



# RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas  
*Brazilian Journal of Clinical Analyses*

• **Estamos de volta com a nova temporada do**

# **SBAC** **DIGITAL** **2022.**

**Um programa de atualizações técnicas e científicas para os laboratórios de todo o Brasil.**

Conhecimento, palestras e novidades da área laboratorial, incluindo grandes oportunidades de negócios.

**Save the date**

Acompanhe a programação em [sbacdigital.com.br](http://sbacdigital.com.br)



**Editor-chefe/Editor-in-Chief**  
Paulo Murillo Neufeld (RJ)

**Editor Emérito/Honorary Editor**  
Mateus Mandu de Souza (RJ) - *in memoriam*

**Editores Associados/Associate Editors**  
Lenilza Mattos Lima (SC)  
Mauren Isfer Anghebem (PR)



# RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas  
*Brazilian Journal of Clinical Analyses*

Publicação oficial da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC  
*Official Publication of Brazilian Society of Clinical Analyses*

**Volume 53 - Número 4 - 2021**  
**Edição online - ISSN 2448-3877**

**Produção Editorial/Publisher**  
Editorarte Projetos de Comunicação e Editora Ltda.



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

#### DIRETORIA EXECUTIVA/EXECUTIVE BOARD

**Luiz Fernando Barcelos (RS)**  
Presidente/President

**Maria Elizabeth Menezes (SC)**  
Vice-Presidente/Vice-President

**Lenira da Silva Costa (RN)**  
Secretária-Geral/General Secretary

**Mauren Isfer Anghebem (PR)**  
Secretária/Secretary

**André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ)**  
Tesoureiro/Treasurer

**Paulo Aparecido Brandão Pinto (SP)**  
Tesoureiro Adjunto/Assistant Treasurer

#### Conselho Fiscal/Fiscal Board Titulares/holders

Vanderlei Eustáquio Machado (MG)  
Alverne Passos Barbosa (GO)  
Jurandi David da Silva (PE)

#### Suplentes/Alternates

Nilson Lima Lopes (BA)  
Tereza Neuma de Souza Brito (RN)  
Paulo Roberto Hatschbach (PR)

#### Endereço para correspondência/Editorial Office

Rua Vicente Licínio, 99 - Tijuca  
Rio de Janeiro, RJ - Brasil  
20270-902 – Fone: 21 2187-0800  
E-mail: rbac@sbac.org.br

#### Afiliações/Affiliations



#### Comitê Editorial/Editorial Board

##### Bioquímica Clínica/Clinical Biochemistry

Álvaro Largura (PR), Marcelo Quintão Mendes (MG), Geraldo Picheth (PR), Marileia Scartezini (PR), Paolo Mocarelli (ITA), Dulcinea Saes Parra Abdalla (SP), Ary Henrique Filho (GO), Daniel Mazziota (AR), Antenor Henrique Pinto Pedrazzi (SP), Jane Maciel Almeida Baptista (MG), Marinez Oliveira Sousa (MG), José Edson P. da Silva (RS), Rafael Noal Maresco (RS)

##### Citologia Clínica/Clinical Cytology

André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ), Carlos Eduardo de Queiroz Lima (PE), Rita Gorete Amaral (GO), Alexandre Sherley Casimiro Onofre (SE), Sílvia Helena Rabelo Guimarães (GO)

##### Controle de Qualidade/Quality Control

José Abol Corrêa (RJ), Luiz Fernando Barcelos (RS), Gabriel de Souza Lima Oliveira (SP)

##### Endocrinologia/Endocrinology

Carlos Alberto Camargo (SP), Ana Maria Menezes (SP)

##### Toxicologia/Toxicology

Regina Helena Queiroz (SP), Maria da Graça Almeida (RN)

##### Microbiologia Clínica/Clinical Microbiology

Antônio Márcio Lopes (MG), Estevão José Colnago (RJ), Amauri Braga Simonetti (RS), Cássia Maria Zoccoli (SC), Carmen Paz Oplusti (SP), Raissa Mayer R. Catão (PB)

##### Imunologia Clínica/Clinical Immunology

Paulo Jaconi Saraiva (RS), Antônio Walter Ferreira (SP), Sílvia Fernandes R. da Silva (CE), Manuela Berto Pucca (SP)

##### Parasitologia Clínica/Clinical Parasitology

Antônio Pedro Soares (MG), Jerolino Lopes Aquino (MT), Alverne Passos Barbosa (GO), Mauren Isfer Anghebem (PR)

##### Micologia Clínica/Clinical Micology

Paulo Murillo Neufeld (RJ), Maria José Gianini (SP), Regina Célia Candido (SP), Rosane Rhan (MT)

##### Biologia Molecular/Molecular Biology

Mario Hirokyu Hirata (SP), Rosário Dominguez Crespo Hirata (SP), Marcelo Ávila Mascarenhas (RS), Kelly Melo (SP), Maria Elizabeth Menezes (SC)

##### Hematologia Clínica/Clinical Hematology

Jorge Fernando Teixeira Soares (RJ), Marcos Kneip Fleury (RJ), Celso Spada (SC), Paulo César Naoum (SP), Julio Cezar Merlin (PR), Paulo Henrique da Silva (PR), Robson Ferreira Ferraz Santos (RJ), José Edson Paz da Silva (RS)

#### Entidades mantidas pela SBAC Entities maintained by the SBAC

**PNCQ – Programa Nacional de Controle de Qualidade/National Program of Quality Control**  
Coordenador/Coordinator:  
Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ)

**SNA / DICQ – Sistema Nacional de Acreditação/National System of Accreditation**  
Coordenador/Coordinator:  
André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ)

**CEPAC – Centro de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas  
Post Graduation Center**  
Coordenadora/Coordinator:  
Maria Elizabeth Menezes (SC)

**CB-36 – ABNT**  
Superintendente/Superintendent:  
Humberto Marques Tiburcio (MG)

**CSM-20**  
Coordenador Técnico/Technical Coordinator  
Luiz Fernando Barcelos (RS)

#### Comissões Institucionais/ Institutional Commissions

**Coordenador Geral/General Coordinator**  
Luiz Fernando Barcelos (RS)

**Comissão de Congressos/Congress Commission**  
Coordenador Geral de Congressos/  
General Congress Coordinator: Irineu K. Grinberg (RS)  
Assessoria Científica/Scientific Advice:  
Jerolino Lopes Aquino (MT); Luiz Fernando Barcelos (RS), Marcos Kneip Fleury (RJ)

**Normas e Habilitação/Norms and Qualification**  
Coordenação/Coordination:  
Mauren Isfer Anghebem (PR)  
Membros/Members: Luiz Fernando Barcelos (RS)

**Ensino/Education**  
Paulo Murillo Neufeld (RJ), Marcos Kneip Fleury (RJ)

**Ética/Ethics**  
Henrique Tommasi Netto (ES), Francisco Einstein do Nascimento (CE), Maria da Conceição L. Oliveira (SE)

## Sumário/Contents

**EDITORIAL / EDITORIAL**

- 328** A Revolta da Vacina  
*The Vaccine Revolt*  
Neufeld PM

**ARTIGOS DE REVISÃO / REVIEW**

- 337** A fase pré-analítica na gestão da qualidade em medicina laboratorial: uma breve revisão  
*The pre-analytical phase in laboratory medicine quality management: a brief overview*  
Boechat NG, Menezes P
- 344** Diagnóstico hematológico e molecular das neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL negativas  
*Hematological and molecular diagnosis of BCR-ABL negative chronic myeloproliferative neoplasms*  
Valente ACMM, Ribeiro RT
- 352** Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavity of professionals in a surgical center  
*Staphylococcus aureus multirresistentes isolados de mãos e cavidade nasal de profissionais de um centro cirúrgico*  
Brock KNRS, Rossi EM, Menezes LK, Honorato JFB, Kessler SSB, Zappani NCM, Bratkowski PRG
- 359** Value of immature reticulocyte fraction in anemias and other hematologic conditions: a brief narrative review  
*Valor da fração de reticulócitos imaturos em anemias e outras condições hematológicas: uma breve revisão narrativa*  
Souza MC, Nogueira LS, Batista TR, Carvalho MG, Rios DRA
- 368** Interferências do gel separador em análises bioquímicas e possíveis soluções: uma revisão bibliográfica  
*Separator Gel interferences in biochemical analysis and possible solutions: a bibliographic review*  
Oliveira TS, Bandeira DM, Batista E, Menezes P

**ARTIGOS ORIGINAIS / ORIGINAL ARTICLES**

- 375** Métrica Seis Sigma em análises clínicas e a qualidade na rotina laboratorial  
*Six Sigma Metrics in Clinical Analysis and Quality in Laboratory Routine*  
Carvalho ÂR, Oliveira OLM
- 381** Análise comparativa dos parâmetros de testes rápidos para o diagnóstico da Hepatite B  
*Comparative analysis of the rapid test parameters for Hepatitis B diagnosis*  
Korb S, Grando AC
- 389** Verificação *in vitro* da ação dos antiagregantes plaquetários ticagrelor, bissulfato de clopidogrel e cloridrato de prasugrel como agente antibacteriano frente ao *Staphylococcus aureus*  
*In vitro verification of the action of the antiplatelet agents ticagrelor, clopidogrel bisulfate and prasugrel hydrochloride as an antibacterial agent against Staphylococcus aureus*  
Coutinho ACA, Paiva LF, Fonseca EMM, Fernandes MH, Beraldo SR

## Sumário/Contents

- 395** A importância da sedimentoscopia em amostras de urina com exame físico-químico negativo  
*The importance of sedimentoscopy in urine samples with negative physical-chemical examination*  
Silva FKS, Monteiro AA
- 398** Comparação das metodologias óptica e de impedância para a determinação de parâmetros hematológicos no analisador Sysmex-XN  
*Comparison of optical and impedance methodologies for the determination of hematological parameters on the Sysmex-XN analyzer*  
Staehler JT, Moro L, Corrêa GG, Scotti L, Morkis IVC, Ghem C
- COMUNICAÇÃO BREVE / SHORT COMMUNICATION**
- 405** Prevalência de Enterobacterales isoladas em amostras de hemoculturas de pacientes em um hospital privado de Juiz de Fora-MG  
*Prevalence of Enterobacterales isolated from patient blood culture samples in a private hospital in Juiz de Fora-MG*  
Carneiro AA, Garcia PG, Tavella PG
- 411** *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina: uma análise da presença na microbiota nasal de estudantes de saúde em período de estágio  
*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an analysis of the presence in the nasal microbiota of health students in the internship period*  
Nascimento BJ, Carstensen S
- 418** Índice de recoletas em um laboratório privado de Salvador-BA no ano de 2019  
*Recollection index in a private laboratory of Salvador-BA in the year 2019*  
Miranda BS, Santos MS, Brito VS
- 426** Comparação de dois métodos na realização do exame de velocidade de hemossedimentação (VHS) em um hospital oncológico  
*Comparison between two methods for performing the erythrocyte sedimentation test (ESR) in an oncology hospital*  
Moreira TCG, Grosso CAC, Stanzani MS, Santos PB, Pedrosa NL
- RELATO DE CASO / CASE REPORT**
- 433** A interação entre Hb B2, Hb S e beta talassemia: um relato de caso familiar  
*The interaction between Hb B2, Hb S and beta thalassemia: a family case report*  
Santos RS, Costa JVM, Leite LAC, Bonini-Domingos CR
- 438** INSTRUÇÕES AOS AUTORES / INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

## A Revolta da Vacina

### *The Vaccine Revolt*

Apesar de haver muitos indícios na história da humanidade acerca do desenvolvimento de vacinas e da vacinação em diferentes sociedades antigas da Ásia, África e Europa, a ciência considera como marco histórico o trabalho de Edward Jenner com a varíola e sua vacinação, na Inglaterra dos séculos XVIII e XIX, em decorrência da documentação e divulgação das práticas experimentais e dos resultados obtidos em publicações oficiais pelo médico inglês.

Interessante notar que, junto com os esforços de alguns para o controle das epidemias e, em particular, da varíola, que assolava o mundo desde tempos imemoriais, havia quase sempre nas sociedades do passado [e nas de hoje] um comportamento refratário constituído por protestos e objeções contra a vacinação, principalmente, pela igreja, nobreza e a própria população que era cooptada pelos clérigos e nobres, representantes das classes dominantes. Dentre os motivos para o fenômeno de rejeição, estava o obscurantismo teológico e científico e o preconceito das classes mais favorecidas que desejavam apenas para si o direito à saúde e ao bem-estar.

No continente americano, a varíola penetrou e se disseminou rapidamente logo após seu descobrimento pela armada do navegador Cristóvão Colombo, em 1492. Em 1677, em decorrência de grande número de casos da doença, o médico Thomas Tachter publicou o que viria a ser considerado o primeiro texto médico da América [*A Brief Rule to guide the Common People of New England How to order themselves and theirs in the Small Pocks, or Measles*], que trazia medidas orientativas de prevenção e controle da varíola pela população. Apesar de todas as dificuldades e movimentos contrários nas diversas civilizações do ocidente e do oriente ao longo da história, havia uma urgente necessidade sanitária de se controlar, de forma definitiva, a varíola no mundo, por isso, a medicina perseverou, em meio a enormes adversidades sociais contra as vacinações, sem recuos. Com esse firme propósito, por fim, a erradicação da doença foi anunciada pela Organização Mundial da Saúde [OMS], em 08 de maio de 1980.

No Brasil, a varíola também chegou com os primeiros colonizadores europeus no século XVI e, como em todos os lugares, se espalhou de maneira rápida entre as populações europeias, indígenas e africanas que viviam na colônia brasileira, fazendo um grande número de vítimas. Em 1804, contudo, a vacina jennericiana antivariólica chegou ao Brasil, trazida pelo Marques de Barbacena em associação com comerciantes bahianos. O nobre enviou à Portugal sete crianças escravizadas, que seriam utilizadas como cobaias e meios de transporte do vírus bovino, juntamente com um médico para que a técnica de vacinação braço-a-braço fosse aprendida e aplicada posteriormente no país. As crianças foram inoculadas e, ao desenvolverem a forma branda da doença no navio, o pus foi coletado das pústulas, se mantendo fresco e adequado para o uso nas primeiras imunizações na Corte do Rio de Janeiro. Essa forma de transporte do imunizante foi também bastante empregada para fazê-lo chegar nas localidades mais distante da colônia.

Vinda de Lisboa, a vacina chegou primeiramente à província da Bahia, indo para a Corte no Rio de Janeiro, em seguida. O Vice-Rei do Brasil e Marques de Aguiar, Dom Fernando José de Portugal e Castro, determinou que as inoculações fossem realizadas nos membros da Corte, às quintas-feiras e domingos, com hora marcada, na sede do

governo, que ficava no prédio do Paço Imperial. Como uma prática cotidiana, essas inoculações, tanto no Paço Imperial quanto na igreja de NS do Rosário, perduraram até o final do século XIX.

A princípio, houve uma boa aceitação da vacina na Corte. Esse contexto favorável foi decorrente da política absolutista do governo português e do apoio direto do rei Dom João VI, que perdera parentes próximos como seu irmão mais velho e príncipe herdeiro (Dom José), uma irmã, um cunhado e seu filho primogênito (Dom Francisco Antônio). Antes de sua transferência para o Brasil, inclusive, ele vacinou seus dois filhos restantes (Dom Pedro e Dom Miguel). Dom João também solicitou a tradução e divulgação de todos os textos de Jenner sobre a vacinação antivariólica.

Em 1811, por Decreto Real, foi criada a Junta da Instituição Vacínica na Intendência Geral de Polícia do Rio de Janeiro, que tinha como atribuição precípua organizar e padronizar as práticas vacinais, promover a vacinação antivariólica em massa na Corte e atuar como um centro difusor de vacinação para outras províncias brasileiras. Apesar de sua criação, o sucesso da instituição foi relativo, tendo em vista a falta de recursos humanos (um inspetor e três vacinadores cirurgiões) e financeiros e a adesão irregular da população. Além dos nobres e indivíduos abastados da sociedade, o público-alvo, em função de interesses econômicos, era formado principalmente por escravizados, incluindo os que estavam à venda. A vacina contra a varíola passou a ser uma exigência para que os escravizados aportados no Brasil fossem entregues aos seus respectivos proprietários, exigindo-se, para tanto, um certificado de vacinação. A população livre, todavia, continuava com uma baixa assistência e, por conseguinte, baixo percentual de vacinação, não se conseguindo, por isso, alcançar uma imunização de base na maioria das regiões do país.

Com a política governamental de vacinar os escravizados oriundos da África, os relatos de casos de varíola ao longo dos anos foram se tornando cada vez menos frequentes na corte do Rio de Janeiro, contudo, com o aumento do tráfico ilegal e a entrada clandestina de escravizados não vacinados, houve, no período compreendido entre 1834 e 1838, um retorno violento dos casos da doença na capital. Paralelamente, uma crescente aversão à vacinação, por parte da população, surgiu como mais um fator de dificuldades para o controle da virose.

Em relação à “vaciofobia” gerada no meio da população, a técnica braço-a-braço empregada era um complicador. Essa técnica dependia do comparecimento do vacinado uma semana depois para que o pus a ser utilizada na vacinação de outro indivíduo pudesse ser retirado de suas pústulas. Entretanto, havia resistência nesse retorno, por ser a retirada do material purulento um procedimento incômodo e demorado. Isso gerava conflitos entre a população, vacinadores e policiais. Uma outra situação estava associada a questões médicas e à teologia cristã. No tocante às questões médicas, havia o temor dos indivíduos adquirirem a doença dos bovinos cujo pus era extraído para a imunização de pessoas, dúvidas acerca da eficácia das vacinas, tendo em vista o relato de casos de varíola entre pessoas vacinadas, equívocos de diagnóstico com a catapora, disseminação da ideia de que se poderia contrair sífilis na vacinação braço-a-braço e confusão entre as técnicas de vacinação [vírus bovino] e variação [vírus humano da varíola benigna]. A visão teológica da vacinação foi outro agravante. A igreja incitava reiteradas vezes os fiéis contra a vacinação com base em dogmas religiosos sobre a origem satânica das vacinas e a ocorrência de possessões diabólicas, bem como sobre a “indesejável” interferência humana nos desígnios de Deus. Além disso, a dificuldade de se importar da Europa a matéria prima purificada (linfa vacínica), a má formação dos vacinadores e a falta de logística para o transporte de vacinas para regiões distantes eram também obstáculos. Todas essas situações repercutiram negativamente na população que passou a ver com desconfiança e medo o procedimento de vacinação, levando a sua rejeição e combate.

Para impor a vacinação à população [que vinha numa progressiva rejeição], o Decreto Imperial no. 464 de 1846 tornou a vacinação compulsória no país, o que desencadeou diversos conflitos entre o povo e o governo, principalmente, no Rio de Janeiro,

e acirradas discussões acerca dos limites entre o respeito às liberdades individuais e à vida privada e as prerrogativas de intervenção sanitária do Estado. Em decorrência disso, no final do século XIX, a população comparecia em número cada vez menor nos postos de saúde, indicando descrença e resistência ao método de vacinação e suas práticas.

Todo esse ambiente adverso, iniciado no século XIX, alcançou o século XX, atingindo seu paroxismo no movimento popular que ficou conhecido na história como “A Revolta da Vacina” e que teve também, em 1904, a cidade do Rio de Janeiro como palco. Na realidade, apesar de apresentar elementos de continuidade, o momento político por que passava a República Velha foi o fator desencadeante e consequente das diversas causas e motivações sociais.

A república foi instaurada em 1889, deixando para trás o período monárquico do Brasil. A República Velha, fase compreendida entre 1889 e 1930, foi marcada pelo controle político das elites agropecuárias com mínima participação popular. Quando o império foi derrubado, não existiam instituições republicanas estabelecidas para substituir àquelas imperiais. Assim, por falta de opção, as Forças Armadas chamaram para si a reponsabilidade de organizar o tecido político do país. Em decorrência disso, por serem as únicas instituições que conseguiam manter a unidade nacional e regional, impondo sua autoridade e impedindo a fragmentação do país, os dois primeiros governos da República nascente foram liderados por militares das Forças Armadas, num período que ficou conhecido como “República das Espadas” e que se estendeu de 1889 até 1894. A partir de 1894, o controle do governo passou às mãos das oligarquias latifundiárias vinculadas à cultura do café em São Paulo e da pecuária em Minas Gerais. Era a “República Oligárquica” e os tempos da política do café com leite.

Com o Golpe Militar de 1889, algumas providências foram tomadas, sendo uma das mais importantes, a expulsão da Família Real e a formação de um governo provisório para o novo regime. Desse modo, assumiu a chefia do governo o Marechal Deodoro da Fonseca que anulou a Constituição de 1824, passando a governar por Decretos-Lei até que uma nova constituição fosse promulgada. Assim, em 1891, o governo convocou uma Assembleia Constituinte que consagrou a separação entre a Igreja e o Estado, passando os atos civis a serem realizados de forma secular, a definição de república federativa como o regime político, a divisão do Estado em três poderes e a instituição do voto universal masculino. Outras medidas foram a transformação das províncias em estados, a dissolução das Assembleias Provinciais e Municipais, com a nomeação de interventores e intendentes para os municípios, e a naturalização automática de estrangeiros. O Estado também passaria a não ser mais obrigado a fornecer educação pública gratuita.

Uma política industrializante, conhecida como Encilhamento, proposta pelo senador e ministro Rui Barbosa, que incluía a emissão de papel-moeda, a liberação de crédito e empréstimos, o estímulo à criação de empresas e sociedades anônimas, produziu forte inflação, desvalorização do dinheiro, especulação financeira, surgimento de empresas fantasmas e falência generalizada, levando o Marechal Deodoro da Fonseca a tentar fechar o Congresso, a fim de conter as fortes críticas à condução da economia que sofria por parte dos parlamentares. A tentativa de dissolver o Legislativo Federal e determinar um estado de sítio não foi apoiada pelos demais militares, fazendo com que Deodoro da Fonseca renunciasse, com o objetivo de evitar uma guerra civil no país, assumindo seu vice, o Marechal Floriano Peixoto.

