem de forma simples a localização da amostra, assim como a acurácia da sua identificação.

Como parte da segurança das amostras armazenadas no biobanco local foi implantado um sistema de segurança com um sistema detector de falhas para notificar a equipe para pronta correção do erro. Neste sentido, o sistema planejado tem a capacidade de identificar qualquer tipo de mau funcionamento de cada uma das partes do sistema assim como problemas dentro da estrutura da central de criogenia (temperatura, ventilação, pane elétrica) ou o funcionamento inadequado do sistema hidráulico de vasos comunicantes de transporte do nitrogênio. Na presença de qualquer tipo de mau funcionamento o sistema envia e-mails imediatamente após a detecção a toda a equipe que monitora a central de criogenia ou na ausência de alguma alteração segue uma mensagem de rotina avisando que está tudo funcionando normalmente.

Tabela 6 - Alíquotas armazenadas por participantes nos biobancos na linha de base do ELSA.

Material biológico	Total de criotubos no Biobanco local	Total de palhetas nos Biobancos centrais
Soro (jejum)	3	6
Plasma EDTA (jejum)	3	6
Plasma citrato (jejum)	2	4
Plasma heparina (jejum)	1	2
Urina	2	4
Soro (após carga)	2	4
Plasma heparina (pós carga)	1	2

3.10. Validação do protocolo

Embora a estabilidade das amostras biológicas esteja bem descrita na literatura (tabela 7), julgou-se necessário verificar a estabilidade das amostras nas condições de trabalho no estudo. Utilizaram-se os “estudos pilotos” realizados antes do início da coleta de dados do ELSA para testar todos os processos antes do início do campo; estes estudos também tiveram a finalidade de treinar a equipe e padronizar as atividades nos seis CI.

Foram realizados três pré-testes antes do início do estudo para estudar o efeito do congelamento das amostras biológicas nos resultados dos exames laboratoriais. Estes pré-testes foram formalizados em Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP. Todos os voluntários incluídos nos pré-testes receberam as mesmas instruções e orientações para a coleta dos materiais biológicos descritas no item 3.3. “Preparo dos participantes para a coleta das amostras biológicas” e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Tabela 7 - Estabilidade das amostras biológicas para os analitos quantificados na linha de base do ELSA ³³.

Analito	Tipo de amostra	Condições de armazenamento	Estabilidade
Glicose	Plasma	Refrigeração (4°C)	72 horas
Colesterol total	Soro	Refrigeração (4°C)	7 dias
HDL Colesterol	Soro	Refrigeração (4°C)	7 dias
Triglicérides	Soro	Refrigeração (4°C)	7 dias
Ácido úrico	Soro	Congelamento (-20°C)	6 meses
AST	Soro	Congelamento (-20°C)	1 ano
ALT	Soro		Deve ser analisada no dia da coleta
Gama GT	Soro	Congelamento (-20°C)	1 ano
TSH	Soro	Congelamento (-20°C)	1 mês
Insulina	Soro	Congelamento (-20°C)	3 meses
PCR	Soro	Congelamento (-70°C)	Indefinida
Creatinina	Soro	Congelamento	Indefinida
	Urina		
Sódio	Soro		Não especificada
	Urina		
Potássio	Soro		
	Urina		
Cálcio	Urina		
Albumina	Urina	Congelamento (-70°C)	Indefinida
Hb Glicada	Sangue total	Congelamento (-70°C)	30 dias

Como as amostras para exames eram enviadas ao laboratório central mensalmente, no primeiro pré-teste avaliou-se o efeito do congelamento das amostras por 30 dias. Para este experimento foram incluídos 25 voluntários sendo 13 mulheres e 12 homens entre 36 e 59 anos, cujas amostras foram coletadas como descrito nos itens 3.5 “Coleta das amostras biológicas”; foram então preparadas seis alíquotas de cada tipo de alíquota descrito na tabela 5 (Tubos coletados e alíquotas de exames) conforme descrito no item 3.7 “Processamento das amostras biológicas”. Três alíquotas foram utilizadas imediatamente para as dosagens em três rodadas analíticas no mesmo dia da coleta das amostras e as três alíquotas restantes foram acondicionadas em criotubos e armazenadas por 30 dias em freezer -80°C, quando foram então descongeladas em temperatura ambiente para a repetição das análises após serem homogeneizadas com o auxílio de um agitador de tubos tipo Vortex.

No segundo pré-teste realizado o cenário estudado foi a interferência do congelamento das amostras por um único dia; este cenário poderia ocorrer com as amostras de São Paulo coletadas na véspera do início do descongelamento das amostras para a realização dos exames. Para este estudo também foram incluídos 25 voluntários sendo 14 mulheres e 11 homens com idade entre 35 e 63 anos. Como descrito no primeiro pré-teste foram mantidos todos os procedimentos de orientação, coleta e processamento de amostras padronizadas pelo ELSA; realizaram-se também seis alíquotas de cada amostra de exame, sendo que três foram analisadas imediatamente após seu processamento e três foram acondicionadas em criotubos e congeladas em freezer -80°C e retiradas do freezer no dia seguinte mantidas em temperatura ambiente até seu completo descongelamento. Após serem homogeneizadas com o auxílio de um agitador de tubos tipo Vortex, foram realizadas as análises.

Nos dois primeiros pré-testes realizados foram testados todos os exames da linha de base do Estudo ELSA com exceção da sorologia para chagas.

No terceiro pré-teste avaliou-se o efeito do congelamento após 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 30 dias após o congelamento das amostras, para este estudo foram utilizadas as alíquotas de bioquímica de soro, bioquímica de urina e cálcio;

todas as análises foram realizadas em simplicata. Foram incluídos 20 voluntários, contendo 12 mulheres e 8 homens com idade entre 38 e 63 anos assim como nos estudos anteriores. Foram mantidos todos os procedimentos de orientação aos voluntários, coleta e processamento de amostras biológicas padronizados pelo ELSA. Para este teste foram preparadas oito alíquotas de cada amostra de exame escolhida para o estudo; a primeira alíquota foi utilizada para a realização dos exames imediatamente após a coleta e as demais foram acondicionadas em criotubos e mantidas em freezer -80°C por 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 30 dias respectivamente, sendo descongeladas como descrito para os demais pré testes realizados.

Tabela 8 - Distribuição de por gênero e faixa etária dos voluntários dos estudos pilotos.

Primeiro pré teste			
Congelamento das amostras por 30 dias			
Gênero	N (%)	Faixa etária (anos)	Idade (média)
Feminino	13 (52)	39-55	45
Masculino	12 (48)		44
Segundo pré teste			
Congelamento das amostras por 1 dia			
Gênero	N (%)	Faixa etária (anos)	Idade (média)
Feminino	14 (56)	35-63	56
Masculino	11 (44)	39-61	44
Terceiro pré teste			
Descongelamento seriado durante 30 dias			
Gênero	N (%)	Faixa etária (anos)	Idade (média)
Feminino	12 (60)	38 – 63	50
Masculino	8 (40)	41-62	49

3.11. Análise estatística

Os valores foram apresentados como média e desvio padrão. Com a finalidade de verificar se as diferenças encontradas entre os resultados antes e após o congelamento das amostras biológicas foram significativas, foi realizado o teste t para amostras pareadas presumindo variâncias equivalentes com os resultados dos exames antes e depois do congelamento das amostras por um e por trinta dias utilizando-se o software Excel; devido a distribuição dos dados optou-se pelo teste bi caudal, utilizando os mesmos protocolos adotados pelo laboratório central na ocasião da realização dos pré-testes. Também foi calculado o coeficiente de variação com os resultados dos três pré-testes realizados resultados e estes foram comparados com os coeficientes de variação do laboratório central e para melhor visualização dos dados foram feitos os gráficos de dispersão dos resultados obtidos nos pré-testes realizados.

4. RESULTADOS

Nesta seção serão descritos os resultados dos pré-testes realizados antes do início do estudo.

As tabelas 9 e 10 mostram os resultados dos pré-testes de congelamento das amostras por trinta e por um dia respectivamente.

Tabela 9 - Resultados do pré-teste de congelamento das amostras por trinta dias.

Analito (material biológico)	Antes do congelamento - t0 Média (SD)	Após 30 dias de congelamento - t30 Média (SD)
Glicose (plasma)	136 (56,2)	129 (53,8)
HbA1C (Sangue)	6,4 (1,41)	6,3 (1,30)
Ácido úrico (soro)	5,1 (1,50)	5,1 (1,51)
Creatinina (soro)	1,0 (0,26)	0,9 (0,24)
Creatinina (urina)	127 (78,2)	117 (71,9)
AST (soro)	22 (6,5)	21 (6,2)
ALT (soro)	24 (10,1)	23 (9,7)
Gama GT (soro)	29 (22,2)	30 (20,7)
Colesterol total (soro)	201 (43,2)	202 (43,4)
HDL colesterol (soro)	63 (16,8)	61 (15,7)
Triglicérides (soro)	138 (114,2)	142 (115,7)
Insulina (soro)	9,26 (4,886)	9,64 (5,240)
TSH (soro)	5,61 (14,641)	5,62 (14,638)
PCR (soro)	2,51 (3,404)	2,43 (3,294)
Albumina (urina)	56,4 (132,96)	56,7 (136,44)
Cálcio (urina)	6,8 (6,09)	6,4 (5,84)
Sódio (urina)	112 (58,8)	110 (57,6)
Potássio (urina)	47 (27,4)	46 (27,2)

Tabela 10 - Resultados do pré-teste de congelamento por um dia.

Analito (material biológico)	Antes do congelamento – t0 Média (desvio padrão)	Após 1 dia de congelamento - t1 Média (desvio padrão)
Glicose (plasma)	107 (21,0)	109 (21,9)
HbA1C (Sangue)	6,3 (1,62)	6,3 (1,62)
Ácido úrico (soro)	5,9 (1,84)	5,9 (1,84)
Creatinina (soro)	1,8 (1,96)	1,8 (2,03)
Creatinina (urina)	113 (71,3)	116 (72,5)
AST (soro)	30 (19,6)	29 (19,8)
ALT (soro)	24 (17,4)	25 (17,2)
Gama GT (soro)	59 (60,6)	60 (62,2)
Colesterol total (soro)	163 (46,4)	168 (47,8)
HDL colesterol (soro)	46 (15,3)	45 (14,9)
Triglicérides (soro)	139 (49,5)	141 (49,8)
Insulina (soro)	9,66 (9,952)	9,96 (9,608)
TSH (soro)	2,82 (2,212)	2,78 (2,159)
PCR (soro)	9,24 (8,195)	9,26 (8,269)
Albumina (urina)	31,2 (33,62)	31,5 (33,54)
Cálcio (urina)	9,4 (10,93)	9,4 (10,78)
Sódio (urina)	108 (62,8)	109 (63,1)
Sódio (soro)	140 (3,4)	141 (4,0)
Potássio (urina)	48,6 (31,32)	48,9 (31,57)
Potássio (soro)	4,5 (0,81)	4,5 (0,78)

Tabela 11 - Resultados do teste t para amostras pareadas.

t crítico = 2,011		
Analito (material biológico)	t calculado Congelamento por 30 dias	t calculado Congelamento por 1 dia
Glicose (plasma)	0,420	- 0,266
HbA1C (Sangue)	0,294	-0,058
Ácido úrico (soro)	0,034	-0,023
Creatinina (soro)	1,127	-0,149
Creatinina (urina)	0,477	-0,153
AST (soro)	0,398	0,086
ALT (soro)	0,541	-0,098
Gama GT (soro)	-0,156	-0,051
Colesterol total (soro)	-0,125	-0,405
HDL colesterol (soro)	0,380	0,309
Triglicérides (soro)	-0,106	-0,108
Insulina (soro)	-0,272	-0,111
TSH (soro)	-0,002	0,080
PCR (soro)	0,090	-0,008
Albumina (urina)	-0,008	-0,014
Cálcio (urina)	0,216	0,023
Sódio (urina)	0,160	-0,037
Sódio (soro)	Não testado	-0,375
Potássio (urina)	0,089	-0,031
Potássio (soro)	Não testado	-0,375

Tabela 12 - Resultados obtidos no pré-teste de congelamento das amostras por um, três, cinco, sete, catorze, vinte e um e trinta dias.

Analito (material biológico)	t 0 Média (SD)	t 1 dia Média (SD)	t 3 dias Média (SD)	t 5 dias Média (SD)	t 7 dias Média (SD)	t 14 dias Média (SD)	t 21 dias Média (SD)	t 30 dias Média (SD)
Ácido úrico (soro)	4,5 (1,00)	4,6 (1,04)	4,3 (0,96)	4,2 (0,91)	4,3 (0,91)	4,2 (0,94)	4,3 (0,97)	4,3 (0,95)
Creatinina (soro)	0,9 (0,11)	0,9 (0,12)	0,8 (0,13)	0,9 (0,13)	0,9 (0,11)	0,9 (0,12)	0,8 (0,11)	0,7 (0,11)
Creatinina (urina)	151 (80,3)	151 (77,9)	151 (80,9)	158 (94,1)	148 (79,3)	148 (78,8)	140 (71,8)	141 (70,8)
AST (soro)	22 (5,9)	22 (5,4)	19 (5,2)	18 (4,3)	19 (5,4)	23 (5,4)	20 (5,4)	19 (4,8)
ALT (soro)	20 (8,4)	20 (8,1)	19 (8,5)	19 (8,5)	17 (8,7)	20 (8,5)	18 (8,3)	17 (7,8)
Gama GT (soro)	20 (7,9)	22 (8,2)	20 (7,8)	20 (7,7)	20 (7,5)	20 (7,9)	20 (7,7)	20 (7,6)
Colesterol total (soro)	203 (28,8)	208 (29,8)	198 (27,8)	193 (27,6)	197 (27,9)	191 (26,8)	191 (26,9)	191 (26,9)
HDL colesterol (soro)	71 (15,8)	73 (16,2)	69 (15,2)	68 (15,6)	67 (16,3)	65 (15,9)	62 (15,6)	63 (16,0)
Triglicérides (soro)	106 (58,1)	116 (59,7)	109 (56,7)	108 (55,3)	107 (55,7)	113 (60,3)	114 (60,5)	115 (60,8)
Cálcio (urina)	13,1 (9,1)	12,8 (8,6)	12,6 (8,4)	12,1 (8,2)	12,6 (8,5)	12,8 (8,5)	12,5 (8,7)	12,4 (8,4)
Sódio (urina)	130 (60,6)	131 (61,3)	131 (61,0)	129 (60,4)	130 (60,2)	128 (59,2)	128 (59,2)	127 (58,2)
Sódio (soro)	147 (1,3)	151 (1,6)	145 (1,3)	140 (1,4)	147 (1,9)	146 (1,6)	143 (1,9)	140 (1,4)
Potássio (urina)	73 (31,0)	72 (29,8)	74 (30,7)	73 (30,1)	73 (30,3)	72 (29,7)	73 (30,7)	70 (29,2)
Potássio (soro)	4,5 (0,20)	4,7 (0,30)	4,5 (0,30)	4,3 (0,30)	4,5 (0,30)	4,4 (0,30)	4,3 (0,30)	4,1 (0,30)

Tabela 13 - Comparação entre o coeficiente de variação (CV) observado com os CV do laboratório central.

Analito (material biológico)	CV observado Congelamento por 30 dia (%)	CV observado Congelamento por 1 dia (%)	CV do lab. Central (%)
Glicose (plasma)	1,24	1,13	1,94
HbA1C (Sangue)	1,27	1,07	5,00
Ácido úrico (soro)	0,20	0,15	5,00
Creatinina (soro)	5,84	3,90	6,20
Creatinina (urina)	5,87	2,26	4,32
AST (soro)	2,40	1,21	4,37
ALT (soro)	1,17	1,07	4,96
Gama GT (soro)	2,29	1,08	2,67
Colesterol total (soro)	1,54	0,74	2,13
HDL colesterol (soro)	2,28	2,00	3,93
Triglicérides (soro)	0,74	1,35	3,55
Insulina (soro)	3,64	4,70	6,36
TSH (soro)	3,96	5,56	5,06
PCR (soro)	2,44	3,30	3,84
Albumina (urina)	1,72	2,02	4,86
Cálcio (urina)	3,92	4,62	5,78
Sódio (urina)	1,68	1,49	1,45
Sódio (soro)	Não testado	0,80	1,43
Potássio (urina)	1,04	1,51	1,93
Potássio (soro)	Não testado	1,84	1,55

Gráfico 1 - Dispersão dos resultados de glicose antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 2 - Dispersão dos resultados de glicose antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 3 - Dispersão dos resultados de HbA1C antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 4 - Dispersão dos resultados de HbA1C antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 5 - Dispersão dos resultados de ácido úrico antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 6 - Dispersão dos resultados de ácido úrico antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 7 - Dispersão dos resultados de creatinina sérica antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 8 - Dispersão dos resultados de creatinina sérica antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 9 - Dispersão dos resultados de ALT antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 10 - Dispersão dos resultados de ALT antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 11 - Dispersão dos resultados de AST antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 12 - Dispersão dos resultados de Aspartato transaminae (AST) antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 13 - Dispersão dos resultados de Gama GT antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 14 - Dispersão dos resultados de GamaGT antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 15 - Dispersão dos resultados de Colesterol total antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 16 - Dispersão dos resultados de Colesterol total antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 17 - Dispersão dos resultados de HDL Colesterol antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 18 - Dispersão dos resultados de HDL Colesterol antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 19 - Dispersão dos resultados de triglicérides antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 20 - Dispersão dos resultados de triglicérides antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 21 - Dispersão dos resultados de insulina antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 22 - Dispersão dos resultados de insulina antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 23 - Dispersão dos resultados de TSH antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 24 - Dispersão dos resultados de TSH antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 25 - Dispersão dos resultados de PCR antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 26 - Dispersão dos resultados de PCR antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 27 - Dispersão dos resultados de microalbuminúria antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 28 - Dispersão dos resultados de microalbuminúria antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 29 - Dispersão dos resultados de creatinina urinária antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 30 - Dispersão dos resultados de creatinina urinária antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 31 - Dispersão dos resultados de cálcio urinário antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 32 - Dispersão dos resultados de cálcio urinário antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 33 - Dispersão dos resultados de sódio urinário antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 34 - Dispersão dos resultados de sódio urinário antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 35 - Dispersão dos resultados de potássio urinário antes e após trinta dias do congelamento das amostras.

Gráfico 36 - Dispersão dos resultados de potássio urinário antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 37 - Dispersão dos resultados de sódio sérico antes e após um dia do congelamento das amostras.

Gráfico 38 - Dispersão dos resultados de potássio sérico antes e após um dia do congelamento das amostras.

A seguir serão apresentados os resultados das análises do teste t para amostras pareadas presumindo variâncias equivalentes realizadas com os resultados obtidos para cada analito, antes e após o congelamento das amostras por um e por trinta dias.

Glicose:

Teste-t: Glicose Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	135,93	129,4
Variância	3153,04	2897,05
Observações	25	25
Variância agrupada	3025,042	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,42	
P (T<=t) bi-caudal	0,676	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: Glicose Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	107,29	108,92
Variância	458,22	477,44
Observações	25	25
Variância agrupada	467,827	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,266	
P (T<=t) bi-caudal	0,791	
t crítico bi-caudal	2,011	

HbA1C:

Teste-t: HbA1C Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	6,39	6,28
Variância	2	1,7
Observações	25	25
Variância agrupada	1,852	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,294	
P (T<=t) bi-caudal	0,77	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: HbA1C Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	6,3	6,33
Variância	2,63	2,64
Observações	25	25
Variância agrupada	2,635	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,058	
P (T<=t) bi-caudal	0,954	
t crítico bi-caudal	2,011	

Ácido úrico:

Teste-t: ácido úrico Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	5,09	5,11
Variância	2,26	2,29
Observações	25	25
Variância agrupada	2,275	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,034	
P (T<=t) bi-caudal	0,973	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: ácido úrico Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	5,85	5,86
Variância	3,42	3,37
Observações	25	25
Variância agrupada	3,394	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,023	
P (T<=t) bi-caudal	0,982	
t crítico bi-caudal	2,011	

Creatinina sérica:

Teste-t: Creatinina sérica Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	0,99	0,91
Variância	0,07	0,06
Observações	25	25
Variância agrupada	0,061	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	1,127	
P (T<=t) bi-caudal	0,265	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: Creatinina sérica Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	1,75	1,84
Variância	3,82	4,07
Observações	25	25
Variância agrupada	3,948	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,149	
P (T<=t) bi-caudal	0,882	
t crítico bi-caudal	2,011	

Creatinina urinária:

Teste-t: Creatinina urinária Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	127,36	117,21
Variância	6121,89	5169,89
Observações	25	25
Variância agrupada	5645,89	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,477	
P (T<=t) bi-caudal	0,635	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: Creatinina urinária Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	112,56	115,67
Variância	5088,95	5251,62
Observações	25	25
Variância agrupada	5170,287	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,153	
P (T<=t) bi-caudal	0,879	
t crítico bi-caudal	2,011	

AST:

Teste-t: AST		
Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	21,59	20,87
Variância	42,82	38,97
Observações	25	25
Variância agrupada	40,895	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,398	
P (T<=t) bi-caudal	0,692	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: AST		
Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	29,72	29,24
Variância	388,13	392,86
Observações	25	25
Variância agrupada	390,492	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,086	
P (T<=t) bi-caudal	0,932	
t crítico bi-caudal	2,011	

ALT:

Teste-t: ALT		
Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	24,4	22,88
Variância	102,48	94,69
Observações	25	25
Variância agrupada	98,587	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,541	
P (T<=t) bi-caudal	0,591	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: ALT		
Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	24,44	24,92
Variância	301,42	298,08
Observações	25	25
Variância agrupada	299,75	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,098	
P (T<=t) bi-caudal	0,922	
t crítico bi-caudal	2,011	

Gama GT:

Teste-t: Gama GT		
Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	28,8	29,75
Variância	490,68	429,65
Observações	25	25
Variância agrupada	460,163	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,156	
P (T<=t) bi-caudal	0,877	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: Gama GT		
Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	58,84	59,72
Variância	3698,72	3867,38
Observações	25	25
Variância agrupada	3783,05	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,051	
P (T<=t) bi-caudal	0,96	
t crítico bi-caudal	2,011	

Colesterol total:

Teste-t: Colesterol Total Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	200,53	202,07
Variância	1864,31	1882,55
Observações	25	25
Variância agrupada	1873,431	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,125	
P (T<=t) bi-caudal	0,901	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: Colesterol Total Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	163,2	168,6
Variância	2151,75	2282,17
Observações	25	25
Variância agrupada	2216,958	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,405	
P (T<=t) bi-caudal	0,687	
t crítico bi-caudal	2,011	

HDL colesterol:

Teste-t: HDL Colesterol Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	62,71	60,96
Variância	283,35	245,61
Observações	25	25
Variância agrupada	264,48	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,38	
P (T<=t) bi-caudal	0,706	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: HDL Colesterol Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	46,4	45,08
Variância	233,42	221,91
Observações	25	25
Variância agrupada	227,663	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,309	
P (T<=t) bi-caudal	0,758	
t crítico bi-caudal	2,011	

Triglicérides:

Teste-t: Triglicérides Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	138,35	141,79
Variância	13050,37	13385,31
Observações	25	25
Variância agrupada	13217,84	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,106	
P (T<=t) bi-caudal	0,916	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: Triglicérides Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	139,24	140,76
Variância	2451,77	2479,27
Observações	25	25
Variância agrupada	2465,523	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,108	
P (T<=t) bi-caudal	0,914	
t crítico bi-caudal	2,011	

Insulina:

Teste-t: Insulina		
Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	9,26	9,64
Variância	23,87	27,45
Observações	25	25
Variância agrupada	25,663	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,272	
P (T<=t) bi-caudal	0,787	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: Insulina		
Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	9,66	9,96
Variância	92	92,31
Observações	25	25
Variância agrupada	92,156	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,111	
P (T<=t) bi-caudal	0,912	
t crítico bi-caudal	2,011	

TSH:

Teste-t: TSH		
Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	5,61	5,62
Variância	214,37	214,28
Observações	25	25
Variância agrupada	214,327	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,002	
P (T<=t) bi-caudal	0,998	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: TSH		
Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	2,83	2,78
Variância	4,89	4,66
Observações	25	25
Variância agrupada	4,778	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,08	
P (T<=t) bi-caudal	0,936	
t crítico bi-caudal	2,011	

PCR:

Teste-t: PCR		
Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	2,51	2,43
Variância	11,59	10,85
Observações	25	25
Variância agrupada	11,22	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,09	
P (T<=t) bi-caudal	0,929	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: PCR		
Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	9,23	9,25
Variância	67,17	68,38
Observações	25	25
Variância agrupada	67,775	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,008	
P (T<=t) bi-caudal	0,993	
t crítico bi-caudal	2,011	

Microalbuminúria:

Teste-t: Microalbuminúria Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	54,23	54,51
Variância	17055,55	17956,69
Observações	25	25
Variância agrupada	17506,12	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,008	
P (T<=t) bi-caudal	0,994	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: Microalbuminúria Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	31,36	31,49
Variância	1129,42	1124,86
Observações	25	25
Variância agrupada	1127,138	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,014	
P (T<=t) bi-caudal	0,989	
t crítico bi-caudal	2,011	

Cálcio urinário:

Teste-t: Cálcio urinário Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	6,76	6,39
Variância	37,03	34,06
Observações	25	25
Variância agrupada	35,544	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,216	
P (T<=t) bi-caudal	0,83	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: Cálcio urinário Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	9,43	9,36
Variância	119,5	116,29
Observações	25	25
Variância agrupada	117,897	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,023	
P (T<=t) bi-caudal	0,982	
t crítico bi-caudal	2,011	

Sódio urinário:

Teste-t: Sódio urinário Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	112,43	109,79
Variância	3453,21	3321,75
Observações	25	25
Variância agrupada	3387,479	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,16	
P (T<=t) bi-caudal	0,873	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: Sódio urinário Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	108,28	108,93
Variância	3945,16	3979,08
Observações	25	25
Variância agrupada	3962,124	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,037	
P (T<=t) bi-caudal	0,971	
t crítico bi-caudal	2,011	

Sódio sérico:

Teste-t	Sódio	sérico
congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	140,16	140,56
Variância	11,89	16,59
Observações	25	25
Variância agrupada	14,240	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,375	
P(T<=t) bi-caudal	0,709	
t crítico bi-caudal	2,011	

Potássio sérico:

Teste-t	Potássio	sérico
Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	4,49	4,48
Variância	0,64	0,61
Observações	25	25
Variância agrupada	0,626	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,054	
P(T<=t) bi-caudal	0,957	
t crítico bi-caudal	2,011	

Potássio urinário:

Teste-t: Potássio urinário		
Congelamento por 30 dias		
	t0	t30
Média	47,1	46,41
Variância	750,01	739,3
Observações	25	25
Variância agrupada	744,656	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	0,089	
P (T<=t) bi-caudal	0,929	
t crítico bi-caudal	2,011	

Teste-t: Potássio urinário		
Congelamento por 1 dia		
	t0	t1
Média	48,65	48,93
Variância	980,83	996,86
Observações	25	25
Variância agrupada	988,844	
Hipótese da diferença da média	0	
gl	48	
Stat t	-0,031	
P (T<=t) bi-caudal	0,975	
t crítico bi-caudal	2,011	

A seguir serão apresentados os gráficos de dispersão dos resultados dos testes de congelamento das amostras por até 30 dias.

Gráfico 39 - Dispersão dos resultados de ácido úrico no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.

Gráfico 40 - Dispersão dos resultados de creatinina sérica no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.

Gráfico 41 - Dispersão dos resultados de ALT no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.

Gráfico 42 - Dispersão dos resultados de AST no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.

Gráfico 43 - Dispersão dos resultados de gama GT no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.

Gráfico 44 - Dispersão dos resultados de colesterol total no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.

Gráfico 45 - Dispersão dos resultados de HDL colesterol no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.

Gráfico 46 - Dispersão dos resultados de triglicérides no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.

Gráfico 47 - Dispersão dos resultados de creatinina urinária no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.

Gráfico 48 - Dispersão dos resultados de cálcio urinário no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.

Gráfico 49 - Dispersão dos resultados de sódio urinário no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.

Gráfico 50 - Dispersão dos resultados de potássio urinário no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.

Gráfico 51 - Dispersão dos resultados de sódio sérico no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.

Gráfico 52 - Dispersão dos resultados de potássio sérico no teste de congelamento das amostras por até trinta dias.

4. DISCUSSÃO

Estudos de coorte em doenças crônicas propiciam a identificação de marcadores de risco nas coortes primárias e marcadores de prognóstico nas coortes de sobrevida de doenças instaladas, chamados de biomarcadores. Os biomarcadores podem ser classificados de acordo com a fisiopatologia em: metabólicos, lipídicos, de função renal, função vascular, estresse oxidativo, angiogênese e de necrose tecidual.³⁴ No caso de amostras de urina é possível identificar metabólitos que são produtos da interação de vários fatores de origem dietética, ambientais, medicamentosas, da microbiota intestinal e genéticos.³⁵

O ELSA-Brasil é uma coorte multicêntrica composta por seis instituições de pesquisa e ensino superior que visa buscar novas associações do diabetes e da doença cardiovascular na população brasileira. Para realização dos exames, o estudo adotou a política de um laboratório central único para o estudo à exceção dos hemogramas que por questões técnicas eram realizados localmente; mesmo assim, por impossibilidade de padronização da leitura de lâminas entre os seis centros em função de sua complexidade, somente foram considerados os dados das leituras automáticas. A opção por um laboratório central garantiu a uniformidade da metodologia utilizada para a realização dos exames, evitando as variações inevitáveis entre laboratórios em caso de sua descentralização.

Em relação ao transporte de material biológico, a opção de transportar o material já processado em vez dos tubos primários diminuiu em muito o peso e isto foi fundamental na redução dos custos do transporte. Transportar os tubos primários para o laboratório central aumentava o peso da material transportado e conseqüentemente, seu custo. De forma compensatória, a estratégia escolhida também implicou na existência de equipes locais em cada centro responsáveis não só pela coleta, mas também pelo processamento local das amostras. A existência de equipes locais, por sua vez, implicou na criação de uma estratégia de treinamento centralizado

dessas equipes locais com aumento dos gastos de transporte e estadia dessas equipes no laboratório central do estudo. Comparando-se os custos atrelados à necessidade de treinamento centralizado com a diminuição do volume de material transportado em função do processamento local das amostras, ficou bastante claro que a primeira estratégia era muito mais custo-efetiva e deveria ser privilegiada durante a execução do campo.

Essa estratégia teve como consequência um grande investimento no controle de qualidade realizado na forma de visitas da equipe do laboratório central aos outros centros de investigação com acompanhamento das atividades realizadas em um dia rotineiro, na implementação de retreinamentos periódicos e sempre que surgia algum problema específico.

Embora o estudo tenha dedicado quase dois anos ao planejamento detalhado de todas as etapas, vários problemas que surgiram no decorrer do campo não foram previstos e colocaram em risco a execução da coleta de dados referente ao laboratório. Os entraves burocráticos na contratação das empresas transportadoras foram muito grandes e puseram em risco o transporte de material biológico, ou seja, o sucesso do transporte dependeu mais da resolução de entraves burocráticos e do trânsito em São Paulo do que de questões técnicas ligadas à coleta e processamento das amostras biológicas. Importante ressaltar que não há apólice de seguro para a perda de material biológico porque se considera que é uma perda irreparável e insubstituível, o que dificulta do ponto de vista jurídico a confecção do contrato de transporte por parte das fundações que gerenciam o orçamento do estudo. Outro ponto importante é a não existência de empresas aéreas com tradição no transporte desse material, visto que durante a fase inicial do estudo houve a saída da Varig das rotas comerciais, empresa que concentrava grande parte desse transporte. Além disso, a redução do número de voos no momento em que o transporte aéreo no Brasil passava por graves problemas também comprometeu a logística. Mesmo a empresa especializada contratada depende das opções de voo disponíveis. Para minimizar esses problemas foi necessária a criação de uma rede de suporte a distância ao laboratório baseada em celulares disponíveis funcionando 24 horas por dia, sete dias por semana em plantão à distância para resolver os problemas que surgiram durante o campo. Essa rede, que foi fundamental

para o sucesso do transporte, não estava prevista inicialmente e foi de difícil implantação pela inexistência de rubricas específicas para estas despesas. A justificativa da sua necessidade, muitas vezes questionada, poderia ter comprometido a realização do estudo. Essa rede também funcionou 24 horas por dia para dar suporte aos laboratórios locais em cada centro de investigação sempre que se deparavam com algum problema. A dificuldade no fornecimento de gelo seco foi outro problema que muitas vezes atrasou a remessa do material, principalmente em Vitória (Espírito Santo), cidade em que o fornecimento de gelo seco é muito precário, com frequentes atrasos no envio do material.

Além disso, no planejamento do estudo muitas necessidades foram subestimadas implicando em novos custos a serem implementados durante o seu decorrer. Embora no Brasil a pesquisa clínica tenha crescido muito nos últimos anos, o transporte de material biológico é feito em pequenas quantidades e em datas específicas. O ELSA-Brasil pela primeira vez fez um planejamento de transporte de material por um período de dois anos e meio. A ausência de perda de material mostra que as soluções encontradas alcançaram sucesso e abrem boa perspectiva para estudos de longo prazo com transporte de material biológico.

Em um estudo prospectivo, o modo como as amostras biológicas são coletadas, processadas ou estocadas em um biobanco tem um impacto importante na utilidade científica futura desse repositório de material biológico. A criação de uma central de criogenia e de um biobanco para um estudo multicêntrico não é tarefa simples. As amostras biológicas são um recurso valioso sendo essenciais na pesquisa médica. Elas devem ser coletadas, estocadas, serem rastreáveis e usadas de acordo com as padronizações/orientações vigentes atualmente. A criação da central de criogenia deve ser planejada de forma cuidadosa devendo-se considerar não somente as demandas do trabalho de campo, mas também antecipar os desafios conhecidos e desconhecidos do futuro. Além das questões de planejamento técnico, a adaptação do biobanco às normas éticas vigentes é fundamental, requerendo reavaliações periódicas conforma e mudança da legislação.

Uma grande preocupação relacionava-se a possibilidade que os procedimentos de armazenamento das alíquotas de exames por até 30 dias provocassem um viés nos resultados dos exames realizados. Julgou-se necessário verificar qual o efeito do processamento das amostras nos resultados dos exames. Para isso foram realizados vários estudos pilotos antes do início da coleta de dados do ELSA. Os pré-testes realizados foram fundamentais para o treinamento de toda a equipe nos procedimentos estabelecidos, e permitiu verificar a interferência do congelamento das amostras nos resultados dos exames laboratoriais. Não foi possível realizar todos os testes com as mesmas amostras porque a quantidade de material biológico necessária para realizar todos os testes implicaria em realizar coletas com composição diferente da preconizada no manual do Projeto ELSA.

Não houve diferenças estatisticamente significativas nos resultados obtidos antes e depois do congelamento das amostras. Quando analisamos as diferenças encontradas entre os coeficientes de variação (CV) calculados a partir dos resultados dos pré-testes com os coeficientes de variação do laboratório central, verifica-se que o CV encontrado nos testes de validação do protocolo para as dosagens de creatinina urinária, sódio urinário e potássio sérico são maiores do que os coeficientes de variação do laboratório central para estes analitos; porém o CV da creatinina urinária foi muito semelhante ao CV encontrado nas análises de creatinina sérica sugerindo que esta variação não se deve ao processo de congelamento das amostras e sim a uma variação do método. Analisando os gráficos de dispersão dos resultados do pré-teste de congelamento das amostras por até 30 dias, verifica-se uma maior dispersão nos resultados de sódio e potássio sérico que não foi possível explicar.

É interessante observar que, embora tenham sido publicados alguns artigos descrevendo os aspectos técnicos de algumas centrais de criogenia para estocagem de material biológico, poucos artigos avaliam aspectos não técnicos do planejamento e implementação dos biobancos. Vários outros problemas como questões políticas, orçamento, dificuldades e custos do processo de importação e aspectos burocráticos e legais para uso do orçamento do estudo, são certamente tão importantes quanto os aspectos

técnicos na determinação final do sucesso ou do fracasso da implementação do biobanco.

5. CONCLUSÃO

O ELSA-Brasil será um dos poucos estudos nos próximos anos que poderá fazer o diagnóstico de diabetes baseado no teste de tolerância a glicose e na hemoglobina glicada, o que poderá abrir uma nova perspectiva para o diagnóstico de diabetes em estudos de longa duração.

O projeto ELSA mostrou a exequibilidade de exames multicêntricos no território nacional com análise centralizada, realizado com qualidade e custo aceitável acoplado à estratégia de guarda permanente de material biológico para estudos futuros.

Em relação à estocagem de material biológico, o ELSA-Brasil se constitui no primeiro biobanco de grande porte no Brasil especialmente delineado para estocagem em material biológico para um estudo de coorte. A opção de utilizar o nitrogênio com as amostras guardadas em palhetas permitiu um melhor custo-benefício da estocagem de material biológico e uma facilidade no manuseio das amostras em relação ao uso de freezers e criotubos. O biobanco do ELSA-Brasil tornou-se um modelo para estocagem de material biológico no país recebendo visitas periódicas de outras instituições que pretendem construir e implementar biobancos semelhantes. Assim o projeto também contribui na difusão de novas tecnologias de estocagem de material biológico no Brasil. As amostras estocadas de cada participante permitirão no futuro a realização de vários estudos de caso-controle aninhado. E as amostras estocadas da “amostra aleatória da coorte” permitirão a execução de estudos de caso-coorte nos próximos anos.

ANEXOS

Anexo A: Regulamento interno do Banco de materiais biológicos do Hospital universitário da USP

REGULAMENTO INTERNO SOBRE O ARMAZENAMENTO DE MATERIAIS BIOLÓGICOS PARA FINALIDADE DE PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1. Ficam estabelecidas por meio deste regulamento as normas de funcionamento do Banco de Materiais Biológicos do Hospital Universitário da USP (BMBHU/USP), cuja organização e uso obedecerá aos princípios legais e éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Saúde – Resolução No. 347, de 13 de janeiro de 2005;
2. O coordenador do BMBHU/USP deverá ser designado pela Câmara de Pesquisa do Hospital Universitário da USP (CPesq-HU/USP);
3. O BMBHU/USP será instalado nas dependências desta instituição e terá como objetivo armazenar materiais biológicos como tecidos, células, líquidos biológicos e material genético (DNA, RNA) de indivíduos (pacientes ou não), provenientes do Hospital Universitário da USP (HU/USP) ou de outras instituições envolvidas em projetos de pesquisa cooperativos, previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP (CEP-HU/USP);
4. Caberá ao HU/USP prover os meios físicos necessários e profissionais habilitados para garantir a guarda e a segurança dos materiais armazenados;
5. Só poderão ser armazenados no BMBHU/USP os espécimes (tecidos, células, líquidos biológicos ou material genético) cuja autorização de coleta e armazenamento esteja explicitamente formalizada no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelo doador do material ou responsável legal;
6. A utilização de materiais armazenados no BMBHU/USP estará rigorosamente vinculada à aprovação pela CPesq-HU/USP e CEP-HU/USP, para atender as necessidades de projetos de pesquisa propostos por pesquisadores do próprio HU/USP individualmente, ou mediante projeto de colaboração com pesquisadores de outras instituições de pesquisa no Brasil ou exterior;
7. Para garantir a confidencialidade da origem do material armazenado, todos os frascos contendo o material biológico serão rotulados em código;
8. Os códigos utilizados na identificação das amostras ficarão registrados em arquivos constituídos especificamente para esta finalidade;
9. Todos os dados pertinentes às amostras deverão ser armazenados com cópia de segurança, sob a responsabilidade de um funcionário do BMBHU/USP, treinado especificamente para esta finalidade;
10. O acesso aos arquivos da pesquisa previamente aprovada pelo CEP-HU/USP, que revelam a identidade dos doadores de material biológico é restrito e será autorizado pelo coordenador do BMBHU/USP;
11. Os arquivos deverão ser mantidos atualizados quanto aos endereços, telefones ou outros meios de acesso aos doadores do material que assegurem a possibilidade de contato com os mesmos;
12. Este regulamento entra em vigor na data de sua aprovação pelo CEP-HU/USP.

Aprovado na 163ª Reunião do Comitê de Ética em Pesquisa em 21/07/2006

Anexo B: Resolução CNS 347/ 2005

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

RESOLUÇÃO N° 347, DE 13 DE JANEIRO DE 2005

O Plenário do Conselho Nacional de Saúde, em sua Centésima Quinquagésima Reunião Ordinária, realizada nos dias 11, 12 e 13 de janeiro de 2005, no uso de suas competências regimentais e atribuições conferidas pela Lei n° 8.080, de 19 de setembro de 1990, e pela Lei n° 8.142, de 28 de dezembro de 1990, e considerando a necessidade de regulamentar o armazenamento e a utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa,

RESOLVE:

Aprovar as seguintes diretrizes para análise ética de projetos de pesquisa que envolve armazenamento de materiais ou uso de materiais armazenados em pesquisas anteriores:

1. Quando, em projetos de pesquisa, estiver previsto o armazenamento de materiais biológicos humanos para investigações futuras, além dos pontos previstos na Resolução CNS n° 196/96, devem ser apresentados:
 - 1.1. Justificativa quanto à necessidade e oportunidade para usos futuros;
 - 1.2. Consentimento dos sujeitos da pesquisa doadores do material biológico, autorizando a guarda do material;
 - 1.3. Declaração de que toda nova pesquisa a ser feita com material será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP; e
 - 1.4. Norma ou regulamento elaborado pela instituição depositária para armazenamento de materiais biológicos humanos.
2. O material biológico será armazenado sob a responsabilidade da instituição depositária, que deverá ter norma ou regulamento aprovado pelo CEP dessa instituição, que deverá incluir:
 - 2.1. Definição dos responsáveis pela guarda e pela autorização de uso do material;
 - 2.2. Mecanismos que garantam sigilo e respeito à confidencialidade (codificação); e
 - 2.3. Mecanismos que assegurem a possibilidade de contato com os doadores para fornecimento de informação de seu interesse (por exemplo, resultados de exames para acompanhamento clínico ou aconselhamento genético) ou para a obtenção de consentimento específico para uso em novo projeto de pesquisa.
3. O armazenamento poderá ser autorizado pelo período de 5 anos, quando houver aprovação do projeto pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP, podendo haver renovação mediante solicitação da instituição depositária, acompanhada de justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material.
4. Em caso de pesquisa envolvendo mais de uma instituição, deve haver acordo entre as instituições participantes, contemplando formas de operacionalização e de utilização do material armazenado.
5. No caso de armazenamento e/ou formação do banco de material biológico no exterior, deve ser obedecida a legislação vigente para remessa de material para o exterior e ser apresentado o regulamento para análise do CEP quanto ao atendimento dos requisitos do item II.
 - 5.1. O pesquisador e a instituição brasileiros deverão ser considerados como cotistas do banco, com direito de acesso a ele para futuras pesquisas. Dessa forma, o material armazenado não poderá ser considerado como propriedade exclusiva de país ou instituição depositária.
6. Sobre o uso de amostras armazenadas:
 - 6.1. Amostras armazenadas podem ser usadas em novas pesquisas aprovadas pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP;
 - 6.2. Os protocolos de pesquisa que pretendam utilizar material armazenado devem incluir:
 - a) Justificativa do uso do material;
 - b) Descrição da sistemática de coleta e armazenamento, com definição de data de início ou período;
 - c) Cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE obtido quando da pesquisa em que foi colhido o material, incluindo autorização de armazenamento e possível uso futuro, se o armazenamento ocorreu a partir de pesquisa aprovada depois da Resolução CNS n° 196/96; e
 - d) TCLE específico para nova pesquisa que, em caso de impossibilidade da obtenção do consentimento específico para nova pesquisa (doador falecido, tentativas anteriores de contato sem sucesso ou outros) devem ser apresentadas as justificativas como parte do protocolo para apreciação do CEP, que dispensará ou não o consentimento individual;
 - 6.3. Em caso de material biológico para cujo armazenamento se dispõe de normas da ANVISA, essas devem também

ser observadas.

HUMBERTO COSTA
Presidente do Conselho Nacional de Saúde

Homologo a Resolução CNS N° 147, de 13 de janeiro de 2005, nos termos do Decreto de Delegação de Competência de 12 de novembro de 1991.

HUMBERTO COSTA
Ministro de Estado da Saúde

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

RESOLUÇÃO N° 347, DE 13 DE JANEIRO DE 2005

O Plenário do Conselho Nacional de Saúde, em sua Centésima Quinquagésima Reunião Ordinária, realizada nos dias 11, 12 e 13 de janeiro de 2005, no uso de suas competências regimentais e atribuições conferidas pela Lei n° 8.080, de 19 de setembro de 1990, e pela Lei n° 8.142, de 28 de dezembro de 1990, e considerando a necessidade de regulamentar o armazenamento e a utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa,

RESOLVE:

Aprovar as seguintes diretrizes para análise ética de projetos de pesquisa que envolve armazenamento de materiais ou uso de materiais armazenados em pesquisas anteriores:

1. Quando, em projetos de pesquisa, estiver previsto o armazenamento de materiais biológicos humanos para investigações futuras, além dos pontos previstos na Resolução CNS n° 196/96, devem ser apresentados:

- 1.1. Justificativa quanto à necessidade e oportunidade para usos futuros;
- 1.2. Consentimento dos sujeitos da pesquisa doadores do material biológico, autorizando a guarda do material;
- 1.3. Declaração de que toda nova pesquisa a ser feita com material será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP; e
- 1.4. Norma ou regulamento elaborado pela instituição depositária para armazenamento de materiais biológicos humanos.

2. O material biológico será armazenado sob a responsabilidade da instituição depositária, que deverá ter norma ou regulamento aprovado pelo CEP dessa instituição, que deverá incluir:

- 2.1. Definição dos responsáveis pela guarda e pela autorização de uso do material;
- 2.2. Mecanismos que garantam sigilo e respeito à confidencialidade (codificação); e
- 2.3. Mecanismos que assegurem a possibilidade de contato com os doadores para fornecimento de informação de seu interesse (por exemplo, resultados de exames para acompanhamento clínico ou aconselhamento genético) ou para a obtenção de consentimento específico para uso em novo projeto de pesquisa.

3. O armazenamento poderá ser autorizado pelo período de 5 anos, quando houver aprovação do projeto pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP, podendo haver renovação mediante solicitação da instituição depositária, acompanhada de justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material.

4. Em caso de pesquisa envolvendo mais de uma instituição, deve haver acordo entre as instituições participantes, contemplando formas de operacionalização e de utilização do material armazenado.

5. No caso de armazenamento e/ou formação do banco de material biológico no exterior, deve ser obedecida a legislação vigente para remessa de material para o exterior e ser apresentado o regulamento para análise do CEP quanto ao atendimento dos requisitos do item II.

5.1. O pesquisador e a instituição brasileiros deverão ser considerados como cotistas do banco, com direito de acesso a ele para futuras pesquisas. Dessa forma, o material armazenado não poderá ser considerado como propriedade exclusiva de país ou instituição depositária.

6. Sobre o uso de amostras armazenadas:

6.1. Amostras armazenadas podem ser usadas em novas pesquisas aprovadas pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP;

6.2. Os protocolos de pesquisa que pretendam utilizar material armazenado devem incluir:

- a) Justificativa do uso do material;
- b) Descrição da sistemática de coleta e armazenamento, com definição de data de início ou período;
- c) Cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE obtido quando da pesquisa em que foi colhido o material, incluindo autorização de armazenamento e possível uso futuro, se o armazenamento ocorreu a partir de pesquisa aprovada depois da Resolução CNS n° 196/96; e
- d) TCLE específico para nova pesquisa que, em caso de impossibilidade da obtenção do consentimento específico para nova pesquisa (doador falecido, tentativas anteriores de contato sem sucesso ou outros) devem ser apresentadas as justificativas como parte do protocolo para apreciação do CEP, que dispensará ou não o consentimento individual;

6.3. Em caso de material biológico para cujo armazenamento se dispõe de normas da ANVISA, essas devem também ser observadas.

HUMBERTO COSTA
Presidente do Conselho Nacional de Saúde

Homologo a Resolução CNS N° 147, de 13 de janeiro de 2005, nos termos do Decreto de Delegação de Competência de 12 de novembro de 1991.

HUMBERTO COSTA
Ministro de Estado da Saúde

Anexo C: Resolução CNS 441/2011

RESOLUÇÃO CNS Nº 441, DE 12 DE MAIO DE 2011.

O Plenário do Conselho Nacional de Saúde, em sua Ducentésima Vigésima Primeira Reunião Ordinária, realizada nos dias 11 e 12 de maio de 2011, no uso de suas competências regimentais e atribuições conferidas pela Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, pela Lei nº 8.142, de 28 de dezembro de 1990, e pelo Decreto nº 5.839, de 11 de julho de 2006, e

Considerando a necessidade de atualizar a complementação da regulamentação da Resolução CNS nº 196/96 no que diz respeito ao armazenamento e à utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa;

Considerando a importância da utilização de material biológico humano para o desenvolvimento das ciências da saúde;

Considerando os subsídios advindos do Sistema EP/CONEP e a experiência acumulada na análise dos projetos de pesquisas que envolvem material biológico humano;

Considerando a necessidade de ser observada a proteção dos Direitos Humanos, das liberdades fundamentais e do respeito à dignidade humana na coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano, resolve:

Art. 1º Aprovar as seguintes diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores:

1. Para os efeitos desta Resolução, considera-se:

I - Biobanco: coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para fins de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais;

II - Biorrepositório: coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais;

III - Material Biológico Humano: espécimes, amostras e alíquotas de material original e seus componentes fracionados;

IV - Projeto de Pesquisa: documento em que é descrita a pesquisa em seus aspectos fundamentais, incluindo informações relativas ao sujeito da pesquisa, detalhamento a respeito dos métodos que serão utilizados para a coleta e tratamento das amostras biológicas, qualificação dos pesquisadores e instâncias responsáveis;

V - Protocolo de Desenvolvimento: documento no qual são definidos a constituição de um Biobanco, seus responsáveis e seus aspectos fundamentais, como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) a ser utilizado; as informações relativas ao sujeito e às amostras; e as etapas de coleta, processamento, armazenamento, distribuição e descarte de material biológico humano; e

VI - Sujeito da pesquisa: aquele que, de forma esclarecida, livre e autônoma, consente em participar de pesquisas, atuais ou potenciais, associadas ao armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório ou Biobanco.

2. Sempre que houver previsão de armazenamento de material biológico humano, no País ou no exterior, visando à possibilidade de utilização em investigações futuras, além do cumprimento dos requisitos da Resolução CNS nº 196/96 e complementares, devem ser apresentados:

I - justificativa quanto à necessidade e oportunidade para utilização futura;

II - consentimento do sujeito da pesquisa, autorizando a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano;

III - declaração de que toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP); e

IV - regulamento aprovado pela instituição depositária destinado à constituição e ao funcionamento do banco de material biológico humano.