Ao assumir, Floriano Peixoto tentou consolidar a república, atacando a oposição com políticas de exílio de civis e reforma ou transferência de militares de alta patente. Ele reprimiu, ainda, duas revoltas, a “Revolta da Armada”, uma rebelião liderada pela Marinha que exigia maior participação no governo republicano, e a “Revolta Federalista”, uma guerra civil ocorrida no Rio Grande do Sul entre os federalistas e os republicanos contra o governo local e central e a favor de uma revisão da Constituição. Apesar de todos esses problemas, Floriano Peixoto, que tinha a aceitação da classe média brasileira, deu também apoio à urbanização e a industrialização com a importação de maquinário e matéria-prima para alavancar o desenvolvimento da economia. No entanto, essa

política desenvolvimentista trouxe muitos descontentamentos, principalmente entre os grandes proprietários de terras, que pleiteavam recursos do Governo Federal, para o setor agrícola, e não eram atendidos. Além disso, Floriano Peixoto claramente impedia a elite cafeeicultora de ascender ao poder e conquistar altos cargos na administração central. O governo de Peixoto foi marcado por um forte paternalismo com estímulo à economia industrial e por uma reforma alfandegária com medidas antiinflacionárias ineficientes.

Após 5 anos de governo militar, finalmente o poder passou às mãos dos civis, em 1894. A partir desse período, as oligarquias estaduais, lideradas por fazendeiros paulistas e mineiros, tiveram sucesso na implantação de uma economia política centralizada em *commodities* agropecuárias, principalmente o café. A divisão no meio militar e, em particular, a Constituição de 1891 facilitou essa aquisição de poder, pois o Brasil passou a um regime federativo com grande autoridade concedida aos estados, tendo cada um deles, inclusive, representantes na Câmara dos Deputados em quantidade proporcional ao número de seus habitantes, o que deu hegemonia [e alternância de poder] a São Paulo e Minas Gerais sobre os demais entes da federação. Importa mencionar que as bases dessa dominação estavam fundadas na “Política dos Governadores” e no “Coronelismo”. Com um pacto de apoio mútuo entre governadores estaduais e presidente da república e o controle da justiça e dos votos [“voto de cabresto”] nas mãos de grandes proprietários rurais, os chamados “coronéis”, a oposição era eliminada federativa e regionalmente [“curral eleitoral”].

Com a eleição [pelo “povo”] do presidente Prudente de Moraes (1894-1898), que estava atrelada à crise gerada pelos ataques aos florianistas, a elite cafeeicultora do oeste paulista conquistou o poder, passando a governar o país. Em seu governo, Prudente de Moraes procurou resolver conflitos relacionadas às regiões de fronteira, alterou as políticas alfandegárias e de exportação e suprimiu de forma violenta o movimento missionário na comunidade baiana de Canudos [Guerra de Canudos]. O início do apogeu da “República Oligárquica” veio com o Presidente Campos Sales (1898-1902). Sales adotou inúmeras medidas (rolagem da dívida externa e penhora de rendas) que beneficiaram a economia brasileira, controlando a grave crise financeira que assolava o país. Nesse período, a chamada “Política dos Governadores” teve seu fortalecimento. Com o governo do presidente Rodrigues Alves (1902-1906), houve a valorização do café através da concessão de empréstimos que seriam utilizados para o financiamento do excedente da produção cafeeira, sendo que a venda dos estoques só ocorreria quando os preços aumentassem. Uma reforma urbana no Rio de Janeiro foi também levada a curso com grandes obras arquitetônicas e de saneamento que determinaram a retirada dos cortiços das áreas centrais da cidade e a construção de passeios públicos e grandes avenidas. Rodrigues Alves ainda adotou a prática de vacinação obrigatória contra a varíola. As consequências de tais reformas e da política de saúde governamental foi o deslocamento da população carente para os morros e periferia da cidade e a emblemática “Revolta da Vacina”.

Importa mencionar, inicialmente, que a questão primordial da “Revolta da Vacina” está fulcrada nas históricas relações políticas, econômicas e sociais construídas, modificadas e reconstruídas no século XIX e, mais particularmente, a partir da década de 1870. Um ponto sensível nesse contexto sociológico foi a perseguição aos cortiços e seus habitantes, pois essas moradias [desde sempre] abrigavam aqueles que “incomodavam” o poder imperial, como os abolicionistas e republicanos. Além disso, os “projetos civilizantes” postulados pelo governo eram perturbados pelas doenças que ali tinham seus mananciais e pelo “comportamento viciado” de seus moradores. Na república, esse sistema gerador de importunação ao poder constituído continuou como epicentro de mobilização e contestação.

Uma outra análise relevante sobre a “Revolta da Vacina”, que decorreu, de fato, como será visto, do acúmulo de ações autoritárias governamentais e da perda das moradias [cortiços] da população mais marginalizada, está associada a um processo de apropriação do corpo pela ciência. Esse processo, na verdade, iniciou-se com René Descartes na França no século XVII e teve sua consolidação no Brasil no final do sé-

culo XIX e no século XX. Assim, além dos motivos socioeconômicos, a população se rebelou também pela perda de controle sobre seus próprios corpos. O movimento foi, inegavelmente, uma sedição dos revoltosos para manter os corpos livres da disciplina e da apropriação pelo que mais tarde Michel Foucault chamaria de biopolítica/ biopoder e Achille Mbembe de necropolítica.

Retomando a discussão dos fatores políticos e sociológicos que desencadearam, à época, o movimento popular contra a vacinação obrigatória, revisita-se à figura do presidente Rodrigues Alves que, ao assumir, em 1902, reiterou que o programa de seu governo era o saneamento da capital e o melhoramento do Porto do Rio de Janeiro. Para tanto, nomeou como prefeito o engenheiro Francisco Pereira Passos que pôs em prática o projeto da Presidência da República. Assim, em 1903, foram contratadas obras públicas para a reurbanização de algumas das principais ruas e avenidas da cidade, com base num projeto chamado “bota-abaixo”, que promoveu a desapropriação e a demolição de casarões e de habitações coletivas ou cortiços que supostamente eram focos de doenças como a febre amarela, a peste bubônica e a varíola, bem como a cólera, a tuberculose, a febre tifoide, o impaludismo, o exantema febril e a lepra. O ministro da indústria, transporte e obras públicas, Lauro Müller, foi encarregado de modernizar, aparelhar e também sanear o porto. Concomitantemente, o governo passou a pagar à população pela captura de ratos, considerados vetores das doenças que assolavam a cidade. Com efeito, em certa medida, houve algum controle de muitas dessas infecções que levavam centenas de pessoas a óbito. No entanto, a varíola continuava resistindo à política de saneamento do novo presidente.

No que concerniu à saúde pública, foi nomeado, em março de 1903, o médico Oswaldo Cruz como o diretor geral de saúde. Cruz iniciou seu trabalho pelo combate à febre amarela, empregando os mesmos métodos utilizados por Carlos Finlay e Walter Reed, de forma exitosa, em Cuba. Esse método incluía a separação de doentes em hospitais e o extermínio das larvas dos mosquitos vetores, bem como a drenagem dos bolsões de água estagnada das partes baixas da cidade. Além disso, criou o Serviço de Profilaxia da Febre Amarela e aumentou os quadros de médicos e funcionários da Diretoria de Saúde Pública. Com um estilo militar de viés autoritário, a campanha contra a febre amarela foi posta em marcha, nos primeiros meses de 1904, sob o comando das brigadas de saúde, conhecidas por “mata-mosquitos”.

Essas brigadas inspecionavam imóveis residências e comerciais, preenchendo formulários e mapas sanitários, orientando com folhetos acerca das medidas e cuidados que inquilinos e proprietários deveriam tomar para o combate à doença, fiscalizando e multando aqueles que descumpriam as determinações preconizadas pela Diretoria de Saúde Pública, promovendo evacuações, transferências e interdições, solicitando reformas ou promovendo demolições prediais, procedendo limpezas, pulverizações e desinfecções de imóveis e de seus entornos e isolando em domicílio ou removendo para hospitais os enfermos. Com relação à peste bubônica, a campanha seguiu de forma similar com o extermínio dos ratos e pulgas, higienização e desinfecção de ruas, passeios públicos, casas e construções comerciais e vacinação.

Essas ações tinham como foco as áreas mais pobres e com grande densidade populacional como morros, bairros afastados e casas de cômodos e cortiços. Efetivamente, os resultados obtidos por Cruz foram satisfatórios, apesar dos desconfortos que a entrada nas casas causava e da inquietação que os despejos, interdições e internações forçadas produziam na população do Rio de Janeiro. Todos os métodos de prevenção e controle empregados nas campanhas governamentais pela brigada sanitária, acabaram levando ao temor, hostilidade e ódio das classes sociais mais baixas contra os brigadistas, à contrariedade dos médicos que não estavam certos quanto aos procedimentos empregados e à oposição dos políticos ao governo federal.

Dando seguimento ao seu trabalho, Oswaldo Cruz se voltou para a erradicação da varíola que, no mesmo período dos combates à febre amarela e peste bubônica, vinha crescendo em número de casos, vitimando uma considerável quantidade de pessoas

e apresentando uma importante recalcitrância em relação às medidas de controle e prevenção até então propostas pela Diretoria Geral de Saúde. Conforme determinação dessa diretoria, os indivíduos doentes deveriam ser recolhidos aos hospitais da cidade para tratamento, contudo, de fato, o número de pessoas que recebia atendimento médico-hospitalar era muito reduzido, estando a maior parte dos enfermos com varíola fora dos hospitais e, portanto, sem assistência médica. Não obstante haver diversos postos de saúde espalhados no Rio de Janeiro para a vacinação, a procura da população pela imunização era extremamente baixa. Diante do crescente aumento dos casos de varíola e da reduzida procura pela vacinação nos postos de atendimento, o governo viu como única solução ao combate à infecção que não cedia, o retorno à obrigatoriedade de vacinação.

A ideia da vacinação obrigatória, todavia, sofreu inúmeros reveses. A imprensa teve papel ativo [e ambivalente] contra a obrigatoriedade da vacinação, publicando diariamente denúncias, textos e depoimentos desfavoráveis à sua imposição e se colocando “ao lado” da população menos favorecida, bem como noticiando o movimento dos políticos adversários do governo do presidente Rodrigues Alves contrários a essa proposição. A resistência à vacinação obrigatória partiu também da Igreja [de diferentes denominações e crenças] com seu discurso teológico não intervencionista e do Centro das Classes Operárias com sua oposição sindical ao projeto sanitário. Muitos médicos e militares também se mostravam refratários à prática da vacinação obrigatória.

No âmbito legislativo, foram travadas intensas batalhas. Importante mencionar, inicialmente, que a Constituição de 1891 não reconhecia o direito à saúde como uma garantia constitucional. Essa lacuna era superada, de algum modo, por decretos e leis que visavam o estabelecimento de um ordenamento jurídico-sanitário. Dos que merecem destaque, podem ser citados o Decreto no. 1.151 de 05 de janeiro de 1904, que tratava da reorganização dos serviços de higiene administrativa da União, o Decreto no. 5.156 de 08 de março de 1904, que estabeleceu novo regulamento para os serviços sanitários da União, e o Decreto no. 5.157 igualmente de 08 de março de 1904, que aprovou o regulamento do Serviço de Profilaxia da Febre Amarela. De maneira geral, no bojo desses decretos estavam a organização da Diretoria Geral de Saúde Pública, a criação de um Código Sanitário, o estabelecimento de uma justiça sanitária, a criação das brigadas sanitárias e a definição das práticas de controle, prevenção e profilaxia geral e específica das doenças infecciosas. No entanto, a grande polêmica que desencadeou, inclusive, importantes enfrentamentos políticos, ficou a cargo da Lei no. 1.261 de 31 de outubro de 1904, que tratava da obrigatoriedade da vacinação e revacinação contra a varíola em todo o país.

Apesar da menor resistência política quando da aprovação dos decretos sanitários pelo legislativo, mesmo ainda como projeto de lei em tramitação, a Lei no. 1.261 foi motivo de intensos debates no Senado e na Câmara dos Deputados, repercutindo, inclusive, diretamente sobre a população da capital. Nessas discussões, o governo afirmava que a vacinação contra a varíola era de grande interesse para a promoção da saúde do povo brasileiro, tendo em vista as inúmeras áreas de endemicidade da virose no país, sendo a maior delas, na cidade do Rio de Janeiro. Em contraponto, os argumentos da oposição eram que os métodos de execução da lei se mostravam violentos, a vacina era de qualidade discutível e os funcionários aplicadores, enfermeiros e policiais encarregados da execução da campanha não eram técnica e moralmente confiáveis. A população, por sua vez, traumatizada pela experiência pouco agradável com as ações sanitárias [muitas das vezes desastrosas] da Diretoria Geral de Saúde Pública nas campanhas de combate à febre amarela e à peste bubônica iniciadas em abril de 1903 e na execução do novo Código de Higiene [batizado de forma irônica de “Código das Torturas”, “Nova Inquisição” e “Santo Ofício da Higiene”] aprovado em fevereiro/ março de 1904, bem como pela ocorrência da morte de Cypriana Maria Leonarda imputada à vacina em julho de 1904 e pela percepção de que a consciência de cada um é que deveria guiar a livre decisão de se vacinar ou não, engrossaram o coro dos descontentes com as condições de aplicação e o caráter compulsório da lei.

Após a aprovação da lei em 31 de outubro de 1904, essa entraria em vigor a partir de 11 de novembro de 1904, sendo que sua regulamentação sob a forma de decreto da Diretoria Geral de Saúde ficou a cargo de Oswaldo Cruz. A proposta de Cruz era extremamente rígida e incluía a imposição de vacinação a todas as fashas etárias (recém-nascidos, jovens, adultos e idosos), exames e reexames, multas pesadas, demissões sumárias e limitado direito de defesa e/ ou recurso judicial e administrativo. O objetivo era alcançar o maior número de pessoas imunizadas de maneira rápida, sem obstáculos e nem dificuldades. Não houve, contudo, maiores preocupações com questões de âmbito psicológico, emocional, material e financeiro da população. Na verdade, o governo esperava submissão total e incondicional.

Com uma insatisfação crescente cuja origem remontava os tempos do império e o início da república e perpassava por autoritarismos e políticas de dominação, lutas de classe, movimentos subversivos, pobreza, ignorância e superstição, reforma urbana e redistribuição espacial de grupos sociais e empoderamento das ciências médicas, a revolta foi sendo construída e atingiu sua culminância em novembro de 1904.

As agitações começaram efetivamente em 10 de novembro de 1904, após a publicação no jornal “A Notícia”, no dia anterior, dos duros termos do regulamento que vinha sendo elaborado por Oswaldo Cruz. Grandes aglomerações se formaram na rua do Ouvidor, na Praça Tiradentes e no Largo de São Francisco onde a população discursava contra a lei da vacina e seu regulamento e pedia a sedição popular. Na Praça Tiradentes, populares entraram em conflito com a polícia jogando pedras, vaiando e gritando *slogans* e palavras de ordem como “Morra a Polícia” e “Abaixo a Vacina”. No final dos confrontos, 15 pessoas foram presas.

No dia 11 de novembro de 1904, o movimento passou a contar com a participação da Liga contra a Vacina Obrigatória, criada em 05 de novembro de 1904, pelos opositores do governo do presidente Rodrigues Alves. Para o dia 11, foi convocado um comício no Largo de São Francisco, porém, como os líderes da Liga não compareceram, oradores populares tomaram a cena, proferindo discursos inflamados e mantendo os ânimos exaltados. Com ordem para intervir, a polícia foi recebida pelos manifestantes sob vaias e provocações. As tentativas de prisões foram rechaçadas pelos populares que se armaram de paus, pedras e ferros dos canteiros de obras das reformas do centro da cidade. A polícia revidou com agressões físicas, houve correria e perseguições, tiros foram ouvidos, lojas, bancos e repartições públicas cerraram as portas. Cerca de 18 pessoas foram presas.

No dia 12 de novembro de 1904, uma nova concentração popular foi convocada pela Liga contra a Vacina Obrigatória na sede do Centro das Classes Operárias, na rua Espírito Santo, próximo à Praça Tiradentes. Nova aglomeração de manifestantes foi formada no Largo de São Francisco. Após algum tempo, no entanto, puseram-se em marcha pelo centro da cidade e pelos bairros da Lapa, Glória e Catete, exortando personalidades, instituições e jornais favoráveis ao movimento e gritando palavras de ordem com ataques e vaias a autoridades, políticos e militares que apoiavam a obrigatoriedade de vacinação. Em vários pontos do trajeto da passeata, ocorreram confrontos entre a população revoltosa e a polícia, inclusive com troca de tiros. O Exército foi convocado para guardar o Palácio do Catete, sede da Presidência da República. Lauro Sodré e Barbosa Lima, líderes da Liga contra a Vacina Obrigatória, tentaram assumir o comando do movimento popular com a intenção de atribuir um sentido político à revolta. Em associação com as lideranças do Centro das Classes Operárias, eles aproveitaram o movimento para iniciar uma conspiração com o objetivo de derrubar o governo, através de um Golpe de Estado.

No dia 13 de novembro de 1904, o conflito se generalizou e o que se viu foi uma violenta reação popular que, como um rastilho de pólvora, se espelhou rapidamente pelas ruas do centro da cidade e dos bairros adjacentes. A população enfurecida, por onde passava, destruíu bondes, postes de luz, combustores de gás, calçamentos e árvores

e vegetações das praças e passeios públicos. Além disso, foram atacadas repartições públicas, delegacias, quartéis [quartel de cavalaria], companhias de bondes, lojas e gasômetros. Barricadas e trincheiras foram levantadas nas ruas. Querosene, armas e dinamites foram roubadas de casas comerciais e instituições militares e policiais ou doadas por simpatizantes. As autoridades, percebendo que estavam perdendo o controle, tentaram pôr fim aos conflitos intensificando a presença dos contingentes do Exército, Marinha, polícia e Guarda Nacional para patrulhamento em diferentes regiões da cidade e guarnecimento de prédios públicos e locais estratégicos. Nesse momento, o principal motivo pelo qual a revolta foi deflagrada [a obrigatoriedade da vacinação e os métodos rígidos de controle das doenças infecciosas] sofreu certo deslocamento e o foco passou a ser os serviços públicos precários, o governo e sua política excludente e as forças de repressão.

No dia 14 de novembro de 1904, os manifestantes tomaram de assalto duas delegacias no centro da cidade, destruíram combustores de gás, linhas telefônicas e veículos de obras públicas, levantaram novas barricadas e atacaram a estação das barcas e algumas fábricas como o Moinho Inglês e as Velas Esteáricas. Intenso tiroteio foi travado entre os manifestantes e as tropas do governo. A cidade foi dividida em três zonas de patrulhamento, sendo o litoral de responsabilidade da Marinha, o norte da avenida Passos de responsabilidade do Exército e o sul da avenida Passos de responsabilidade da polícia. Somado a isso, foram trazidos reforços dos batalhões de Niterói, São Paulo e Minas Gerais.

Concomitante a todos esses eventos, um Golpe de Estado continuava sendo planejado com o concurso de Lauro Sodré e militares sediciosos. Programado inicialmente para o dia 17 de novembro de 1904, em decorrência de uma denúncia de conspiração pela imprensa, o “golpe” foi antecipado para o dia 15 de novembro, durante o desfile militar pelo Dia da Independência, que não aconteceu. Duas escolas militares estavam também envolvidas nesse plano de sedição. A Escola Preparatória e Tática de Realengo, comandada pelo general Hermes da Fonseca, e a Escola Militar da Praia Vermelha. Efetivamente, a penas a escola da Praia Vermelha se engajou no levante e se envolveu em um combate armado com as tropas governamentais. Interessante notar que, num dado momento, parte das tropas do governo passou para o lado dos revoltosos, havendo um cessar fogo e um abandono de ambas as tropas do local de combate. Nessa ocasião, várias pessoas que participaram da tentativa de golpe foram presas e outras tantas mortas pelas forças militares leais ao presidente Rodrigues Alves.

No dia 16 de novembro de 1904, diante dos conflitos que já duravam 6 dias, o governo decretou Estado de Sítio e decidiu revogar a obrigatoriedade da vacina, desarticulando os revoltosos e sufocando o movimento. O Estado de Sítio foi prorrogado em duas oportunidades, em 14 de dezembro de 1904 e 15 de fevereiro de 1905. Em setembro de 1905, o Congresso anistiou todos os civis e militares participantes dos acontecimentos de novembro de 1904.

Com o fim dos conflitos, as campanhas de vacinação prosseguiram num certo curso natural. Nos anos seguintes, as taxas de mortalidade declinaram, se tornando praticamente zero, demonstrando a efetividade da vacina. Importa reiterar, contudo, que foi a obrigatoriedade e não a eficácia da vacina, num primeiro momento, o estopim da revolta que, na verdade, entre outras questões, denunciava a precariedade das relações sociais e institucionais vivida pela população brasileira daquela época.

Em termos sanitários, a “Revolta da Vacina” intensificou as discussões sobre saúde e saneamento, o que determinou a reestruturação dos diversos programas e serviços de saúde pública que passaram a ser fundamentados em ações governamentais que visavam o controle e a prevenção de doenças e outros agravos de forma essencialmente científica com o emprego de dados estatísticos e epidemiológicos e com a participação mais consciente da população.