3. No caso de Biobanco:

I - o Regulamento corresponde ao seu Protocolo de Desenvolvimento, devendo ser primeiramente analisado pelo CEP institucional ou por CEP indicado pela CONEP e, quando aprovado, ser necessariamente avaliado e receber parecer final da CONEP;

II - o Protocolo de Desenvolvimento é necessário para o credenciamento do Biobanco, devendo ser apresentado no momento de sua proposição e avaliado de acordo com os prazos de tramitação estabelecidos no Sistema CEP/CONEP; e

III - o Biobanco deve conter um sistema seguro de identificação, que garanta o sigilo, o respeito à confidencialidade e à recuperação dos dados dos sujeitos da pesquisa, para fornecimento de informações do interesse destes ou para a obtenção de consentimento específico para utilização em nova pesquisa;

IV - quando houver alteração da titularidade da responsabilidade pelo Biobanco, tal fato deve ser prontamente comunicado ao Sistema CEP/CONEP; e

V - os Biobancos estão sujeitos à inspeção sanitária pelos órgãos competentes.

4. No caso de Biorrepositório, as condições associadas ao armazenamento de material biológico humano devem estar explicitadas no Projeto de Pesquisa respectivo, devendo seu Regulamento ser apreciado pelo CEP institucional ou por CEP indicado pela CONEP e, quando for o caso, pela CONEP, segundo atribuições definidas na Resolução CNS nº 196/96 e complementares.

5. O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento e utilização de material biológico humano em Biobanco é formalizado através de TCLE, por meio do qual o sujeito da pesquisa deve se manifestar expressamente quanto às seguintes alternativas, excludentes entre si:

I - necessidade de novo consentimento a cada pesquisa; e

II - dispensa de novo consentimento a cada pesquisa.

a) O TCLE deve conter referência aos tipos de informação que poderão ser obtidos nas pesquisas futuras, a partir da utilização do material biológico humano armazenado, para fins de conhecimento e decisão autônoma do sujeito.

b) O TCLE deve conter a garantia expressa da possibilidade de acesso pelo sujeito da pesquisa, inclusive a(s) forma(s) de contato para tal, ao conhecimento dos resultados obtidos com a utilização do seu material biológico e às orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando aplicável, a qualquer tempo.

c) O TCLE pode conter manifestação expressa da vontade do sujeito da pesquisa quanto à cessão dos direitos sobre o material armazenado aos sucessores ou outros por ele indicado, em caso de óbito ou condição incapacitante.

d) O TCLE deve informar ao sujeito que os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir de pesquisas poderão ser utilizados nas pesquisas futuras.

e) O TCLE pode conter referência à autorização de descarte do material armazenado e às situações nas quais o mesmo é possível.

6. O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano em Biorrepositório é formalizado por meio de TCLE específico para cada pesquisa, conforme preconizado nas resoluções do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

7. A transferência do material biológico humano armazenado entre Biobancos ou Biorrepositórios, da própria ou de outra instituição, deve ser comunicada ao sujeito da pesquisa, sempre que possível ou, na impossibilidade, deve ser apresentada justificativa ao Sistema CEP/CONEP.

8. O sujeito da pesquisa deve ser informado sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do Biobanco ou do Biorrepositório, quando for o caso.

9. O material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório é do sujeito da pesquisa, permanecendo sua guarda sob a responsabilidade institucional.

I - O gerenciamento do material biológico humano armazenado em Biobanco cabe à instituição e no caso de Biorrepositório ao pesquisador responsável.

10. O sujeito da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado em Biobanco ou Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta.

I - A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo sujeito da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes.

11. O prazo de armazenamento de material biológico humano em Biobanco é indeterminado, sendo a manutenção de seu credenciamento subordinada ao atendimento das normas vigentes.

I - A cada cinco anos, contados a partir da sua constituição, ou a qualquer tempo, por solicitação da CONEP, a instituição responsável pelo Biobanco deve apresentar relatório de atividades do período ao Sistema CEP/CONEP, constando, obrigatoriamente, o número de sujeitos incluídos no período e a relação de pesquisas que utilizaram amostras armazenadas.

II - O descarte do material biológico humano armazenado em Biobanco pode ocorrer:

- a) pela manifesta vontade do sujeito da pesquisa;
- b) devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade;
- c) por iniciativa da instituição; e
- d) pela dissolução do Biobanco.

III - Nas hipóteses previstas nas alíneas "c" e "d", são obrigatórias:

- a) a oferta formal do material armazenado a, no mínimo, duas instituições de pesquisa que possuam Biobanco e a apresentação comprovada da recusa; e
- b) a submissão da decisão institucional e da destinação do material biológico ao CEP, que as encaminhará para avaliação da CONEP.

12. O prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa correspondente e pode ser autorizado por até dez anos.

I - Renovações da autorização de armazenamento são permitidas mediante solicitação do pesquisador responsável, ao CEP, acompanhada de justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material durante o período.

II - Ao final do período de realização da pesquisa, o material biológico humano armazenado em Biorrepositório pode:

- a) permanecer armazenado, se em conformidade com as normas pertinentes do CNS;
- b) ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, mediante aprovação dos CEP e das instituições envolvidas; e
- c) ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do sujeito da pesquisa.

13. No caso de pesquisa envolvendo mais de uma instituição deve haver acordo firmado entre as instituições participantes, contemplando formas de operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório, inclusive a possibilidade de dissolução futura da parceria e a consequente partilha e destinação dos dados e materiais armazenados, conforme previsto no TCLE.

I - É necessário explicitar o tipo e a quantidade dos materiais compartilhados, informando sua destinação após a utilização.

14. No caso de constituição ou participação em banco de material biológico humano no exterior, devem ser obedecidas as normas nacionais e internacionais para remessa de material e ser apresentado o regulamento da instituição destinatária para análise do Sistema CEP/CONEP quanto ao atendimento dos requisitos desta Resolução.

I - O pesquisador e instituição brasileiros devem ter direito ao acesso e à utilização, em pesquisas futuras, do material biológico humano armazenado no exterior, não necessariamente das amostras por ele depositadas pelo pesquisador, garantida, no mínimo, a proporcionalidade da participação.

II - O direito de acesso e utilização compreende as amostras, informações associadas e resultados incorporados ao banco, obtidos em pesquisas aprovadas pelo Sistema CEP/CONEP.

III - Os direitos relativos ao material biológico humano armazenado no exterior não podem ser considerados exclusivos de Estado ou instituição.

IV - A utilização de amostras de brasileiros armazenadas no exterior somente poderá se realizar se observado o art. 5º desta Resolução e com a participação de pesquisador e/ou instituição brasileiros.

Anexo D: Manual de coleta de amostras biológicas Projeto ELSA

Coleta de Amostras Biológicas Projeto ELSA

1. Fluxograma para coleta, processamento e armazenamento das amostras biológicas do estudo ELSA

2. Amostras a serem coletadas:

01 frasco de urina de 12 horas.

Participante em jejum:

03 tubos com gel 8,5mL - coleta basal (tampa amarela)

03 tubos EDTA 4mL – coleta basal (tampa roxa)

01 tubo fluoreto 2mL – coleta basal (tampa cinza)

02 tubos citrato 4,5mL – coleta basal (tampa azul)

01 tubo heparina 4mL – coleta basal (tampa verde)

Total de sangue coletado em jejum: 52,5mL

Após sobrecarga de glicose ou sobrecarga alimentar:

01 tubo com gel 8,5mL- coleta pós sobrecarga (tampa amarela)

01 tubo heparina 4mL – coleta pós sobrecarga (tampa verde)

01 tubo fluoreto 2 mL – coleta pós sobrecarga (tampa cinza)

Total de sangue coletado pós sobrecarga: 14,5mL

Total de sangue coletado: 67mL

Atenção: Tubos citrato, fluoreto, EDTA e heparina, coletar sempre o volume total do tubo, para que a proporção sangue/anticoagulante seja respeitada. (tubos que tenham volumes >50% da capacidade do tubo poderão ser aceitos, salientando que isto vai gerar menor no. de amostras) , indicar no Sistema sempre que não for coletado o volume ideal do tubo citrato.

2.1. Seqüência de coleta dos tubos:

Primeira coleta - participante em jejum:

1. 01 tubo com gel (tampa amarela)
2. 01 tubo EDTA (tampa roxa)
3. 01 tubo fluoreto (tampa cinza)
4. 01 tubo citrato (tampa azul)
5. 01 tubo heparina (tampa verde)
6. 01 tubo EDTA (tampa roxa)
7. 01 tubo citrato (tampa azul)
8. 01 tubo com gel (tampa amarela)
9. 01 tubo EDTA (tampa roxa)
10. 01 tubo com gel (tampa amarela)

Segunda coleta - após sobrecarga:

1. 01 tubo com gel (tampa amarela)
2. 01 tubo heparina (tampa verde)
3. 01 tubo fluoreto (tampa cinza)

No caso do participante não autorizar o armazenamento do material biológico, devem ser coletados apenas os seguintes materiais:

01 frasco de urina de 12 horas.

Participante em jejum:

01 tubos com gel 8,5mL - coleta basal (tampa amarela)

01 tubos EDTA 4mL – coleta basal (tampa roxa)

01 tubo fluoreto 2 mL – coleta basal (tampa cinza)

Após sobrecarga de glicose ou carga alimentar:

01 tubo com gel 8,5mL- coleta pós sobrecarga (tampa amarela)

01 tubo fluoreto 2 mL – coleta pós sobrecarga (tampa cinza)

3. Orientações para Coleta:

3.1.Amostra de Urina:

O participante será orientado quanto ao preparo e procedimento para coletar a urina de 12 horas noturnas e receberá um frasco de boca larga e o formulário com instruções sobre a coleta de urina e onde deverão ser anotados os horários de início e fim da coleta (Formulário de Coleta de Urina - anexo 1).

Preparo do participante para coleta de urina

O participante deverá ser orientado (verbalmente e por escrito) que alguns fatores, não relacionados a doenças, são capazes de alterar os exames laboratoriais, portanto é importante que ele siga as seguintes instruções (ver Formulário para Recepção no Centro de Pesquisa ELSA):

- Realizar ingestão de líquidos com a habitual frequência durante as 12 horas de coleta;
- Não realizar esforço físico durante as 12 horas da coleta;
- Não utilizar supositórios ou laxantes e não aplicar talco ou cremes na região genital na véspera e durante a coleta do material;
- Para mulheres: não coletar a urina durante o período menstrual. Neste caso, o participante será preferencialmente agendado na semana seguinte após o término do período menstrual.

Procedimento para a coleta da urina de 12 horas noturnas:

- Às 19 horas, urine no vaso e anote no Formulário de Coleta de Urina a hora em que você de fato urinou. Esta hora marca o início da coleta
- A partir desse momento, coletar toda a urina produzida até as 7 horas do dia seguinte no frasco que foi fornecido.
- Faça a última coleta exatamente às 7 horas ou o mais próximo desta hora. Anote novamente no Formulário de Coleta de Urina o horário em que você de fato fez a última coleta. Fechar bem o frasco.
- Após cada coleta de urina, manter o frasco bem fechado e armazená-lo na geladeira.
- Anote também no Formulário de Coleta de Urina se você se esqueceu de coletar a urina em algum momento ou se perdeu alguma urina durante o período de coleta de 12 horas:

Observações:

- Utilize o frasco fornecido pelo projeto. Se este frasco não for suficiente para acondicionar toda a urina, utilizar garrafas plásticas de água, limpas e secas, com tampa, para guardar o restante da urina.
- Não adicionar nada ao frasco; somente urina.
- A amostra não deverá ser contaminada com fezes.
- Após o termino da coleta de urina traga o material para o Projeto ELSA.
- Transportar o frasco em posição vertical (em pé), dentro de até 2 horas após a retirada da amostra de urina da geladeira.

No caso do participante não coletar a amostra de urina, este material poderá ser coletado e entregue em outra data.

3.2. Amostras de sangue:

O participante será orientado quanto ao preparo prévio e procedimento para coleta de sangue. As amostras de sangue serão obtidas por punção venosa, utilizando escalpe e tubos de coleta a vácuo. Inicialmente, serão coletadas amostras em jejum, em seguida, será fornecida uma solução de 75g de glicose para todos os participantes que NÃO forem diabéticos. Para diabéticos, será fornecido uma carga alimentar padrão. Após 2 horas, será feita nova punção venosa para coleta de outras amostras de sangue.

Preparo do participante para coleta de sangue basal:

O participante deverá ser orientado (verbalmente e por escrito) que alguns fatores, não relacionados a doenças, são capazes de alterar os exames laboratoriais, portanto é importante que ele siga as seguintes instruções (ver Formulário para Recepção no Centro de Pesquisa ELSA):

- Durante 24 horas que antecedem a prova suspender o uso de polivitamínicos e vitamina C.
- Realizar jejum de 12 horas antes da coleta, não ultrapassando 14 horas. Durante este período, não ingerir bebidas alcoólicas e não realizar esforço físico.
- Participantes com diabetes deverão seguir as orientações recebidas quanto ao uso de insulina na véspera da sua visita ao Centro de Investigação ELSA e aplicar a insulina ou ingerir o medicamento hipoglicemiante oral após a coleta de sangue.

- Participantes em uso de outros medicamentos deverão manter seu uso nos horários recomendados. NÃO suspender o uso desses!

Preparo da carga alimentar:

Os itens alimentares que compõem o lanche para sobrecarga são:

- 1 suco artificial (200ml) sabor laranja (Kappo/Coca-Cola);
- 2 embalagens individuais de torradas Bauducco – 15g/embalagem (totalizando 4 fatias);
- 4 unidades de Polenguinho Natural;
- Água mineral sem gás (100ml);

Modo de preparo do lanche:

- Acondicionar as quatro torradas num prato raso e colocar sobre cada uma delas um Polenguinho;
- Aquecer em microondas por cerca de 20 segundos;
- Despejar o conteúdo do suco num copo descartável de 300ml. A água (100ml) pode ser usada para diluir o suco ou tomar em separado (não é necessário o uso da água);
- Oferecer o lanche ainda quente, juntamente com o suco, ao participante.

6. Identificação dos tubos de coleta (tubos primários):

A identificação dos tubos primários (tubos de coleta de sangue e frasco de urina) é feita com as etiquetas de códigos de barras fornecidas pelo CI ELSA SP, estas etiquetas possuem 10 dígitos, o primeiro dígito é sempre zero, o segundo dígito identifica o Centro de Investigação ELSA e o terceiro dígito é sempre o número 1 (identificação de um tubo primário), os demais dígitos são uma sequência numérica.

Identificação do centro: dois primeiros dígitos
(o primeiro é sempre zero)

Centro	identificador
BA	1
ES	2
MG	3
RJ	4
RS	5
SP	6

Exemplo de identificação de tubos primários:

0110000001 – tubo primário do CI ELSA BA
 0210000001 – tubo primário do CI ELSA ES
 0310000001 – tubo primário do CI ELSA MG
 0410000001 – tubo primário do CI ELSA RJ
 0510000001 – tubo primário do CI ELSA RS
 0610000001 – tubo primário do CI ELSA SP

5. Procedimento de coleta de amostras de sangue:

5.1.Recepção do Participante:

- Após o participante se apresentar na recepção, dar as boas-vindas;
- Solicitar o preenchimento do Formulário de Recepção no Centro de Pesquisa ELSA;
- Verificar se o preparo para a coleta foi realizado;
- Entregar as roupas que o participante utilizará durante sua visita ao CI ELSA e orientá-lo a retirar toda a roupa, permanecendo com suas roupas íntimas, retirar adereços do cabelo e objetos como relógio, anéis, etc.;
- Se o jejum estiver entre 14 e 15 horas ou entre 8 e 10 horas, seguir o fluxo como planejado e anotar o tempo de jejum;
- Se jejum for maior do que 15 horas ou menor que 8 horas, remarcar a coleta de sangue

5.2.Coleta basal:

Com o auxílio do Formulário de coleta de urina, verificar se esta foi coletada adequadamente;

A seguir o mesmo técnico fará a coleta de sangue deve clicar no nome do participante que estará na tela do computador (o nome de todos os participantes no dia estarão disponíveis na tela).

Se o participante não estiver em jejum de 12 horas, colher os exames previstos e anotar o tempo de jejum.

Procedimento de coleta de sangue:

- Verificar se todo o material necessário para a realização da coleta (algodão, álcool 70%, torniquete, escalpe, curativo, banho de gelo, etc.) está disponível e organizado;

- Pegar um aramado com os tubos da coleta basal previamente etiquetados e na organizados na ordem de coleta:

01 tubo com gel (tampa amarela)

01 tubo EDTA (tampa roxa)

01 tubo fluoreto (tampa cinza)

01 tubo citrato (tampa azul)

01 tubo heparina (tampa verde)

01 tubo EDTA (tampa roxa)

01 tubo citrato (tampa azul)

01 tubo com gel (tampa amarela)

01 tubo EDTA (tampa roxa)

01 tubo com gel (tampa amarela)

- Receber o participante; orientá-lo a sentar na cadeira de coleta e verificar se está em uso de anticoagulantes ou antiagregantes plaquetários. Caso esteja há risco potencial de sangramento e/ou hematoma;

- Informar ao participante sobre o procedimento que será realizado: punção venosa, número de tubos a serem colhidos; ingestão de sobrecarga, nova coleta, etc. Aproveitar este momento para tranquilizar o participante, permitindo que ele se acomode e se sinta confortável;

- Lavar as mãos e calçar as luvas;

- Posicionar o braço do participante no apoio, inclinando-o para baixo na altura do ombro

- Selecionar o melhor acesso venoso para punção. Caso o torniquete seja usado para seleção preliminar da veia, pedir para que o participante abra a mão, afrouxá-lo e aguardar 2 minutos antes de realizar a coleta.
- Abrir a embalagem do escalpe na frente do participante. Retirar o escalpe e rosqueá-lo no adaptador de tubos;
- Proceder à anti-sepsia local utilizando algodão umedecido com solução de álcool a 70%. Permitir a secagem da área por 30 segundos;
- Solicitar ao participante que feche a mão e proceder ao garroteamento do membro, posicionando o torniquete 8 cm acima do local da punção (aproximadamente 4 dedos);
- Utilizando o escalpe, puncionar a veia com o bisel da agulha voltado para cima. Caso necessário, para melhor visualizar a veia, esticar a pele com a outra mão (longe do local onde foi feita a antissepsia).
- Inserir o primeiro tubo de coleta no adaptador.
- Quando o sangue começar a fluir para dentro do tubo, diminuir a pressão do torniquete, não permitindo que esse permaneça por mais de 2 minutos e solicitar ao participante que abra a mão. Preferencialmente, o tempo de garroteamento deverá ser controlado (através de cronometragem);
- Após o completo preenchimento do tubo de coleta, homogeneizá-lo imediatamente 10 vezes, por inversão suave; poderá ser utilizado homogeneizador de tubos
- Realizar a troca dos tubos sucessivamente, seguindo a ordem de coleta (ver item 2.1)
- Após a retirada do último tubo, remover o cateter e fazer a compressão local com algodão seco;

- Exercer pressão no local por cerca de 2 minutos. Solicitar ao participante que faça a compressão por mais alguns minutos.
 - Desprezar o escalpe em recipiente para materiais perfurocortantes;
 - Fazer curativo oclusivo no local da punção;
 - Orientar o participante para que não dobre o braço, mantendo-o estendido.
 - Desprezar a luva e o algodão utilizado na anti-sepsia local no lixo para resíduos comuns. Lavar as mãos;
 - Na presença de intercorrências clínicas é importante avaliar a administração da sobrecarga de glicose ou carga alimentar;
 - Fornecer a solução de 75g de glicose, que deverá ser ingerida lentamente em até 5 minutos, se o participante necessitar de mais tempo para a ingestão da sobrecarga, registrar este tempo. Informar a hora do início da ingestão da glicose;
 - Orientar o participante para aguardar assentado, não fazer esforço físico e a não sair da área do projeto. Há risco de queda da própria altura devido a tonteadas.
- Atenção: Participantes submetidos a cirurgia bariátrica serão dispensados da sobrecarga de glicose.
- Em caso de vômitos, dispensar o participante da sobrecarga e informar ao SISTEMA. Deverá ser reagendado novo TTG devendo também ser repetida a coleta da glicemia jejum, para diabéticos, não é necessária nova tentativa de ingestão da carga alimentar.
 - A ingestão sobrecarga deve ser total, ou seja, o participante deve ingerir os 300 mL da solução de glicose. Se não ingerir os 300 mL o teste deverá ser remarcado. Para diabéticos, não é necessária nova tentativa de ingestão da carga alimentar.

- Mantenha os tubos em temperatura ambiente por no máximo 30 minutos;
- Encaminhar amostras para laboratório em até 30 minutos contados a partir do final da coleta para centrifugação das amostras.

5.3. Coleta pós sobrecarga:

- Antes de completar os 120 minutos após a ingestão da solução de glicose ou carga alimentar, preparar a coleta pós sobrecarga;
- Solicitar ao participante que diga seu nome completo para confirmação da identificação no SISTEMA;
- Verificar se todo o material necessário para a realização da coleta (algodão, álcool 70%, torniquete, escalpe, curativo, banho de gelo, etc.) está disponível e organizado;
- Pegar um aramado com os tubos da coleta previamente etiquetados e na organizados na ordem de coleta após sobrecarga:
01 tubo com gel - coleta pós sobrecarga (tampa amarela)
01 tubo heparina – coleta pós sobrecarga (tampa verde)
01 tubo fluoreto – coleta pós sobrecarga (tampa cinza)
- Receber o participante para a coleta no horário previsto;
- Informar ao participante sobre o procedimento que será realizado;
- Lavar as mãos e calçar as luvas;
- Posicionar o braço do participante no apoio, inclinando-o para baixo na altura do ombro;
- Selecionar o melhor acesso venoso para punção. Caso o torniquete seja usado para seleção preliminar da veia, pedir para que o participante abra a mão, afrouxá-lo e aguardar 2 minutos antes de realizar a coleta;
- Abrir a embalagem do escalpe na frente do participante. Retirar o escalpe e rosqueá-lo no adaptador de tubos;

- Proceder à anti-sepsia local utilizando algodão umedecido com solução de álcool a 70%. Permitir a secagem da área por 30 segundos;
- Solicitar ao participante que feche a mão e proceder ao garroteamento do membro, posicionando o torniquete 8 cm acima do local da punção (aproximadamente 4 dedos);
- Utilizando o escalpe, puncionar a veia com o bisel da agulha voltado para cima. Caso necessário, para melhor visualizar a veia, esticar a pele com a outra mão (longe do local onde foi feita a anti-sepsia).
- Inserir o primeiro tubo de coleta no adaptador.
- Quando o sangue começar a fluir para dentro do tubo, diminuir a pressão do torniquete, não permitindo que esse permaneça por mais de 2 minutos e solicitar ao participante que abra a mão. Preferencialmente, o tempo de garroteamento deverá ser controlado (através de cronometragem);
- Após o completo preenchimento do tubo de coleta, homogeneizá-lo imediatamente 10 vezes, por inversão suave; poderá ser utilizado homogeneizador de tubos;
- Realizar a troca dos tubos sucessivamente, seguindo a ordem de coleta (ver item 2.1);
- Após a retirada do último tubo, remover o cateter e fazer a compressão local com algodão seco;
- Exercer pressão no local por 2 minutos. Solicitar ao participante que faça a compressão por mais alguns minutos;
- Desprezar o escalpe em recipiente para materiais perfurocortantes;
- Fazer curativo oclusivo no local da punção;
- Orientar o participante para que não dobre o braço, mantendo-o estendido;

- Desprezar a luva e o algodão utilizado na anti-sepsia local no lixo para resíduos comuns. Lavar as mãos;
- Informar ao SISTEMA o final da coleta pós sobrecarga e quais tubos não foram utilizados e desprezá-los;
- Certificar-se das condições gerais do participante, perguntando-se se está em condições de se locomover sozinho e liberá-lo.
- Mantenha os tubos em temperatura ambiente por no máximo 30 minutos;
- Encaminhar amostras para laboratório em até 30 minutos contados a partir do final da coleta para centrifugação das amostras.

Logística de coleta:

Tempo máximo entre coleta e centrifugação refrigerada: 30 min.
Tubo de tampa amarela com gel SO pode ser centrifugado após 30 minutos e sem refrigeração.

6. Guia de eventos adversos

Todos os eventos adversos deverão ser anotados em livro ata local e no sistema de dados.

6.1. Participantes extremamente ansiosos:

Explique que o procedimento a ser realizado é pouco doloroso e sem riscos. Enfatize que o volume de sangue a ser colhido não trará danos para o participante. Deixe o participante se acomodar na cadeira, sentindo-se relaxado, permitindo a seleção do melhor local para punção. Caso o participante tenha “boa veia” faça comentário enfatizando isso e informando que não haverá maiores problemas. Jamais force o participante a se submeter ao procedimento. Caso necessário comunique ao Diretor do Centro de Investigação ELSA. Registre o evento.

6.2. Punções venosas difíceis:

Caso o sangue não flua para dentro do tubo após a punção, tente trocar por outro tubo do mesmo tipo. Caso o fluxo de sangue para o tubo seja lento, avançar ou retroceder suavemente a agulha, sem causar desconforto ao participante.

Torniquete muito apertado pode impedir o fluxo sanguíneo. Evite aplicá-lo fortemente e afrouxe-o se necessário.

Enfatize ao participante que a dificuldade da coleta é uma questão técnica, não relacionada ao estado de saúde dele.

Não tente mais do que duas punções. Caso não consiga coletar as amostras proponha uma nova visita para realizar esse procedimento.

Caso necessário comunique ao Diretor do Centro de investigação ELSA. Registre o evento.

6.3. Formação de hematoma:

Pode ocorrer durante ou após a punção, sendo visualizado na forma de uma protuberância. As situações que podem precipitar a formação de um hematoma são: (1) Uso de anticoagulantes e antiagregantes plaquetários, (2) Veia frágil ou muito pequena, em relação ao calibre da agulha, (3) A agulha ultrapassa a parede posterior da veia puncionada, (4) A agulha perfura parcialmente a veia, não penetrando por completo, (5) Diversas tentativas de punção sem sucesso, (6) A agulha é removida sem antes remover o torniquete, (7) Pressão inadequada aplicada no local da punção.

A dor é o sintoma de maior desconforto ao participante, e eventualmente, pode ocorrer a compressão de algum ramo nervoso. Caso a formação do hematoma seja identificada durante a punção, deve-se retirar imediatamente o torniquete e a agulha. É necessária uma compressão local durante pelo menos dois minutos. Fazer curativo compressivo. Orientar o participante para que não dobre o braço, mantendo-o estendido e elevado, na altura dos ombros. O uso de compressas frias pode auxiliar na atenuação da dor local.

Caso necessário, comunique ao Diretor do Centro de investigação ELSA.

Registre o evento.

6.4. Participantes que apresentam síncope ou desmaio:

Mantenha o participante na cadeira de coleta. Recline o encosto da cadeira até a posição máxima. Caso necessário eleve os membros inferiores do participante. Providencie um recipiente se o participante queixar-se de náusea. Caso necessário comunique ao Diretor do Centro de investigação ELSA.

Registre o evento.

7. Controle de temperatura da sala de coleta:

A temperatura da sala de coleta deverá ser controlada e mantida entre 20 e 24°C, devendo ser verificada e registrada às 7:00h, 9:00h e 11:00h.

Anexo E: Manual de processamento de amostras biológicas

Projeto ELSA

Processamento de Amostras Biológicas

Projeto ELSA

1. Fluxograma para coleta, processamento e armazenamento das amostras biológicas do estudo ELSA

2. Identificação dos criotubos e palhetas:

A identificação dos criotubos é feita com as etiquetas de códigos de barras fornecidas pelo CI ELSA SP, estas etiquetas possuem 10 dígitos, o primeiro dígito é sempre zero, o segundo dígito identifica o Centro de Investigação ELSA e o terceiro dígito é sempre o número 3 (identificação de um criotubo), os demais dígitos são uma sequência numérica.

Exemplo de identificação de criotubos:

0130000001 – criotubo do CI ELSA BA

0230000001 – criotubo do CI ELSA ES

0330000001 – criotubo do CI ELSA MG

0430000001 – criotubo do CI ELSA RJ

0530000001 - criotubo do CI ELSA RS

0630000001 - criotubo do CI ELSA SP

A identificação das palhetas é feita através de códigos de barras impressos nas palhetas, estes códigos possuem 10 dígitos, o primeiro dígito é sempre zero, o segundo dígito identifica o Centro de Investigação ELSA e o terceiro dígito é sempre o número 4 (identificação de uma palheta), os demais dígitos são uma sequência numérica.

**Identificação do centro: dois primeiros dígitos
(o primeiro é sempre zero)**

Centro	identificador
BA	1
ES	2
MG	3
RJ	4
RS	5
SP	6

Exemplo de identificação de palhetas:

0140000001 – palhetas do CI ELSA BA
 0240000001 – palhetas do CI ELSA ES
 0340000001 – palhetas do CI ELSA MG
 0440000001 – palhetas do CI ELSA RJ
 0540000001 - palhetas do CI ELSA RS
 0640000001 - palhetas do CI ELSA SP

3. Processamento das amostras biológicas:

3.1. Processamento das amostras para exames – coleta basal:

3.1.1. Processamento da amostra do tubo EDTA para HbA1C:

- Utilizar o tubo EDTA (tampa roxa) que será usado para a realização do hemograma;
- Homogeneizar o tubo utilizando o homogeneizador de sangue;
- Transferir 1,0 ml do reagente hemolisante (enviado de São Paulo) para um criotubo previamente etiquetado;
- Transferir 5 µL de sangue total em EDTA para o criotubo contendo o hemolisante;
- Fechar bem o criotubo e homogeneizar por inversão por 10 vezes.
- Ler o código de barras do criotubo com hemolisante e indicar a amostra de HbA1c;
- Manter o criotubo refrigerado (banho de gelo ou geladeira).

Após a realização do hemograma, caso este tubo de coleta possa voltar ao CI ELSA, poderá ser usado para obtenção do plasma EDTA para armazenamento.

3.1.2 Centrifugação dos tubos de coleta de sangue:

Centrifugar os tubos com gel (tampa amarela), fluoreto (tampa cinza), citrato (tampa azul), EDTA (tampa roxa), e heparina (tampa verde) incluindo o tubo EDTA utilizado para realização do hemograma, quando disponível, como se segue:

- Colocar os tubos na centrífuga previamente refrigerada a 5°C;
- Centrifugar a 1500 g (3000rpm) por 15 minutos a 50C;
- Retirar da centrífuga e manter os tubos refrigerados (banho de gelo ou geladeira).

3.1.3 Processamento da amostra de urina:

- Homogeneizar a amostra e verificar o volume total da urina com proveta e registrá-lo;
- Identificar com a numeração do frasco de coleta, um tubo de ensaio com tampa (este material será utilizado para a alíquota de cálcio);
- Transferir 10mL da amostra homogeneizada para um tubo cônico com tampa e transferir a etiqueta do frasco de coleta para este tubo (este material será utilizado para fazer as alíquotas de urina para os demais exames e para o banco de amostras);
- Manter o tubo com a urina em banho de gelo.

3.1.4 Preparo das alíquotas de urina para exames bioquímicos (sódio, potássio, creatinina) e microalbuminúria:

- Separar 02 criotubos previamente etiquetados;
- Transferir 1,0mL da urina reservada no tubo cônico para cada criotubo;
- Fechar bem os criotubos;
- Ler o código de barras de um criotubo e indicar a amostra de urina não acidificada para microalbuminúria;
- Ler o código de barras do outro criotubo e indicar no SISTEMA a amostra de urina não acidificada para bioquímica – urina;
- Manter as alíquotas refrigeradas (banho de gelo ou geladeira);
- Manter o tubo cônico com a urina refrigerado em banho de gelo ou geladeira (este material será utilizado para o banco de amostras).

3.1.5 Preparo da alíquota de urina para dosagem de cálcio:

- A um tubo de ensaio previamente identificado com a numeração do tubo primário da urina, transferir 5mL da urina e adicionar uma gota de ácido clorídrico PA (HCl), homogeneizar suavemente 10 vezes, por inversão;
- Transferir 1mL desta urina acidificada para um criotubo previamente etiquetado;
- Fechar bem o criotubo;
- Ler o código de barras de um criotubo para indicar a amostra de urina acidificada para a dosagem de cálcio;
- Manter a alíquota refrigerada (banho de gelo ou geladeira);
- Manter a alíquota refrigerada (banho de gelo ou geladeira).

ATENÇÃO: Após certificar-se de que foi guardada a amostra de urina para o banco de amostras biológicas, desprezar, na pia, a urina restante na proveta.

3.1.6 Preparo das alíquotas de soro para exames de bioquímica, hormônios jejum e imunologia:

- Separar um tubo com gel (tampa amarela) da coleta basal, mantendo-o refrigerado (banho de gelo ou geladeira);
- Separar 3 criotubos previamente etiquetados;
- Transferir 500 µL do soro obtido após a centrifugação para cada criotubo;
- Fechar bem os criotubos;
- Ler o código de barras de um dos criotubos e indicar a amostra de soro para exames de bioquímica;
- Ler o código de barras de outro criotubo e indicar a amostra de soro para exames de hormônios jejum;
- Ler o código de barras do terceiro criotubo e indicar a amostra de soro para imunologia;
- Manter as alíquotas refrigeradas (banho de gelo ou geladeira);
- Manter o tubo com gel (tampa amarela) refrigerado em banho de gelo ou geladeira (este material será utilizado para as alíquotas de soro jejum do banco de amostras biológicas).

3.1.7 Preparo da alíquota de plasma fluoretado para dosagem da glicemia de jejum:

- Separar o tubo fluoreto (tampa cinza) da coleta basal, mantendo-o refrigerado (banho de gelo ou geladeira);
- Separar 1 criotubo previamente etiquetado;
- Transferir 500 µL do plasma obtido após a centrifugação para o criotubo;
- Fechar bem o crotubo;
- Ler o código de barras do criotubo e indicar a amostra de plasma para glicemia jejum;
- Manter a alíquota refrigerada (banho de gelo ou geladeira);
- Só desprezar o tubo fluoreto após certificar-se de que a alíquota de glicemia jejum foi realizada.

4. Processamento das amostras para exames – coleta pós sobrecarga:

4.1.1. Centrifugação dos tubos de coleta pós sobrecarga:

Centrifugar os tubos com gel (tampa amarela), heparina (tampa verde) e fluoreto (tampa cinza), como se segue:

- Colocar os tubos na centrífuga previamente refrigerada a 5°C;
- Centrifugar a 1500 g(3000rpm) por 15 minutos a 50°C;
- Retirar da centrífuga e manter os tubos refrigerados (banho de gelo ou geladeira).

4.1.2 Preparo da alíquota de plasma fluoretado para dosagem da glicemia pós sobrecarga:

- Separar o tubo fluoreto (tampa cinza) da coleta pós sobrecarga, mantendo-o refrigerado (banho de gelo ou geladeira);
- Separar 1 criotubo previamente etiquetado;
- Transferir 500 µL do plasma obtido após a centrifugação para o criotubo;
- Fechar bem o criotubo;
- Ler o código de barras do criotubo e indicar a amostra de plasma para glicemia pós sobrecarga;
- Manter a alíquota refrigerada (banho de gelo ou geladeira);
- Só desprezar o tubo fluoreto após certificar-se de que a alíquota foi realizada.

4.1.3 Preparo da alíquota de soro para dosagem de insulina ou triglicérides pós sobrecarga:

- Separar o tubo com gel (tampa amarela) da coleta pós sobrecarga, mantendo-o refrigerado (banho de gelo ou geladeira);
- Separar 1 criotubo previamente etiquetado;

- Transferir 500 µL do soro obtido após a centrifugação para o criotubo;
- Fechar bem o crotubo;
- Ler o código de barras do criotubo e indicar a amostra de soro para dosagem de insulina pós sobrecarga (a alíquota de triglicérides dosada para participantes diabéticos não é indicada no Sistema.
- Manter a alíquota refrigerada (banho de gelo ou geladeira);
- Manter o tubo com gel (tampa amarela) refrigerado em banho de gelo ou geladeira (este material será utilizado para o banco de amostras).

5. Armazenamento das amostras de exames até a data de envio para São Paulo:

- Colocar todas as alíquotas para exames, em sacos plásticos previamente identificados pelo tipo de alíquota de exames nome do centro;
- Manter o material em freezer a - 80°C, até o envio para São Paulo;
- Anotar no saco plástico, com caneta tinta permanente, a data do envio para São Paulo.
- Gerar o arquivo dos criotubos de exames para ser enviado para SP (ver utilização do Sistema de exames SP, no manual de exames).

6.Total de alíquotas para a realização dos exames em São Paulo:

Número de Alíquotas	Material	Exames
01	Hemácias lisadas	HbA1C
02	Urina não acidificada	Creatinina, sódio, potássio e microalbuminúria
01	Urina acidificada	Cálcio
03	Soro jejum	Bioquímicos, hormônios, PCR e sorologia para chagas
01	Plasma fluoreto jejum	Glicemia jejum
01	Plasma fluoreto pós carga	Glicemia pós carga
01	Soro pós carga	Insulina ou triglicérides

7.Processamento das amostras para armazenamento:

Após a realização das alíquotas de exames, separar os tubos de coleta de sangue basal e pós sobrecarga (com gel -tampa amarela, EDTA - tampa roxa,citrato – tampa azul e heparina - tampa verde) e a amostra de urina não acidificada que serão utilizados para realização das alíquotas de bancos.

Agrupar os tubos coletados no aramado da seguinte forma:

- Tubos com gel (tampa amarela) da coleta basal;
- Tubos EDTA (tampa roxa) da coleta basal;
- Tubos citrato (tampa azul) da coleta basal;
- Tubo heparina (tampa verde) da coleta basal;
- Tubo contendo a urina de 12 horas;
- Tubos com gel (tampa amarela) da coleta pós sobrecarga;
- Tubo heparina (tampa verde) da coleta pós sobrecarga.

Sempre que um material for alíquotado seguir a seguinte ordem:

- Preparar uma palheta;
- Preparar um criotubo;
- Preparar uma palheta.

Repetir esta sequência até que todas as alíquotas previstas sejam realizadas, caso ainda haja material biológico disponível, alíquotá-lo em criotubos para armazenamento local; só depois que todo o material tenha sido distribuído em alíquotas, iniciar o processo com outro material.

8. Preparo da alíquota de soro basal (jejum) para armazenamento:

Separar os seguintes materiais:

- Tubos com gel (tampa amarela) – coleta basal;
- Seis palhetas vermelhas;
- Três criotubos previamente etiquetados.

8.1 Preparo das palhetas:

- Pegar uma palheta da cor vermelha;
- Acoplar uma ponteira amarela à tubulação de aspiração do compressor;
- Acoplar a ponteira à palheta, encaixando a outra ponta da ponteira na extremidade colorida da palheta;
- Introduzir a palheta no tubo mantendo a extremidade da palheta mergulhada no soro – ATENÇÃO: cuidado para não introduzir a palheta no Gel separador;
- Ligar o compressor que fará a aspiração, se necessário regular a velocidade de aspiração com o auxílio do botão de regulagem de aspiração;
- Aguardar a aspiração do soro;
- Retirar a palheta do material biológico;
- Retirar a ponteira, limpar a palheta com papel absorvente e iniciar a vedação;
- Introduzir uma das extremidades da palheta no orifício da seladora;
- Pressionar o botão branco (à direita) ou o pedal da seladora;
- Aguardar que as luzes superiores se apaguem;

- Retirar a palheta;
- Repetir o procedimento de vedação com o outro lado da palheta;
- Mergulhar a palheta, no banho de gelo com o lado colorido para cima.

9.1 Preparo dos criotubos:

- Pegar uma micropipeta de 500µL e acoplar uma ponteira;
- Abrir um criotubo previamente etiquetado;
- Aspirar o soro jejum que será aliquotado;
- Transferir o material aspirado para o criotubo;
- Fechar bem o criotubo - ATENÇÃO: certifique-se que o criotubo está bem vedado;
- Manter o criotubo refrigerado em banho de gelo.

9.1.2 Identificação das alíquotas realizadas:

Após a realização de todas as alíquotas ler os códigos de barras das palhetas e dos criotubos para a identificação

10. Preparo da alíquota de plasma EDTA para armazenamento:

Separar os seguintes materiais:

- Tubos EDTA (tampa roxa);
- Seis palhetas azuis;
- Três criotubos previamente etiquetados.

10.1 Preparo das palhetas:

- Pegar uma palheta da cor azul;
- Acoplar uma ponteira amarela à tubulação de aspiração do compressor;
- Acoplar a ponteira à palheta, encaixando a outra extremidade da ponteira no lado colorido da palheta;

- Introduzir a palheta no tubo mantendo a extremidade da palheta mergulhada no plasma – ATENÇÃO: cuidado para não introduzir a palheta na papa de hemácias;
- Ligar o compressor que fará a aspiração, se necessário regular a velocidade de aspiração com o auxílio do botão de regulação de aspiração;
- Aguardar a aspiração do plasma;
- Retirar a palheta do material biológico;
- Retirar a ponteira, limpar a palheta com papel absorvente e iniciar a vedação;
- Introduzir uma das extremidades da palheta no orifício da seladora;
- Pressionar o botão branco (à direita) ou o pedal da seladora;
- Aguardar que as luzes superiores se apaguem;
- Retirar a palheta;
- Repetir o procedimento de vedação com o outro lado da palheta;
- Mergulhar a palheta, no banho de gelo com o lado colorido para cima.

10.2 Preparo dos criotubos:

- Pegar uma micropipeta de 500µL e acoplar uma ponteira;
- Abrir um criotubo previamente etiquetado;
- Aspirar o plasma que será alíquotado;
- Transferir o material aspirado para o criotubo;
- Fechar bem o criotubo - ATENÇÃO: certifique-se que o criotubo está bem vedado;
- Manter o criotubo refrigerado em banho de gelo.

10.3 Identificação das alíquotas realizadas:

Após a realização de todas as alíquotas ler os códigos de barras das palhetas e dos criotubos para a identificação

10.4 Preparo da alíquota de plasma citrato para armazenamento:

Separar os seguintes materiais:

- Tubos citrato (tampa azul);
- Quatro palhetas brancas;
- Dois criotubos previamente etiquetados.

10.5 Preparo das palhetas:

- Pegar uma palheta da cor branca;
- Acoplar uma ponteira amarela à tubulação de aspiração do compressor;
- Acoplar a ponteira à palheta, encaixando a outra extremidade da ponteira no lado colorido da palheta;
- Introduzir a palheta no tubo mantendo a extremidade da palheta mergulhada no plasma – ATENÇÃO: cuidado para não introduzir a palheta na papa de hemácias;
- Ligar o compressor que fará a aspiração, se necessário regular a velocidade de aspiração com o auxílio do botão de regulação de aspiração;
- Aguardar a aspiração do plasma;
- Retirar a palheta do material biológico;
- Retirar a ponteira, limpar a palheta com papel absorvente e iniciar a vedação;
- Introduzir uma das extremidades da palheta no orifício da seladora;
- Pressionar o botão branco (à direita) ou o pedal da seladora;
- Aguardar que as luzes superiores se apaguem;
- Retirar a palheta;
- Repetir o procedimento de vedação com o outro lado da palheta;
- Mergulhar a palheta, no banho de gelo com o lado colorido para cima.

10.6 Preparo dos criotubos:

- Pegar uma micropipeta de 500µL e acoplar uma ponteira;
- Abrir um criotubo previamente etiquetado;
- Aspirar o plasma que será aliquotado;
- Transferir o material aspirado para o criotubo;
- Fechar bem o criotubo - ATENÇÃO: certifique-se que o criotubo está bem vedado;
- Manter o criotubo refrigerado em banho de gelo.

10.7 Identificação das alíquotas realizadas:

Após a realização de todas as alíquotas ler os códigos de barras das palhetas e dos criotubos para sua identificação

11. Preparo da alíquota de plasma heparinizado basal (jejum) para armazenamento:

Separar os seguintes materiais:

- Tubos heparina (tampa verde) – coleta basal;
- Duas palhetas cinzas;
- Um criotubo, previamente etiquetados.

11.1 Preparo das palhetas:

- Pegar uma palheta da cor cinza;
- Acoplar uma ponteira amarela à tubulação de aspiração do compressor;
- Acoplar a ponteira à palheta, encaixando a outra extremidade da ponteira no lado colorido da palheta;
- Introduzir a palheta no tubo mantendo a extremidade da palheta mergulhada no plasma – ATENÇÃO: cuidado para não introduzir a palheta na papa de hemácias;

- Ligar o compressor que fará a aspiração, se necessário regular a velocidade de aspiração com o auxílio do botão de regulação de aspiração;
- Aguardar a aspiração do plasma;
- Retirar a palheta do material biológico;
- Retirar a ponteira, limpar a palheta com papel absorvente e iniciar a vedação;
- Introduzir uma das extremidades da palheta no orifício da seladora;
- Pressionar o botão branco (à direita) ou o pedal da seladora;
- Aguardar que as luzes superiores se apaguem;
- Retirar a palheta;
- Repetir o procedimento de vedação com o outro lado da palheta;
- Mergulhar a palheta, no banho de gelo com o lado colorido para cima.

11.2 Preparo dos criotubos:

- Pegar uma micropipeta de 500µL e acoplar uma ponteira;
- Abrir um criotubo previamente etiquetado;
- Aspirar o plasma que será aliquoteado;
- Transferir o material aspirado para o criotubo;
- Fechar bem o criotubo - ATENÇÃO: certifique-se que o criotubo está bem vedado;
- Manter o criotubo refrigerado em banho de gelo.

11.3 Identificação das alíquotas realizadas:

Após a realização de todas as alíquotas ler os códigos de barras das palhetas e dos criotubos para sua identificação.

12. Preparo da alíquota de urina para armazenamento:

Separar os seguintes materiais:

- Tubo contendo a urina;

- Quatro palhetas verdes;
- Dois criotubos previamente etiquetados.

12.1 Preparo das palhetas:

- Pegar uma palheta da cor verde;
- Acoplar uma ponteira amarela à tubulação de aspiração do compressor;
- Acoplar a ponteira à palheta, encaixando a outra extremidade da ponteira no lado colorido da palheta;
- Introduzir a palheta no tubo mantendo a extremidade da palheta mergulhada na urina;
- Ligar o compressor que fará a aspiração, se necessário regular a velocidade de aspiração com o auxílio do botão de regulagem de aspiração;
- Aguardar a aspiração da amostra;
- Retirar a palheta do material biológico;
- Retirar a ponteira, limpar a palheta com papel absorvente e iniciar a vedação;
- Introduzir uma das extremidades da palheta no orifício da seladora;
- Pressionar o botão branco (à direita) ou o pedal da seladora;
- Aguardar que as luzes superiores se apaguem;
- Retirar a palheta;
- Repetir o procedimento de vedação com o outro lado da palheta;
- Mergulhar a palheta, no banho de gelo com o lado colorido para cima.

12.2 Preparo dos criotubos:

- Pegar uma micropipeta de 500µL e acoplar uma ponteira;
- Abrir um criotubo previamente etiquetado;
- Aspirar a urina que será alíquotada;

- Transferir o material aspirado para o criotubo;
- Fechar bem o criotubo - ATENÇÃO: certifique-se que o criotubo está bem vedado;
- Manter o criotubo refrigerado em banho de gelo.

12.3 Identificação das alíquotas realizadas:

Após a realização de todas as alíquotas ler os códigos de barras das palhetas e dos criotubos para sua identificação.

13. Preparo da alíquota de soro pós sobrecarga para armazenamento:

Separar os seguintes materiais:

- Tubos com gel (tampa amarela) – coleta pós sobrecarga;
- Quatro palhetas laranjas;
- Dois criotubos previamente etiquetados.

13.1 Preparo das palhetas:

- Pegar uma palheta da cor laranja;
- Acoplar uma ponteira amarela à tubulação de aspiração do compressor;
- Acoplar a ponteira à palheta, encaixando a outra extremidade da ponteira no lado colorido da palheta;
- Introduzir a palheta no tubo mantendo a extremidade da palheta mergulhada no soro – ATENÇÃO: cuidado para não introduzir a palheta no Gel separador;
- Ligar o compressor que fará a aspiração, se necessário regular a velocidade de aspiração com o auxílio do botão de regulagem de aspiração;
- Aguardar a aspiração do soro;
- Retirar a palheta do material biológico;
- Retirar a ponteira, limpar a palheta com papel absorvente e iniciar a vedação;

- Introduzir uma das extremidades da palheta no orifício da seladora;
- Pressionar o botão branco (à direita) ou o pedal da seladora;
- Aguardar que as luzes superiores se apaguem;
- Retirar a palheta;
- Repetir o procedimento de vedação com o outro lado da palheta;
- Mergulhar a palheta, no banho de gelo com o lado colorido para cima.

13.2 Preparo dos criotubos:

- Pegar uma micropipeta de 500µL e acoplar uma ponteira;
- Abrir um criotubo previamente etiquetado;
- Aspirar o soro jejum que será aliquoteado;
- Transferir o material aspirado para o criotubo;
- Fechar bem o criotubo - ATENÇÃO: certifique-se que o criotubo está bem vedado;
- Manter o criotubo refrigerado em banho de gelo.

13.3 Identificação das alíquotas realizadas:

Após a realização de todas as alíquotas ler os códigos de barras das palhetas e dos criotubos para sua identificação.

14. Preparo da alíquota de plasma heparinizado pós sobrecarga para armazenamento:

Separar os seguintes materiais:

- Tubos heparina (tampa verde) – coleta pós sobrecarga;
- Duas palhetas amarelas;
- Um criotubo, previamente etiquetados.

14.1. Preparo das palhetas:

- Pegar uma palheta da cor amarela;
- Acoplar uma ponteira amarela à tubulação de aspiração do compressor;

- Acoplar a ponteira à palheta, encaixando a outra extremidade da ponteira no lado colorido da palheta;
- Introduzir a palheta no tubo mantendo a extremidade da palheta mergulhada no plasma – ATENÇÃO: cuidado para não introduzir a palheta na papa de hemácias;
- Ligar o compressor que fará a aspiração, se necessário regular a velocidade de aspiração com o auxílio do botão de regulagem de aspiração;
- Aguardar a aspiração do plasma;
- Retirar a palheta do material biológico;
- Retirar a ponteira, limpar a palheta com papel absorvente e iniciar a vedação;
- Introduzir uma das extremidades da palheta no orifício da seladora;
- Pressionar o botão branco (à direita) ou o pedal da seladora;
- Aguardar que as luzes superiores se apaguem;
- Retirar a palheta;
- Repetir o procedimento de vedação com o outro lado da palheta;
- Mergulhar a palheta, no banho de gelo com o lado colorido para cima.

14.2 Preparo dos criotubos:

- Pegar uma micropipeta de 500µL e acoplar uma ponteira;
- Abrir um criotubo previamente etiquetado;
- Aspirar o plasma que será aliquoteado;
- Transferir o material aspirado para o criotubo;
- Fechar bem o criotubo - ATENÇÃO: certifique-se que o criotubo está bem vedado;
- Manter o criotubo refrigerado em banho de gelo.

14.3 Identificação das alíquotas realizadas:

Após a realização de todas as alíquotas ler os códigos de barras das palhetas e dos criotubos para sua identificação

Cores de palhetas e seus respectivos materiais:

Cor da palheta	Material
Vermelha	Soro basal
Azul	Plasma EDTA jejum
Branca	Plasma citrato
cinza	Plasma heparinizado jejum
Verde	Urina de 12 horas
Laranja	Soro pós carga
Amarela	Plasma heparinizado pós carga

15. Identificação dos cilindros:

A identificação dos cilindros é feita com as etiquetas de códigos de barras fornecidas pelo CI ELSA SP, estas etiquetas possuem 10 dígitos, o primeiro dígito é sempre zero, o segundo dígito identifica o Centro de Investigação ELSA e o terceiro dígito é sempre o número 2(identificação de um cilindro), os demais dígitos são uma sequência numérica.