## BIBLIOGRAFIA

- Azambuja CMB. A Política sanitária na República Velha e a revolta da vacina. *RICADI – Revista Interdisciplinar*. 2016; 01: 128-149.
- Burian CL. Presidencialismo, federalismo y oligarquía cartelizada en Brasil (1889-1930): La dinámica del poder en la República Velha. *Revista de Historia*. 2017; 2 (24): 81-121.
- Carreta JA. Médicos e a revolta da vacina. A presença das idéias de Antoine Béchamp no Brasil. *Teoria e Pesquisa*. 2009; 18 (1): 143-169. Disponível em: <https://www.teoriaepesquisa.ufscar.br/index.php/tp/article/view/164/140>. Acesso em: 25 nov 2021.
- Crescêncio CL. Revolta da vacina: higiene e saúde como instrumentos políticos. *Biblos*. 2008; 22 (2): 57-73.
- Larocca LM, Carraro TE. O mundo das vacinas–caminhos (des) conhecidos. *Cogitare Enfermagem*, 2000; 5 (2): 43-50.
- Mattos RLP. Revolta da Vacina (1904): Varíola e Vacinação. Anais do I Colóquio do LAHES – Laboratório de História Econômica e Social-UFJF. 2005. Disponível em <http://www.conhecer.org.br/download/cp/HISTORIA%20DO%20BRASIL/LEITURA%20ANEXA%20MODULO%20III%20-%20a.pdf>. Acesso em: 25 nov 2021.
- Menezes AP. A revolta da vacina: leituras. *Espaços - Revista de Teologia e Cultura*. 2002; 10 (1-2): 163-171.
- Moutinho FFB. Conflitos da sociedade brasileira com as normas sanitárias: um paralelo entre a revolta da vacina e a pandemia de Covid-19. *Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*. 2020; 60-71.
- Nogueira RASB *et al.* A revolta da vacina e seus impactos. *Cientific@ Multidisciplinary Journal*. 2021; 8 (2): 1-10.
- Porto A, Ponte CF. Vacinas e campanhas: imagens de uma história a ser contada. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*. 2003; 10 (suplemento 2): 725-42.
- Rosado RCLS *et al.* Origens históricas da vacinação no Brasil. *Cientific@-Multidisciplinary Journal*. 2021; 8 (2): 1-9.
- Tuells J. La «Revolta da vacina» en Río (1904): resistencia violenta a la ley de vacunación obligatoria contra la viruela propuesta por Oswaldo Cruz. *Vacunas*. 2009; 10 (4): 140-147.

**Paulo Murillo Neufeld, PhD**

Editor-Chefe da Revista Brasileira de Análises Clínicas

# A fase pré-analítica na gestão da qualidade em medicina laboratorial: uma breve revisão

## *The pre-analytical phase in laboratory medicine quality management: a brief overview*

Natalia Gomes Boechat<sup>1</sup>

Patrick Menezes<sup>2</sup>

### Resumo

A grande evolução científica e tecnológica observada nas últimas décadas foi um dos fatores responsáveis pelo aumento da complexidade laboratorial e dos erros laboratoriais. A fase pré-analítica é a etapa mais propensa a erros em razão de dificuldade de monitoramento e controle dos fatores, visto que a maioria ocorre fora dos laboratórios. As falhas ocorridas nessa fase podem refletir nas fases posteriores (analítica e pós-analítica) e comprometer o resultado final do exame. O objetivo desse estudo é discutir como os erros e os interferentes pré-analíticos influenciam na área de Medicina Laboratorial. Por meio de pesquisas bibliográficas, levantaram-se dados de materiais já publicados na área nas principais plataformas de pesquisa, como Google Acadêmico, MEDLINE, Scopus®, ISI Web of Knowledge®, SciFinder®, Lilacs e IBECs. Após aplicar os critérios de exclusão e realizar uma leitura pormenorizada dos títulos e dos conteúdos de todo o material levantado, 23 artigos foram utilizados na revisão. Tentar minimizar os erros laboratoriais é de suma importância e permitir a melhoria do processo técnico reduz os resultados falsos dos testes e isso pode ser alcançado através da qualidade dos indicadores, o que melhora a qualidade dos serviços em Medicina Laboratorial.

### Palavras-chave

Fase Pré-Analítica; Gestão da Qualidade; Laboratório Clínico

## INTRODUÇÃO

O principal objetivo do laboratório clínico é garantir um atendimento eficiente e seguro, fornecendo laudos confiáveis em menor tempo possível para direcionar a conduta clínica da equipe sobre a condição de saúde do paciente.<sup>(1)</sup> Para isso, essas instituições obedecem a normas e programas que visam reduzir os erros ou mesmo evitá-los, porém eles ainda se fazem presentes, podendo comprometer o resultado do exame e, por consequência, o cuidado ao paciente.<sup>(2)</sup>

De acordo com Plebani,<sup>(3)</sup> erro laboratorial é qualquer problema na realização do exame e que gere um resultado inapropriado ou uma interpretação equivocada, ou seja,

uma falha ocorrida em qualquer fase do ciclo laboratorial, desde a solicitação médica até a interpretação e a reação do médico com o resultado recebido.

A metodologia laboratorial costuma ser dividida em três fases. São elas: pré-analítica, que compreende tudo que precede o ensaio laboratorial; analítica, que começa com a validação do sistema analítico e termina quando a determinação analítica gera um resultado; e pós-analítica, que abrange os procedimentos executados após a realização do exame.<sup>(4)</sup>

Observa-se na Tabela 1 a definição e caracterização de cada fase do processo laboratorial, podendo ocorrer erros em cada uma destas etapas afetando diretamente a qualidade e a confiabilidade do resultado.

<sup>1</sup> Farmacêutica com habilitação em Homeopatia, Instituto Federal do Rio de Janeiro - IFRJ, especialista em Análises Clínicas e Diagnóstico *in vitro*, Fundação Técnico Educacional Souza Marques - FTESM - (Farmacêutica de varejo). Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>2</sup> Biólogo Clínico. Doutorando no Instituto de Bioquímica Médica (UFRJ), Mestre em Medicina Laboratorial (UERJ), MBA Executivo em Saúde (UCAM), Especialista em Ciências do Laboratório Clínico (UFRJ). Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido em 25/09/2021

Aprovado em 21/12/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102187

Tabela 1 – Caracterização das fases

Fase	Definição
<b>Pré-analítica</b>	Orientação ou preparo do paciente, identificação do cliente, identificação de materiais, coleta ou preparo, transporte e conservação de materiais.
<b>Analítica</b>	Qualificação e treinamento de mão de obra, metodologia, equipamentos e reagentes.
<b>Pós-analítica</b>	Cálculos, transcrição de resultados, digitação e expedição ou endereçamento de laudos.

Fonte: Adaptado de Menezes<sup>(5)</sup>, *apud* Bonini *et al.*<sup>(6)</sup>

Dessa forma, o presente artigo traz para o centro da discussão a fase pré-analítica na área de saúde e Medicina Laboratorial. Esta fase pode sofrer interferências de variáveis biológicas e de erros, os quais podem ocorrer em diversas etapas: na requisição do exame, na orientação da coleta do material ao paciente, na obtenção da amostra biológica e após a coleta, nas etapas de acondicionamento, transporte e triagem da amostra.<sup>(7)</sup>

Durante a busca do material bibliográfico, percebeu-se que trabalhos recentes conseguiram demonstrar que é na fase pré-analítica que ocorre a maior parte dos erros, os quais, normalmente, são oriundos da elevada rotatividade de pessoal do laboratório, negligência, falta de entendimento sobre boas práticas em laboratório, treinamento ineficiente<sup>(8,9)</sup> e falta de orientação aos pacientes sobre os procedimentos que serão realizados. Alguns estudos constataram que a fase pré-analítica é a mais vulnerável a erros, sendo responsável por, aproximadamente, 60% a 90% dos erros laboratoriais em consequência da falta de padronização.<sup>(9)</sup> Lima-Oliveira<sup>(10)</sup> ressalta que uma outra explicação plausível para essa situação é que há muitas pessoas envolvidas nesta etapa. Apesar do gradativo processo de automatização laboratorial, não há como substituir a figura dos coletadores (flebotomistas), por exemplo, do processo de coleta do material utilizado para análise.

Para que o laboratório clínico possa atender adequadamente o seu objetivo, é indispensável que todas as fases do atendimento ao paciente sejam desenvolvidas e que sejam seguidas dos mais elevados princípios de correção técnica, considerando a existência e a importância de diversas variáveis biológicas que influenciam, significativamente, a qualidade final do trabalho.<sup>(11)</sup>

A missão fundamental da análise laboratorial é proporcionar informações que contribuam para a prevenção, o diagnóstico, o prognóstico e o acompanhamento das patologias e estado metabólico dos pacientes. Essas informações são obtidas através da determinação da concentração do(s) analito(s) de interesse presente(s) nos fluidos biológicos.

Deste modo, a integridade do material biológico é um importante fator pré-analítico capaz de afetar a precisão e a utilidade clínica dos exames laboratoriais.<sup>(12)</sup>

Através desta revisão, pode-se perceber que a Medicina Laboratorial mudou bastante nos últimos anos. Guimarães e colaboradores<sup>(9)</sup> esclarecem que os testes laboratoriais estão cada vez mais aprimorados e, com o avanço tecnológico na área da saúde, os reagentes e equipamentos laboratoriais proporcionam resultados cada vez mais específicos e em menor tempo; por estas facilidades, os médicos aumentaram consideravelmente a solicitação de exames. Entretanto, as falhas no diagnóstico podem comprometer significativamente a segurança do paciente em condições clínicas normais e aqueles em situações clínicas graves, porque é com base nessa informação científica e tecnológica que muitas decisões são tomadas.

Assim, pode-se inferir que os erros diagnósticos ameaçam a segurança dos pacientes, comprometendo os tratamentos, o que pode causar um agravamento dos quadros clínicos. Além disso, problemas na esfera judiciária também podem ocorrer. Uma grande parte das reivindicações judiciais, por exemplo, se deve a erros na fase pré-analítica. Em função disso, a qualidade no laboratório é fundamental para minimizar esses erros, pois leva a uma maior eficácia tanto para o médico quanto para o paciente.<sup>(9)</sup>

O objetivo primordial deste estudo é investigar a relevância dos erros e dos interferentes pré-analíticos e discutir quais os impactos que tais fatores podem gerar na área de Medicina Laboratorial.

## MATERIAL E MÉTODO

Utilizou-se como recurso metodológico a pesquisa bibliográfica, a qual foi realizada a partir da análise criteriosa de materiais já publicados na literatura e de artigos científicos divulgados no meio eletrônico. As pesquisas foram feitas nas bases de dados do Google Acadêmico, do Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE), do Scopus<sup>®</sup> (que inclui MEDLINE e Embase<sup>®</sup>), do ISI Web of Knowledge<sup>®</sup>, do SciFinder<sup>®</sup>, do Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs) (que inclui a Scientific Eletronic Library Online – SciELO) e o do Índice Bibliográfico Espanhol de Ciências de Saúde (IBECS). Elegeu-se como critério para a busca os trabalhos publicados entre 2002 e 2021 e que estivessem escritos nos idiomas português e inglês. Para se buscar os dados, foram utilizados os seguintes descritores para refinamento da amostra: “Análises clínicas”, “Fase pré-analítica”, “Variáveis pré-analíticas”, “Erro laboratorial”, “Erros pré-analíticos”, “Interferentes pré-analíticos”, além de seus correspondentes na língua inglesa – “Health”; “Pre-analytical phase”; “Pre-analytical variables”; “Laboratory errors”, “Pre-analytical

errors”, “Pre-analytical interferences”. Foram excluídos livros (*E-books*), prospectos de materiais de divulgação de empresas consolidadas no ambiente laboratorial e hospitalar e artigos escritos em outros idiomas que não fossem o inglês e o português. Após a captura do material restante, foi feita uma análise dos títulos e dos conteúdos, onde foram excluídos os que não se encaixavam no tema proposto e/ou não corresponderam ao objetivo em comum, obtendo-se uma amostra final de 23 trabalhos, os quais participaram da construção desta revisão.

## RESULTADOS

De forma geral, os trabalhos encontrados têm como objetivo discutir os principais erros e os principais interferentes que podem ocorrer na fase pré-analítica e analisar como isso influencia na rotina do laboratório clínico até a emissão do laudo. Para discutir o tema proposto, foram revisados 23 trabalhos científicos (tanto trabalhos originais quanto de revisão), cujas principais características podem ser encontradas na Tabela 2.

Tabela 2 – Resumo dos principais resultados encontrados em cada artigo selecionado para a revisão

Autor/Ano	Título	Principais resultados
<b>Saramela MM, Fernandes, TRL, 2021</b>	Evaluation of urinalysis pre-analytical phase in private laboratory of Maringá city, Paraná, Brazil	Orientação insuficiente e/ou inadequação do paciente, falta de compreensão e/ou desatenção do paciente, utilização de frasco errado e amostra com volume insuficiente são alguns interferentes que podem prejudicar a qualidade da amostra urinária.
<b>Lima IL et al., 2021</b>	Avaliação da influência de fatores pré-analíticos nas dosagens de testosterona em homens jovens saudáveis	Conseguiram demonstrar que o jejum antes da coleta e o ritmo circadiano da testosterona influenciam diretamente na concentração sérica de testosterona total.
<b>Ramos LR et al., 2020</b>	Avaliação de variáveis pré-analíticas em exames laboratoriais de pacientes atendidos no Laboratório Central de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil	Participaram da pesquisa 425 participantes; 94,6% declararam não ter recebido nenhum tipo de orientação prévia e 68,5% utilizavam algum tipo de medicamento que pode produzir alterações em exames.
<b>Montel AB, 2020</b>	Interferências pré-analíticas em laboratórios clínicos: uma revisão integrativa	Com o grande avanço tecnológico houve um aumento do número e nos tipos de erros laboratoriais, tais como falta ou perda de amostra e/ou solicitação de exame, erro ou ausência de identificação da amostra, contaminação através da rota de infusão etc.
<b>Oliveira LS, Santos WL, 2019</b>	Esclarecendo dúvidas relacionadas à coleta, conservação e transporte de urina destinada para exame laboratorial	Foram revisados 14 artigos que decorriam sobre coleta, conservação e transporte de urina destinada para o exame laboratorial. Destes, 12 não abordaram maneiras ou protocolos que auxiliassem o paciente na coleta deste material.
<b>Baskin L et al., 2019</b>	Erros in patient preparation, specimen collection, anticoagulant and preservative use: how to avoid such pre-analytical errors (second edition)	Para alguns parâmetros, como o ferro sérico, os hábitos do paciente podem afetar nas dosagens.
<b>Kapil M et al. 2019</b>	Pre collection variables anthral laboratory testing	Alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos podem sofrer alterações devido ao horário de coleta, à postura do paciente durante a flebotomia e frente a alguns hábitos do paciente.
<b>Guerra KO et al., 2019</b>	Avaliação da técnica de aperto de punho como interferente pré-analítico na dosagem de potássio	Demonstraram que o aperto de punho durante a coleta de sangue pode ser responsável por uma pseudo-hipercalcemia.
<b>Aragão DP, Araújo RML, 2019</b>	Orientação ao paciente antes da realização de exames	A detecção dos erros e orientações corretas ao paciente evitariam contratempos.
<b>Almatrafi AA, 2019</b>	Pre-analytical errors: a major issue in Medical Laboratory	Erros pré-analíticos, como: ausência de identificação do paciente, ausência de amostra para análise e uso de tubos ou recipientes inadequados, podem necessitar de recoletas para corrigir tais erros.
<b>Oliveira TA, 2019</b>	Fatores pré-analíticos que requerem nova amostra de exames laboratoriais	Fatores pré-analíticos, como, por exemplo: solicitação de exame errado pelo médico, abreviação ou escrita ilegível, ausência de identificação médica e interpretação inadequada da solicitação médica são alguns erros que acarretam recoletas.
<b>Bhavsar M et al., 2018</b>	Pre-analytical errors in clinical chemistry laboratory of a tertiary care hospital	De 33.679 amostras analisadas em seis meses, 354 apresentaram erros na fase pré-analítica.
<b>Ferreira OB, Cohen JFVB, 2019</b>	Não conformidades encontradas na fase pré-analítica	As principais não conformidades ocorrem durante a coleta de sangue.

Tabela 2 (continuação) – Resumo dos principais resultados encontrados em cada artigo selecionado para a revisão

Autor/Ano	Título	Principais resultados
<b>Shcolnik W, Carvalho SMN, 2012</b>	Erros laboratoriais e segurança do paciente: revisão sistemática	Revisão de 9 artigos que forneceram métodos que podem ser utilizados no Brasil para conhecer e monitorar os danos aos pacientes causados por erros laboratoriais.
<b>Hawkins R, 2012</b>	Managing the pre – and post-analytical phases of the total testing process	É de responsabilidade do laboratório clínico garantir a qualidade das fases pré e pós-analíticas, reduzindo os erros e melhorando a segurança do paciente
<b>Costa VG, Moreli LM, 2012</b>	Principais parâmetros biológicos avaliados em erros na fase pré-analítica de laboratórios: revisão sistemática	Revisão de 14 artigos. Observaram que a maior precisão dos exames ocorrem devido à automatização e à adoção de programa de qualidade (PGQ).
<b>Gilor S, Gilor C, 2011</b>	Common laboratory artifacts caused by inappropriate sample collection and transport: how to get the most out of a sample	Os autores compilaram os principais erros pré-analíticos que podem ocorrer no setor de hematologia e esperam que as informações coletadas ajudem os médicos em suas decisões clínicas.
<b>Guimarães AC et al., 2011</b>	O laboratório clínico e os erros pré-analíticos	Educação continuada aos profissionais envolvidos no processo de obtenção e manipulação de amostras biológicas é uma das maneiras de se diminuir os erros pré-analíticos.
<b>Lippi G et al., 2009</b>	Causes, consequences, detection and prevention of identification errors in laboratory diagnostics	A tecnologia da informação e sistemas automatizados são exemplos de meios que podem ajudar a evitar erros de identificação do paciente durante a fase pré-analítica.
<b>Laposata M, Dighe A, 2007</b>	“Pre-pre” and “post-post” analytical error: high-incidence patient safety hazards involving the clinical laboratory	Algoritmos de diagnósticos podem auxiliar nas decisões dos médicos sobre quais exames devem ser solicitados em algumas doenças específicas.
<b>Carraro P, Plebani M, 2007</b>	Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later	Em 10 anos, as taxas de erros laboratoriais em um hospital foram reduzidas, porém houve mudanças nos tipos e nas frequências desses erros.
<b>Picarelli MM et al., 2004</b>	Dosagem de enzimas musculares e diagnóstico equivocado de polimiosite juvenil: problemas na avaliação clínica e na fase pré-analítica	Punções repetidas no mesmo braço contra o esforço muscular da criança, garroteamento prolongado, ocorrência de hemólise e atividade física prévia à coleta podem elevar a enzima CPK e conferir diagnósticos equivocados de polimiosite infantil.
<b>Bonini P et al., 2002</b>	Errors in laboratory medicine	As auditorias devem ser usadas para detectar, classificar e reduzir os erros laboratoriais causados por fatores externos.

Fonte: Autores.

## DISCUSSÃO

Na área da saúde, a filosofia de qualidade não é diferente das aplicadas nas indústrias. É preciso adequação dos produtos ou serviços para a satisfação do cliente, sendo esse fundamento de qualidade perfeitamente aplicável aos diversos serviços de assistência à saúde.<sup>(12)</sup>

Os laboratórios seguem normas e/ou recomendações que visem diminuir erros ou mesmo evitá-los, sendo existentes erros frequentes que, em grande parte, não alteram significativamente o resultado de um exame.<sup>(2)</sup>

Shir Gilor & Chen Gilor<sup>(13)</sup> esclarecem que o diagnóstico laboratorial é a soma das fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, que são de extrema importância para um diagnóstico preciso. Costa e Moreli<sup>(2)</sup> explicam que, de forma simples e concisa, pode-se dizer que cada fase é fundamental no laboratório, visto que os erros embutidos na fase inicial, média ou final alterarão o resultado do produto e, conseqüentemente, sua interpretação.

Continuamente ao primeiro contato do paciente com o profissional de saúde, existe ainda uma série de fatores que podem ser responsáveis por diagnósticos falsos ou, ainda, na ausência dos mesmos.<sup>(14)</sup> Infelizmente, os erros pré-analíticos são comuns e podem afetar a qualidade do diagnóstico de uma amostra, gerando resultados não confiáveis e imprecisos.<sup>(2)</sup>

De acordo com Ferreira e Cohen<sup>(15)</sup>, a fase pré-analítica é responsável por grande parte dos erros laboratoriais pelo fato da maioria dos procedimentos ainda serem manuais. Por outro lado, Montel<sup>(16)</sup> defende que, com o grande avanço tecnológico, houve um aumento no número e nos tipos de erros laboratoriais. Guimarães *et al.*<sup>(9)</sup> esclarecem que quando os erros são percebidos, na maioria das vezes gera a rejeição da amostra e surge a necessidade de nova coleta. Oliveira<sup>(17)</sup> explica que uma nova coleta implica mais demora para o resultado do exame e custos dos profissionais incluídos e desconforto e incômodo ao usuário. Almatrafi<sup>(18)</sup> esclarece que isso pode gerar falta de confiança do paciente

e da equipe médica e prejuízos econômicos para o paciente e para o laboratório. Aragão e Araújo<sup>(19)</sup> sinalizam que a detecção dos erros e orientações corretas aos pacientes evitariam estes contratemplos.

No estudo de Bhavsar e colaboradores,<sup>(20)</sup> foram analisadas 33.679 amostras biológicas durante seis meses, das quais 354 apresentaram algum tipo de erro na fase pré-analítica. A maior parte da rejeição das amostras de sangue se deu por hemólise (10,7%) e por lipemia (12,4%). Além disso, em 14,4% das amostras não foram mencionados nome, idade ou sexo do paciente; 11,9% não continham os diagnósticos provisórios e 18,1% não continham formulários de solicitações. Na pesquisa de Ramos *et al.*,<sup>(21)</sup> houve 425 participantes, dos quais 94,6% declararam não ter recebido nenhum tipo de orientação prévia e 68,5% utilizavam algum tipo de medicamento que pode produzir alterações nos exames.

A flebotomia, como discutido por Ferreira e Cohen<sup>(15)</sup>, deve receber uma atenção especial devido a maior probabilidade de incidentes que podem ocasionar não conformidades na fase pré-analítica. O estudo de Guerra e colaboradores<sup>(22)</sup> demonstrou que o aperto de punho durante a coleta de sangue pode ser responsável por uma pseudo-hipercalcemia e isso pode esconder uma hipocalcemia, mascarar doenças renais ou alcalose metabólica e elevar falsamente níveis anormais de potássio. Além disso, Kapil *et al.*<sup>(23)</sup> lembram que, para alguns parâmetros, o horário de coleta é muito importante. Os níveis de ferro sérico são 30% mais baixos à noite em comparação com a manhã na maioria dos indivíduos. Por outro lado, Baskin *et al.*<sup>(24)</sup> enfatizam que um indivíduo que trabalha durante a noite apresentará os níveis de ferro sérico mais elevados durante o horário de maior atividade. Lima *et al.*<sup>(25)</sup> conseguiram demonstrar que o jejum antes da coleta e o ritmo circadiano da testosterona influenciam diretamente na concentração sérica de testosterona total.

Outro material biológico que também requer atenção especial é a urina. Saramela e Fernandes<sup>(26)</sup> afirmam em seu estudo que no exame de urina a qualidade da amostra influencia diretamente na análise e na interpretação do resultado. As autoras observaram que material insuficiente foi o motivo mais prevalente para solicitação de recoletas. Oliveira e Santos<sup>(27)</sup> revisaram 14 artigos e observaram que em 12 não havia abordagens de maneiras ou protocolos que auxiliassem os pacientes durante a coleta do material.

Com isso, observam-se que as variáveis pré-analíticas são agrupadas em três categorias: variáveis fisiológicas, variáveis de coleta de espécime e fatores de interferência.<sup>(28)</sup>

Conforme a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial,<sup>(11)</sup> o médico solicitante ou seus auxiliares diretos devem ser responsáveis pela primeira instrução ao paciente sobre as condições requeridas para a realização do exame informando-o sobre a eventual necessidade de preparo, como jejum, interrupção do uso

de alguma medicação, dieta específica ou, ainda, a não realização de atividade física antes da coleta de sangue.

Para minimizar os erros que podem ocorrer na fase pré-analítica, diversos pesquisadores da área têm se debruçado sobre o assunto, em especial sobre a Gestão da Qualidade e a Segurança do Paciente, em que recomendam o monitoramento de todas as fases da assistência na prevenção dos incidentes e quase falhas.<sup>(29)</sup> A partir da publicação "*To err is human: building a safer health system*", vários estudos avaliaram medidas para minimizar e melhorar os processos potencialmente perigosos na assistência à saúde e à segurança dos pacientes.<sup>(30)</sup>

Com o advento das novas tecnologias, que a cada dia tornam-se mais aperfeiçoadas e precisas, proporcionando a constante evolução das pesquisas científicas, o diagnóstico laboratorial vem se tornando cada vez mais um fator influente e até mesmo definidor da conduta terapêutica a ser aplicada.<sup>(31)</sup>

Em dezembro de 1999, a Associação Mundial de Sociedade de Patologia e Medicina Laboratorial (World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine) e a Federação Internacional de Química Clínica (International Federation of Clinical Chemistry) divulgaram um documento sobre os princípios da acreditação para laboratórios clínicos, no qual consta que:

*"é do interesse dos pacientes, da Sociedade e do Governo que os laboratórios clínicos operem dentro de altos padrões de competência profissional e técnica".*<sup>(32)</sup>

Atualmente, o objetivo mais importante da medicina diagnóstica é garantir aos médicos e pacientes um atendimento eficiente e seguro, fornecendo laudos, sejam eles laboratoriais ou de imagem, com resultados rápidos e confiáveis, para posterior tomada de decisão dos médicos em relação à conduta clínica dos seus pacientes.<sup>(9)</sup>

Também é importante destacar os erros que ocorrem em relação à medicação. Laposata e Dighe<sup>(33)</sup> esclarecem que os erros de medicação em pacientes hospitalizados são muito comuns nos Estados Unidos. Tais erros são relativamente fáceis de identificar e quantificar. Os principais erros destacados pelos autores que podem ocorrer em relação à medicação são: fármaco errado, dose errada, rota errada, paciente errado e hora errada. O maior número de erros envolve simplesmente o médico solicitando o teste errado. Isso, talvez, possa não ser surpreendente, pois até mesmo o médico mais experiente pode não ter conhecimento para saber, de forma consistente, o melhor medicamento ou o melhor teste de laboratório, visto que, na atualidade, mais de 20.000 revistas médicas publicam novas descobertas constantemente. Essa explosão de informações torna extremamente difícil, para um médico solicitante, e até mesmo um especialista na área, fazer um

diagnóstico definitivo e de baixo custo, visto que quanto mais específico é o teste, mais caro ele é.

Dado que a produção científica sobre o tema dos erros pré-analíticos é relativamente recente (tornou-se mais expressiva nas duas últimas décadas), observa-se que a maioria dos artigos produzidos até o momento adotou delineamentos descritivos. Portanto, nota-se a necessidade de ampliação do escopo de evidências disponível sobre o tema, que ainda requer estudos originais sobre o modelo causal para estes desfechos.

Pelo exposto, são imprescindíveis as necessidades de implementações, classificações e cuidados na detecção das falhas, para que ocorra a redução dos erros.<sup>(28)</sup> Além disso, para que se consiga evitar certos erros na fase pré-analítica, o médico solicitante e/ou seus auxiliares devem ser os primeiros a instruir corretamente o paciente a fazer o preparo adequado para cada tipo de exame, ressaltando a importância desse preparo para um resultado mais preciso.<sup>(29)</sup>

Contudo, a sistematização dos erros laboratoriais pré-analíticos se torna de grande importância, levando em consideração seus efeitos reais e potenciais sobre os pacientes. Isso permitirá o desenvolvimento de algoritmos de prevenção e controle desse tipo de falha.<sup>(6)</sup>

É importante que os trabalhadores envolvidos com os laboratórios clínicos tenham conhecimento de todas as normas para evitar falhas e não influenciar no diagnóstico por meio de resultados falsos positivos, indicando alguma patologia quando não há, ou falsos negativos, escondendo a doença presente.<sup>(2)</sup>

As consequências dos erros em laboratórios de medicina podem ser muitas vezes graves, especialmente quando o teste irá definir um diagnóstico, ocasionando resultados falsos positivos, ou ainda falsos negativos. Ambas as circunstâncias colocam em risco a saúde do paciente e produzem custos desnecessários para o sistema de saúde.<sup>(34)</sup>

## CONCLUSÃO

Em síntese, a grande evolução científica e tecnológica observada nas últimas décadas também foi responsável pelo aumento da complexidade laboratorial, o qual ocorre em ambiente em que coexistem procedimentos, equipamentos, tecnologia e conhecimento humano. Esse ambiente é um meio propício para que ocorram erros laboratoriais e tentar minimizá-los é de suma importância, visto que assegurar resultados confiáveis impacta diretamente na saúde e na segurança do paciente.

O alvo dessa pesquisa foi a fase pré-analítica, já que é a fase comprovadamente mais vulnerável a erros, a qual se inicia com a preparação do paciente e finda com a coleta do material biológico. Permitir a melhoria do processo técnico reduz os resultados falsos dos exames e isso pode

ser alcançado através da qualidade dos indicadores, o que, conseqüentemente, melhora a qualidade dos serviços em Medicina Laboratorial.

À vista disso, fica evidenciada a importância de promover ações e capacitações de recursos humanos para a padronização dos critérios com o intuito de melhorar a qualidade dos resultados que liberamos no laboratório.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, José Carlos Boechat de Oliveira (*in memoriam*), por todo o apoio que sempre me dedicou.

### Abstract

*The growing scientific and technological evolution observed in recent decades was one of the factors responsible for the increase in laboratory complexity and laboratory errors. Pre-analytical phase is the most error-prone stage due to the difficulty of monitoring and controlling the factors, since most of them take place outside the laboratories. Faults in this phase may be reflected in other phases (analytical and post-analytical) and implicate the final result of the exam. The paper's aim is to think about the consequences in Laboratory Medicine by pre-analytical errors and pre-analytical interferences. Through bibliographical research, data were collected from materials on the main platforms, like Google Acadêmico, MEDLINE, Scopus®, ISI Web of Knowledge®, SciFinder®, Lilacs and IBECS. After to apply the exclusion criteria and to analyze the titles and the scripts, 23 papers were used in the overview. Try to decrease laboratory errors is very most important and to allow the progress of the technical process reduces wrong results and this be achieved over the quality of indicators, which improves the capacity of services in Laboratory Medicine.*

### Keywords

*Pre-Analytical Phase; Quality Management; Clinical Laboratory*

## REFERÊNCIAS

- Xavier RM *et al.* Laboratório na prática clínica. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2011.
- Costa VG, Moreli LM Principais parâmetros biológicos avaliados em erros na fase pré-analítica de laboratórios clínicos: revisão sistemática. *Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 48, n. 3, p. 163-168, 2012.
- Plebani M. Errors in laboratory medicine and patient safety: the road ahead. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 45, n. 6, p. 700-707, 2007.
- Brisolara ML. Controle de qualidade em análises clínicas. In: Xavier RM *et al.* (org.). Laboratório na prática clínica: consulta rápida. Porto Alegre: Artmed; 2016. cap. 3, p. 91-109.
- Menezes P. Erros pré-analíticos em medicina laboratorial: uma revisão sistemática. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense] – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, 98p.; 2013.
- Bonini P *et al.* Errors in laboratory medicine. *Clinical Chemistry*, v. 48, n. 5, p. 691-698, 2002.
- Lopes HJJ. Garantia e controle de qualidade no laboratório clínico. In: Manual Gold Analisa Diagnóstica Ltda. Belo Horizonte, 2003.
- Plebani M *et al.* Laboratory network of excellence: Enhancing patient safety and service effectiveness. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 4, n. 2, p. 150-156, 2006.
- Guimarães AC *et al.* O laboratório clínico e os erros pré-analíticos. *Revista do Hospital de Clínicas e da Faculdade de Medicina*, v. 31, n. 1, p. 66-72, 2011.

10. Lima-Oliveira GS *et al.* Controle da qualidade na coleta do espécime diagnóstico sanguíneo: iluminando uma fase escura de erros pré-analíticos. *Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 45, n. 6, p. 441-447, 20 dez. 2009.
11. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso*. 2. ed. Barueri: SBPC/ML; 2010.
12. Mendes ME *et al.* Gestão por processos no laboratório clínico: uma abordagem prática. São Paulo: EPR; 2006.
13. Gilor S, Gilor C. Common laboratory artifacts caused by inappropriate sample collection and transport: how to get the most out of a sample. *Elsevier*, v. 26, n. 2, p. 109-118, mai. 2011.
14. Picarelli MM *et al.* Dosagem laboratorial de enzimas musculares e diagnóstico equivocado de polimiosite juvenil: problemas na avaliação clínica e na fase pré-analítica. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 44, n. 3, p. 224-226, mai/jun. 2004.
15. Ferreira OB, Cohen JVFB. Não conformidades encontradas na fase pré-analítica. Porto Velho. Monografia [Graduação em Biomedicina] – Centro Universitário São Lucas, 18 p.; 2018. Disponível em: <http://repositorio.saolucas.edu.br:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2735/Ohana%20Batista%20Ferreira%20-20N%C3%A3o%20conformidades%20encontradas%20na%20fase%20pr%C3%A9-anal%C3%ADtica.pdf?sequence=1>. Acesso em: 08 mai. 2021.
16. Montel AB. Interferências pré-analíticas nos laboratórios clínicos: uma revisão integrativa. Goiânia. Monografia [Graduação em Ciências Médicas modalidade Médica] – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 16 p.; 2020. Disponível em: <https://repositorio.pucgoias.edu.br/jspui/handle/123456789/1375>. Acesso em: 08 mai. 2021.
17. Oliveira TA. Fatores pré-analíticos que requerem novas amostras de exames laboratoriais. Ariquemes. Monografia [Graduação em Farmácia] – Faculdade de Educação e Meio Ambiente, 35 p.; 2019. Disponível em: <http://repositorio.faema.edu.br/bitstream/123456789/2476/1/TCC%20Thayza%20Ara%20c3%baixo%20de%20oliveira.pdf>. Acesso em: 08 mai. 2021.
18. Almatrafi AA. Pre-analytical errors: a major issue in medical laboratory. *Acta Scientific Medical Sciences*, v. 3, n. 2, p. 93-95, fev. 2019.
19. Aragão DP, Araújo, RML. Orientação ao paciente antes da realização de exames laboratoriais. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 51, n. 2, p. 98-102, 2019.
20. Bhavsar M *et al.* Pre-analytical errors in clinical chemistry laboratory of a tertiary care hospital. *International Journal of Scientific Research*, v. 7, n. 4, p. 27-29, abr. 2018.
21. Ramos LR *et al.* Avaliação de variáveis pré-analíticas em exames laboratoriais de pacientes atendidos no Laboratório Central de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. *Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 56, n. 1, p. 1-8, 20 jan. 2020.
22. Guerra KO *et al.* Avaliação da técnica de aperto de punho como interferente pré-analítico na dosagem de potássio. *Revista de Divulgação Científica Sena Aires*, v. 8, n. 4, p. 427-348, out./dez. 2019.
23. Kapil M *et al.* Pre collection variables anthral laboratory testing. *Hematology & Transfusion International Journal*, v. 7, n. 1, p. 5-6, 2019.
24. Baskin L *et al.* Errors in patient preparation, specimen collection, anticoagulant and preservative use: how to avoid such pre-analytical error (second edition). Elsevier, p. 11-26, 2019.
25. Lima IL *et al.* Avaliação da influência de fatores pré-analíticos nas dosagens de testosterona total em homens jovens saudáveis. *Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 57, n. 1, p. 1-6, 20 mar. 2021.
26. Saramela MM, Fernandes TRL. Evaluation of urinalysis pre-analytical phase in a private laboratory of Maringá city, Paraná, Brazil. *Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 57, n. 1, p. 1-6, 20 mar. 2021.
27. Oliveira LS, Santos WL. Esclarecendo dúvidas relacionadas à coleta, conservação e transporte de urina destinada para exame laboratorial. *Revista de Divulgação Científica Sena Aires*, v. 2, n. 5, p. 148-155, ago./dez. 2019.
28. Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. *Clinical Chemistry*, v. 53, n. 7, p. 1338-1342, 2007.
29. Hawkins R. Managing the pre- and post-analytical phases of the total testing Process. In: *Annals of Laboratory Medicine*, v. 32, n. 1, p. 5-16, jan. 2012.
30. Kohn LT *et al.* To err is human: building a safer health system. Washington D.C.: The National Academic Press, 2000.
31. Stankovic AK *et al.* Notas Pré-analíticas BD Diagnósticos, ano 2, n. 2, p. 3-4, 2010.
32. Shcolnik W, Carvalho SMN. Erros laboratoriais e segurança dos pacientes: Revisão sistemática. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Saúde Pública] – Fundação Oswaldo Cruz, 142 p.; 2012.
33. Laposata M, Dighe A. “Pre-pre” and “post-post” analytical error: high-incidence patient safety hazards involving the clinical laboratory. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 45, n. 6, p. 712-719, jun. 2007.
34. Lippi G *et al.* Causes, consequences, detection and prevention of identification errors in laboratory diagnostics. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 47, n. 2, p. 143-153, 2009.

Correspondência

**Natalia Gomes Boechat**

Centro de Aperfeiçoamento Profissional Biomédico (CAPBio)

Avenida Santa Cruz, 1678 - Realengo

Rio de Janeiro - RJ, CEP: 21710-232

E-mail: boechat.nataliag@gmail.com

# Diagnóstico hematológico e molecular das neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL negativas

## Hematological and molecular diagnosis of BCR-ABL negative chronic myeloproliferative neoplasms

Ana Carolina Menezes Mendonça  
Valente<sup>1</sup>

Raquel Tognon Ribeiro<sup>2</sup>

### Resumo

As neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPC) são doenças hematopoiéticas clonais que acometem a linhagem mieloide. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose (MF) são classificadas como NMPC BCR-ABL negativas. O surgimento dessas doenças está correlacionado com fatores genéticos, como mutações nos genes *JAK2*, *MPL* e *CALR* e outras mutações cooperantes que também podem estar presentes, levando ao aparecimento de diferentes fenótipos e prognósticos. A OMS constantemente revisa e atualiza os critérios de classificação, levando em consideração aspectos clínicos, morfológicos e genéticos. As análises laboratoriais, hematológicas e genéticas são de grande importância para o diagnóstico das neoplasias hematológicas, e devem ser realizadas da forma correta para permitir o diagnóstico diferencial entre outras neoplasias e distúrbios reacionais. O presente trabalho tem como objetivo revisar a fisiopatologia das NMPC e relacionar com os achados clínicos, hematológicos e genéticos, visando instruir e atualizar os analistas clínicos para que possam efetivamente contribuir para o diagnóstico dessas doenças, impactando o prognóstico dos pacientes. Ainda, a discussão sobre diagnóstico molecular tem o intuito de chamar a atenção para a constante evolução da área e importância desta para a hematologia.

### Palavras-chave

Transtornos Mieloproliferativos; Neoplasias Hematológicas; Técnicas de Diagnóstico Molecular

## INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMPC) configuram um grupo de doenças clonais da célula-tronco hematopoiética, afetando as células da linhagem mieloide. De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para as neoplasias mieloides publicada em 2016, as NMPC estão divididas em dois grupos: as BCR-ABL positivas, que inclui a leucemia mieloide crônica (LMC), e as BCR-ABL negativas, que inclui a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose primária (MF), classificadas também como cromossomo Philadelphia negativas (Ph-).<sup>(1)</sup> Ademais, também fazem parte do grupo

de NMPC a leucemia neutrofílica crônica (LNC) e a leucemia eosinofílica crônica. A leucemia neutrofílica crônica é caracterizada por leucocitose e hiperplasia da medula óssea, consistindo predominantemente de células granulocíticas (neutrofilia). Na LNC, existe uma associação com a mutação CSF3R e ausência do cromossomo Philadelphia.<sup>(2)</sup> A "leucemia eosinofílica crônica – não especificada de outra forma" – é caracterizada pelo aumento de eosinófilos no sangue periférico, pela ausência do cromossomo Philadelphia e por apresentar um aumento de blastos na medula óssea ou no sangue (mas menos de 20% para excluir leucemia aguda como diagnóstico), e a presença de uma anormalidade citogenética clonal e a NMPC inclassificável,

<sup>1</sup> Programa multicêntrico de pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Juiz de Fora - Campus Governador Valadares, Governador Valadares, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Professora Doutora, Departamento de Farmácia, Instituto Ciências da Vida, Universidade Federal de Juiz de Fora - Campus Governador Valadares, Governador Valadares, MG, Brasil.

Recebido em 20/07/2021

Aprovado em 02/03/2022

DOI: 10.21877/2448-3877.202202168

a qual inclui neoplasias semelhantes à NMPC que, porém, não podem ser claramente classificadas como os outros subgrupos. A mastocitose fazia parte desse grupo na classificação de 2008, no entanto, em 2016, deixou de ser assim considerada em razão das suas características clínicas e patológicas únicas.<sup>(1,2)</sup>

O objetivo do presente trabalho é revisar o diagnóstico das principais NMPC (PV, TE e MF), dando enfoque aos achados laboratoriais e ao diagnóstico diferencial. Inicialmente, será apresentada a epidemiologia e fisiopatologia e, posteriormente, será aprofundada a descrição das características clínicas e laboratoriais – achados no hemograma, mielograma, biópsia de medula óssea e exames genéticos.

## EPIDEMIOLOGIA

A PV, TE e MF são distúrbios mais frequentes em adultos com 50 a 70 anos com sobrevida mediana estimada de 10 a 15, 15 a 20 e 2 a 5 anos, respectivamente.<sup>(3,4)</sup> No âmbito global, a mielofibrose, policitemia vera e trombocitemia essencial apresentam taxas de incidência de 0,3 a 1,5; 1,5 a 2,0 e 1,03 a 2,5 por 100.000/ano, respectivamente.<sup>(5)</sup> Na Europa, um estudo estimou a incidência de PV sendo de 0,68 a 2,6 de 100.000 habitantes, 0,38 a 1,7 para TE e 0,1 a 1,00 para MF e a prevalência estimada foi de 4,96 a 30,00 para PV, 4,00 e 24,00 para TE e 0,51 a 2,7 para MF por 100.000 habitantes.<sup>(3)</sup> Além da existência de uma grande variação nas estimativas de prevalência e incidência, até o momento não há dados referentes à América do Sul na literatura. Um estudo realizado na Coreia avaliando o período de 2004 a 2013 mostrou um aumento da prevalência das NMPC ao longo dos anos. A TE apresentou faixa de prevalência de 4,1 a 9,0 por 100.000, a PV faixa de 2,8 a 5,4 por 100.000 e a MF faixa de 0,5 a 0,9 por 100.000. Assim, as incidências foram entre 2,0 e 3,0 por 100.000 por ano para TE e 1,0 e 1,5 por 100.000 por ano para PV e a MF variou de 0,3 a 0,5 por 100.000 por ano.<sup>(6)</sup> A respeito da etnia, brancos apresentaram a maior incidência geral das NMPC, sendo a PV a mais incidente em brancos. Já os leste-asiáticos apresentaram menor incidência, sendo mais frequente o acometimento por TE. Hispânicos e negros apresentaram maior incidência para PV e TE, respectivamente.<sup>(6)</sup>

Vale ressaltar que em vários países as NMPC são subnotificadas ou classificadas de maneira incorreta, pois a classificação dessas patologias depende de critérios clínicos e laboratoriais que sofreram alterações com a evolução das descobertas a respeito dessas doenças.<sup>(7)</sup>

Apesar da PV e TE serem doenças com sobrevida longa quando comparadas a outras neoplasias hematológicas, o correto diagnóstico faz-se importante porque esses pacientes podem apresentar complicações e evolução para mielofibrose e leucemia mieloide aguda, conforme será abordado adiante.