Exemplo de identificação de cilindros:

0120000001 – cilindro do CI ELSA BA

0220000001 – cilindro do CI ELSA ES

0320000001 – cilindro do CI ELSA MG

0420000001 – cilindro do CI ELSA RJ

0520000001 - cilindro do CI ELSA RS

0620000001 - cilindro do CI ELSA SP

16. Montagem dos cilindros de palhetas:

São montados quatro cilindros por participante; dois vermelhos (para o banco do ao RJ) e dois azuis (para o banco de SP);

Seguir a seguinte ordem para a montagem de cilindros:

Primeiro cilindro Vermelho:

- Pegar um cilindro vermelho previamente etiquetado;
- Ler o código de barras do cilindro para informar ao SISTEMA;
- Pegar uma palheta vermelha;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar outra palheta vermelha;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta laranja;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta azul;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar outra palheta azul;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta verde;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta branca;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Fechar o cilindro e mantê-lo em banho de gelo.

Primeiro cilindro Azul:

- Pegar um cilindro azul previamente etiquetado;
- Ler o código de barras do cilindro para informar ao SISTEMA;
- Pegar uma palheta vermelha;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar outra palheta vermelha;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta laranja;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta azul;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar outra palheta azul;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta verde;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta branca;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Fechar o cilindro e mantê-lo em banho de gelo.

Segundo cilindro Vermelho:

- Pegar um cilindro vermelho previamente etiquetado;
- Ler o código de barras do cilindro para informar ao SISTEMA;
- Pegar uma palheta vermelha;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta cinza;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta laranja;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta azul;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta verde;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta amarela;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta branca;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Fechar o cilindro e mantê-lo em banho de gelo.

Segundo cilindro azul:

- Pegar um cilindro azul previamente etiquetado;
- Ler o código de barras do cilindro para informar ao SISTEMA;
- Pegar uma palheta vermelha;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta cinza;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta laranja;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta azul;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta verde;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta amarela;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta branca;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Fechar o cilindro e mantê-lo em banho de gelo.

17. Armazenamento dos cilindros até o envio ao banco central:

- Armazenar os cilindros vermelhos em sacos plásticos ou caixas de papelão em freezer -80oC até a data de envio ao Banco do RJ.
- Armazenar os cilindros azuis em sacos plásticos em freezer -80oC até a data de envio ao Banco de SP;
- Enviar os cilindros para armazenamento em SP (cilindros azuis) na mesma data de envio de amostras para exames.

No caso de participantes com material faltante (reagendamento de coleta pós sobrecarga ou no caso de entrega da urina em outra data), os cilindros incompletos devem ficar separados em um outro saco plástico devidamente identificado e serão completados na ocasião da coleta do material faltante, só então serão guardados com os demais cilindros para o envio às Biotecas.

18. Banco de amostras ELSA:

Alíquotas de materiais para o banco de amostras:

Material	Total de alíquotas	Número de palhetas	Número de criotubos
Soro jejum	9	6	3
Plasma EDTA jejum	9	6	3
Plasma citrato jejum	6	4	2
Plasma heparina jejum	3	2	1
Urina de 12 horas	6	4	2
Soro pós carga	6	4	2
Plasma heparina pós carga	3	2	1

33,3% das amostras do banco será guardado em freezer -80°C nos bancos locais, acondicionadas em criotubos. O banco local de São Paulo será no INCOR – HC.

33,3% no HU-USP em criogênio, acondicionada em palhetas.

33,3% na FIOCRUZ –R.J. em criogênio, acondicionadas em palhetas.

Se houver sobra de material biológico após a realização das alíquotas previstas; este poderá ser alíquotado em criotubos e armazenado localmente.

Logística de alíquotas:

19. Banco estendido da Amostra Aleatória da Coorte:

Todo o material biológico coletado de participantes sorteados da Amostra Aleatória da Coorte deve ser alíquotado seguindo a

sequência palheta – criotubo – palheta até ser esgotado; desta forma ao final da alíquotagem teremos feito, em média, o seguinte número de alíquotas por tipo de material biológico:

Total de alíquotas realizadas esgotando todo o material coletado:

Material	Alíquotas possíveis
Soro jejum	18
Plasma EDTA	11
Plasma citrato	11
Plasma heparina jejum	3
Urina de 12 horas	16
Soro pós carga	6
Plasma heparina pós carga	3

Após a distribuição deste material em palhetas e criotubos é possível fazer as seguintes alíquotas

Total de palhetas realizadas por tipo de material coletado:

Material	Palhetas	Criotubos	Palhetas extras
Soro jejum	12	6	6
Plasma EDTA	7	4	1
Plasma Citrato	7	4	3
Plasma heparina jejum	2	1	0
Urina de 12 horas	8	8	4
Soro pós carga	4	4	0
Plasma heparina pós carga	2	1	0
Total	42	28	14

20. Montagem dos cilindros extras da Amostra Aleatória da Coorte:

Estes participantes terão 06 cilindros guardados nas biotecas centrais, os quatro cilindros montados seguindo a padronização “habitual” e mais dois cilindros montados como segue:

Terceiro cilindro Vermelho:

- Pegar um cilindro vermelho previamente etiquetado;
- Ler o código de barras do cilindro para informar ao SISTEMA;
- Pegar uma palheta vermelha;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar outra palheta vermelha;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar outra palheta vermelha;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta azul;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta branca;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta verde;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar outra palheta verde;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Fechar o cilindro e mantê-lo em banho de gelo.

Terceiro cilindro Azul:

- Pegar um cilindro azul previamente etiquetado;
- Ler o código de barras do cilindro para informar ao SISTEMA;
- Pegar uma palheta vermelha;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar outra palheta vermelha;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar outra palheta vermelha;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta branca;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar outra palheta branca;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar uma palheta verde;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Pegar outra palheta verde;
- Ler o código de barras da palheta para informar ao SISTEMA;
- Introduzir a palheta no cilindro;
- Fechar o cilindro e mantê-lo em banho de gelo.

Todos os cilindros destes participantes são mantidos no freezer -80°C em sacos separados e identificados como “Amostra aleatória da Coorte” para posteriormente serem guardados nos tanques de nitrogênio em racks definidas para estes participantes.

Anexo F: Manual de exames e metodologias Projeto ELSA

Exames e Metodologias Projeto ELSA

1. Fluxograma para coleta, processamento e armazenamento das amostras biológicas do estudo ELSA

2. Exames:

2.1 Exames realizados no laboratório central _ SP:

Serão realizados os seguintes exames de laboratório em São Paulo:

2.1.1. Urina de 12 horas:

- Microalbuminúria;
- Creatinina;
- Sódio;
- Potássio;
- Cálcio.

2.1.2. Sangue:

- Glicemia de jejum e 2h pós sobrecarga;
- Colesterol total;
- Triglicérides;
- HDL colesterol;
- LDL colesterol;
- Creatinina;
- Gama GT;
- AST;
- ALT;
- Ácido úrico;
- Sódio;
- Potássio;
- Hb A1C;
- Proteína C reativa (ultra sensível);
- TSH;
- T4 livre (realizado para os participantes com TSH alterado);
- Insulina em jejum e 2h pós sobrecarga;
- Sorologia para Chagas.
- Triglicérides pós-sobrecarga (realizado para participantes diabéticos que recebem sobrecarga alimentar)

2.2. Exame realizado localmente:

Hemograma

3. Metodologias, reagentes e equipamentos utilizados no exames realizados no laboratório central - SP.

Glicose: Hexoquinase (enzimático). Reagente Siemens código 99301540. Realizado no equipamento ADVIA 1200®.

Colesterol total: colesterol oxidase (enzimático colorimétrico). Reagente Siemens código 99301390. Realizado no equipamento ADVIA 1200®.

Triglicérides: Glicerol fosfato peroxidase segundo Trinder (enzimático colorimétrico). Reagente Siemens código 99301385. Realizado no equipamento ADVIA 1200®.

HDL colesterol: Enzimático colorimétrico homogêneo sem precipitação. Reagente Siemens código 99335204. Realizado no equipamento ADVIA 1200®.

LDL colesterol: Cálculo de Friedewald.

Obs: O LDL colesterol será obtido pelo cálculo de Friedewald quando o triglicérides for menor que 400mg/dL, caso contrário será dosado o LDL colesterol direto.

LDL colesterol direto: Enzimático colorimétrico homogêneo sem precipitação. Reagente Siemens código 99335105. Realizado no equipamento ADVIA 1200®.

Creatinina: Jaffé sem desproteinização (enzimático colorimétrico). Reagente Siemens código 99362867. Realizado no equipamento ADVIA 1200®.

Gama GT: Szasz Persijn (cinético colorimétrico). Reagente Siemens código 99301380. Realizado no equipamento ADVIA 1200®.

AST: IFCC modificado (enzimático). Reagente Siemens código 99362869. Realizado no equipamento ADVIA 1200®.

ALT: IFCC modificado (enzimático). Reagente Siemens código 99363766. Realizado no equipamento ADVIA 1200®.

Ácido úrico: Uricase/PAP (enzimático colorimétrico). Reagente Siemens código 99362882, realizado no equipamento ADVIA 1200®.

Microalbuminúria: Imunoquímico por nefelometria. Reagente Dade Boering código OSAL15. Realizado no equipamento nefelômetro BN II®.

Sódio e potássio: Potenciometria com eletrodo íon seletivo. Reagente Siemens código 99302591. Realizado no equipamento ADVIA 1200®.

Cálcio: -cresolftaleína(colorimétrico). Reagente Siemens código 9301361.Realizado no equipamento ADVIA 1200®.

HbA1C: Cromatografia de Alta Pressão (HPLC). Reagente Bio Rad código 220.0101. Realizado no Variant®.

Proteína C reativa Ultra sensível: Imunoquímico por nefelometria. Reagente Dade Boering código OQIY13. Realizado no equipamento nefelômetro BN II®.

TSH:Imunoenzimático com pérolas. Reagente Siemens código L2KTS2. Realizado no equipamento Centaur®.

Insulina: Imunoenzimático com pérolas. Reagente Siemens código L2KIN2. Realizado no equipamento Centaur®.

Sorologia para Chagas: ELISA com fase sólida em Microplaca, reagente WIENER - Código 1293254 (CHAGATEST).

3.1. Metodologias, reagentes e equipamentos utilizados para a realização do hemograma nos centros locais:

Centro BA: Equipamento: MAXM® – Beckman Coulter

Centro ES: : MAXM® – Beckman Coulter

Centro MG:

Centro RJ: ALFA T 1800i® - Symex

Centro RS:

Centro SP: Equipamento CellDyn 3700®Abbott, com reagentes marca hemogram®.

5. Extração de DNA:

EXTRAÇÃO DE DNA À PARTIR DE SANGUE TOTAL

(Nuucleic Acids Research - Volume 16 - Number 3 - 1988 1215)

- ✓ **Material:**8ml de sangue periférico coletado em tubo contendo EDTA ou citrato (tubo de tampa roxa ou azul); no caso do plasma ter sido utilizado para armazenamento, o volume retirado de plasma deve ser substituído por solução fisiológica.
- ✓ **Hemólise:** Transferir o material reservado para a extração de DMA para um tubo de falcom de 50ml, adicionar tampão A (1x) até 20ml, agitar bem utilizando Vortex; manter a 4°C (geladeira) durante 10minutos e em seguida centrifugar a 4°C por 10minutos a 3000rpm.

- ✓ **Lavagem:** Desprezar o sobrenadante, adicionar 20ml de tampão A, ressuspender o sedimento leucocitário através de agitação utilizando o vortex – até os leucócitos ficarem bem soltos, deixar a 4°C (geladeira) durante 10 minutos e em seguida centrifugar a 4°C por 10 minutos a 3000rpm.
- ✓ **Lise:** Desprezar o sobrenadante, retirar o excesso de sangue, ressuspender o sedimento leucocitário em: 3ml de tampão B, 200µl de SDS 10% e 500µl de tampão C com proteinase K (2µl de proteinase K 20mg/ml diluída em 5ml de tampão C → este volume é suficiente apenas para 10 amostras, se estivermos trabalhando com um número maior de amostras, fazer o cálculo proporcional); manter a 37°C (estufa) por aproximadamente 12 a 18 horas.

✓ **Precipitação** este procedimento deve ser realizado com o material mantido em gelo seco

1. Adicionar 1ml de solução D (NaCl 6M), misturar vigorosamente durante 1 minuto utilizando o Vortex (é muito importante agitar durante 1 minuto), centrifugar a 4°C por 20 minutos a 3000rpm e transferir o sobrenadante para tubo de falcon de 15ml.
 2. Adicionar 1 volume de etanol 100% (mantido a -20°C), com o auxílio de uma ponteira de micropipeta amarela "pescar" o DNA precipitado e transferir para tubo de 1,5ml que já deve conter 1ml de etanol 70% (mantido a -20°C).
 3. Centrifugar a 4°C por 15 minutos a 13500rpm, Desprezar o sobrenadante e deixar secar bem o tubo a temperatura ambiente (ideal de um dia para outro).
 4. Ressuspender o sedimento (DNA) em 1ml de TE 1X (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)*.
- *O volume de TE usado vai depender do tamanho do sedimento (DNA).
5. Transferir 900 µL do DNA ressuspendido para um criotubo previamente identificado com a etiqueta de código de barras para criotubos; este material será armazenado localmente(Freezer -80°C).

6. Transferir 100 μL do DNA ressuspensionado para um criotubo previamente identificado com a etiqueta de código de barras para criotubos; este material deve ser enviado para SP para realização do controle de qualidade do DNA extraído.

✓ **Dosagem do DNA obtido:** após completa dissolução, diluir o DNA 50x (em TE 1X) e ler a densidade óptica a 260nm. (este procedimento será realizado em SP na aliquota de DNA enviada para controle de qualidade).

Exemplo: 20 μL DNA + 980 μL TE 1X, após leitura a 260nm = 0.300 X 50 (=diluição de 50X) X 50 (fator do DNA) = 750ng/ μL .

Acerto da concentração para PCR = acertar a concentração para 100ng/ μL .

5.1.SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO DE DNA (fornecidas por SP):

TAMPÃO A

10X Buffer A

1,44M NH_4Cl (cloreto de amônio – ammonium chloride ☒ PM = 53,49)

0,01M NH_4HCO_3 (bicarbonato de amônio – ammonium bicarbonate ☒ PM = 79,06)

NH_3 = amônia (ammonia)

NH_4 = amônio (ammonium)

- Pesar **154,0512g** de NH_4Cl
- Pesar **1,5812g** de NH_4CO_3
- H_2O tipo I ("Milli-Q") quantidade suficiente para (qsp) **2l**

1X Buffer A

0,144M NH_4Cl (cloreto de amônia)

0,001M NH_4CO_3 (bicarbonato de amônia)

- A **100ml do tampão A 10X** (“Buffer A”) adicionar **900ml de H₂O tipo I (“Milli-Q”)** – **diluição feita em cada CI**

TAMPÃO B

- 10mM (0,010M) Tris pH 8.0
- 400mM (0,400M) NaCl
- 2mM (0,002M) EDTA pH 8.0
- Pipetar **10ml** de um Tris 1M pH 8.0
- Pesar **23,3772g** de NaCl
- Pipetar **4ml** de um EDTA 0,5M pH 8.0
- H₂O tipo I (“Milli-Q”) qsp **1l**

TAMPÃO C – sem proteinase K

- 50µl de um SDS 10%
- 2µl de um EDTA 0,5M pH 8.0
- 488ml de H₂O tipo I (“Milli-Q”)

Proteinase K : 5mL de Tampão C: 2µL de Proteinase K 20mg/ml- preparado localmente

TAMPÃO D

- NaCl 6M
- Pesar 175,329g de NaCl
- Adicionar 500ml de H₂O tipo I (“Milli-Q”)
- $M = n/v$, onde $n = m/PM$

O DNA extraído é armazenado localmente em criotubo; uma alíquota de 100µl deve ser enviada para São Paulo para realização do Controle de Qualidade da extração.

Normas de Segurança e biosegurança:

Em todas as etapas em que envolvem manuseio de amostras biológicas são utilizadas normas de segurança e biosegurança conforme legislação vigente. (**NR 32** – Segurança e Saúde no Trabalho em serviços de Saúde - **Portaria MTE nº 485**, de 11 de Novembro de 2006;

Centro de Vigilância Sanitária – **Portaria CVS 01** de 18 de janeiro de 2000; Resolução da Diretoria Colegiada - **RDC 283** de 12 de julho de 2001 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Controle de qualidade dos exames realizados:

O controle de qualidade é feito pela duplicação de um tubo de coleta que gera a duplicação de um criotubo de alíquota de exames(ou duplicação do tubo EDTA do hemograma) em 10% dos participantes.

Processamento das amostras para exames em São Paulo:

As amostras são conferidas, seu recebimento é indicado no SISTEMA;
São então organizadas de acordo com os exames a serem realizados e encaminhadas ao setor técnico para a realização dos exames;

Os Setores técnicos iniciam as amostras; realizam os exames e liberam os resultados no SISTEMA APOLO;

Os resultados são acessados através de senha pessoal no site:
www.hu.usp.br/resultadoelsa.

Utilização do “Sistema de exames” de SP:

✓ **Informar a coleta basal:**

– Selecione - Arquivos - Tubos – Coleta; preencha os seguintes campos obrigatórios:

- Data;

- Técnico (responsável pela coleta);
- Código ELSA (ID do participante);
- Nome do participante (caso esta informação não esteja disponível repetir neste campo o ID do participante);
- **Os dados, data de nascimento e sexo não são obrigatórios.**
- Hora do início da coleta;

Ler o código de barras dos tubos coletados (inclusive o código da etiqueta utilizada na identificação da urina) – ao ler código de um tubo, o sistema passa automaticamente para o próximo tubo coletado obedecendo a sequência estabelecida para a coleta de sangue, caso algum tubo não tenha

sido coletado digitar o número zero no local do código da etiqueta do tubo (O Sistema “entende” que este tubo não existe);

- Hora do término da coleta.

OBS: Caso tenha ocorrido alguma intercorrência na coleta informá-la selecionando “intercorrências” – IMPORTANTE: caso não tenha sido administrada a sobrecarga informar nas “intercorrências” para que o Sistema anule a segunda coleta.

- “Clique” em finalizar para salvar as informações no Sistema.

Informar a segunda coleta (pós-sobrecarga):

- Selecione – Arquivos - Tubos – Coleta – coleta pós carga de glicose:

Digite o código do participante (ID ELSA) e selecione Buscar participante – O Sistema resgata as informações do participante;

Preencha os seguintes campos obrigatórios:

- Data;

- Técnico responsável pela coleta;
- Hora do início da coleta;

Leia o código de barras dos tubos coletados – ao ler código de um tubo, o sistema passa automaticamente para o próximo tubo coletado obedecendo a sequência estabelecida para a coleta de sangue, caso algum tubo não tenha sido coletado digitar o número zero no local do código da etiqueta do tubo (O Sistema “entende” que este tubo não foi coletado”);

- **Os dados data de nascimento e sexo não são obrigatórios.**
- Hora do término da coleta;
- “Clique” em finalizar para salvar as informações no Sistema.

Indicar as Alíquotas de exames:

- Selecione no Sistema: Arquivos - Tubos – Separação;
Busque os tubos coletados para o participante digitando o código do participante e “clique” em “Buscar participante”;
O Sistema mostrará na tela os tubos coletados;
Preencha os seguintes campos obrigatórios:
- Data;
- Técnico (responsável pela execução das alíquotas de exames);
Selecione o tubo utilizado para a realização de cada alíquota de exame;
Faça as alíquotas de exames e leia os códigos de barras dos criotubos para cada alíquota de exame realizada e o volume urinário do participante.
- “Clique” em finalizar para salvar as informações no Sistema.

Gerando o Arquivo para enviar para SP:

Na ocasião do envio das amostras de exames para SP, gerar o arquivo dos criotubos de exames seguindo os seguintes passos:

- Selecione “Arquivo Exportar Arquivo” - o Sistema mostrará os arquivos que estão disponíveis para exportação;
- Selecione um local no computador para salvar o arquivo gerado, “clcando” em “Procurar”;
- “Clique” em – “Gerar”

Ao finalizar a exportação o Sistema mostrará a seguinte mensagem: “Arquivo gerado com sucesso”.

Enviar o arquivo gerado para SP para o seguinte e-mail: elsa.laboratorio@gmail.com

Ao receber o arquivo, o responsável pelos exames em SP, salva o arquivo enviado numa pasta do computador, para posteriormente importar o arquivo para o Sistema;

Importar o arquivo para gerar os exames (procedimento realizado apenas em SP):

- Selecione no Sistema – “Arquivo – importar arquivo”
- Selecione o arquivo a ser importado e ‘clique” em Importar;
- Ao finalizar a importação o sistema mostrará a seguinte mensagem: “Arquivo importado com sucesso”.

Gerar os exames no Sistema de exames do HU (Procedimento realizado apenas em SP):

Selecione gerar exames (SADT), o Sistema mostrará as seguintes opções:

- Hemograma
- Outros
- T4 livre

- Selecione outros; o Sistema abre uma janela para informar o número do criotubo;
- Faça a leitura dos códigos de barras dos criotubos, ao ler o código de barras do último criotubo, “Clique” em “gerar Exame”;

Ao finalizar o Sistema mostrará a seguinte informação: “Exames gerados com sucesso”;

Automaticamente são impressas as etiquetas para identificação dos tubos que serão utilizados nos equipamentos e as “Ordens de Serviço” do sistema APOLO (Sistema de exames do Hospital Universitário da USP);

Os tubos são etiquetados e as amostras biológicas já descongeladas são transferidas para estes tubos; para conferência dos criotubos e suas respectivas “Ordens de Serviço”, conferir o número do Tubo que aparece no campo “hipótese diagnóstica”, com o criotubo que está sendo transferido, no caso das alíquotas de urina, neste campo “hipótese diagnóstica”, além do número do criotubo esta registrado o volume da urina informado na tela de Separação – (Alíquotas de exames)

Gerar exames de T4 livre:

Sempre que algum resultado de TSH estiver fora dos valores de referência estabelecidos, o Setor técnico do laboratório do HU informa o responsável pelos exames do Projeto ELSA para que seja gerado um exame de T4 livre para este participante;

Para gerar o exame de T4 livre:

Selecione “gerar exames”, o Sistema mostrará as seguintes opções:

- Hemograma
- Outros
- T4 livre
- Selecione T4 livre; O Sistema abre uma janela solicitando o numero do criotubo;
- Digite o numero do criotubo cujo resultado de TSH foi alterado e “clique” em – “Buscar participante”;
- Após o Sistema buscar o participante “clique” em “Gerar exame”;

Ao finalizar o Sistema mostrará a seguinte informação: “Exames gerados com sucesso”;

Automaticamente são impressas as etiquetas para identificação do tubo que será utilizado no equipamento para a realização do exame e as “Ordens de Serviço” do sistema APOLO (Sistema de exames do Hospital Universitário da USP);

9.1: Utilização do Sistema de exames para gerar amostras de Controle de Qualidade:

O participante sorteado para coletar amostras de Controle de Qualidade tem 1 tubo duplicado e após a indicação dos tubos coletados normalmente (sem a amostra de CQ), deve-se seguir os seguintes procedimentos no Sistema de exames:

✓ **Indicar o tubo coletado para Controle de qualidade:**

Selecione no Sistema;

- Arquivo – Tubos - Controle de Qualidade;
Indique o participante, e “clique” em “Buscar Participante”;
- Selecione o tubo coletado para CQ e leia o código de barras do tubo da amostra de CQ;
- “Clique” em salvar.

✓ **Indicar a alíquota de exames para Controle de qualidade:**

Selecione no Sistema;

- Arquivo – Tubos - Separação;
- “Clique” em Controle de Qualidade;
- Digite o código do participante e “clique” em “buscar participante” (O Sistema busca o tubo indicado como controle de qualidade);

Preencha os seguintes campos obrigatórios:

- Data;
- Técnico (responsável pela execução das alíquotas de exames);

Faça as alíquotas de exames e leia os códigos de barras dos criotubos, para cada alíquota de exame realizada, no caso de alíquotas de urina, indique o volume urinário do participante.

- “Clique” em finalizar para salvar as informações no Sistema.

Procedimento Operacionais dos exames realizados em São Paulo:

❖ Procedimento para a realização do hemograma

Introdução:

O hemograma compreende a análise global e morfológica das três séries dos elementos figurados do sangue.

A contagem e avaliação das células serão realizadas por equipamentos automatizados.

Metodologias utilizadas em equipamento automatizado:

Impedância Elétrica: para contagem de leucócitos (WIC) e contagem e avaliação do volume das hemácias e das plaquetas

Citometria de Fluxo: para contagem de leucócitos (WOC) e análise de sub-populações dos leucócitos.

Colorimetria: para dosagem de hemoglobina.

Princípio dos testes:

Impedância Elétrica:

Esta metodologia é baseada nas alterações elétricas provocadas por uma partícula dispersa em um líquido condutor, quando ela passa através de uma abertura de dimensões conhecidas. Quando a partícula passa pela abertura, há uma mudança transitória na resistência, gerando um pulso elétrico. O número de pulsos gerados indica o número de partículas que atravessaram a abertura. A amplitude de cada pulso será proporcional ao volume da partícula, fornecendo o volume das hemácias (MCV) e plaquetas (MPV).

Citometria de Fluxo:

É utilizada para determinar a contagem total e diferencial de leucócitos.