## FISIOPATOLOGIA

Assim como outras neoplasias, o aparecimento das NMPC está correlacionado com diversos fatores genéticos e ambientais que vão resultar em diferentes fenótipos dessas doenças. Cada uma das NMPC apresenta características mais predominantes quando avalia-se a medula óssea e o sangue periférico, com expectativa de vida e prognóstico diferentes. Porém elas compartilham muitas características relacionadas às disfunções celulares das células hematopoiéticas. Diferentes mutações somáticas adquiridas são responsáveis pela expansão clonal de células-tronco hematopoiética nas NMPC e estão envolvidas em genes relacionados à proliferação e sobrevivência celular. Elas apresentam grande relevância, pois resultam em uma grande variabilidade de manifestações clínicas patológicas.<sup>(2,8)</sup>

As mutações nos genes *JAK2*, *MPL* e *CALR* são as mutações atualmente conhecidas como responsáveis pelo estabelecimento do fenótipo das NMPC e, por essa razão, são chamadas de “*driver mutations*”.<sup>(9,10)</sup> A presença de apenas uma dessas mutações genéticas é o suficiente para o surgimento da patologia, pois todas ativam constitutivamente as mesmas vias a jusante, a via JAK/STAT, a via PI3K/AKT/mTOR, RAS e a via MAPK/ERK, que atuam aumentando a proliferação celular e resistência à apoptose. Dessa forma, culminam em um fenótipo hiperproliferativo e associam-se clinicamente a um risco aumentado de complicações trombóticas, hemorrágicas e evolução à transformação fibrótica ou leucêmica.<sup>(8,11,12)</sup> Ademais, outras mutações genéticas adquiridas em diversos genes, como *TET2*, *CBL*, *ASXL1*, *SH2B3*, *SF3B1*, *U2AF1*, *TP53*, *IDH2* e *EZH2*, também podem ser encontradas em pacientes com NMPC, sendo consideradas mutações cooperantes, e podem contribuir para a progressão da doença e transformação leucêmica.<sup>(10)</sup>

A identificação em 2005 da mutação adquirida *JAK2V617F* permitiu o melhor entendimento da patogênese dessas doenças. A *JAK2V617F* é uma mutação somática pontual que consiste na substituição de uma guanina por timina, no éxon 14 do gene *JAK2*, que acarreta a substituição do aminoácido valina por fenilalanina na posição 617 da proteína. A proteína JAK2 é uma tirosina quinase envolvida na sinalização celular que possibilita a transdução de sinal de diversos receptores de fator de crescimento nas células hematopoiéticas em resposta às citocinas. Por exemplo, a proteína JAK2 atua nas vias disparadas pelos receptores de eritropoetina (EPOR), receptor de trombopoetina (MPL) e receptor de fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSFR).<sup>(8,13)</sup>

Outra alteração genética importante para as NMPC são as mutações no gene *MPL*, descrita em 2006. O gene *MPL* codifica uma proteína que é homóloga a outros membros da superfamília de receptores hematopoiéticos, o receptor de trombopoetina (TPO). Seu ligante, a TPO, atua

como regulador da megacariocitopoiese e da formação de plaquetas. Há diversas mutações descritas no gene *MPL*, mas as principais foram identificadas no éxon 10, a mutação da troca do aminoácido triptofano por leucina W515L ou lisina W515K. Essas mutações acarretam a ativação constitutiva do receptor de TPO e fosforilação das vias de sinalização citadas anteriormente que irão conduzir à proliferação exacerbada de megacariócitos na medula óssea com consequente trombocitose no sangue periférico.<sup>(12,13)</sup>

Em 2013, foram identificadas em pacientes *JAK2V617F* negativos mutações somáticas no gene da calreticulina (*CALR*), que codifica uma proteína que participa da regulação do cálcio intracelular. Acredita-se que a proteína possua atividade relacionada a proliferação, migração, adesão e apoptose celular, através da regulação do cálcio.<sup>(14)</sup> As mutações somáticas que atingem o gene *CALR* são do tipo indel, ocorrendo inserção e/ou deleção de pares de bases (pb) no éxon 9 do gene, sendo divididas em dois tipos: a *CALRdel52* (deleção de 52pb) ou tipo 1 e *CALRins5* (inserção de 5pb) ou tipo 2.<sup>(12)</sup>

A identificação das mutações *JAK2*, *CALR* e *MPL* é um dos critérios principais para o diagnóstico das NMPC.<sup>(1)</sup> Um estudo realizado com 162 pacientes, por Porto-Soares,<sup>(9)</sup> 93,5% dos 61 pacientes com PV apresentaram mutação em *JAK2V617F* e 1,6% mutação em *JAK2* éxon 12. Dos 50 pacientes com TE, 48% apresentaram mutação em *JAK2V617F*, 22% em *CALR* e 22% eram triplo negativo. Nos 51 com MF, 61% tinham a mutação *JAK2V617F*, 25% em *CALR* e 2% eram triplo negativo; nenhum paciente apresentou mutação em *MPL*.<sup>(9)</sup> Geralmente, a mutação *JAK2V617F* no éxon 14 pode ser encontrada em cerca de 70% das NMPC, está presente em cerca de 95% dos pacientes com PV e em 50% a 60% dos pacientes com TE e MF.<sup>(9,10)</sup> Nos poucos casos de PV *JAK2V617F* negativa, ocorrem mutações no éxon 12 de *JAK2* em 3% a 5% dos casos de PV. A mutação no éxon 9 do gene da calreticulina (*CALR*) pode ocorrer em 20% a 25% na TE e 25% a 36% na MF. A mutação no gene do receptor da trombopoetina (*MPL*) ocorre em cerca de 3% a 20% na TE e 3% a 10% na MF. Aproximadamente 5% a 15% dos pacientes com MF ou TE podem ser “triplo negativos”, ou seja, não apresentar nenhuma das três mutações.<sup>(8,10,14)</sup> Mais recentemente, um estudo mostrou que pacientes com baixa carga alélica de *JAK2V617F* também podem apresentar mutações nos genes *MPL* e *CALR*, aumentando a complexidade genética.<sup>(15)</sup>

É possível que ocorram diferentes tipos de combinações de mutações *driver* e cooperantes em uma célula, e isso implica a grande diversidade fenotípica encontrada em pacientes com NMPC. Além disso, é possível que pacientes que possuem o mesmo perfil genômico apresentem diferentes fenótipos, pois as interações das células não se dão apenas entre as múltiplas mutações que podem acometê-las; a interação com o microambiente também irá refletir no

fenótipo.<sup>(12)</sup> Ainda assim, é importante identificar as mutações *driver* e cooperantes, bem como suas correlações com o fenótipo e resposta ao tratamento. Por exemplo, o aumento na carga alélica de *JAK2V617F* está correlacionado com a progressão para MF. Além disso, a presença da mutação em *JAK2* aumenta o risco de eventos trombóticos. Dessa forma, a carga do alelo mutante *JAK2V617F* pode ajudar a determinar o fenótipo da doença.<sup>(10)</sup> Rumi *et al.* relataram que a presença da mutação *CALR* apresenta um risco de trombose menor quando comparado com o da mutação *JAK2V617F* para os pacientes com PV, por essa razão aparenta oferecer proteção.<sup>(13)</sup>

## CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DAS NMPC BCR-ABL NEGATIVAS

A PV caracteriza-se laboratorialmente por valores no hemograma que excedem o limite superior do intervalo de referência, apresentando aumento da massa eritrocitária, aumento na concentração de hemoglobina e hematócrito, assim como nas contagens de leucócitos e plaquetas. Clinicamente, pode apresentar-se inicialmente assintomática, mas as alterações hematológicas, inflamatórias e da microvasculatura levam ao aparecimento de sinais e sintomas como fraqueza, cefaleia, eritromelalgia, distúrbios visuais, fadiga, dispneia, perda de peso, prurido, esplenomegalia, sangramento e trombose, sendo a fadiga o sintoma mais comum em PV, apresentando-se em cerca de 85% dos pacientes em um estudo realizado com 1.179 pessoas.<sup>(16)</sup> Vale ressaltar que ocorrem variações nos sintomas de acordo com o gênero, apesar do gênero não apresentar associação com a classificação de risco. Além disso, alguns sintomas (fadiga, sudorese noturna, febre, dor óssea e prurido) podem estar associados a elevação dos níveis de citocinas em paciente com PV.<sup>(16)</sup>

Segundo a OMS,<sup>(1)</sup> o diagnóstico de PV requer a presença dos três critérios principais ou a presença dos dois primeiros critérios principais e o critério secundário.<sup>(1)</sup> Como critérios principais, considera-se (1) os valores de hemoglobina acima de 16,5g/dL para homens e acima de 16g/dL ou hematócrito acima de 49% para homens e 48% para mulheres, respectivamente); (2) biópsia da medula óssea com hiperplasia das linhagens eritrocítica, granulocítica e megacariocítica (pan-mielose), com megacariócitos pleomórficos; (3) presença da mutação *JAK2V617F* ou *JAK2* éxon 12. Como critério secundário, considera-se o nível de eritropoetina sérica subnormal.<sup>(1)</sup> Ressalta-se que os valores de hemoglobina e hematócrito estabelecidos em 2016 foram menores do que os estabelecidos na classificação de 2008, o que teve bastante impacto no diagnóstico dos casos de PV que anteriormente não recebiam esse diagnóstico.<sup>(2)</sup>

No caso de encontrar apenas dois dos critérios principais é necessário o preenchimento do critério secundário

para possibilitar o diagnóstico diferencial de policitemias secundárias. O achado de policitemia (aumento do número de eritrócitos) pode ser secundário ao aumento da produção de eritropoetina (EPO), decorrente, por exemplo, de situações que provocam hipóxia que ocasionam aumento compensatório da EPO, como doenças cardiovasculares, tabagismo, doença renal e alta altitude, ou ainda em decorrência do uso de medicamentos, andrógenos ou existência de tumores.<sup>(11)</sup> No caso da policitemia secundária, a história clínica e os valores bioquímicos dos pacientes serão diferentes. Para distinguir as condições reativas das condições neoplásicas, além de observar as diferenças morfológicas e o grau de aumento da hematopoese (pan-mielose),<sup>(17)</sup> realiza-se a dosagem da EPO, já que o nível de eritropoetina é suprimido na policitemia vera. Essa distinção entre PV e policitemia secundária tem impacto sobre o tratamento direcionado à causa do aumento eritrocitário. Por exemplo, na policitemia secundária a realização da flebotomia terapêutica pode ser prejudicial.<sup>(11)</sup>

O exame de medula óssea na PV mostra aumento da celularidade medular de todas as séries eritroide, granulocítica e megacariocítica (pan-mielose). No entanto, alguns pacientes em fases iniciais de PV e MF podem não apresentar hiperplasticidade, se assemelhando mais à TE.<sup>(4)</sup> Assim, é necessário avaliar também a morfologia dos megacariócitos, conforme detalhado adiante, e também avaliar a presença ou não de displasias para se diferenciar de outras neoplasias mieloides.

Ainda, para o diagnóstico diferencial de distúrbios que cursam com aumento das contagens das células sanguíneas é de grande importância realizar a pesquisa do gene de fusão BCR-ABL para se descartar o diagnóstico de LMC; se negativo, prossegue-se com os testes moleculares para identificar presença de mutações nos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL* que auxiliarão na confirmação do diagnóstico e prognóstico.<sup>(18)</sup>

É possível verificar também algumas alterações bioquímicas na PV, mas são alterações inespecíficas, como hiperuricemia e a hiperuricosúria (em  $\geq 80\%$  dos pacientes), hiperbilirrubinemia, VHS diminuída, aumento da fosfatase alcalina de leucócitos (LAP) e lactato desidrogenase sérica (LDH).<sup>(17)</sup> Vale ressaltar que esses testes não estão entre os critérios diagnósticos para o diagnóstico de PV.

Apesar da expectativa de sobrevida em torno de 10 a 15 anos, os eventos tromboembólicos apresentam grande impacto na qualidade de vida do paciente com PV. Além disso, a doença pode evoluir para leucemia mieloide aguda (transformação em leucêmica) e para mielofibrose pós-PV (secundária).<sup>(6,11)</sup> A transformação leucêmica ocorre em um tempo médio de 4,6 a 19 anos a partir do diagnóstico inicial de PV,<sup>(2)</sup> e leva a uma expectativa de sobrevida de apenas 1,5 a 2,5 meses em pacientes não tratados.<sup>(16)</sup> Alguns podem progredir para um quadro de MF antes de ter transformação leucêmica, sendo que a progressão para

MF ocorre em média 8,5 a 20 anos a partir do diagnóstico. Fatores de risco como idade avançada, leucocitose, excesso de citocinas e a presença de mutações exercem influência na progressão da doença.<sup>(2,16)</sup>

Na TE, 1/3 dos pacientes podem ser assintomáticos e os demais apresentam aumento persistente de plaquetas no sangue periférico  $> 450 \times 10^9/L$ . Os pacientes podem apresentar quadro clínico variável, sintomas como síncope, dor torácica atípica, prurido, perda de peso, distúrbios visuais, fraqueza, parestesias de mãos e pés, esplenomegalia, quadros hemorrágicos e eventos trombóticos.<sup>(19)</sup>

De acordo com a OMS (2016), o diagnóstico de TE requer o encontro de todos os quatro critérios principais, ou os primeiros três critérios principais mais o critério secundário. Os critérios principais são: (1) número aumentado de plaquetas  $> 450 \times 10^9/L$ ; (2) alteração da celularidade na medula óssea, proliferação principalmente da linhagem de megacariócitos com núcleos hiperlobulados; (3) não atender aos critérios da OMS para BCR-ABL1, LMC, PV, MF, síndromes mielodisplásicas ou outras neoplasias mieloides; (4) e a presença de uma das mutações *JAK2*, *CALR*, ou *MPL*. O critério secundário é a presença de um marcador clonal (por exemplo a mutação *MPLW515K/L*) ou ausência de trombocitose reativa.<sup>(1)</sup>

O diagnóstico de TE muitas vezes se dá incidentalmente quando pacientes apresentam eventos tromboembólicos. Para chegar ao diagnóstico de TE tem que ser feita a exclusão de causas reativas comuns de trombocitose. A trombocitose reativa está relacionada com condições infecciosas, inflamatórias, deficiência de ferro, síndromes hereditárias, hemorragia aguda e reações a medicamentos, sendo que todos se caracterizam por serem processos transitórios.<sup>(11)</sup>

A biópsia de medula óssea na TE mostra principalmente uma proliferação aumentada da linhagem megacariocítica, com megacariócitos grandes com citoplasma abundante, maduros e com núcleos hiperlobulados, aparecendo geralmente agrupados ou dispersos pela medula. Raramente pode haver um aumento em menor grau das fibras de reticulina.<sup>(1,20)</sup>

O curso clínico da TE caracteriza-se por complicações vasculares que se relacionam à morbimortalidade, estando associadas ao maior risco de trombose venosa profunda e embolia pulmonar.<sup>(21)</sup> A evolução de TE para MF ou LMA ocorre em cerca de 0,8% a 12,3% e 0,7% a 5,8%, respectivamente.<sup>(19)</sup>

A MF apresenta como característica laboratorial a presença de anemia com poiquilocitose (principalmente dacriócitos) e leucoeritroblastose (presença de células jovens granulocíticas e eritrocíticas). Na MF pré-fibrótica esses achados podem não ser tão evidentes, podendo o paciente apresentar aumento da contagem de plaquetas e leucócitos, evoluindo posteriormente para leucopenia e trombocitopenia na fase avançada da doença (fibrótica).<sup>(22)</sup>

Com relação às manifestações clínicas, a MF é caracterizada por sinais e sintomas como fraqueza, cansaço, palpitação e dispnéia. É comum o paciente apresentar também esplenomegalia e hepatomegalia resultantes da hematopoiese extramedular. Sintomas de cansaço, mal-estar, perda ponderal, infecções recorrentes e estados febris estão correlacionados com a progressão da doença para o estado fibrótico causado pela diminuição da celularidade da medula.<sup>(2)</sup>

Os critérios da OMS<sup>(1)</sup> para o diagnóstico da MF consideram os achados na biópsia de medula óssea, tanto no que diz respeito às atipias dos megacariócitos, como o grau de fibrose, a ausência de critérios para LMC, PV, TE, síndromes mielodisplásicas ou outras neoplasias mieloides, e à presença de mutação *JAK2*, *CALR* ou *MPL* ou presença de outro marcador clonal. O grau de fibrose menor ou igual a 1 caracteriza a fase pré-fibrótica da doença, enquanto grau igual ou maior que 2 caracteriza a fase fibrótica. Além desses critérios maiores, a OMS também estabelece os critérios secundários, sendo necessário que o paciente preencha todos os três critérios principais e pelo menos um critério secundário. Os critérios secundários são: presença de anemia não relacionada a outra comorbidade, leucocitose  $> 11 \times 10^9/L$  esplenomegalia palpável, e LDH acima dos limites normais, sendo que para a fase fibrótica acrescenta ainda um outro critério secundário que é a presença de leucoeritroblastose.<sup>(1)</sup>

A diferenciação de pré-MF e MF fibrótica é importante por apresentarem quadros distintos nos pacientes e diferentes prognóstico. Os achados no perfil mutacional e morfologia celular da MF na fase pré-fibrótica se assemelham aos encontrados na TE, por isso é necessário diferenciar ambos. A diferença se dá pelas características morfológicas na medula óssea e a clínica da doença. A TE apresenta megacariócitos maiores e maduros e tem melhor sobrevida e menor taxa de progressão leucêmica ou fibrótica, enquanto na fase pré-fibrótica da MF os megacariócitos se apresentam mais agrupados (em *clusters*) com núcleos hipercrômicos e irregulares.<sup>(11,22)</sup>

Com o estabelecimento da fibrose na medula óssea, a MF apresenta, na maioria das vezes, um mielograma “seco”, sendo necessária a biópsia da medula. A medula óssea apresenta proliferação de megacariócitos atípicos, com razão núcleo-citoplasma aberrante, núcleos hipercrômicos e irregulares e presença de *cluster* de megacariócitos. A medula apresenta também fibrose grau 2 ou maior, com fibras de reticulina e colágeno.<sup>(1)</sup>

Com relação às alterações laboratoriais bioquímicas é possível ocorrer o aumento de LDH, que inclusive é um critério secundário para classificação da MF, e ácido úrico para acima do limite normal superior do intervalo de referência.<sup>(23)</sup> O LDH foi encontrado aumentado também em outras NMPC, estando correlacionado com o aumento de leucócitos possivelmente por ter propriedade na renovação celular.<sup>(24)</sup>

Com a progressão da doença, aumentam os blastos no sangue periférico e na medula óssea, sendo que uma porcentagem acima de 20% de blastos indica transformação para leucemia mieloide aguda (LMA). Assim, a avaliação de blastos no sangue periférico auxilia no prognóstico de pacientes com MF, uma vez que a presença de blastos 10% a 19% define uma fase acelerada da doença.<sup>(22)</sup>

A MF apresenta maior taxa de transformação leucêmica quando comparada às outras NMPC BCR-ABL negativas. A transformação leucêmica causa morte de aproximadamente 20% dos pacientes com MF e fibrose medular.<sup>(25)</sup> Além da progressão para leucemia, podemos listar como causa de mortalidade desses pacientes a ocorrência de distúrbios cardiovasculares, infecções e sangramentos, esses dois últimos resultantes das citopenias.<sup>(22)</sup>

Na Figura 1, encontram-se ilustrados os principais achados na PV, TE e MF, de acordo com a presente revisão de literatura.

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR E AS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

O avanço científico e tecnológico permitiu o desenvolvimento de técnicas moleculares que auxiliaram na descoberta de alterações moleculares recorrentes em doenças específicas. Esse conhecimento teve um impacto direto no diagnóstico, prognóstico e definição da terapia para diversas doenças.<sup>(26)</sup> O desenvolvimento das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e de sequenciamento genético com maior eficiência, maior sensibilidade e menor custo tem permitido que essas técnicas não sejam mais utilizadas somente em pesquisas mas passem a ser cada vez mais utilizadas na prática clínica.<sup>(26,27)</sup>

A medicina de precisão tem sido utilizada em diversas áreas, mas podemos destacar seu emprego na oncologia. Por exemplo, podemos citar o emprego de pequenos painéis de Sequenciamento de Nova Geração (Next Generation Sequencing, NGS) que vêm sendo utilizados para possibilitar melhor classificação e definição da terapia do câncer de mama.<sup>(27)</sup>

Para as doenças hematológicas a identificação das diversas alterações moleculares e a utilização desse conhecimento para o diagnóstico, classificação, prognóstico, definição de terapia e monitoramento do tratamento teve uma evolução rápida e expressiva devido à facilidade de obtenção das amostras e estudo das células, quando comparadas aos tumores sólidos.<sup>(26)</sup>

Em se tratando das neoplasias mieloides, é interessante destacar que, em 2001, a OMS publicou o primeiro documento de classificação das neoplasias hematológicas inserindo critérios genéticos para a classificação da LMA, que passaram posteriormente a serem considerados na classificação de 2008 e de 2016 também para as outras entidades, como as NMPC.<sup>(1,28)</sup> Como consequência, além do uso da

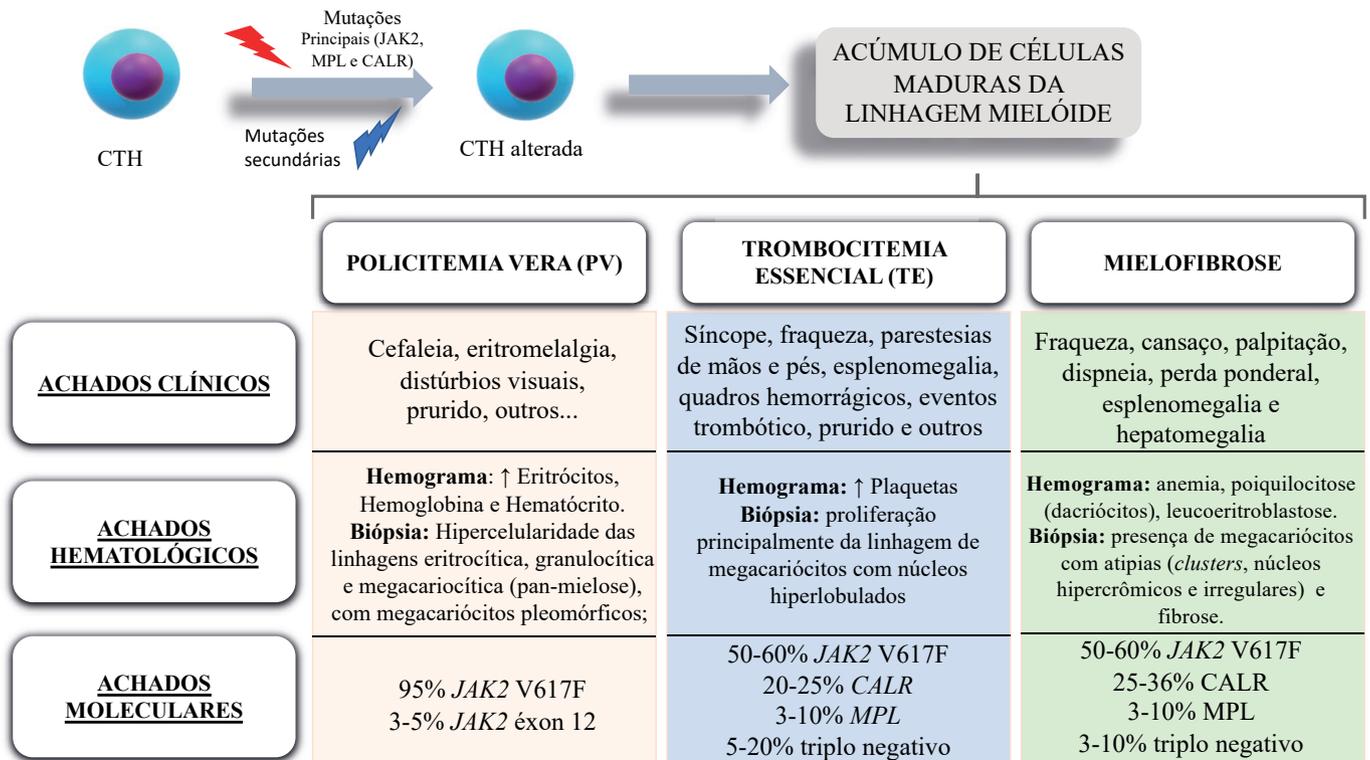


Figura 1. Representação esquemática das alterações moleculares que ocorrem na célula tronco hematopoiética (CTH) e principais achados clínicos, morfológicos e moleculares na policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose (MF).

Fonte: Próprio Autor, com base nas informações apresentadas no artigo.

imunofenotipagem por citometria de fluxo e de avaliação das alterações cromossômicas por cariótipo convencional ou molecular (FISH, hibridização *in situ* fluorescente), o emprego das técnicas de PCR e NGS para detectar as alterações genéticas recorrentes se tornam imprescindíveis para o diagnóstico das neoplasias mieloides.<sup>(26)</sup>

A leucemia mielóide aguda (LMA) é, portanto, um bom exemplo de como o conhecimento sobre as alterações genéticas impactou na classificação, visto que existe uma categoria específica de classificação para as LMA com as alterações genéticas recorrentes. Para essa leucemia, é necessário pesquisar alterações nos genes que levam à superativação de vias envolvidas na proliferação e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas. As mutações podem ser em genes relacionados a modificações epigenéticas (*TET2*, *IDH1 / IDH2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *KMT2A*, *EZH2*), vias de sinalização (*FLT3*, *KRAS*, *NRAS*, *KIT*), genes supressores de tumor (*TP53*, *WT1*), *splicing* de RNA (*TP3B1*), mutação da nucleofosmina (*NPM1*) e genes que codificam para diferenciação da transcrição (*CEBPA*, *RUNX1*).<sup>(29)</sup>

Também podemos destacar a importância do diagnóstico molecular para outras neoplasias mieloides como a síndrome mielodisplásica (SMD), para a qual podem

ser pesquisados genes como *SF3B1*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *RUNX1*, *SRSF2*, *TET2*, *TP53* e *U2AF*, para a leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), para a qual os genes *ASXL1*, *CBL*, *EZH2*, *NRAS/KRAS*, *RUNX1*, *SETBP1*, *SRSF2* e *TET2* podem ser analisados. Como já mencionado anteriormente, para a leucemia mielóide crônica (LMC), a pesquisa do gene de fusão BCR-ABL é essencial para o diagnóstico e pode ser feita por técnicas como análise do cariótipo para detectar o cromossomo Ph presente em 90% a 95% dos pacientes ou técnicas moleculares como a FISH ou por PCR em tempo real, que também é utilizada para monitoramento terapêutico.<sup>(30)</sup>

Para as NMPC, como já mencionado, é necessário realizar pesquisa de mutações nos genes *JAK2*, *MPL* e *CALR*. A detecção dessas mutações é bastante útil, pois muitas vezes pode ser difícil diferenciar a LMC, a PV, a TE e a MF em estágios iniciais apenas por critérios morfológicos e até mesmo pode ser difícil de diferenciar de uma leucocitose reativa intensa com desvio à esquerda (benigna).<sup>(18)</sup>

Na PV, como 95% dos pacientes apresentam uma mutação *JAK2*V617F e os outros 5% apresentam outras mutações no mesmo gene *JAK2*, o teste para mutação neste gene possui um valor diagnóstico muito grande.<sup>(26)</sup> Por isso, na

classificação OMS essa mutação é incluída como critério maior. Em casos em que o paciente preenche todos os critérios exceto mutação na *JAK2*, é necessário comprovar que a EPO está normal ou diminuída para se excluir policitemia secundária.<sup>(1)</sup> Na TE e na MF, cerca de 50% dos pacientes apresentam a mutação na *JAK2V617F*. Os demais podem apresentar mutações nos genes *MPL* e *CALR*, como descrito anteriormente.<sup>(10)</sup>

Entretanto, é importante notar que várias mutações são comuns entre as neoplasias mieloides e, ainda, que os resultados precisam ser interpretados com cautela devido à chamada CHIP, sigla em inglês para “Hematopoese Clonal de Potencial Indeterminado”, em que o indivíduo já mais idoso apresenta mutações em genes como *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *JAK2*, *TP53*, *SF3B1*, *SRSF2* e *CBL* devido à ocorrência de hematopoiese clonal. No entanto, não significa que ele irá desenvolver obrigatoriamente uma neoplasia mielóide, apesar de terem um risco 10 a 15 vezes maior. Indivíduos saudáveis normalmente apresentam frequência alélica variante (VAF) menor que 30%, visto que VAF > 50% e com mais de uma mutação coexistindo em paciente mais jovem sugerem a presença da doença.<sup>(18)</sup>

Sistemas de pontuação de prognóstico utilizam a identificação das mutações nos pacientes para prever o prognóstico das NMPC com foco específico em cada fenótipo dessas doenças. Por exemplo, a carga alélica de *JAK2V617F* e a presença das mutações de alto risco, *ASXL1*, *SRSF2*, *IDH2*, *SH2B3*, *SF3B1*, *U2AF1* e *TP53*, têm se mostrado associadas a um pior prognóstico.<sup>(10)</sup> Pacientes triplo negativos, isto é, negativos para mutações nos genes *JAK2*, *MPL* e *CALR*, apresentam ainda pior prognóstico quando comparados aos pacientes com mutações nesses genes e, nestes casos, é importante investigar mutações nos genes *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2* e *SF3B1*.<sup>(2,29)</sup>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude dos aspectos abordados, a avaliação clínica, morfológica e genética é de extrema importância para o diagnóstico diferencial da PV, TE e MF e os achados nessas avaliações têm impacto direto no prognóstico e tratamento dos pacientes. Além disso, permitem um acompanhamento da evolução dos mesmos. Por sua vez, o avanço científico e tecnológico tem contribuído para a evolução do conhecimento sobre a fisiopatologia, a identificação de mutações e alvos moleculares, refinamento dos critérios diagnósticos e dos sistemas de escore de prognóstico das NMPC. Importante ressaltar que, com o rápido progresso científico na área, torna-se imprescindível que os analistas dos laboratórios de análises clínicas mantenham-se atualizados e busquem se aperfeiçoar nas técnicas moleculares.

## Abstract

*The Chronic Myeloproliferative Neoplasms (MPN) are hematopoietic disease that affect the myeloid lineage cells. According to WHO, the Polycythemia vera (PV), Essential Thrombocythemia (ET) and Myelofibrosis (MF) are classified as BCR-ABL negative neoplasms. The occurrence of these diseases is correlated with genetics factors, as mutations in the JAK2, MPL e CALR genes and other cooperative mutations that may also be present, leading to different phenotypes manifestations and prognostics. WHO revises and updates constantly these diseases' classification criteria, considering clinical, morphological and genetic aspects. Laboratory tests, both hematological and genetic, have a key rule at these diseases' diagnosis and must be performed correctly in order to ensure a differential diagnosis from other neoplasms and reactive disorders. This manuscript aims to revise the MPN's physiopathology linking it to clinical, hematological and genetical findings, aiming to instruct and update clinical analysts so they can contribute to those diseases' diagnostic, impacting the patients' prognostics. Furthermore, the considerations about molecular diagnostics have the intention of emphasize the constant evolution of this subject and its importance to hematology.*

## Keywords

*Myeloproliferative Disorders; Hematologic Neoplasms; Molecular Diagnostic Techniques*

## REFERÊNCIAS

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Beau MML *et al*. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May;127(20):2391-2405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka MH, Vannucchi AM, Guglielmelli P, *et al*. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in depth discussion. *Blood Cancer J*. 2018; 8(15):1-11. doi: 10.1038/s41408-018-0054-y.
- Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union *Eur J Haematol*. 2013 Dec;92(4), 289–97. doi:10.1111/ejh.12256.
- Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017 Feb;129(6):680-92. doi:10.1182/blood-2016-10-695957.
- Harrison CN, Koschmieder S, Foltz L, Guglielmelli P, Flindt T, Koehler M, *et al*. The impact of myeloproliferative neoplasms (MPNs) on patient quality of life and productivity: results from the international MPN Landmark survey. *Ann Hematol*. 2017 Aug;96(10):1653–65. doi: 10.1007/s00277-017-3082-y.
- Byun JM, Kim YJ, Youk T, Yang JJ, Jongha Yoo J, Park TS. Real world epidemiology of myeloproliferative neoplasms: a population based study in Korea 2004–2013. *Ann Hematol*. 2016 Dec; 96(3): 373-81 doi: 10.1007/s00277-016-2902-9
- Titmarsh GJ, Duncombe AS, McMullin MF, O'Rorke M, Mesa R, De Vocht F, *et al*. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. *Am J Hematol*. 2014 Feb;89(6):581-7. doi:10.1002/ajh.23690.
- Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017 Feb;129(6):667-79. doi:10.1182/blood-2016-10-695940.
- Porto-Soares MA, de Oliveira RD, Cortopassi GM, Machado-Neto JA, Palma LC, de Figueiredo-Pontes LL, *et al*. Clinical and molecular profile of a Brazilian cohort of patients with classical BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2019;42(3):1-7. doi:10.1016/j.htct.2019.07.008.

10. Grabek J, Straube J, Bywater M, Lane SW. (2020). MPN: The Molecular Drivers of Disease Initiation, Progression and Transformation and their Effect on Treatment. *Cells*. 2020; 9(8):1-32. doi:10.3390/cells908190.
11. Wong WJ, Pozdnyakova O. Myeloproliferative neoplasms: Diagnostic workup of the cythemic patient. *Int J Lab Hematol*. 2019 Feb;41(Suppl. 1):142–150. doi: 10.1111/ijlh.13005.
12. Lee J, Godfrey AL, Nangalia J. Genomic heterogeneity in myeloproliferative neoplasms and applications to clinical practice. *Blood reviews*. 2020;42. doi: 10.1016/j.blre.2020.100708.
13. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martínez-Trillos A, Casetti I, *et al*. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(7):1062–9. doi: 0.1182/blood-2014-05-578435.
14. How J, Hobbs GS, Mullally A. Mutant calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2019 Dec; 134(25): 2242–8. doi:10.1182/blood.2019000622.
15. Makarik TV, Abdullaev AO, Nikulina EE, Treglazova SA, Stepanova EE, Subortseva IN, *et al*. Low JAK2 V617F Allele Burden in Ph-Negative Chronic Myeloproliferative Neoplasms Is Associated with Additional CALR or MPL Gene Mutations. *Genes (Basel)*. 2021 Apr;12(4):559. doi: 10.3390/genes12040559.
16. Cuthbert D, Stein BL. Polycythemia vera-associated complications: pathogenesis, clinical manifestations, and effects on outcomes. *J Blood Med*. 2019;10:359-71. doi:10.2147/jbm.s189922.
17. Thiele J, Kvasnicka HM, Muehlhausen K, Walter S, Zankovich R, Diehl V. Policitemia rubra vera versus policitemia secundária. Uma avaliação clínico-patológica de características distintivas em 199 pacientes. *Pathol. Res. Pract*. 2001;197(2):77-84. doi: 10.1078 / 0344-0338-5710013.
18. Zuo Z, Li S, Xu J, You MJ, Khoury JD, Yin CC. Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: laboratory workup in the era of next-generation sequencing. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019 Aug; 14(5): 376-85. doi:10.1007/s11899-019-00534-8.
19. Tefferi A; Pardanani A. Essential Thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2019;381(22):2135- 44. doi: 10.1056 / NEJMcp1816082.
20. Fujiwara H. Histological evaluation of myeloproliferative neoplasms. *J Clin Exp Hematop*. 2018;58(2):45-50. doi: 10.3960/jslr.18006.
21. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2017 Jan;92(1):94-108. doi: 10.1002/ajh.24607.
22. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2021;96:145 - 162. doi: 10.1002/ajh.26050.
23. Shah S, Mudireddy M, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, Pardanani A, *et al*. Marked elevation of serum lactate dehydrogenase in primary myelofibrosis: clinical and prognostic correlates. *Blood Cancer J*. 2017. 7(12):657 doi:10.1038/s41408-017-0024-9.
24. Mudireddy M, Barraco D, Hanson CA, Pardanani A, Gangat N, Tefferi A. The prognostic relevance of serum lactate dehydrogenase and mild bone marrow reticulin fibrosis in essential thrombocythemia. *Am J Hematol*. 2017 May;92(5):454-459. doi: 10.1002/ajh.24689.
25. Masarova L, Bose P, Pemmaraju N, Daver NG, Zhou L, Pierce S, *et al*. Prognostic value of blasts in peripheral blood in myelofibrosis in the ruxolitinib era. *Cancer*. 2020 Oct;126(19):4322-31. doi: 10.1002/cncr.33094.
26. Ramkissoon LA, Montgomery ND. Applications of next-generation sequencing in hematologic malignancies. *Hum Immunol*. 2021 Feb 26:S0198-8859(21)00046-X. doi: 10.1016/j.humimm.2021.02.006.
27. Zhong Y, Xu F, Wu J, Schubert J, Li MM. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Ann Lab Med*. 2021 Jan;41(1):25-43. doi: 10.3343/alm.2021.41.1.25.
28. Hebeda KM, Fend F. Changed concepts and definitions of myeloproliferative neoplasms (MPN), myelodysplastic syndromes (MDS) and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in the updated 2008 WHO classification. *J Hematop*. 2009 Sep 26;2(4):205-10. doi: 10.1007/s12308-009-0048-6.
29. ÖZ Puyan F, Alkan S. The Progress of Next Generation Sequencing in the Assessment of Myeloid Malignancies. *Balkan Med J*. 2019; 36(2):78-87. doi: 10.4274/balkanmedj.galenos.2018
30. Aguilera-Diaz A, Vazquez I, Ariceta B, Mañú A, Blasco-Iturri Z, Palomino-Echeverría S, *et al*. Assessment of the clinical utility of four NGS panels in myeloid malignancies. Suggestions for NGS panel choice or design. *PLoS One*. 2020 Jan 24;15(1):1-24. doi: 10.1371/journal.pone.0227986.

Correspondência

**Raquel Tognon Ribeiro**

Universidade Federal de Juiz de Fora - Campus Governador Valadares. Departamento de Farmácia.

Rua São Paulo, 745 - Centro.

Governador Valadares, MG. CEP: 35.010-180

E-mail: raquel.ribeiro@unifal-mg.edu.br

# Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavity of professionals in a surgical center

## *Staphylococcus aureus* multirresistentes isolados de mãos e cavidade nasal de profissionais de um centro cirúrgico

Kauana Nadine Rangel de Souza Brock<sup>1</sup>

Eliandra Mirlei Rossi<sup>2</sup>

Larissa Kochhann Menezes<sup>3</sup>

Jessica Fernanda Barreto Honorato<sup>4</sup>

Shara Sakira Becker Kessler<sup>5</sup>

Natacha Cristina Melz Zappan<sup>6</sup>

Priscila Rodrigues Garrido Bratkowski<sup>7</sup>

### Abstract

Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* has often been found in the hands and nasal cavity of human beings and is among the leading causes of nosocomial infections. Our objective was to verify the presence of *S. aureus* in the hands and nasal cavity of 27 professionals from the operating room in a hospital. The samples were collected with a sterile swab previously moistened with saline solution and later were spread in plates containing Salt Mannitol agar. Characteristic colonies were confirmed by Gram-staining and biochemical tests. The Antibiotic susceptibility test was performed using the disk diffusion technique described by Kirby-Bauer. 40.7% (11) of the professionals have *S. aureus* in the nasal cavity. 14.81% (4) of the professionals presented *S. aureus* in their hands in only one of the collections. Of the 36 strains of *S. aureus* isolated, 11.11% are methicillin resistant, 77.8% showed resistance to penicillin, amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam and 58.3% were multidrug resistant. The sensitivity of strains observed mainly to ciprofloxacin (97.22%) and nitrofurantoin (97.22%). The results allow us to conclude that the number of *S. aureus* carriers is relatively high and that the isolated strains are multidrug-resistant, mainly for the antibiotics of first choice used to control common infections.

### Keywords

*Staphylococcus aureus*; Health Personnel; Antimicrobial resistance; Hospital infection

## INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus*, which is a commensal and human pathogen, is commonly found in the nasal cavity, however it can also colonize the skin and mucosa. The bacterium is responsible for a wide variety of infections, ranging from skin infections to life-threatening bacteremia infections.<sup>(1)</sup>

This bacterium is a pathogen that evolved to acquire genes and characteristics associated with increased antibiotic resistance, virulence and transmissibility.<sup>(2)</sup>

Several studies have been carried out in hospitals around the world to demonstrate the incidence of *S. aureus* on the surface of the hands and nasal cavities of healthcare

professionals. In Brazil, Gomes *et al.*<sup>(3)</sup> reported that 33.1% of professionals in the pediatric department were carriers, and of these, 5.1% were carriers of methicillin resistant strains (MRSA). Varghese *et al.*,<sup>(4)</sup> also demonstrated that 36.7% of health professionals in the surgery and orthopedics department had *S. aureus*, with 2.93% having MRSA.

Although the literature review indicates that there is considerable variation, it is reported that nasal MRSA carriers vary between 6.3 and 17.8% in the general population and between 18.2 and 43.8% among health professionals.<sup>(5,6)</sup> However, transmission from person to person and from health professional to patients is one of the main concerns in healthcare services.<sup>(7,8)</sup>

<sup>1</sup> Graduanda. Universidade do Oeste de Santa Catarina-Unoesc, Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia, São Miguel do Oeste, SC, Brasil.

<sup>2</sup> Doutora. Universidade do Oeste de Santa Catarina-Unoesc, Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia, São Miguel do Oeste, SC, Brasil.

<sup>3</sup> Graduanda. Universidade do Oeste de Santa Catarina-Unoesc, Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia, São Miguel do Oeste, SC, Brasil.

<sup>4</sup> Especialista. Universidade do Oeste de Santa Catarina-Unoesc, Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia, São Miguel do Oeste, SC, Brasil.

<sup>5</sup> Graduanda. Universidade do Oeste de Santa Catarina-Unoesc, Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia, São Miguel do Oeste, SC, Brasil.

<sup>6</sup> Especialista. Hospital Regional Terezinha Gaio Basso, Setor de Infectologia e Enfermagem, São Miguel do Oeste, SC, Brasil.

<sup>7</sup> Doutora. Hospital Regional Terezinha Gaio Basso, Setor de Infectologia e Enfermagem, São Miguel do Oeste, SC, Brasil.