Em um canal óptico, um fluxo da amostra a ser analisada é focado hidrodinamicamente através de um líquido (leucoprotetor), de forma a alinhar as células uma a uma enquanto elas passam por um feixe de laser focalizado. Conforme as células penetram a área de observação específica, elas dispersam a luz do laser em diferentes ângulos, produzindo informações sobre o tamanho da célula, estrutura interna, granulosidade e morfologia da superfície chamada tecnologia MAPSS (classificação da Dispersão polarizada em Múltiplos Ângulos). Os sinais ópticos gerados pela célula são detectados e convertidos a impulsos elétricos, os quais são então armazenados e analisados pelo computador. As informações de todas as quatro determinações (dos 4 ângulos diferentes) são utilizadas para diferenciar os leucócitos em cinco populações:

- *Neutrófilos,*
- *Linfócitos,*
- *Monócitos,*
- *Eosinófilos,*
- *Basófilos*

Os dados são apresentados em forma de gráfico, com um gráfico de dispersão.

a contagem óptica interage com WIC para conduzir o valor final relatado para contagem dos leucócitos. Ocorre uma comparação dos dois resultados para verificar se há uma diferença entre eles. Um algoritmo da análise dos dados avalia automaticamente cada determinação e seleciona o resultado apropriado a ser relatado, dependendo do tipo de interferência.

Colorimetria:

A amostra é diluída com o Diluente e o reagente Lisante para WIC/HGB. Esta diluição é usada para a contagem de WIC e determinação de hemoglobina. O reagente lisante é livre de cianeto. este reagente converte a hemoglobina a um complexo de hemoglobíndroxilamina. Um diodo emissor de luz, filtrado com um comprimento de onda a 540 nm é a fonte de luz. Um fotodetector determina a luz transmitida.

Amostra:

Sangue total colhido em tubo EDTA com volume mínimo de 1mL.

devem ser rejeitadas amostras coaguladas, fibrinadas, com mais de quatro horas sem refrigeração.

Estabilidade da amostra:

Temperatura ambiente: até 12 horas

Refrigerada: 24 horas entre 2 - 8°C.

Controles de qualidade – no equipamento automatizado:

Controles comerciais:

Em três níveis, com valores baixos, normais e altos. Permite monitorar os vários parâmetros de acordo com intervalos preconizados na bula. Frequência: diária.

Sempre que o resultado de algum parâmetro estiver fora dos limites aceitáveis, o controle deve ser reprocessado, persistindo um parâmetro fora dos limites em dois níveis, o equipamento deve ser recalibrado.

Controle de qualidade interno:

Amostra frescas são passadas para controle interno individual do equipamento e para avaliação da Relação (R) entre equipamentos sempre que mais de um equipamento for utilizado (exemplo; equipamento principal/ equipamento back-up) através da avaliação do Coeficiente de Variação (C.V.) usando as médias dos parâmetros RBC, WBC, Hb, Ht, VCM, PLT onde:

Relação – faixa aceitável:

0,95 – 1,05 para WBC, RBC, Hb, Ht e VCM

0,92 – 1,08 para PLT

as amostras devem ser passadas no mínimo 1 vez no módulo aberto e 1 vez no módulo fechado por período (manhã e tarde).

Controle de qualidade externo:

O laboratório deve participar de um Programa Controle de Qualidade Externo que avalie as análises de contagem global e morfológicas, com periodicidade mensal.

Cálculos:

Realizados pelo equipamento:

O *HCT* (hematócrito) é a proporção dos glóbulos vermelhos para o plasma e é expresso como uma porcentagem do volume de sangue total. O *HCT* é calculado utilizando a contagem de eritrócitos (RBC) e o VCM (volume corpuscular médio), do seguinte modo:

$$HCT = (RBC \times VCM) / 10$$

A *MCH* (Hemoglobina Corpuscular Média) é a quantidade de hemoglobina contida no glóbulo vermelho, expressa em picogramas. A *MCH* é calculada a partir do RBC e HGB (hemoglobina) como segue: $MCH = (HGB / RBC) \times 10$

A *MCHC* (Concentração Corpuscular Média) é a proporção do peso da hemoglobina para o volume da média de glóbulos vermelhos expressa em percentual. É calculada a partir da HGB (hemoglobina) e do HCT (hematócrito).do seguinte modo:

$$MCHC = (HGB/HCT) \times 100$$

O RDW (Extensão de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos) é uma medida da heterogeneidade da população RBC. É derivada do histograma de RBC, utilizando a extensão da distribuição de RBC a 50% do pico de altura.

Avaliação de resultados:

Sempre que os alertas citados a seguir estiverem presentes deve ser realizada a análise da lâmina.

➤ Alerta de leucócitos:

DIFF: alerta morfológico gerado quando o gráfico é diferente de um padrão já estabelecido e é gerado se:

- a soma da contagem de neutrófilos e eosinófilos for menor que 400 células
- a posição entre as populações de linfócitos e monócitos diminua no eixo 0 do gráfico.
- o ângulo de separação entre a população de eosinófilo e neutrófilo no gráfico ortogonal não atende aos padrões estabelecidos para a geração do mesmo.

IG: determinado pela combinação de tamanho e densidade da população de neutrófilos no gráfico 0 x 10 e é gerado se:

- a população de neutrófilos estiver deformada.
- a população de eosinófilos for logaritmicamente retirada do espaço reservado para a população de neutrófilos.
- granulócitos imaturos se dirigem abaixo da população de neutrófilos com aumento de CV da população.

BAND: é gerado se:

- a contagem absoluta de neutrófilos for maior que 8.500
- a população de neutrófilos for maior que 85%

- estiverem presentes células estranhas no espaço reservado para a população de neutrófilos, causando aumento de CV deste espaço. a população de eosinófilos é algoritmicamente removida do espaço reservado para a população de neutrófilos.

VAR LYM: determinado pela combinação de tamanho e densidade da população de linfócitos no gráfico 0x10. Se o formato da população de linfócitos com a posição reservada para a população dos linfócitos, ou a separação dos espaços reservados para a população dos linfócitos e monócitos não estiver dentro dos padrões estabelecidos para a mesma, ocorrerá esse alerta.

BLAST: quando a população de monócitos for maior que 20%, do total de WBC contados, o tamanho da população xcede os limites pré-determinados no gráfico 0x10

- um número suficiente de células for identificado nas regras pré-definidas no gráfico de 90x0
- presença de blastos a serem identificados em lâmina.

WBC: é determinado no aumento do número de células fragmentadas que ocorre na região abaixo da população dos linfócitos no gráfico 0x10. Se esse excede o total das células brancas este alerta será gerado.

WIC (leitura de leucócitos pela impedância): Existe uma diferença clinicamente significativa entre os valores WIC e WOC, portanto o algoritmo selecionou a contagem WIC como o WBC mais exato.

WOC (leitura de leucócitos pela óptica): Existe uma diferença clinicamente significativa entre os valores WIC e WOC, portanto o algoritmo selecionou a contagem WOC como o WBC mais exato.

NWBC (não é glóbulo branco): exibido próximo ao resultado de monócitos. Pode estar presente na região limiar dos WBC: níveis baixos de eritroblastos, hemácias não lisadas, acúmulo de plaquetas ou plaquetas gigantes.

FWBC (glóbulos brancos frágeis): exibido próximo ao resultado % de monócitos. Não é necessário corrigir a contagem de glóbulos brancos.

NRBC (glóbulos vermelhos nucleares): exibido próximo a % de monócitos. há suspeita de presença de eritroblastos.

- Alerta das hemácias:

- *NRBC*: é determinado pelo número de células ou células fragmentadas que se acomodam na região pré-definida abaixo da população de linfócitos no gráfico 0x10. Se a população destas células for maior que 2% do total da contagem de leucócitos, este alerta será

gerado. É importante lembrar que não há necessidade de correção dos leucócitos pois este alerta pertence às hemácias.

RBC Morph: é determinado por uma análise dos valores de RDW, MCV, MCH, MCHC caso estejam fora da faixa pré-definida para os mesmos.

RBC/HGB: é determinado por uma análise de dados de RBC e HGB de cada amostra, se a relação destes parâmetros não estiverem de acordo com o critério estabelecido pelo fabricante, o alerta é gerado. Quando este ocorrer a amostra deve ser repassada.

- Alerta de plaquetas:
Sempre que o valor das plaquetas for inferior a 130.000 /mm³

Prováveis causas de erro

- Amostras com volume reduzido (erros devido ao excesso de anticoagulante).
- Amostras não homogeneizadas adequadamente.
- Linfócitos atípicos x monócitos: linfócitos atípicos de tamanho idêntico aos monócitos são confundidos devido à dispersão da luz. Assim obtém-se falsa monocitose. Amostras com monócitos $\geq 13\%$ e alarme VARL são separadas para microscopia.
- Alarmes falsos de IG e BANDS são observados em amostras após aproximadamente 4 horas de coleta sem refrigeração.
- Presença de hemácias em rouleaux: devido à sua disposição, o reagente não consegue lisar todas as hemácias e estas são contadas como leucócitos.
- Eritroblastos podem ser contados como leucócitos por serem nucleados.
- Policitemias: devido ao número de eritrócitos muito aumentado, hemácias são contadas como leucócitos.

- Microcitose: hemácias com VCM muito baixo podem ser contadas como plaquetas.
- Hemólise e lipemia severa: ocorre interferência na leitura de hemoglobina.
- Leucócitos fragmentados: podem ser contados como plaquetas.
- Microcoágulos: podem ser causas de falsos decréscimos nas três séries: leucocitária, eritrocitária e plaquetária

❖ Procedimento para dosagem de ácido úrico - ELSA

Metodologia utilizada:

Método enzimático colorimétrico (Uricase/PAP) realizado no equipamento automatizado ADVIA1200 da Bayer®.

Princípio do teste:

O ácido úrico é convertido pela uricase a alantoína e peróxido de hidrogênio. Um complexo colorido é formado com o peróxido de hidrogênio, 4-aminofenazona e [N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina] sob a ação catalítica da peroxidase. A concentração de ácido úrico na amostra é diretamente proporcional à intensidade da cor do complexo formado e determinada pela medida da absorbância em 545nm.

Intervalo Analítico: Soro: 0 a 20 mg/dL

Amostra:

Soro

Calibração: A calibração do teste é realizada quando necessário, de acordo com a análise dos controles, quando houver substituição de componentes ópticos ou hidráulicos no equipamento ou mudança de lote do reagente.

Controle de Qualidade:

Controle de qualidade interno:

Soros controles comerciais em dois níveis (normal e alto), que devem ser passados diariamente; e quando há mudança de lote do reagente, quando houver manutenção ou limpeza do sistema.

Sempre que os resultados do controle de qualidade interno estiverem fora da faixa aceitável, deve ser re-testado, caso o problema persista o teste deve ser re-calibrado, persistindo o problema deve-se trocar o reagente e re-calibrar o teste.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital universitário - USP.

Avaliação de resultados:

Os resultados de soro dentro dos valores estabelecidos são liberados automaticamente.

Resultados acima ou abaixo dos flags estabelecidos para o analito são repetidos

Automaticamente, e liberados.

Prováveis causas de erro:

Presença de fibrina, volume inadequado de amostra, instabilidade do gel separador, contaminação de reativos.

Interferentes:

Hemólise: níveis de hemoglobina superiores a 5 g/L diminuem a concentração de ácido úrico de forma significativa.

Icterícia: níveis de bilirrubina superiores a 5 mg/dL diminuem a concentração de ácido úrico de forma significativa.

Lipemia: sem interferência significativa.

Medicamentos: ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, furosemida, alguns agentesantineoplásicos, paracetamol, dentre outros, podem interferir no resultado.

Valores de Referência:

Soro:

Homens: 3,5 a 7,5 mg/dL

Mulheres: 2,5 a 6,0 mg/dL

❖ Procedimento Alanina Transaminase - ELSA

Metodologia utilizada:

Método enzimático (IFCC modificado) realizado no equipamento automatizado ADVIA[®] 1200 da Siemens

Princípio do teste:

A ALT catalisa a reação entre L-alanina e α -cetoglutarato. O piruvato formado é reduzido por NADH numa reação catalisada pela lactato desidrogenase para formar L-lactato e NAD⁺. A taxa de oxidação do NADH é diretamente proporcional à atividade catalítica da ALT e sua absorbância medida a 340 nm.

Intervalo Analítico: 0 a 1100 U/L.

Amostra:

Soro

Calibração: A calibração do teste é realizada quando necessário, de acordo com a análise dos controles, quando houver substituição de componentes ópticos ou hidráulicos no equipamento ou na mudança de lote do reagente.

Controle de Qualidade:**Controle de qualidade interno:**

Soros controles comerciais em dois níveis (normal e alto), que devem ser passados diariamente; e quando há mudança de lote do reagente, quando houver manutenção ou limpeza do sistema.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Avaliação de resultados:

Os resultados de soro dentro dos valores estabelecidos são liberados automaticamente.

Resultados acima ou abaixo dos flags estabelecidos para o analito são repetidos

Automaticamente, e liberados.

Prováveis causas de erro:

Presença de fibrina, volume inadequado de amostra, instabilidade do gel separador, reativos contaminados

Interferentes:

Hemólise: deve ser evitada pois qualquer interferência por hemoglobina aumenta atividade da ALT de forma significativa.

Icterícia: sem interferência significativa.

Lipemia: sem interferência significativa

Medicamentos: captopril, aminoglicosídeos, ciclosporina, interleucina 2, etambutol, levodopa, interferon, ácido ascórbico, benzodiazepínicos,

clortalidona, dipirona, fenitoína, fenobarbital e paracetamol, dentre outros, podem interferir nos resultados.

Valores de Referência:

Homens: 9 a 43 U/L

Mulheres: 9 a 36 U/L

❖ **Procedimento Aspartato Transaminase - ELSA**

Metodologia utilizada:

Método enzimático (IFCC modificado) realizado no equipamento automatizado ADVIA1200 da Siemens.

Princípio do teste:

A AST catalisa a reação entre L-aspartato e α -cetoglutarato. O piruvato formado é reduzido por NADH numa reação catalisada pela lactato desidrogenase para formar L-lactato e NAD⁺. A taxa de oxidação do NADH é diretamente proporcional à atividade catalítica da AST e a absorbância medida a 340 nm.

Intervalo Analítico: 0 a 1000 U/L.

Amostra:

Soro

Calibração: A calibração do teste é realizada quando necessário, de acordo com a análise dos controles, quando houver substituição de componentes ópticos ou hidráulicos no equipamento ou na mudança de lote do reagente.

Controle de Qualidade:

Controle de qualidade interno:

Soros controles comerciais em dois níveis (normal e alto), que devem ser passados diariamente; e quando há mudança de lote do reagente, quando houver manutenção ou limpeza do sistema.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Avaliação de resultados:

Os resultados de soro dentro dos valores estabelecidos são liberados automaticamente.

Resultados acima ou abaixo dos flags estabelecidos para o analito são repetidos

Automaticamente, e liberados.

Prováveis causas de erro:

Presença de fibrina, volume inadequado de amostra, instabilidade do gel separador, reativos contaminados

Interferentes:

Hemólise: deve ser evitada; a presença de hemoglobina na amostra altera a atividade da AST.

Icterícia: sem interferência significativa

Lipemia: sem interferência significativa

Medicamentos: captopril, ranitidina, ciclosporina, etambutol, omeprazole, interferon, ácido ascórbico, dipirona, fenobarbital e paracetamol, dentre outros, podem interferir nos resultados.

Valores de Referência:

Homens: 10 a 35 U/L

Mulheres: 10 a 31 U/L

❖ Procedimento Colesterol total e Frações - ELSA

Metodologia utilizada:

Método enzimático colorimétrico (colesterol oxidase) realizado no equipamento automatizado ADVIA[®] 1200 da Siemens[®].

As frações do colesterol ligado às lipoproteínas de baixa densidade (LDL = low density lipoproteins) e muito baixa densidade (VLDL = very low density lipoproteins) são obtidas pelo cálculo de de Friedewald.

Princípio do teste:

A colesterol esterase hidrolisa os ésteres de colesterol dando origem a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol é convertido a colesterol-3-ona pela colesterol oxidase (CHOD) na presença de oxigênio para formar peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase, o peróxido formado efetua o acoplamento oxidativo entre fenol e 4-aminoantipirina, dando origem a um complexo

colorido cuja intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra, determinada medindo-se a absorbância a 505 nm.

Intervalo Analítico: 0 a 675 mg/dL.

Amostra:

Soro

Calibração: A calibração do teste é realizada quando necessário, de acordo com a análise dos controles, quando houver substituição de componentes ópticos ou hidráulicos no equipamento ou na mudança de lote do reagente.

Controle de Qualidade:**Controle de qualidade interno:**

Soros controles comerciais em dois níveis (normal e alto), que devem ser passados diariamente; e quando há mudança de lote do reagente, quando houver manutenção ou limpeza do sistema.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Avaliação de resultados:

Os resultados de soro dentro dos valores estabelecidos são liberados automaticamente.

Resultados acima ou abaixo dos flags estabelecidos para o analito são repetidos automaticamente, e liberados.

Cálculos:

Cálculo de Friedewald: $LDL = COL\ total - HDL - VLDL$

$VLDL = TG/5$

Prováveis causas de erro:

Presença de fibrina, volume inadequado de amostra, instabilidade do gel separador, reativos contaminados.

Interferentes:

Hemólise: sem interferência significativa.

Icterícia: níveis de bilirrubina acima de 10 mg/dL diminuem a concentração aparente de colesterol de forma significativa.

Lipemia: sem interferência significativa

Medicamentos: metildopa, ácido ascórbico, ácido acetilsalicílico, dipirona, catecolaminas, ciclosporina, corticosteróides glicogênicos e lovastatina, dentre outros, podem interferir nos resultados.

Valores de Referência:

Colesterol: Adulto: Desejáveis - < 200 mg/dL

Limítrofe: 200 – 239 mg/dL

Elevado: > 240 mg/dL

LDL-colesterol*: Desejáveis para pacientes de alto risco: < 100 mg/dL

Desejáveis para pacientes de médio risco: <130 mg/dL

Desejáveis para pacientes baixo risco: < 160 mg/dL

* Valores desejáveis para controle de pacientes segundo Colégio Americano de Patologistas.

❖ **Procedimento Creatinina - ELSA**

Metodologia utilizada:

Método enzimático colorimétrico (Jaffé sem desproteinização) realizado no equipamento automatizado ADVIA1200 da Siemens®.

Princípio do teste:

A creatinina reage com ácido pícrico em meio alcalino resultando um complexo colorido cuja taxa de formação é diretamente proporcional à concentração de creatinina na amostra. A absorvância é medida em 505 nm.

Intervalo Analítico:

Soro: 0 a 25 mg/dL

Urina: 17 a 160 mg/dL

Amostra:

Soro e urina de 12 horas noturnas

Calibração: A calibração do teste é realizada quando necessário, de acordo com a análise dos controles, quando houver substituição de componentes ópticos ou hidráulicos no equipamento ou na mudança de lote do reagente.

Controle de Qualidade:

Controle de qualidade interno:

Soros controles comerciais em dois níveis (normal e alto), que devem ser passados diariamente; e quando há mudança de lote do reagente, quando houver manutenção ou limpeza do sistema.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Avaliação de resultados:

Os resultados de soro dentro dos valores estabelecidos são liberados automaticamente.

Resultados acima ou abaixo dos flags estabelecidos para o analito são repetidos automaticamente, e liberados.

Prováveis causas de erro:

Soro: presença de fibrina, volume inadequado de amostra, instabilidade do gel separador, contaminação de reativos.

Urina: desenvolvimento bacteriano alterando a composição da amostra, volume inadequado de amostra, contaminação de reativos.

Interferentes:

Soro:

Hemólise: sem interferência significativa.

Icterícia: níveis de bilirrubina acima de 5 mg/dL diminuem a concentração aparente de creatinina de forma significativa.

Lipemia: níveis de triglicérides superiores a 250 mg/dL interferem com o teste.

Medicamentos: acetona, ácido ascórbico, lidocaína, levodopa, metildopa, dipirona, paracetamol, cefalosporina, cimetidina e hidantoína, dentre outros, podem interferir nos resultados.

Urina: captopril, corticosteróides, ácido ascórbico, levodopa, metildopa, cefalosporina, esteróides anabólicos e andrógenos, dentre outros, podem interferir nos resultados.

Valores de Referência:

Soro:

Adultos: 0,4 a 1,3 mg/dl

Urina:

Homens: 600 a 1800 mg/24h

Mulheres: 800 a 2000 mg/24h

Não estão estabelecidos os valores de referência para amostras de urina de 12 horas.

❖ Procedimento Gama GT- ELSA

Metodologia utilizada:

Método cinético colorimétrico (Szasz-Persijn) realizado no equipamento automatizado ADVIA1200 da da Siemens®.

Princípio do teste:

Na reação com substrato sintético (L-γ-glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida), a glicilglicina atua como aceptor de resíduo da gama-glutamyl e, pela ação da γ-glutamyltransferase (GGT), 5-amino-2-nitrobenzoato (ANB) é liberado. A taxa de liberação do ANB, de cor amarelada, é diretamente proporcional à atividade da Gama-GT na amostra e quantificada medindo o aumento da absorbância a 410 nm.

Intervalo Analítico: 0 a 1200 U/L

Amostra:

Soro:

Calibração: A calibração do teste é realizada quando necessário, de acordo com a análise dos controles, quando houver substituição de componentes ópticos ou hidráulicos no equipamento ou na mudança de lote do reagente.

Controle de Qualidade:

Controle de qualidade interno:

Soros controles comerciais em dois níveis (normal e alto), que devem ser passados diariamente; e quando há mudança de lote do reagente, quando houver manutenção ou limpeza do sistema.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Avaliação de resultados:

Os resultados de soro dentro dos valores estabelecidos são liberados automaticamente.

Resultados acima ou abaixo dos flags estabelecidos para o analito são repetidos automaticamente, e liberados.

Prováveis causas de erro:

Soro: presença de fibrina, volume inadequado de amostra, instabilidade do gel separador, contaminação de reativos.

Interferentes:

Hemólise: sem interferência significativa.

Icterícia: sem interferência significativa.

Lipemia: sem interferência significativa.

Medicamentos: captopril, cefalosporina, estrógenos, etanol, contraceptivos orais, fenitoína, fenobarbital, carbamazepina, estreptoquinase, ácido ascórbico, dentre outros, podem interferir nos resultados.

Valores de Referência:

Homens: 2 a 30 U/L

Mulheres: 1 a 24 U/L.

❖ **Procedimento para dosagem de Glicemia - ELSA**

Metodologia utilizada:

Método enzimático (hexoquinase), realizado em equipamento automatizado

Princípio do teste:

A glicose é fosforilada pela adenosina trifosfato (ATP) na presença de hexoquinase. A glicose-6-fosfato formada é oxidada na presença de glicose-6-fosfato desidrogenase, causando a redução de NAD para NADH, cuja absorbância é medida a 340 nm. A concentração de NADH formado é diretamente proporcional à concentração de glicose presente na amostra.

Amostra:

Plasma: de jejum e após 75g de glutol coletados em tubo Fluoreto

Controles:

Controle de qualidade interno:

Soros controles comerciais em dois níveis (normal e alto), que devem ser passados diariamente; e quando há mudança de lote do reagente, quando houver manutenção ou limpeza do sistema.

Sempre que os resultados do controle de qualidade interno estiverem fora da faixa aceitável, deve ser retestado, caso o problema persista o teste deve ser recalibrado, persistindo o problema deve-se trocar o reagente e recalibrar o teste.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Calibração:

A calibração do teste deve ser realizada sempre que necessário, de acordo com a análise dos controles, quando houver substituição de componentes ópticos ou hidráulicos no equipamento ou na mudança de lote do reagente.

Avaliação de resultados:

Os resultados acima de 250mg/dL e abaixo de 70 mg/dL devem ser repetidos para confirmação antes da sua liberação.

Interferentes:

Hemólise: sem interferência significativa

Icterícia: sem interferência significativa

Lipemia: sem interferência significativa

Medicamentos: bloqueadores β -adrenérgicos, ACTH, cafeína, calcitonina, tiazida, dopamina, corticosteróides, epinefrina, glugagon, morfina, carbonato de lítio, contraceptivos orais, fenotiazina, fenitoína, teofilina, captopril, ácido ascórbico, ácido acetil salicílico, paracetamol, dentre outros, podem interferir nos resultados.

❖ Procedimento hemoglobina Glicada HbA1c- ELSA**Metodologia utilizada:**

Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) de troca iônica realizado no equipamento automatizado D-10 da BIORAD®.

Princípio do teste:

O D-10 Dual Program baseia-se na separação cromatográfica dos analitos através da HPLC por troca iônica. As amostras são automaticamente diluídas no D-10 e injetadas na coluna analítica.

Em seguida é aplicado um gradiente programado de tampão de crescente força iônica, resultando na separação das hemoglobinas de acordo com suas respectivas interações iônicas com o material da coluna. As hemoglobinas separadas passam então pela célula de fluxo do fotômetro de filtros, onde se medem as alterações na absorvância a 415 nm.

O software do D-10 executa a redução dos dados brutos recolhidos de cada análise. É utilizada uma calibração de dois níveis para quantificar os valores da HbA2/F/A1c. Para cada amostra são gerados um relatório e um cromatograma. A área de A1c é calculada utilizando um algoritmo de Gauss exponencialmente modificado (EMG) que exclui as frações A1c lábil e carbamiladas.

Intervalo Analítico: 3.8% a 18.5% de HbA1c

Amostra:

Hemácias lavadas obtidas por coleta com EDTA.

Calibradores:

Calibradores nível 1 e nível 2 do kit de Hemoglobina A1c Program e Dual Program marca Bio-Rad®. Os calibradores contêm hemácias humanas hemolisadas liofilizadas preservadas com gentamicina, tobramicina e EDTA.

Preparo: reconstituir cada frasco com 7 mL do diluente de calibrador que acompanha o kit, homogeneizar delicadamente e aguardar de 5 a 10 minutos para a utilização.

Estabilidade: antes da reconstituição os reagentes são estáveis até data de validade fornecida pelo fabricante quando armazenados de 2 a 8°C. Após a reconstituição, os calibradores são estáveis por 7 dias, quando mantidos de 2 a 8°C.