Recebido em 25/04/2021

Aprovado em 02/03/2022

DOI: 10.21877/2448-3877.202202140

*S. aureus* infections are responsible for approximately 10% of hospital infections and the mortality attributed to bacteremia in children has been reported as 0.7%-5.1%, and up to a third of patients with *S. aureus* develop complications such as bacteremia, endocarditis, pneumonia, sepsis and vancomycin treatment.<sup>(9)</sup>

In addition to the incidence of this bacterium in hospital environments, one of the biggest problems is the resistance to antimicrobials developed by *S. aureus*, which makes its removal difficult and, consequently, the control of infections.<sup>(10)</sup>

The rise of antimicrobial-resistant *S. aureus* and the steady increase in rates of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) pose a greater risk and burden to health services worldwide, presenting global health issues.<sup>(11)</sup>

In the last few years, several studies have shown that in patients treated with cardiac, orthopedic and spine surgery, nasal colonization of *S. aureus*, especially MRSA, can increase the risk of acquiring infections after surgery.<sup>(12)</sup> Thus, since infections at the surgical site are frequent, often requiring prolonged hospitalizations, elongated treatments with antibiotics and additional surgical procedures, control and prevention measures are necessary.<sup>(13)</sup>

Thus, in view of the above, the present study aimed to identify the presence of *S. aureus* on the surfaces of the hands and nasal cavity of professionals working in the operating room at a hospital; considering that they are subject to colonization by typically hospital microorganisms and they are often multiresistant; placing them in the condition of carriers, disseminators and responsible for outbreaks of nosocomial infections. In addition, they act in contact with the patient during the pre-operative period until the post-operative period, with the possibility of transferring multiresistant strains of *S. aureus*, increasing the risk of infections since the patient is exposed during and after the surgery.

## MATERIAL AND METHODS

The methodological procedures were performed at the Research and Diagnostic Laboratory in Microbiology at UNOESC, Campus of São Miguel do Oeste. To carry out this research, this project was submitted to the University's ethics committee, having been approved under protocol number 3.818.499.

### Sample collection

Sample collections were carried out in inside of nasal cavity and in the hands of 27 healthcare professionals. They had worked in the hospital's operating room, used as criteria for choosing the participants of this study.

The nasal cavity samples were collected by rotating a sterile swab previously moistened with saline solution in both nostrils of the participants of the present study.<sup>(14)</sup>

The collection of samples from the hands of the participants, in turn, was performed with a sterile swab previously moistened with saline solution, which was rubbed three times on each finger of the hand, in the region between the fingers and inside of the hands.

All swabs from both nasal swabbing were transported inside tubes containing saline solution, packed in a thermal box and subsequently taken to the laboratory for analysis.

The sample collections were performed monthly by a nurse from the hospital, from August to December 2019, always the same professionals.

### Isolation and identification of *S. aureus*

All samples from the nasal cavity and hands were used for inoculation onto plates containing the selective medium (Sal Mannitol agar) and incubated in a bacteriological incubator at  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  for 24-48 hours. Characteristic (yellow) colonies were confirmed by Gram staining and specific biochemical tests for the identification of *S. aureus*, according to Koneman *et al.*<sup>(15)</sup> and Maccfadin.<sup>(16)</sup> The confirmed strains for *S. aureus* were subjected to the antimicrobial susceptibility test.

### Antibiotic sensitivity test

The antimicrobial susceptibility test was performed using the disk diffusion technique described by Kirby-Bauer according to the methodology recommended by the Brazilian committee on antimicrobial susceptibility testing - BR Cast.<sup>(17)</sup>

The strains were inoculated in Nutrient broth, being incubated at  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  for approximately 6 hours. After this period, the density of the suspension was compared and adjusted to the standard 0.5 of Maccfarland.

Subsequently, with the aid of a swab, the samples were inoculated and spread on the surface of plates containing Mueller-Hinton agar, taking care to obtain a uniform spreading.

Then, the bio-disks were placed on the agar surface, with the aid of sterile forceps and applying light pressure on the disc, to obtain an adherence on the surface of the medium. Each one was positioned in a way to maintain a distance of 3 cm between them.

Susceptibility to the following antimicrobials was evaluated: oxacillin (1 $\mu\text{g}$ ), penicillin (10 $\mu\text{g}$ ), clindamycin (2 $\mu\text{g}$ ), tetracycline (30 $\mu\text{g}$ ), erythromycin (15 $\mu\text{g}$ ), sulfazotrim (25 $\mu\text{g}$ ), rifampicin (5mcg), amoxicillin / clavulanic acid (30 $\mu\text{g}$ ), cefazolin (30 $\mu\text{g}$ ), azithromycin (15 $\mu\text{g}$ ), ampicillin / sulbactam (20  $\mu\text{g}$ ), gentamicin (10  $\mu\text{g}$ ), amikacin (30 $\mu\text{g}$ ), ceftaxime (30 $\mu\text{g}$ ), nitrofurantoin (300 $\mu\text{g}$ ), ciprofloxacin (5 $\mu\text{g}$ ), cefotaxime (30 $\mu\text{g}$ ). In this study, the strain *S. aureus* ATCC 25923 was used as a control.

The results were read after 16-20 hours of incubation, by measuring the halos, with the aid of a millimeter ruler and table for reading the sensitivity to antimicrobials.

Were characterized as multidrug-resistant microorganisms those resistant to three or more classes of antimicrobials.<sup>(18)</sup>

**Prevalence of *S. aureus* and *MRSA* in healthcare professionals**

Professionals who presented the bacteria at least twice during the study were considered as carriers of *S. aureus*. In addition, a professional who had a strain of *S. aureus* with an inhibition zone <22 mm for cefoxitin was considered as carrier of *MRSA*.<sup>(17)</sup>

To discuss the results, the strains isolated from the nasal cavity were called N1 to N27 and M1 to M27 were the strains isolated from the hands of healthcare professionals.

**STATISTICAL ANALYSIS**

The analysis of the patterns of antimicrobial sensitivity of *S. aureus* and colonization was performed with the SPSS version 16 package (SPSSInc., Chicago, IL, USA). The findings were analyzed statistically using descriptive statistics, frequency and percentage.

**RESULTS**

**Sociodemographic characteristics**

The age of the 27 participants varied between 20 and 50 years (average of 34.4 years). Sixteen were females (59.2%) and eleven males (40.7%).

**Prevalence of *S. aureus* in the hands and nasal cavities of health professionals**

The results showed that 40.7% (11) of the professionals in the hospital's surgical center have *S. aureus* in the nasal cavity, that is, they presented this bacterium at least twice during the performance of this study. 14.81% (4) of the professionals presented *S. aureus* on their hands in only one of the sample collections.

36 strains of *S. aureus* were isolated during the study, in which the second collection was the one with the highest (14) number of strains (Table 1).

The prevalence rate of *S. aureus* in healthcare professionals at the hospital's surgical center was very

similar in all three sample collections. In the first collection, 37% had *S. aureus* only in the nasal cavities and 3.7% only in the hands. In the second collection, 11 (40.7%) strains were isolated from the nasal cavity and 3 (11.1%) from the hands, and all professionals who presented the microorganism on the surface of the hands also presented in the nasal cavity. In the third collection, 11 (40.7%) of the strains were isolated from the nasal cavity and no strains were isolated from the hands.

The results showed that the prevalence of *S. aureus* was higher in the nasal cavity when compared to the number of strains isolated from the hands of healthcare professionals (Figure 1).

**Antimicrobial susceptibility profile of isolated *S. aureus* strains**

The susceptibility profile of the 36 strains of *S. aureus* isolated from the hands and nasal cavity of healthcare professionals demonstrated that the strains showed resistance of 77.78% to penicillin, amoxicillin / clavulanic acid and ampicillin / sulbactam (Table 2).

The antimicrobials in which the strains were most sensitive were cefazolin (88.89%), cefotaxime (88.89%), cefoxitin (88.89%), oxacillin (88.89%), gentamicin (91.67%), nitrofurantoin (97.22%) and ciprofloxacin (97.22%) (Table 2).

In addition, our results showed that of the 36 strains of *S. aureus* isolated during the three collections performed in the hands and nasal cavities of health professionals, 21 (58.3%) are multi-resistant, of which seven (19.4%) showed multidrug resistance for at least five different classes of antimicrobials.

**Prevalence of *MRSA* in healthcare professionals**

The results of this study showed that only one professional had strains of *MRSA*. As three collections were performed during the execution of this study, 4 strains of *MRSA* were isolated from the only professional carrier, three of them in the nasal cavity and one of them on the surface of the hands.

The susceptibility profile of *MRSA* strains shows that they are multidrug-resistant, in which all strains showed resistance to penicillin, amoxicillin / acid. clavulanic, cefazolin, ampicillin / sulbactam, oxacillin, cefotaxime and cefoxitin (Table 3).

Table 1 - Number of strains of *S. aureus* isolated from the nasal cavity and the surface of the hands of professionals in the operating room of a hospital.

Collect	Department	Professionals (n)	<i>S.aureus</i> strains in nasal cavity	<i>S.aureus</i> strains on the surface of the hands	<i>MRSA</i> positive
1	Operating Room	27	10	1	1
2	Operating Room	27	11	3	2
3	Operating Room	27	11	0	1
Total strains			36		

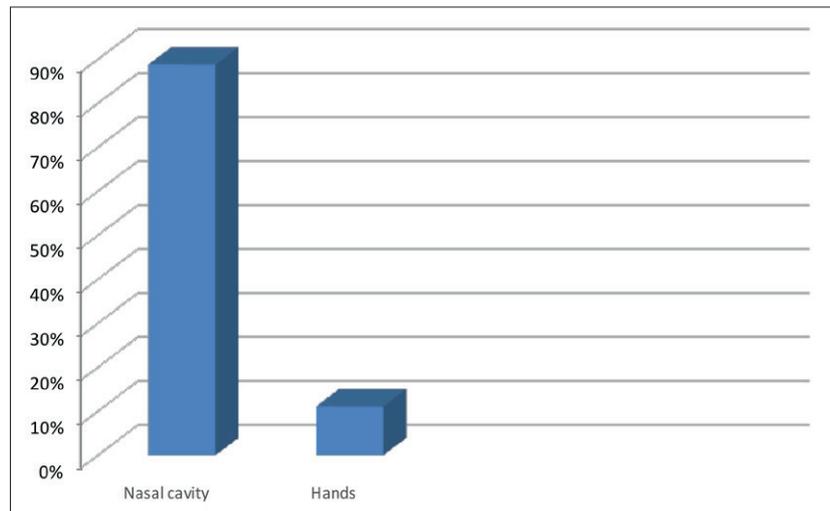


Figure 1. Prevalence of *S. aureus* in the nasal cavities and hands of health professionals in the operating room of a hospital.

Table 2 - Antimicrobial susceptibility profile of *S. aureus* strains isolated from the hands and nasal cavities of health professionals in the operating room of a hospital.

ANTIMICROBIAL	SENSITIVE	EXPANDED SENSITIVITY	RESISTANT
Amikacin 30	31 (86,11%)	2 (5,56%)	3 (8,33%)
Amoxicillin / Clavulanic acid 30	8 (22,22%)	0 (0%)	28 (77,78%)
Ampicillin / Sulbactam 20	8 (22,22%)	0 (0%)	28 (77,78%)
Azithromycin 15	14 (38,89%)	3 (8,33%)	19 (52,78%)
Cefazolin 30	32 (88,89%)	0 (0%)	4 (11,11%)
Cefotaxime 30	32 (88,89%)	0 (0%)	4 (11,11%)
Cefoxitin 30	32 (88,89%)	0 (0%)	4 (11,11%)
Ciprofloxacin 5	35 (97,22%)	0 (0%)	1 (2,78%)
Clindamycin 2	24 (66,67%)	6 (16,67%)	7 (19,44%)
Erythromycin 15	14 (38,89%)	3 (8,33%)	19 (52,78%)
Gentamicin 10	33 (91,67%)	0 (0%)	3 (8,33%)
Nitrofurantoin 300	35 (97,22%)	0 (0%)	1 (2,78%)
Oxacillin 1	32 (88,89%)	0 (0%)	4 (11,11%)
Penicillin G 10	8 (22,22%)	0 (0%)	28 (77,78%)
Rifampicin 5	18 (50%)	8 (22,22%)	10 (27,78%)
Sulfazotrim 25	32 (88,89%)	0 (0%)	4 (11,11%)
Tetracycline 30	22 (61,11%)	9 (25%)	5 (13,89%)

OBS: It is called as sensitive increased exposure (I) when there is a high probability of therapeutic success if the exposure of the drug is increased by adjusting the dosage regimen or its concentration at the site of infection.<sup>(17)</sup>

Table 3 - Antimicrobial susceptibility profile of *MRSA* strains isolated from a surgical center healthcare professional.

Samples Collection	Positive Samples for <i>MRSA</i>	Antimicrobial resistance
Collect 1	N11	PEN, AMC, CFZ, APS, CLI, OXA, RIF, SUT, CTX, CFO
Collect 2	N11 M11	PEN, AMC, CFZ, APS, OXA, RIF, CTX, CFO PEN, AMC, CFZ, APS, CLI, OXA, CTX, CFO
Collect 3	N11	PEN, AMC, CFZ, APS, OXA, CTX, CFO

Antibiotic caption: OXA: oxacillin; PEN: penicillin; AMC: amoxicillin / clavulanic acid; CFZ: cefazolin; APS: ampicillin / sulbactam; RIF: rifampicin; CTX: cefotaxime; CFO: cefoxitin; CLI: clindamycin; SUT: sulfamethoxazole / trimethoprim.

## DISCUSSION

Of the 27 professionals, the age ranged from 20 to 50 years, obtaining an average (34.4 years) data similar to a research conducted in northern Ethiopia, where Shibabaw, Abebe, Mihret<sup>(14)</sup> cite achieve an average age of 30.4 years old, an age group where the majority of the population is already working. On the other hand, the work by Barcudi *et al.*,<sup>(19)</sup> who compared the circulation of *MRSA* between the community and the hospital environment, obtained an average age of 24 years, a relatively smaller age group compared to the data obtained in our study.

In our study, the majority (59.2%) of the participants were female, corroborating the results of Pathare *et al.*<sup>(7)</sup> in which there was also a female predominance (82.6%) among the participants of their research.

The data found in our study are similar to several studies already carried out regarding health professionals with *S. aureus*. Our results (40.7% with *S. aureus* in the nasal cavities) are similar to those found by Pourramezan, Moghadam and Pourmand<sup>(20)</sup> who of 133 participants, 53 (39.8%) had *S. aureus* in the nasal cavities.

The smallest number (14.81%) of *S. aureus* carriers in the hands found in our study was also reported by Castro *et al.*<sup>(21)</sup> who claimed to have found a lower percentage (8.9%) of strains of *S. aureus* in the hands compared to the nostrils (39.6%), corroborating to the hypothesis that a good part of healthcare professionals have a correct hygiene routine, since the hands are not a reflection of the nasal microbiota.

Nasal colonization by *S. aureus* is an important risk factor for the development of infections, because although colonization is generally harmless, the healthcare professional can be considered one of the exogenous sources of infections associated with health care.<sup>(22)</sup> The research by Moremi *et al.*<sup>(23)</sup> reports that although the evidence is low, there is a possibility that healthcare professionals are reservoirs of *S. aureus*, for the cross-transmission of this bacteria; a fact that highlights the role of examining them as part of infection control measures hospital, especially during outbreaks.

The antimicrobial susceptibility profiles of *S. aureus* isolated from healthcare professionals revealed that 77.78% of the strains were resistant to the antibiotics penicillin, amoxicillin / clavulanic acid and ampicillin / sulbactam, these results being similar to a study conducted in a hospital in Ghana by Walana *et al.*<sup>(24)</sup> who reported 81.5% of strains resistant to amoxicillin. Furthermore, Chinnamedu *et al.*,<sup>(11)</sup> demonstrated that a large number of strains (95.2%) were resistant to penicillin.

These resistance found for the aforementioned antibiotics can be explained by the fact that these antimicrobials are frequently used to treat common infections in the clinical routine in health centers and hospitals, causing concern regarding the high percentage of resistant strains,

mainly because *S. aureus* it is one of the most common microorganisms involved in nosocomial infections.

The high sensitivity (97.22% of the strains) to the antimicrobials nitrofurantoin and ciprofloxacin are similar to the results found by Chinnamedu *et al.*,<sup>(11)</sup> in southern India, who also found that the antibiotic nitrofurantoin was the one with the lowest level of resistance, thus concluding that the classes of nitrofurans and quinolones are highly sensitive to the strains of *S. aureus* tested.

The multidrug resistance (58.3%) found in the strains isolated in this study has been one of the main concerns and discussions, as many studies report this problem faced by healthcare professionals.

Especially the multidrug resistance of *S. aureus* strains has been observed for many years. In the work carried out by Nur *et al.*,<sup>(25)</sup> still in 1997, 26% of multidrug-resistant strains were diagnosed. Recently, Walana *et al.*<sup>(24)</sup> reported that 18.5% of *S. aureus* were multidrug-resistant.

This information causes concern, since in a hospital environment, patients are immunocompromised, receiving high doses of drugs that sometimes have side effects, weakening them even more, which makes them a target for multi-resistant bacteria and few therapeutic options, as well as being able to cause outbreaks of infections.

According to Walana *et al.*<sup>(24)</sup> as antibiotics are widely used in health facilities, professionals who work in these places are generally colonized by multidrug-resistant strains and the *S. aureus* infections resulting from these people are difficult to treat.

Another clinically important challenge associated with *S. aureus* is the development of strains resistant to methicillin / oxacillin which are most often resistant to other antibiotics as well.

In our work we found a low number (only one professional) of people with *MRSA*. Some articles also report the low prevalence of this microorganism, such as the study conducted by Rao, Nayak and Prasad,<sup>(26)</sup> with 3.7% of *MRSA* carriers. On the other hand, it is common to find other studies in the literature that demonstrate a higher prevalence of this bacteria in healthcare professionals such as Safdari *et al.*,<sup>(27)</sup> who reported the prevalence of *MRSA* in 31% of professionals.

The prevalence rate (11.11%) of *MRSA* in our research is similar to the studies by Pathare *et al.*<sup>(8)</sup> and Buenaventura-alcazaren *et al.*<sup>(28)</sup> who reported prevalence of *MRSA* in healthcare professionals of 15.1% and 13% respectively.

Periodic screening of caregivers and healthcare professionals to identify carriers is essential to prevent hospital infections associated with *MRSA* in a healthcare setting. In Brazil, several studies have demonstrated a prevalence of *S. aureus* infections acquired in hospitals, ranging from 17% to 26%, and approximately 70% to 100% of these infections are caused by multi-resistant strains.<sup>(29)</sup>

Therefore, as infections resulting from these *MRSA* strains are difficult to treat, the resulting effects include prolonged hospitalization and increased healthcare costs.<sup>(30)</sup> For this reason, the ecological niche and the virulence nature of *S. aureus*, together with the growing concerns about antibiotic resistance, could justify the need for healthcare centers to monitor the nasal transport rate of their staff, patients and caregivers, in order to avoid possible sources of outbreaks associated with *S. aureus*.

## CONCLUSION

The results found in this research allow us to conclude that healthcare professionals may be carriers of multiresistant *S. aureus* and that the nasal cavity still is one of the main sites colonized by this bacterium. The low rate of *S. aureus* isolated from the hands may be an indicative that the professionals at this hospital have a correct hand hygiene routine.

Besides that, we can conclude that the resistance of *S. aureus* strains to the antimicrobials penicillin, amoxicillin / clavulanic acid and ampicillin / sulbactam may be related to the frequent use of this class of antimicrobials in the treatment of infections.

In this study, were isolated strains of *MRSA* only from one professional, which becomes an important result, since *MRSA* is the main microorganism responsible for infections in the hospital environment and *MRSA* infections are a problem of clinical and public health importance.

Thus, it is suggested that safety regulations with the patient and hygiene protocols should be followed by all professionals, including those without *S. aureus*, since it is extremely important to prevent the spread and promote prevention and control of infections, ensuring greater safety for patients and hospital professionals.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Our acknowledgements to all health workers that participated in this study. Special thanks to nurse Natacha Melz Zappani and doctor Priscila Rodrigues Garrido Bratkowski for actively participating in this research.

We also thank the University of West of Santa Catarina, São Miguel do Oeste and the government of the state of Santa Catarina for providing financial resources to carry out this research.

### Resumo

*Staphylococcus aureus* multirresistente tem sido frequentemente encontrado nas mãos e cavidades nasais de seres humanos, sendo uma das principais causas de infecção nosocomial. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *S. aureus* nesses sítios anatômicos em 27 profissionais de saúde que trabalham em centro cirúrgico. As amostras foram obtidas por swabs estéreis, previamente humedecidos com solução salina, que posteriormente foram semeados em placas de Petri contendo ágar manitol salgado.

As colônias com aspecto característico foram coradas pelo Gram e submetidas a testes bioquímicos para sua confirmação. Provas de susceptibilidade a antimicrobianos foram também realizadas, utilizando a técnica de difusão em disco descrita por Kirby-Bauer. 40,7% (11) dos profissionais apresentam *S. aureus* nas cavidades nasais e 14,81% (4) apresentaram esse microrganismo nas mãos, pelo menos, em uma das coletas. Das 36 cepas de *S. aureus* isoladas, 11,11% apresentaram resistência à metilina, 77,8% apresentaram resistência à penicilina, amoxicilina/ácido clavulânico e ampicilina/sulbactam e 58,3% se mostraram multirresistentes. A sensibilidade das cepas foi observada principalmente para ciprofloxacina (97,22%) e nitrofurantoína (97,22%). A partir dos resultados encontrados é possível concluir que o número de portadores de *S. aureus* é relativamente alto e que as cepas isoladas são resistentes a múltiplas drogas, principalmente àquelas de primeira escolha, empregadas para controlar infecções comuns.