Obs: Há uma diferenciação nos calibradores de cada programa:

- Programa HbA1c: padronização para HbA1c
- Dual program: padronização para HbA2, HbF e HbA1c

Desta forma, em ambos os programas é possível quantificar HbA1c mas apenas no “Dual program” as hemoglobinas A2 e F são passíveis de quantificação. É essa a característica que diferencia os dois programas.

Diluente de calibradores: Contém água deionizada com < 0,05% de azida sódica como agente de preservação.

Estabilidade: estocado entre 2 a 8 °C o reagente é estável até a data de validade fornecida pelo fabricante.

Preparo: Pronto para uso.

Primer: Hemácias humanas hemolisadas liofilizadas e preservadas com gentamicina, tobramicina e EDTA.

Estabilidade: antes da reconstituição, o reagente é estável até a data de validade fornecida pelo fabricante quando armazenado de 2 a 8°C.

Preparo: reconstituir com 1,0 mL de H₂O deionizada. Homogeneizar delicadamente e aguardar de 10 a 15 minutos de 15 a 30°C. A estabilidade após a reconstituição é de 1 dia quando armazenado de 2 a 8°C.

Controles:

Controles Lyphochek Diabetes Control níveis 1 e 2, marca Bio-Rad®.

Estabilidade: estocados entre 2 e 8° C, os controles são estáveis até a data de validade fornecida pelo fabricante. Uma vez reconstituídos são estáveis por 7 dias estocados de 2 e 8° C.

Preparo: reconstituir cada frasco de controle com 0,5 mL de H₂O destilada ou deionizada. Homogeneizar e aguardar de 5 a 10 minutos.

O controle deve ser diluído 1:300 antes da análise. Pipetar 1,5 mL do diluente de calibrador ou wash/diluent solution e 5 µL do controle reconstituído. Homogeneizar.

Calibração:

A calibração do teste é realizada a cada troca de coluna analítica. Deve ser feita após a instalação do disquete do novo pack e após a passagem do primer.

Controle de Qualidade:**Controle de qualidade interno:**

Os controles são passados diariamente a cada início de período, quando há mudança de kit ou quando se julgar necessário.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Avaliação de resultados:

Os resultados de soro dentro dos valores estabelecidos são liberados automaticamente.

Resultados acima ou abaixo dos flags estabelecidos para o analito são repetidos e liberados.

Prováveis causas de erro:

Presença de microcoágulos e volume inadequado de amostra.

Interferentes:

HbF: sem interferência significativa até níveis de 10%

Icterícia: sem interferência significativa até níveis de 20 mg/dL de bilirrubinas

Lipemia: sem interferência significativa até níveis próximos a 5.680 mg/dL de Triglicérides.

Valores de Referência:

< 5,7% - Baixo risco de desenvolvimento de Diabetes

5,7 a 6,4% - Pré-diabetes

≥ 6,5 – Diabetes*

*Caso não existam sintomas claros de hiperglicemia o teste deve ser repetido para confirmação do diagnóstico.

❖ **Procedimento HDL Colesterol - ELSA**

Metodologia utilizada:

Método enzimático colorimétrico homogêneo sem precipitação realizado no equipamento automatizado ADVIA1200 da Siemens®.

Princípio do teste:

O teste para HDL direto baseia-se na adsorção de poliânions sintéticos à superfície das lipoproteínas. As LDLs, VLDLs e quilomícrons são consequentemente transformados numa forma resistente a detergentes, o mesmo não acontecendo com as HDLs. A ação combinada dos poliânions e do detergente solubiliza o colesterol das HDLs, mas não das LDLs, das VLDLs e dos quilomícrons. O colesterol solubilizado é oxidado por ação enzimática sequencial da colesterol esterase e colesterol oxidase. O peróxido de hidrogênio que é formado reage com N,N-bis-(4-sulfobutil)-m-toluidina (DSBmT) e 4-aminoantipirina na presença de peroxidase dando origem a um corante avermelhado cuja absorbância é medida a 596 e 694 nm (medida bicromática). A intensidade da cor do corante é diretamente proporcional à concentração de HDL-colesterol da amostra.

Intervalo Analítico: 0 a 200 mg/dL

Amostra:

Soro

Calibração: A calibração do teste é realizada quando necessário, de acordo com a análise dos controles, quando houver substituição de componentes ópticos ou hidráulicos no equipamento ou na mudança de lote do reagente.

Controle de Qualidade:

Controle de qualidade interno:

Soros controles comerciais em dois níveis (normal e alto), que devem ser passados diariamente; e quando há mudança de lote do reagente, quando houver manutenção ou limpeza do sistema.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Avaliação de resultados:

Os resultados de soro dentro dos valores estabelecidos são liberados automaticamente.

Resultados acima ou abaixo dos flags estabelecidos para o analito são repetidos automaticamente, e liberados.

Cálculos:

Cálculo de Friedewald: $LDL = COL\ total - HDL - VLDL$

$VLDL = TG/5$

Prováveis causas de erro:

Presença de fibrina, volume inadequado de amostra, instabilidade do gel separador, reativos contaminados.

Interferentes:

Hemólise: níveis de hemoglobina superiores a 7,5 g/L aumentam a concentração aparente de HDL de forma significativa.

Icterícia: níveis de bilirrubina acima de 20 mg/dL reduzem a concentração aparente de HDL de forma significativa.

Lipemia: níveis de triglicérides muito altos levam a resultados falsamente elevados de HDL.

Medicamentos: metildopa, propranolol, carbamazepina, cimetidina, etanol, lovastatina, fenobarbital, andrógenos e β -bloqueadores, dentre outros, podem interferir nos resultados.

Valores de Referência:

Valores desejáveis: $> 40\ mg/dL$

$> 45\ mg/dL$ para pacientes diabéticos

❖ Procedimento para dosagem de Microalbuminúria - ELSA

Metodologia utilizada:

Método nefelométrico realizado no equipamento automatizado Nefelômetro BNII da Dade Behring®.

Princípio do teste:

Numa reação imunoquímica com anticorpos específicos, as proteínas contidas na urina humana formam imunocomplexos que dispersam a luz incidente. A intensidade da luz dispersada depende da concentração de proteína na amostra. O valor para a amostra é obtido por comparação com um padrão de concentração conhecida.

Características do método:

A sensibilidade é definida de acordo com o limite inferior da curva de referência e depende, assim, da concentração do calibrador.

Amostra:

Urina de 12 horas noturnas

Calibradores e controles:

Calibradores:

N Proteína Padrão SL, marca Dade Behring®

Estabilidade: estocado entre 2 a 8 °C, o calibrador é estável até a data de validade fornecida pelo fabricante. Depois de aberto, é estável por 14 dias entre 2 e 8°C, desde que o frasco seja fechado hermeticamente após o uso.

- Preparo: o calibrador já está pronto para uso e não requer preparo.

Controles:

N/T Controle de Proteína LC, marca Dade Behring®

- Estabilidade: estocado entre 2 a 8 °C, o controle é estável até a data de validade fornecida pelo fabricante. Depois de ressuspendido, é estável por

14 dias entre 2 e 8 °C, desde que o frasco seja fechado hermeticamente após o uso.

- Preparo: controle N/T 1 frasco

água destilada..... 1 mL

Agitar, evitando a formação de bolhas, e esperar aproximadamente 30 minutos para utilizar.

Liquichek Urine Chemistry Control níveis 1 e 2 marca Bio Rad - Uso eventual

- Estabilidade: quando mantido no frasco lacrado e armazenado nas condições indicadas (2 a 8 °C), os controles são estáveis até a data indicada pelo fabricante.

Após a abertura, estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiológica que podem ocasionar redução da estabilidade.

- Preparo: Os controles para urina já vêm prontos para uso. Antes da utilização, homogeneizá-los invertendo os frascos ao menos 5 vezes. Manter sob refrigeração no frasco original.

Calibração:

A curva de referência é obtida por uma calibração de múltiplos pontos. As séries de diluição do calibrador são efetuadas automaticamente.

A calibração do teste é realizada quando necessário, de acordo com a análise dos controles, após o término da validade da curva de calibração ou quando for trocado o lote de reagente.

Controle de qualidade**Controle de Qualidade Interno:**

O controle “N/T Controle de Proteína LC” é passado a cada rotina ou quando há mudança de lote do reagente e analisado segundo o valor analítico fornecido nas bulas do respectivo controle. O intervalo de confiança corresponde ao valor teórico de $\pm 15\%$. Se o resultado estiver dentro da faixa ideal o controle é aceito e o aparelho liberado para uso. Se o valor estiver fora do “range” estabelecido, então se realiza a repetição do controle com outra alíquota e se continuar fora, realizar a calibração do teste.

Controle de Qualidade Externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Cálculos:

Microalbuminúria (μg)/min = concentração (mg/L) x volume (mL) / tempo (minutos)

Obs1: Quando o resultado for menor que o limite inferior da curva de referência este cálculo não é aplicado e o resultado é liberado da seguinte maneira:

Microalbuminúria < _____ mg/L VR: até 30 mg/L

Avaliação de resultados:

Diluições automáticas são feitas para valores acima da linearidade.

Prováveis causas de erro:

Desenvolvimento bacteriano alterando a composição da amostra, volume inadequado de amostra, reativo contaminado, turvação e partículas em suspensão nas amostras (necessário centrifugação prévia).

Interferentes:

Resíduos de detergentes.

Aplicações clínicas:

A albumina urinária é considerada o mais importante marcador na disfunção glomerular. A excreção ligeiramente elevada de albumina na urina tem particular importância no diagnóstico precoce da nefropatia diabética por indicar uma lesão potencialmente reversível. Níveis aumentados: glomerulonefrite, diabetes mellitus, pielonefrite, mieloma múltiplo, cistite, amiloidose, sarcoidose, rejeição ao transplante renal, exercício extremos.

Valores de Referência:

Para urina de 12 horas: Normal: < 20 µg/min

Microalbuminúria: 20 a 200 µg/min

Macroalbuminúria: > 200 µg/min

8.12. Procedimento proteína C Reativa - ELSA**Metodologia utilizada:**

Método imunoquímico realizado em equipamento automatizado nefelômetro BNII (Dade Behring).

Princípio do teste:

As partículas de látex de poliestireno revestidas de um anticorpo monoclonal contra a Proteína C Reativa (PCR) ficam aglutinadas ao misturar-se com amostras que contêm PCR. A intensidade da luz dispersa no nefelômetro depende da concentração de PCR da amostra, de forma que, por comparação com diluições de um padrão de concentração conhecida, é possível determinar a concentração de PCR da amostra.

Características do método:

Sensibilidade: definida de acordo com o limite inferior da curva de referência, dependendo da concentração do padrão utilizado.

Limite de detecção: de 0,175 mg/L de acordo com indicação do fabricante.

Amostra:

Soro

Calibradores:

Calibrador N Padrão Reumatológico SL, marca Dade Behring.

Produto pronto para uso.

Após aberto, é estável por 14 dias, quando armazenado entre 2 e 8°C.

Não congelar.

Controles:

Controle N/T Controle Reumatológico SL/1, marca Dade Behring.

Produto pronto para uso.

Após aberto, é estável por 14 dias, quando armazenado entre 2 e 8°C.

Não congelar.

Controle N/T Controle Reumatológico SL/2, marca Dade Behring.

Produto pronto para uso.

Após aberto, é estável por 14 dias, quando armazenado entre 2 e 8°C C.

Não congelar.

Após hidratação, é estável por 6 meses à -20°C armazenado em alíquotas.

Calibração: Realizar nova curva caso os controles estejam fora do respectivo valor de confiança ou quando for trocado algum lote de reagente.

Controle de Qualidade:**Controle de qualidade interno:**

O controle é passado a cada 24 horas e após a realização da curva de calibração.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Prováveis causas de erro:

Presença de turvação e partículas, fibrina, volume inadequado de amostra, instabilidade do gel separador no tubo de coleta, reagente contaminado.

Valores de Referência:

Classificação para avaliação do risco nas doenças cardiovasculares:

Risco PCR Ultra-Sensível

Baixo < 1,0 mg/L

Médio 1,0-3,0 mg/L

Alto > 3,0 mg/L

❖ Procedimento Potássio- ELSA**Metodologia utilizada:**

Método de potenciometria com eletrodo seletivo de íon (ISE) realizado no equipamento automatizado ADVIA1200 da Siemens®.

Princípio do teste:

A amostra é misturada com tampão ISE resultando deste modo em uma solução de pH e resistência iônica constantes. O potássio é medido potenciometricamente com auxílio de dois eletrodos: eletrodo de potássio e eletrodo de referência. As amostras são introduzidas através dos eletrodos e mudanças no potencial elétrico ocorrem. Essas diferenças de potencial são medidas contra o eletrodo de referência, obtendo-se a concentração de potássio da amostra.

Intervalo Analítico:

Soro: 1 a 10 mEq/L

Urina: 3 a 300 mEq/L

Amostra:

Soro e urina de 12 horas noturnas

Calibração: A calibração do teste é realizada quando necessário, de acordo com a análise dos controles, quando houver substituição de componentes ópticos ou hidráulicos no equipamento ou na mudança de lote do reagente.

Controle de Qualidade:**Controle de qualidade interno:**

Soros controles comerciais em dois níveis (normal e alto), que devem ser passados diariamente; e quando há mudança de lote do reagente, quando houver manutenção ou limpeza do sistema.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Avaliação de resultados:

Os resultados de soro dentro dos valores estabelecidos são liberados automaticamente.

Resultados acima ou abaixo dos flags estabelecidos para o analito são repetidos automaticamente, e liberados.

Prováveis causas de erro:

Soro: presença de fibrina, volume inadequado de amostra, instabilidade do gel separador, contaminação de reativos.

Urina: desenvolvimento bacteriano alterando a composição da amostra, volume inadequado de amostra, contaminação de reativos.

Interferentes:**Soro:**

Hemólise: deve ser evitada; qualquer interferência por hemoglobina aumenta a concentração do potássio de forma significativa.

Icterícia: sem interferência significativa.

Lipemia: sem interferência significativa.

Medicamentos: β -bloqueadores, digoxina agentes antineoplásicos, ciclosporina, epinefrina, lítio, histamina IV, corticóide, penicilina, tetraciclina, anfotericina, cisplatina, furosemida, dentre outros, podem interferir nos resultados.

Urina:

Medicamentos como anfotericina, corticosteróides, calcitonina, gentamicina, levodopa, penicilina, sulfatos e diuréticos, dentre outros, podem interferir nos resultados.

Valores de Referência:**Soro:**

adultos: 3,5 a 5,0 mEq/L

Urina: Não estabelecidos para amostras de 12 horas.

❖ Procedimento Sódio- ELSA**Metodologia utilizada:**

Método de potenciometria com eletrodo seletivo de íon (ISE) realizado no equipamento automatizado ADVIA1200 da Siemens®.

Princípio do teste:

A amostra é misturada com tampão ISE resultando deste modo em uma solução de pH e resistência iônica constantes. O potássio é medido potenciometricamente com auxílio de dois eletrodos: eletrodo de potássio e eletrodo de referência. As amostras são introduzidas através dos eletrodos e mudanças no potencial elétrico ocorrem. Essas diferenças de potencial são medidas contra o eletrodo de referência, obtendo-se a concentração de sódio da amostra.

Intervalo Analítico:

Soro: 100 a 200 mEq/L

Urina: 10 a 400 mEq/L

Amostra:

Soro e urina de 12 horas noturnas

Calibração: A calibração do teste é realizada quando necessário, de acordo com a análise dos controles, quando houver substituição de componentes ópticos ou hidráulicos no equipamento ou na mudança de lote do reagente.

Controle de Qualidade:**Controle de qualidade interno:**

Soros controles comerciais em dois níveis (normal e alto), que devem ser passados diariamente; e quando há mudança de lote do reagente, quando houver manutenção ou limpeza do sistema.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Avaliação de resultados:

Os resultados de soro dentro dos valores estabelecidos são liberados automaticamente.

Resultados acima ou abaixo dos flags estabelecidos para o analito são repetidos automaticamente, e liberados.

Prováveis causas de erro:

Soro: presença de fibrina, volume inadequado de amostra, instabilidade do gel separador, contaminação de reativos.

Urina: desenvolvimento bacteriano alterando a composição da amostra, volume inadequado de amostra, contaminação de reativos.

Interferentes:

Soro:

Hemólise: deve ser evitada; qualquer interferência por hemoglobina aumenta a concentração do sódio de forma significativa.

Icterícia: sem interferência significativa.

Lipemia: sem interferência significativa

Medicamentos: corticóides, estrógenos, guanetidina, metildopa, contraceptivos orais, fenilbutazona, bicarbonato de sódio, etanol, aminoglicosídeos, anfotericina B, captopril, carbamazepina, cisplatina, furosemida, manitol, tiazida, lítio, vincristina, dentre outros, podem interferir nos resultados.

Urina: medicamentos como cafeína, calcitonina, captopril, diuréticos, dopamina, progesterona, corticóides e epinefrina, dentre outros, podem interferir nos resultados.

Valores de Referência:

Soro:

adultos: 136 a 146 mEq/L

Urina: Não estabelecidos para amostras de 12 horas.

❖ Procedimento T4 livre - ELSA

Metodologia utilizada:

Método imuno-enzimático com pérolas realizado em equipamento automatizado Centaur Siemens®

Princípio do teste:

Amostra biológica, pérola recoberta de anti-T4 livre e reagente (T4 livre conjugado com fosfatase alcalina) são dispensados na cubeta de reação, e incubados por 60 minutos à 37°C com agitação contínua. Se houver presença de T4 livre na amostra, esta compete com a T4 livre marcada formando um complexo antígeno-anticorpo sobre a pérola recoberta. Após lavagem da pérola por ultra-centrifugação, o substrato é adicionado para uma nova incubação por 10 minutos à 37°C. A reação é medida através da emissão de fótons de luz, sendo o resultado obtido dado em contagens por segundo (cps). A concentração de T4 livre é determinada através de curva de calibração previamente armazenada.

O ensaio é padronizado de modo que o equilíbrio entre a fração livre e a fração ligada às proteínas (TBG, albumina) é mantido para que seja medida rigorosamente a fração livre. São utilizados agentes bloqueadores que impedem a ligação do T4 marcado (reagente) com as proteínas endógenas, porém mantendo as características do T4 nativo. Estes agentes também minimizam interferências nos resultados devido a presença de níveis alterados de albumina e ácidos graxos livres. A afinidade do T4 marcado a TBG é detectável, impedindo o deslocamento do T4 amostra da TBG. A afinidade do ácido é semelhante à afinidade da albumina ao T4, minimizando o deslocamento do T4 ligado às proteínas que se encontra ligado. Além disso, o ensaio é realizado em condições semelhantes às fisiológicas (pH, temperatura e força iônica).

Características do método:

Intervalo de Calibração: de 0,3 a 6,0 ng/dL (3,9 a 77,2 pmol/L) de acordo com a indicação do fabricante.

Sensibilidade Analítica: de 0,3 ng/dL de acordo com a indicação do fabricante.

Amostra:

Soro

Calibradores:

Ajustador T4 livre (baixo e alto),

Produto pronto para uso.

Armazenar entre 2-8°C.

Estável até a data de validade fornecida pelo fabricante.

Controles:

Controles comerciais (baixo, médio e alto).

Armazenar entre 2-8°C.

Calibração: Realizada a cada novo lote de reagentes, ou quando necessário.

Controle de Qualidade:

Controle de qualidade interno:

O controle é verificado a cada rotina.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Interferentes:

Resultados errôneos podem ser obtidos em amostras com concentrações de salicilato acima de 1g/L.

Resultados errôneos podem ser obtidos em amostras com concentrações de albumina acima de 50g/L.

Resultados errôneos podem ser obtidos em amostras com concentrações de eritrócitos acima de 384mg/dL.

Resultados errôneos podem ser obtidos em amostras com concentrações de bilirrubina acima de 200mg/L.

Resultados errôneos podem ser obtidos em amostras com concentrações de triglicerídeos acima de 3000mg/dL.

Resultados errôneos podem ser obtidos em amostras com presença de fibrina, bem como em pacientes com presença de anticorpos heterofílicos, e pacientes expostos a produtos ou soro de animais.

Valores de Referência:

0,89 a 1,76 ng/dL

❖ Procedimento TSH - ELSA

Metodologia utilizada:

Método imuno-enzimático com pérolas realizado em equipamento automatizado Centaur®.

Princípio do teste:

Amostra biológica, pérola e reagente (TSH conjugada com fosfatase alcalina) são misturadas na cubeta de reação, sendo incubada por 60 minutos à 37°C com agitação contínua. Se houver presença de TSH na amostra ocorre a formação de um complexo anticorpo-antígeno-anticorpo sobre a pérola revestida. Após lavagem da pérola por ultra-centrifugação, o substrato é adicionado para uma nova incubação por 10 minutos à 37°C. A reação é medida através da emissão de fótons de luz, sendo o resultado obtido dado em contagens por segundo (cps). A concentração de TSH é determinada por comparação com a curva de calibração previamente armazenada.

Características do método:

Intervalo de Calibração: até 75 μ IU/mL de acordo com a indicação do fabricante.

Sensibilidade Analítica: de 0,004 μ IU/mL de acordo com a indicação do fabricante.

Amostra:

Soro

Calibradores:

Ajustador TSH (baixo e alto).

Produto pronto para uso.

Armazenar entre 2-8°C.

Controles:

Controles CON6 (baixo, médio e alto).

Armazenar entre 2-8°C.

Calibração: Realizada a cada novo lote de reagentes, ou quando necessário.

Controle de Qualidade:

Controle de qualidade interno:

O controle é verificado a cada rotina.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Avaliação de resultados:

Amostras com resultado acima de 75,0 μ IU/mL são diluídas automaticamente pelo equipamento com diluente para TSH. A concentração obtida com a amostra diluída é automaticamente calculada pelo equipamento.

Interferentes:

Resultados errôneos podem ser obtidos em amostras com concentrações de eritrócitos acima de 30 mg/mL.

Resultados errôneos podem ser obtidos em amostras com concentrações de bilirrubina acima de 200 mg/L.

Resultados errôneos podem ser obtidos em amostras com concentrações de triglicerídeos acima de 5000 mg/dL.

Resultados errôneos podem ser obtidos em amostras com presença de fibrina, bem como em pacientes com presença de anticorpos heterofílicos, e pacientes expostos a produtos ou soro de animais.

Valores de Referência:

0,4 a 4,0 μ IU/mL.

❖ Procedimento Chagas - ELSA

Metodologia Utilizada:

Método imuno-enzimático com microplacas (ELISA) realizado por técnica manual.

3.2. Princípio do teste:

A amostra diluída é incubada nas cavidades da microplaca revestidas de antígenos purificados nas formas tripomastigota e epimastigota (método de 3a. geração). Se a amostra de soro apresentar anticorpos específicos formam-se complexo antígeno-anticorpo que ficam presos a fase sólida. O conjugado anti-IgG humana com peroxidase liga-se ao complexo formado, sendo a revelação feita pela adição concomitante dos substratos A (Peróxido de Hidrogênio) e B (TMB) com desenvolvimento de cor. A reação é bloqueada com ácido sulfúrico, sendo a intensidade da cor medida em espectrofotômetro (leitora de microplacas) com filtro de 450nm. O valor obtido é proporcional a quantidade de anticorpos anti-*T.cruzi* presentes na amostra.

Características do método:

Sensibilidade: de 99,5% de acordo com a indicação do fabricante.

Especificidade: de 100% de acordo com a indicação do fabricante.

Amostra:

Critérios para aceitação e rejeição de amostras inadequadas:

Soro: Amostras lipêmicas, ictericas e hemolisadas são aceitas sob condições.

Não devem ser utilizadas amostras inativadas pelo calor.

Calibradores e controles:

Calibração:

Não se aplica.

Controle de Qualidade Interno:

Realizado a cada rotina, segundo o procedimento descrito para análise de amostras.

Controle de Qualidade Externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Procedimento Técnico:

Preparo dos Reagentes:

Solução de Lavagem:

Diluir o conteúdo do frasco em água destilada na proporção de 1/5 (200mL tampão de lavagem concentrado + 800mL água destilada).

Análise de Amostra:

Deixar os componentes do “kit” de reagentes à temperatura ambiente por 30 minutos antes do início da reação

Diluir controles e amostras na microplaca (10mL de amostra ou controle + 200mL de diluente de amostra)

Controles negativo são analisados em triplicatas e positivo em duplicata sendo colocados nas primeiras posições da tira de reação.

As amostras são colocadas em seguida.

Misturar aplicando batidas suaves na lateral da microplaca durante 10 segundos.

Cobrir a placa e incubar em estufa a 37 °C (± 2 °C) por 30 minutos

Lavar a placa 5 vezes (30 segundos por lavagem) com 300mL de tampão de lavagem

Se necessário bater a placa invertida sobre papel absorvente para retirada do restante de solução de lavagem

Adicionar 50mL (uma gota) de conjugado em cada cavidade da placa

Misturar aplicando batidas suaves na lateral da microplaca durante 10

Segundos Cobrir a placa e incubar em estufa a 37 °C (± 2 °C) por 30 minutos.

Lavar a placa 5 vezes (30 segundos por lavagem) com 300mL de tampão de Lavagem

Se necessário bater a placa invertida sobre papel absorvente para retirada do restante de solução de lavagem

Adicionar 50mL do revelador A e 50mL do revelador B (uma gota de cada revelador respeitando a ordem)

Misturar aplicando batidas suaves na lateral da microplaca durante 10 segundos.

Cobrir a placa e incubar à temperatura ambiente por 30 minutos

Adicionar 50mL de ácido sulfúrico 2N em cada cavidade da placa

Misturar aplicando batidas suaves na lateral da microplaca durante 10

Segundos. Efetuar a leitura da placa em espectrofotômetro (leitora de microplaca – segundo procedimento IT IMU-004) com filtro de 450nm

Cálculos:

“Cutoff” é calculado através da equação:

$$\text{“Cutoff”} = \text{CNx} + 0.300 \text{ D.O.}$$

Onde: CNx é a média dos valores obtidos para o controle negativo

Zona de indeterminação: “Cutoff” $\pm 10\%$

Avaliação de resultados:

No Projeto ELSA este exame é apenas uma triagem e as amostras reagentes não são avaliadas por outra metodologia.

Prováveis causas de erro:

Lavagem incorreta das cubetas

Não devem ser utilizadas amostras inativadas pelo calor

Interferentes:

Não se aplica

Interpretação de resultados:

NÃO REAGENTE - Amostras com valor de absorbância menor que o limite inferior da zona de indeterminação;

REAGENTE - Amostras com valor de absorbância maior que o limite superior da zona de indeterminação;

INDETERMINADA - Amostras com valor de absorbância dentro da zona de indeterminação (devem ser repetidas).

Aplicações Clínicas:

A Doença de Chagas é causada pelo *Trypanossoma cruzi*, sendo disseminada pelo seu vetor, o “barbeiro”, um inseto hematófago. A doença é transmitida quando as fezes contaminadas do “barbeiro” entram em contato com picadas recentes, membranas mucosas ou lesões dérmicas, principalmente pelo ato de coçar após a picada do inseto.

Existe a transmissão congênita da doença, que pode ser fatal para recém-nascidos; bem como transmissão parenteral através de hemoderivados. A determinação de anticorpos

anti-*T. cruzi* auxilia o diagnóstico e tratamento de indivíduos infectados, também a triagem em bancos de sangue.

Valores de Referência:

Não reagente

❖ Procedimento dosagem de Insulina - ELSA**Metodologia utilizada:**

Método imuno-enzimático com pérolas realizado em equipamento automatizado IMMULITE2000 ANALYZER Siemens®.

Princípio do teste:

Amostra biológica e reagente (anti-insulina conjugada com fosfatase alcalina) são misturadas na unidade teste contendo uma pérola revestida de anti-insulina, sendo incubada por 60 minutos à 37°C com agitação contínua. Se houver presença de insulina na amostra, ocorre a formação um complexo antígeno-anticorpo sobre a pérola recoberta. Após lavagem da pérola por ultracentrifugação, o substrato é adicionado para uma nova incubação por 10 minutos à 37°C. A reação é medida através da emissão de fótons de luz, sendo o resultado obtido dado em contagens por segundo (cps). A concentração de insulina é determinada através de curva de calibração previamente armazenada.

Características do método:

Intervalo de Calibração: até 300 μ IU/mL (WHO NIBSC 1st IRP 66/304) de acordo com a indicação do fabricante.

Especificidade: anticorpo específico para insulina.

Sensibilidade Analítica: 2mUI/mL ng/mL de acordo com a indicação do fabricante.

Amostra:

Soro, podendo ser realizado em plasma heparinizado

Critérios para Aceitação e Rejeição de Amostras Inadequadas:

Não utilizar amostras lipêmicas, hemolisadas, ictericas ou grosseiramente contaminadas.

Não usar amostras de plasma colhido com EDTA e Fluoreto de Sódio.

Amostras com volume inferior a 350mL são rejeitadas.

Calibradores:

Ajustador para Insulina (baixo e alto).

Produto deve ser hidratado antes do uso. Armazenar entre 2 e 8°C.

Após hidratação, aguardar 30 minutos antes do uso, sendo estável por 2 meses à -20°C armazenado em alíquotas.

Controles:

Controle para Insulina (baixo e alto).

Produto deve ser hidratado antes do uso.

Armazenar entre 2 e 8°C.

Após hidratação, é estável por 2 meses à -20°C armazenado em alíquotas.

Calibração: Realizada a cada quatro semanas ou a cada novo lote de reagentes, quando necessário segundo o IT HDE-003.

Controle de Qualidade:

Controle de qualidade interno:

O controle é verificado a cada rotina.

Controle de qualidade externo:

Participa do Programa de Controle de Proficiência Externo ou do Programa Alternativo da Qualidade segundo descrito em Procedimento relacionado do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP.

Periodicidade: mensal.

Os resultados passam por avaliação da área técnica e de Gestão da Qualidade do Serviço de Laboratório clínico do Hospital Universitário - USP.

Avaliação de resultados:

Amostras com resultados acima de 300mUI/mL devem ser diluídas manualmente com diluente de amostra para insulina, sendo adequada uma diluição de 1:10. A concentração obtida com a amostra diluída deve ser multiplicada pelo fator de diluição.

Interferentes:

Resultados errôneos podem ser obtidos com amostras grosseiramente contaminadas, colhidas com EDTA, lipêmicas, ou com presença de fibrina, bem como em pacientes com presença de anticorpos heterofílicos, e pacientes expostos a produtos ou soro de animais. Presença de anticorpos contra insulina em pacientes tratados com formas não humanas de insulina podem interferir nos resultados obtidos. Resultados falsamente diminuídos podem ser obtidos em amostras hemolisadas. Resultados diminuídos podem ser obtidos em amostras ictericas.

Valores de Referência:

Até 29,1 µIU/mL.

Anexo G: Manual de armazenamento e transporte de amostras biológicas Projeto ELSA

Armazenamento e Transporte de Amostras Biológicas Projeto ELSA

1. Fluxograma para coleta, processamento e armazenamento das amostras biológicas do estudo ELSA

Logística de aliquotas:

2. Banco de amostras ELSA:

Alíquotas de materiais para o banco de amostras:

Material	Total de alíquotas	Número de palhetas	Número de criotubos
Soro jejum	9	6	3
Plasma EDTA jejum	9	6	3
Plasma citrato jejum	6	4	2
Plasma heparina jejum	3	2	1
Urina de 12 horas	6	4	2
Soro pós carga	6	4	2
Plasma heparina pós carga	3	2	1

33,3% das amostras do banco será guardado em freezer -80°C nos bancos locais, acondicionadas em criotubos. O banco local de São Paulo será no INCOR – HC.

33,3% no HU-USP em criogênio, acondicionada em palhetas.

33,3% na FIOCRUZ –R.J. em criogênio, acondicionadas em palhetas

Se houver sobra de material biológico após a realização das alíquotas previstas, este material restante poderá ser alíquotado em criotubos e armazenados localmente.

3. Regra de Armazenamento das amostras nos bancos locais:

Nos freezers as amostras são armazenadas por tipo de material biológico, as racks podem ser divididas por tipo de material biológico (exemplo: Rack 1 para soro jejum; Rack 2 para Plasma EDTA; Rack 3 para plasma citrato, e assim sucessivamente).

4. Identificação dos freezers:

Os freezers -80oC utilizados no projeto ELSA são identificados pela letra do Centro de investigação seguida do número do freezer, (exemplo o freezer **S1** é o primeiro freezer de São Paulo).

5. Identificação das prateleiras dos freezers:

As prateleiras dos freezers são identificadas pela letra **P** seguida do número, a primeira prateleira (**P1**) é a prateleira superior.

Exemplo: freezer com 5 prateleiras:

1. Identificação das racks nas prateleiras:

As racks são identificadas pela letra **R** seguida do número.

Exemplo: freezer com 5 racks nas quatro prateleiras superiores e 4 racks na quinta prateleira:

P1	R1	R2	R3	R4	R5
P2	R6	R7	R8	R9	R10
P3	R11	R12	R13	R14	R15
P4	R16	R17	R18	R19	R20
P5	R21	R22	R23	R24	

2. Identificação dos Nichos das racks:

Os “nichos” das racks, aonde são colocadas as caixas de criotubos são identificadas pela letra **N** seguida do número, a numeração dos nichos é feita de cima para baixo e da esquerda para a direita.

Exemplo: Rack contendo 16 nichos:

P1				
R1	N1	N5	N9	N13
	N2	N6	N10	N14
	N3	N7	N11	N15
	N4	N8	N12	N16

3. Identificação das caixas:

A identificação das caixas é feita com as etiquetas de códigos de barras fornecidas pelo CI ELSA SP, estas etiquetas possuem 7 (sete) dígitos; o primeiro dígito é sempre zero, o segundo dígito identifica o Centro de Investigação ELSA e o terceiro dígito é sempre o número 5 (identificação de uma caixa de freezer), os demais dígitos são uma sequência numérica.

Identificação do centro: dois primeiros dígitos (o primeiro é sempre zero)	
Centro	identificador
BA	1
ES	2
MG	3
RJ	4
RS	5
SP	6

Exemplo de identificação das caixas:

0150001 – caixa do CI ELSA BA
0250001 – caixa do CI ELSA ES
0350001 – caixa do CI ELSA MG
0450001 – caixa do CI ELSA RJ
0550001 - caixa do CI ELSA RS
0650001 - caixa do CI ELSA SP

9. Montagem das caixas para armazenamento dos criotubos:

As caixas de 100 posições são montadas retirando-se as divisórias centrais verticais e horizontais, ficando assim com 81 posições disponíveis; este procedimento é necessário para que os criotubos utilizados no Projeto se encaixem sem dificuldade em todos os espaços disponíveis.

10. Mapa interno das caixas para armazenamento de criotubos:

Os nichos das caixas são identificados verticalmente por um número (1 → 9) e horizontalmente por uma letra (A → I)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1
2	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2	I2
3	A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3	I3
4	A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4	H4	I4
5	A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5	H5	I5
6	A6	B6	C6	D6	E6	F6	G6	H6	I6
7	A7	B7	C7	D7	E7	F7	G7	H7	I7
8	A8	B8	C8	D8	E8	F8	G8	H8	I8
9	A9	B9	C9	D9	E9	F9	G9	H9	I9

O mapa interno das caixas pode ser impresso e colado na parte interna da tampa da caixa para facilitar a localização das amostras.

11. Identificação das caixas:

As caixas são identificadas externamente pela etiqueta enviada por São Paulo, esta preferencialmente não deve ser afixada na tampa.

12. Transporte das amostras de exames e cilindros com palhetas para São Paulo:

Todos os Centros de Investigação ELSA recebem para o início do Projeto ELSA, 04 (quatro) caixas de envio de material biológico; acompanhadas da documentação necessária para o transporte (Conhecimento de transporte Expresso – CTE e Declaração de transporte).

Na véspera da data prevista para a retirada do material no CI, o responsável pelo laboratório ou pessoa designada por ele, deve entrar em contato com a empresa SafeLab através do telefone (11) 5070 5066 ou pelo e-mail mlog@safelab.com.br e agendar a coleta do material.

Para esta solicitação a empresa pede que sejam informados o **nome do Projeto**, o **Centro de Investigação** e o **Investigador Responsável**, a **quantidade de caixas** que serão enviadas, o **tipo de envio (material biológico congelado)** e o número do Conhecimento de Transporte Expresso (**CTE**) - um dos documentos que deve acompanhar o material. Nesta ocasião é **IMPORTANTE** solicitar o **gelo seco** e anotar o número da coleta fornecido pela Safelab.

- **Instruções para o preenchimento da documentação necessária:**

Conhecimento de Transporte Expresso – CTE: Este documento (em 6 vias) deve acompanhar cada transporte, é necessário preencher a **Quantidade de volumes** (caixas enviadas), o **Conteúdo (BIO)** e a **Temperatura** (congelada).

Declaração de Transporte: Este documento é uma declaração do Investigador responsável, portando deve constar seu CPF e CRM, deve ser assinalado o tipo de substância (no caso Soro, urina e Plasma) e a quantidade total aproximada de material biológico em mL.

Para cada envio de material a CTE deve ser preenchida em 6 vias e a declaração de transporte em 2 vias.

Na retirada do material a empresa de transporte entrega o gelo seco que será utilizado e devolve uma via da CTE com a assinatura do funcionário, data e hora da retirada do material no Centro de Investigação.

- **Solicitação de caixas e documentação (suprimentos):**

A solicitação de novas caixas para o transporte bem como a documentação necessária é de responsabilidade de cada Centro de Investigação e deve ser feita com no mínimo 5 dias úteis de antecedência pelo telefone (11) 5070 5066 ou pelo e-mail mlog@safelab.com.br, o fornecimento mínimo é de 04 embalagens.

- **Organização do material a ser enviado nas caixas de transporte**

Envolver os sacos plásticos contendo as alíquotas de exames e o saco plástico com os cilindros **AZUIS** (cilindros a serem enviados para São Paulo) com o “plástico bolha” fornecido pela Safelab.

Colocar no interior da caixa de transporte uma camada de gelo seco e proteger o material com uma camada de plástico bolha ou papel craft

Acomodar o material a ser transportado em cima desta camada de gelo seco.

Cobrir todo o material com outra camada de gelo seco.

Fechar a caixa e entregá-la ao funcionário da Safelab, a caixa não deve ser lacrada com fita crepe porque é necessário que haja frestas para que o CO₂ liberado pelo gelo seco se dissipe.

- **Datas de envio de amostras biológicas**

As amostras serão enviadas ao Centro de Investigação ELSA SP em datas pré agendadas e de comum acordo entre o CI ELSA que fará o envio do material e o CI ELSA SP.

Anexo H: Formulário de orientação para a coleta de urina

Informações sobre jejum e coleta de urina – 12 horas
Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto ELSA BRASIL	
<p>A urina pode ser usada para a realização de diversos exames. No ELSA ela será coletada para fornecer informações sobre o funcionamento dos seus rins. Por isso a coleta deve ser feita ao longo de 12 horas. A contagem exata deste tempo é muito importante. Portanto, siga rigorosamente as informações abaixo.</p>	

Orientações

Você deverá utilizar o frasco fornecido pelo ELSA. Se este frasco não for suficiente para acondicionar toda a urina, utilize garrafas plásticas de água, limpas e secas, com tampa, para guardar o restante da urina.

Favor não adicionar nada ao frasco; somente urina.

A urina não deverá ser contaminada com fezes. Evite utilizar talco ou creme na região genital e o uso de laxantes para não contaminar a coleta.

Tenha cuidado e atenção para não perder nenhuma urina nessas 12 horas. Tenha atenção especial durante o banho e durante a madrugada.

Após cada coleta de urina, mantenha o frasco bem fechado e guarde-o na geladeira.

Durante o período de jejum e coleta de urina, você pode beber água e urinar normalmente.

O frasco deverá ser transportado em posição vertical (em pé).

Para mulheres: Se estiver menstruada na véspera de ir ao centro ELSA, não faça a coleta de urina e entre em contato conosco.

Em caso de dúvidas, entre em contato conosco: FONE: _____

Em torno de 12h antes do horário previsto para sair de casa e dirigir-se ao Centro ELSA, inicie o jejum e a coleta de urina noturna.

Início do jejum - Anote abaixo quando encerrou a última alimentação (comida ou bebida exceto água).

1. Início do período de coleta da urina - Esvazie a bexiga, urinando **no vaso sanitário** e anote na figura (item 1) o horário exato em que você urinou. Essa urina é descartada porque já estava na bexiga antes do período da coleta. Este horário marca o início da coleta.

2. Coleta de urina no frasco - Durante as 12h seguintes, sempre que sentir vontade de urinar, colete toda a urina produzida no frasco que lhe foi fornecido. Lembre-se de guardar na geladeira.

3. Final da coleta de urina - A última urina coletada **no frasco** deve ocorrer após 12h do início do período de coleta. Anote na figura (item 3) o horário exato em que fez a última coleta.

Início do jejum Hora: ____ : ____
<p>1. Início do período de coleta de urina: Urinar no vaso sanitário. Hora: ____ : ____</p>	<p>2. A cada vez que desejar urinar durante as 12h seguintes, urine no frasco e guarde-o na geladeira.</p>	<p>3. Final da coleta Hora: ____ : ____</p>

Favor anotar no espaço abaixo se você esqueceu de coletar a urina em algum momento, ou se perdeu alguma urina durante o período de coleta de 12 horas:

F001

12/12/08

Anexo I: Formulário de coleta em jejum

Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto **ELSA BRASIL**

Formulário de coleta jejum

Data: _____ ID Participante: _____ Sexo: _____

Data Nascimento: _____ Nome Participante: _____

Hora início: _____ Técnico: _____

etiqueta	tubo
<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>	tubo com gel
<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>	tubo EDTA
<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>	tubo fluoreto
<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>	tubo citrato
<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>	tubo heparina
<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>	tubo EDTA
<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>	tubo citrato
<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>	tubo com gel
<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>	tubo EDTA
<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>	tubo com gel
<div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>	urina 12 horas

C Q	número do tubo <div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>	tipo de material <div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>
-----	---	---

Hora término: _____

Participante é da amostra aleatória da coorte? ☐ Sim ☐ Não

Intercorrências: () Sem intercorrências
 () Acesso difícil
 () Coleta incompleta
 () Outras - especificar: _____

Hora início centrifugação: _____

Anexo J: Formulário de coleta pós-sobrecarga

Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto	ELSA BRASIL	
Formulário coleta pós sobrecarga		
Data : _____	ID Participante: _____	Sexo: _____
Data Nascimento: _____	Nome Participante: _____	
Hora sobrecarga: _____		
Sobrecarga:	() Glicêmica	() Alimentar
Hora início coleta: _____	Técnico: _____	
etiqueta	tubo	
<div style="border: 2px solid black; width: 150px; height: 25px;"></div>	tubo com gel	
<div style="border: 2px solid black; width: 150px; height: 25px;"></div>	tubo heparina	
<div style="border: 2px solid black; width: 150px; height: 25px;"></div>	tubo fluoreto	
C Q	número do tubo <div style="border: 2px solid black; width: 150px; height: 25px;"></div>	tipo de material <div style="border: 2px solid black; width: 150px; height: 25px;"></div>
Intercorrências:	☐ Sem intercorrências ☐ Acesso difícil ☐ Coleta incompleta ☐ Outras - especificar: _____ _____ _____	
Hora término coleta: _____		
Hora início centrifugação: _____		

Anexo K: Formulário de alíquotas de exames

<div style="text-align: right;"> </div> <div style="text-align: center;"> <small>Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto</small> ELSA BRASIL </div>			
Formulário de alíquotas de exames			
Participante: _____	Data: _____	Técnico _____	
<input type="text"/>	tubo EDTA	→ criotubo	<input type="text"/> HbA1C
<input type="text"/>	urina 12 horas	→ criotubo	<input type="text"/> tubo EDTA → Hemograma
<input type="text"/>	urina 12 horas	→ criotubo	<input type="text"/> Microalb.
<input type="text"/>	urina 12 horas acidificada	→ criotubo	<input type="text"/> bioquímica urina
			<input type="text"/> cálcio
Volume: _____ mL			
<input type="text"/>	tubo com gel jejum	→ criotubo	<input type="text"/> bioquímica soro
<input type="text"/>	tubo com gel jejum	→ criotubo	<input type="text"/> hormônios jejum
<input type="text"/>	tubo com gel jejum	→ criotubo	<input type="text"/> imunologia
<input type="text"/>	tubo fluoreto jejum	→ criotubo	<input type="text"/> glicemia jejum
<input type="text"/>	tubo fluoreto pós sobr.	→ criotubo	<input type="text"/> glicemia pós-sobrecarga
<input type="text"/>	tubo com gel pós sobr.	→ criotubo	<input type="text"/> insulina pós-sobrecarga
		criotubo	<input type="text"/> triglicérides pós-sobrecarga OU
C.Q.	Tubo CQ		Exame CQ
<input type="text"/>	<input type="text"/>	→ criotubo	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	→ criotubo	<input type="text"/>

REFERÊNCIAS

1. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ, editors. Global burden of disease and risk factors. Washington: Oxford University Press / The World Bank; 2006.
2. National Health, Lung, and Blood Institute (US). Framingham Heart Study: 50 years of research success. Bethesda; 2002. Available from: <http://www.nhlbi.nih.gov/about/framingham/>.
3. Marmot M, Brunner E. Cohort Profile: The Whitehall II study. Int J Epidemiol. 2005; 34: 251-6.
4. The Nurses' Health Study. Boston: NHS; 2006. Available from: <http://www.channing.harvard.edu/nhs/index.html>.
5. University of North Carolina at Chapel Hill. ARIC Atherosclerosis Risk in Communities. Chapel Hill: CSCC; 2006. Available from: <http://www.csc.unc.edu/ARIC/>.
6. Bild DE, Bluemke DA, Burke GL. Multi-ethnic study of atherosclerosis: objectives and design. Am J Epidemiol. 2002;156:871–881.
7. Aquino EM, Barreto SM, Benseñor IM, Carvalho MS, Chor D, Duncan BB, Lotufo PA, Mill JG, Molina M Del C, Mota E, Passos VM, Schmidt MI, Szklo M. ELSA-Brasil (Brazilian Longitudinal Study of Adult Health): objectives and design. Am J Epidemiol. 2012;175(4):315–324.
8. Neeley WE; Simple automated determination of serum or plasma glucose by a hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase method. Clinical Chemistry, 1972; 18 (6): 509-515.

9. Allain CC, Poon LS, Chan CSG, et al. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Clinical Chemistry*, 1974; 20: 470-475.
10. Warnick GR, Nauck M, Rifai N. Evolution of methods for measurement of HDL-Cholesterol:from ultracentrifugation to homogeneous assays. *Clinical Chemistry*, 2001; 47 (9): 1579-1596.
11. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
12. Bachorik PS. Measurement of low density lipoprotein cholesterol. In: Rifai N,Warnick GR, Dominiczak MH, eds. *Handbook of Lipoprotein Testing*. Washington DC: AACC Press, 1997:145-160.
13. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with na enzyme that produce hydrogen peroxide. *Clinical Chemistry*, 1982;28 (10): 2077-2080.
14. Jaffe M Z., Ueber den Niederschalag, welchen. Pikrinsaure in normalem harn erzeugt and ueber eine reaction dês kreatinins. *Zeitschrift Fuer Physiologishe Chemie*, 1986; 10: 391-400.
15. Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3,4-dihidro-2-hydroxybenzenesulfonic acid 4 aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clinical Chemistry*, 1980; 26 (2): 227–231.
16. International Federation of Clinical Chemistry, Comittee on Reference Systems for Enzymes, *Chemical Clinical Laboratories Medical*,2002; 40 7: 725-733

17. International Federation of Clinical Chemistry, Committee on Reference Systems for Enzymes, Chemical Clinical Laboratories Medical, 2002; 40 7: 718 – 724.
18. Shaw LM, Stromme JH, Loudon JL, and Theodosen L. IFCC Methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 4 IFCC Method for γ -glutamyltransferase. Journal Clinical Chemistry Biochemistry, 1983; 21: 633-646.
19. Ferrard G, Goester C, Klumpp T, Metais P. Evolution of immunonephelometry of C-reactive protein in serum. Clinical Chemistry, 1980; 26: 782-783.
20. Kobold, U. et al. Candidate reference methods for hemoglobin A1c based on peptide mapping. Clin Chem, 1999; 43:1944-1951.
21. Wilkinson E, Rae PW, Thomson KJ, Toft AD, Spencer CA, Beckett CJ. Chemiluminescence third generation assay (analite TSH – 30) of thyroid-stimulating hormone in serum or plasma assessed. Clinical Chemistry 1993; 39(10): 2167-3173.
22. Kricka JL. Chemiluminescent and Bioluminescent Techniques. Clinical Chemistry 1991; 37(9): 1742-1481.
23. Koch DD, Parrish D, Ladenson JH. Evaluation of a Direct Potentiometric Method for Sodium and Potassium used in the Du Pont aca. Clinical Chemistry 1983; 29(6): 1090-1092.
24. Ferreira AW, Belem ZR, Moura MEG, Camargo ME Aspectos da padronização de testes sorológicos para doença de chagas: Um teste imunoenzimático para triagem de doadores de sangue. Rev Inst Med Trop 1991; 33:123-128.
25. Gieltman HJ. An improved procedure for the determination of calcium in biochemical specimens. Analytical Biochemistry 1967; 18: 521-53.

26. Schwab SJ, Dunn FL, Feinglos MN. Screening for microalbuminuria. A comparison of single sample methods of collection and techniques of albumin analysis. *Diabetes Care* 1992;15:1581
27. Ceriello A. The possible role of postprandial hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetologia* 46 (Supl. 1):M9–M16, 2003.
28. Ceriello A, Davidson J, Hanefeld M, Leiter L, Monnier L, Owens D, Tajima N, Tuomilehto J; International Prandial Glucose Regulation Study Group. Postprandial hyperglycaemia and cardiovascular complications of diabetes: an update. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16(7):453-456.
29. Ebenbichler CF, Kirchmair R, Egger C, Patsch JR. Postprandial state and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1995; 6:286–290.
30. da Silva AB, Molina M del C, Rodrigues SL, Pimentel EB, Baldo MP, Mill JG. Correlation between the creatinine clearance in the urine collected during 24 hours and 12 hours. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 2110; 32(2): 165-172.
31. Hallmans G, Vaught JB. Best practices for establishing a biobank. *Methods Mol Biol*.675:241-260.
32. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). 2008 Best Practices for Repositories Collection, Storage, Retrieval and Distribution of Biological Materials for Research International. *Cell Preservation Technology*, 2008 6(1):3-58.
33. Alan HB Wu Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests. 4th Ed, Elsevier.
34. Blankenberg S, Zeller T, Saarela O, Havulinna AS, Kee F, Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa H, Yarnell J, Schnabel RB, Wild PS, Münzel TF, Lackner, KJ, Tiret L, Evans A, Salomaa V, for the MORGAM Project. Contribution of 30 Biomarkers to 10-Year Cardiovascular Risk Estimation in 2

Population Cohorts. The MONICA, Risk, Genetics, Archiving, and Monograph (MORGAM). Biomarker Project. *Circulation* 2010; 121(22): 2388-2397.

35. Holmes E, Loo¹ RL, Stamler J, Bictash¹ M, Yap¹ IK, Queenie C, Ebbels T, De Iorio M, Brown IJ, Veselkov¹ KA, Daviglus ML, Kesteloot H, Ueshima H, Zhao L, Nicholson JK & Elliott P. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature* 2008; 453(7193): 396-400.

36. Motta V T., Corrêa JA, Motta LR “Gestão da Qualidade no Laboratório Clínico” 2ª. Ed. Médica Missau, 2001.