### Palavras-Chave

*Staphylococcus aureus*, Profissional de Saúde, Resistência a antimicrobianos, infecção hospitalar

## REFERENCES

- Bouchiat C, Grando J, Saadatian-Elahi M, Landelle C, Boisset S, Vandenesch F, et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage among healthcare professionals: Unexpected categories at risk. *Revue D'Épidémiologie Et de Santé Publique*. 2018 jul; 66:231-446.
- Loftus RW, Dexter F, Robinson ADM. High-risk *Staphylococcus aureus* transmission in the operating room: A call for widespread improvements in perioperative hand hygiene and patient decolonization practices. *American Journal of Infection Control*. 2018 Oct; 46(10):1134-1141.
- Gomes IM, Marlow MA, Pinheiro MG, de Freitas MF, Fonseca FF, Cardoso CA, Aguiar-Alves F. Risk factors for *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S aureus* colonization among health care workers in pediatrics departments. *American Journal of Infection Control*. 2014 Aug; 42(8):918-20.
- Varghese S, Ramakrishnan D, Rajahamsan J, Balakrishnan SK, Mercybai IR, Valampampil MJ, et al. *Staphylococcus aureus* carrier state among surgery and orthopedics health care personnel of a tertiary care center. *Clinical Epidemiology And Global Health*. 2018 Sept; 6(3):105-108.
- Ozguven A, Tunger O, Cetin CB, Dinç G. Investigation of nasal carriage of community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in primary and high school students. *Mikrobiyol Bul*. 2008 Oct; 42 (4): 661-7.
- Treesirichod A, Hantagool S, Prommalikit O. Nasal carriage and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* among medical students at the HRH Princess Maha Chakri Sirindhorn Medical Center, Thailand: a cross sectional study. *Journal of Infection and Public Health*. 2013 Jun; 6(3): 196-201.
- Pathare NA, Asogan H, Tejani S, Al Mahruqi G, Al Fakhri S, Zafarulla R, et al. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA] colonization or carriage among health-care workers. *Journal Of Infection And Public Health*. 2016 sept; 9(5):571-576.
- Asaoka K, Endo S, Suzuki Y, Komuro S, Nemoto T, Kaku M. Hand hygiene using a new hand-cleansing formulation without sanitizers: Effect on *Staphylococcus aureus* removal and recovery of properties against skin damage. *American Journal of Infection Control*. 2016 Aug 1; 44(8):e129-32.
- Hamdy RF, Dona D, Jacobs MB, Gerber JS. Risk Factors for Complications in Children with *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *The Journal of Pediatrics*. 2019 May; 208:214-220. e2.
- Álvarez A, Fernández L, Gutiérrez D, Iglesias B, Rodríguez A, García P. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Hospitals: Latest Trends and Treatments Based on Bacteriophages. *Journal of Clinical Microbiology*. 2019 Nov 22; 57(12): e01006-19.



# Value of immature reticulocyte fraction in anemias and other hematologic conditions: a brief narrative review

## Valor da fração de reticulócitos imaturos em anemias e outras condições hematológicas: uma breve revisão narrativa

Mariane Cristina Souza<sup>1</sup>

Leilismara Sousa Nogueira<sup>2</sup>

Thais Resende Batista<sup>3</sup>

Maria das Graças Carvalho<sup>4</sup>

Danyelle Romana Alves Rios<sup>5</sup>

### Abstract

New hematological parameters, such as immature reticulocyte fraction (IRF), tend to become important tools in clinical practice. IRF identifies the most immature reticulocytes that contain a large amount of ribonucleic acid, being an important parameter to evaluate bone marrow activity in real time for differential diagnosis of anemias, monitoring of its treatment, and for follow-up or bone marrow recovery in various clinical conditions. However, there is still a long way to go before IRF can be used in clinical practice. Thus, it is urgent to establish reference values and to standardize of the methodologies used by different hematological analyzers and how to express the results. This narrative review provides a critical perspective on IRF, its potential of clinical use and limitations.

### Keywords

Reticulocytes; Iron-Deficiency Anemia; Hemolytic Anemia; Bone Marrow; Thalassemia

Anemias are a serious public health problem in the world due to their high prevalence and close relationship with the development of children, mainly in the cognitive, motor, social, emotional and neurophysiological areas.<sup>(1-3)</sup> Although, anemias present varied etiopathogenesis can share common clinical manifestations. Thus, identification of laboratory abnormalities is essential for the differential diagnosis, treatment and follow-up of this disease.<sup>(1)</sup>

The blood count corresponds to the first laboratory test for the identification and initial direction of the anemia investigation.<sup>(4)</sup> According to the World Health Organization (WHO), anemia is a condition in which hemoglobin concentration in the blood is below the reference values, being 13 g/dL and 12 g/dL for men and women, respectively.<sup>(3)</sup> After the identification of anemia, erythrocyte parameters such as mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin

(MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) aid a search of the possible causal mechanisms. In addition, they are the basis for the morphological classification including normochromic and normocytic, microcytic and hypochromic, and macrocytic anemias.<sup>(5)</sup>

Considering that microcytic anemia is the most commonly encountered anemia in general medical practice, mainly in children and adolescents, expanding the possibilities of laboratory tests for their differential diagnosis is of great importance.<sup>(6)</sup> The types of anemia with these morphological characteristics include iron deficiency anemia, thalassemias, anemia of chronic disease and sideroblastic anemia.<sup>(7)</sup>

Erythrocyte parameters, and both reticulocyte count and indices are also considered very useful tools in the differential diagnosis of anemia and its treatment.<sup>(8)</sup> Reticulocytes, described by the first time by Wilhelm Henrich in

<sup>1</sup> Bacharela em Farmácia/Universidade Federal de São João del-Rei/Campus Centro Oeste Dona Lindu, Divinópolis, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Pós-doutoranda em Ciências da Saúde/Universidade Federal de São João del-Rei/Campus Centro Oeste Dona Lindu, Divinópolis, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Mestra em Ciências Farmacêuticas/Universidade Federal de São João del-Rei/Campus Centro Oeste Dona Lindu, Divinópolis, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Pós-doutora em Hemostasia/Universidade Federal de São João del-Rei/Campus Centro Oeste Dona Lindu, Divinópolis-MG/Faculdade de Farmácia da UFMG/Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>5</sup> Doutora em Ciências Farmacêuticas/Universidade Federal de São João del-Rei/Campus Centro Oeste Dona Lindu, Divinópolis, MG, Brasil.

Recebido em 31/03/2021

Aprovado em 02/03/2022

DOI: 10.21877/2448-3877.202202130

1865 as “Granulated” erythrocytes are immature red blood cells (RBC) with varying amounts of RNA<sup>(9)</sup> and may indicate whether anemia has aregenerative pattern and whether the bone marrow is responding to treatment.<sup>(9-11)</sup>

Automated reticulocyte counting was made possible by methods based on detection of fluorescence or change in absorbance. Various fluorochromes such as polimetidine, acridine orange and orange thiazole, and dyes such as oxazine 750 and new methylene blue are used according to the type of equipment. As reported previously, flow cytometric analysis of reticulocytes is an attractive alternative procedure because of its higher reproducibility when compared to microscopic enumeration method.<sup>(12)</sup>

By means of automation and the intensity of emitted fluorescence or light absorption, reticulocytes can be identified and classified into three fractions based on their degree of maturation.<sup>(13)</sup> Thus, the types I (high fluorescence or light absorption), II (medium fluorescence or light absorption) and III (low fluorescence or light absorption) have been introduced. Also, from the automation features, new reticulocyte indices were introduced for volume (MCVr), hemoglobin content (MCHr) and hemoglobin concentration (MCHCr), as well as the volume dispersion measures (RDWr) and hemoglobin content (CHr) of reticulocytes.<sup>(13)</sup>

Reticulocytes are known to circulate a maximum of 4 days in the blood until they become fully mature erythrocytes, while the erythrocytes live approximately 120 days in the circulation. In light of this knowledge, changes in the volume and content of reticulocytes are much faster compared to RBC.<sup>(13)</sup> This characteristic of reticulocytes enables them both for differential diagnosis and for investigation of response to anemia treatment by means of calculating the new indexes previously mentioned.

The reticulocyte count is also clinically important for the pathophysiological classification of anemia. If a decreased number of reticulocytes is found, this indicates an inadequate production of erythrocytes by the bone marrow. On the other hand, an increase in reticulocyte count indicates destruction of erythrocytes or an excessive blood loss.<sup>(5)</sup>

Several studies have been published in recent years<sup>(8,9,14-16)</sup> about the immature reticulocyte fraction (IRF), the younger fraction of reticulocytes, especially for the differential diagnosis of anemias, monitoring of its treatment, and for follow-up or bone marrow recovery in various clinical conditions.

## IRF: DEFINITION AND MEASUREMENT

The availability of fluorochromes and dyes that bind to RNA, together with the advancement of technology, allowed the automated reticulocyte counting and new parameters derived from it, such as RMI (reticulocyte maturity index), HFR (high fluorescence reticulocytes) and IRF.<sup>(13, 17)</sup>

The term IRF was introduced to indicate the more immature reticulocytes containing high amounts of RNA.<sup>(18)</sup> The maturity of the reticulocytes is based on the amount of RNA traces present in the cell, which can be stained with a fluorescent dye specific for nucleic acids as polymethin or others. According to the intensity of fluorescence emitted, reticulocytes are classified as low (LFR), medium (MFR) or high (HFR) fluorescence. The IRF corresponds to the sum of the medium and high fluorescence fractions [(HFR + MFR) x100] and is able to provide real-time information on the quality of erythropoiesis. On the other hand, the RMI corresponds to [(HFR + MFR) x100]/LFR.<sup>(9,13,19)</sup>

According to Buttarello,<sup>(8)</sup> IRF and reticulocyte count can be considered as an index of acceleration and a quantitative measure of the effectiveness of erythropoiesis, respectively. Moreover, these parameters are useful for discriminating those anemias characterized by an increase in erythropoiesis (hemolytic anemias) or loss of blood resulting in an increase in both total reticulocyte and in IRF; anemias consequent to the reduced bone marrow production (chronic renal disease) with both parameters decreased and, finally, those anemias provoked by acute infections or myelodysplastic syndromes in which occur a dissociation between total reticulocyte count (reduced or normal) and IRF (can be increased). Still, according to the same author,<sup>(8)</sup> the increase in IRF precedes in several days the increase in reticulocyte count during replacement of cobalamin, folates and iron for the treatment of nutritional anemias.

In this sense, studies have investigated the association between IRF and the diagnosis of anemia, in an attempt to better understand the ability of this parameter to reflect erythropoietic activity.<sup>(17,20,21)</sup> However, results have been conflicting and despite the relative ease of obtaining the IRF, its use in clinical practice is still limited due to the lack of establishment of reference value, standardization of the methodologies used by hematological analyzers and knowledge of significant clinical outcomes.<sup>(8)</sup>

Thus, the objective of the present study was to provide a comprehensive and critical review about the clinical usefulness of IRF in the differential diagnosis of anemias, in addition to its potentialities of use and limitations. As a timely complementation, some background was also included on the possible clinical utility of IRF for evaluating hematological recovery in many clinical conditions.

## SEARCH STRATEGY AND SELECTION CRITERIA

An electronic search for original or review articles published in English and Portuguese was conducted without date limit, through Medline Ovid, Embase, Web of Science and LILACS/SciELO databases. The search was performed using a combination of relevant keywords, such as reticulocyte

maturation, immature reticulocyte fraction, IRF, immature reticulocytes, reticulocyte maturation profile, iron deficiency anemia, microcytic anemia, macrocytic anemia, anemia of chronic disease, anemia of inflammation, thalassemia, beta-thalassemia, alpha-thalassemia, monitoring of erythroid regeneration, bone marrow transplant, hemolytic anemia, medullary aplasia. "OR" and "AND" tools were utilized to combine the words. A total of 47 articles were raised and after careful reading of their titles and abstracts, 9 articles were excluded. The remaining 38 articles in strict association with the objectives of this review were included. In addition to articles, some books were used that included an overview about IRF. The criterion of inclusion of articles was based on the reading of their titles and abstracts, through which the subjects of greatest interest were identified, highlighting the applicability and limitations of the IRF. Articles that did not meet these requirements were excluded.

### IRF IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF IRON DEFICIENCY ANEMIA AND THALASSEMIAS

The differential diagnosis between iron deficiency anemia (IDA), mainly on its mild and moderate forms, and thalassemia on its heterozygous form is very complex as they share laboratory and clinical characteristics. However, differential diagnosis is important to provide a prompt and adequate indication for iron supplementation to the patients with IDA, to avoid unnecessary iron therapy in patients with thalassemia. Also, a correct IDA diagnosis may prevent severe and lethal forms of thalassemic syndromes in the context of pre-nuptial counseling in areas with high prevalence of the disease. In this case, however, blood counts are insufficient and other tests are required, such as hemoglobin electrophoresis, HbA2 and Fetal Hb dosages, serum levels of ferritin and iron and DNA analysis.<sup>(1)</sup> However, in areas where thalassemia is endemic usually have limited or unavailable health care resources. Thus, introduction of low-cost and easy-to-perform biomarkers are highly desirable in the differential diagnosis of microcytic and hypochromic anemias.<sup>(22)</sup> The IRF has been shown to be an alternative parameter in the differentiation of these anemias.<sup>(19,21,23)</sup> In this context, some studies have been addressed as follows.

Urrechaga *et al.*<sup>(24)</sup> evaluated 383 adult patients including 136 patients with minor  $\beta$ -thalassemia, 121 with mild iron deficiency anemia and 126 patients with severe iron deficiency anemia. The investigators observed a significant difference among the three groups, with a mean IRF estimate of 8.7%, 12.9% and 16.7%, respectively. A significant difference was observed when all groups were compared to the healthy individuals, who had an IRF of 4.4%. Noronha and Grotto<sup>(23)</sup> also observed a higher mean IRF in patients

with severe iron deficiency anemia (22.1%), followed by patients with mild iron deficiency anemia (17.1%) and patients with minor  $\beta$ -thalassemia (13.2%), when compared to the healthy individuals (8.8%). These findings indicate that IRF is increased in the more severe forms of iron deficiency anemias when compared to patients with minor  $\beta$ -thalassemia.

Velasco-Rodriguez *et al.*<sup>(21)</sup> have found a significantly higher percentage of IRF in patients with iron deficiency anemia (22.3%) when compared to patients with  $\beta$ -thalassemia trait (18.0%), but there was no difference when compared with patients with  $d\beta$ -thalassemia (18.3%). On the other hand, in a study by Lima and Grotto,<sup>(25)</sup> the percentage of high fluorescence reticulocytes was not significantly different between patients with heterozygous  $\beta$ -thalassemia (7.3%), patients with iron deficiency anemia (6.9%) and control subjects (6.2%). However, it is important to highlight that these authors evaluated only the percentage of high fluorescence reticulocytes, not the sum of high and medium fluorescence reticulocytes as in the other three studies mentioned previously, which may explain the difference in the results.

In iron deficiency anemia, as well as in thalassemia, inefficient erythropoiesis can be observed. Interestingly, individuals with iron deficiency anemia, despite having a suppressed erythropoiesis, presented a higher IRF, suggesting a more intense erythropoietic activity. However, in the three previous studies,<sup>(21,23,24)</sup> the absolute number of reticulocytes was lower in patients with iron-deficiency anemia compared to those with thalassemia, although the latter had more prone to higher IRF. Therefore, one can speculate that patients with iron deficiency anemia probably behave as in myelodysplastic syndromes in which there is a dissociation between total reticulocyte count and IRF may be observed, that is, a lower absolute number of reticulocytes and a higher IRF. On the other hand, this unexpected event could be explained by the supplementation of iron by the patients resulting in an increase in IRF that precedes in several days the increase of reticulocyte count.

Although iron replacement has not been mentioned by the previously cited investigators, it cannot be ruled out. Another hypothesis is that the higher proportion of immature reticulocytes in iron deficiency anemia, when compared to patients with thalassemia, could be a consequence of a higher mRNA expression of the transferrin soluble receptor (sTfR). In response to the insufficient supply of iron, sTfR synthesis is proportionally increased and may result in an increase of erythroid precursor's levels.<sup>(25)</sup> The table 1 shows the main characteristics of four studies comparing maturity of reticulocytes between patients with iron deficiency anemia and thalassemia, and Table 2 between iron deficiency anemia and healthy individuals.

Table 1 - Summary of cross-sectional studies comparing the maturity of reticulocytes between iron deficiency anemia and thalassemia.

Design of the study and sample size	Participants' characteristics	Hematologic analyzer and parameter	Main results
Velasco-Rodríguez et al., 2016 <sup>(21)</sup> N = 428 . Spain.	dβ-thalassemia (n = 43) β-thalassemia (n = 179) Iron deficiency anemia (n = 206)	ADVIA 2120 (Siemens/ USA) IRF	dβ-thalassemia: 18.3% β-thalassemia: 18.0% Iron deficiency anemia: 22.3% Significant difference between β-thalassemia and iron deficiency anemia
Urrechaga et al., 2011 <sup>(24)</sup> N = 473. Spain.	β-thalassemia, minor (n = 136) Iron deficiency anemia, mild (n = 121) Iron deficiency anemia, severe (n = 126) Healthy individuals (n = 90)	Sysmex XE-5000 (Sysmex/ Japan) IRF	β-thalassemia: 8.7% Iron deficiency anemia, mild: 12.9% Iron deficiency anemia, severe: 16.7% Healthy individuals = 4.4%. Significant difference between healthy individuals and both types of anemia
Noronha and Grotto, 2005 <sup>(23)</sup> N = 108. Brazil.	Iron deficiency anemia, mild (n = 14) Iron deficiency anemia, severe (n = 19) β-thalassemia, minor (n = 25) Healthy individuals (n = 50)	Sysmex XE-2100 (Sysmex/ Japan) IRF	Iron deficiency anemia, severe: 22.1% Iron deficiency anemia, mild: 17.1% β-thalassemia, minor: 13.2% Healthy individuals: 8.8% Significant difference between healthy individuals and both types of anemia and β-thalassemia
Lima and Grotto, 2003 <sup>(25)</sup> N = 149. Brazil.	β-thalassemia, heterozygous (n = 43) Iron deficiency anemia (n = 49) Healthy individuals (n = 57).	Cell-Dyn 3500 (Abbott/ USA) HFR	β-thalassemia, heterozygous: 7.3% Iron deficiency anemia: 6.9% Healthy individuals: 6.2% No significant difference among the groups

HFR: high fluorescence reticulocytes; IRF: immature reticulocytes fraction.

Table 2 - Summary of cross-sectional studies comparing the maturity of reticulocytes between iron deficiency anemia and healthy individuals.

Design of the study and sample size	Participants' characteristics	Hematologic analyzer and parameter	Main results
Canalejo et al., 2011 <sup>(26)</sup> N = 99. Argentina.	Pregnant women ageing between 18 and 40 years without history of disease or prescription of iron.	Cell-Dyn 3700 (Abbott USA) IRF	IRF values showed significant differences: > 0.35 in pregnant women with iron deficiency; < 0.35 in healthy women. Sensibility: 76.1%. Specificity: 53.1%.
Choi and Son, 2005 <sup>(27)</sup> N = 149. South Korea.	Iron deficiency anemia (n = 76), average age: 15.9 ± 1.6; Healthy individuals (n = 73), average age: 16.3 ± 1.4.	Sysmex R-3000 (Sysmex/Japan) IRF	Iron deficiency anemia: 2.10%; Healthy individuals: 1.13%. There was significant difference between the groups.

IRF: immature reticulocytes fraction.

Canalejo *et al.*<sup>(26)</sup> evaluated 99 pregnant women, aged between 18 and 40 years, during prenatal care, with no history of disease or prescription of supplementary iron. The authors aimed to assess the specificity and sensibility of IRF for the early diagnosis of iron deficiency during pregnancy. The authors observed that the IRF value was different between pregnant women with and without iron deficiency, with 76.1% of sensitivity and 53.1% of specificity, using as cut-off a value of 0.35.

Choi and Son<sup>(27)</sup> evaluated the IRF of 149 patients and the means of IRF found were 1.13% for healthy individuals and 2.10% for patients with iron deficiency anemia. These studies have demonstrated that IRF started

to increase as serum iron levels decreased reaching its peak when the patients had an evident iron deficiency. This finding suggests an increased erythropoietic activity when patients were compared with healthy individuals. In normal erythropoiesis, reticulocytes mature gradually in the peripheral blood losing their RNA. By other side, iron deficiency leads to a restricted synthesis of hemoglobin and to an increase in the production rate of transferrin receptor. The fluorescence intensity of reticulocytes is directly proportional to the amount of intracellular RNA. Therefore, higher emission of MFR and HFR in iron deficiency anemia could be influenced by the amount of RNA of the intracellular transferrin receptors.<sup>(25)</sup>

## IRF IN THE DIAGNOSIS OF THALASSEMIA AND MACROCYTIC ANEMIAS

The diagnosis of thalassemia requires, in addition to the blood count, electrophoresis of hemoglobin, and other complementary tests, such as molecular, to confirm and differentiate the types of thalassemia. IRF may be useful as a screening parameter since it presents significant differences between healthy individuals and patients with thalassemia; however, it was not effective in differentiating the types of thalassemia.

Butthep *et al.*<sup>(28)</sup> evaluated reticulocyte maturity in 141 individuals, among them patients with  $\alpha$  and  $\beta$ -thalassemia, intermediary thalassemia and healthy individuals. IRF value showed significant increase both in  $\alpha$  and  $\beta$ -thalassemia in relation to healthy individuals, but there was no difference between the groups of thalassemia. These results reinforce that active and compensatory erythropoiesis in the bone marrow of patients with thalassemia lead to a greater release of immature reticulocytes in the bloodstream when compared to healthy individuals and is useful to raise a diagnostic suspicion.

Another possible application of IRF would be in the differential diagnosis of macrocytic anaemias including patients with myelodysplastic syndromes, megaloblastic anemia and non-megaloblastic macrocytic anemias. Very high values of IRF (>16) would most likely exclude the diagnosis of non-megaloblastic macrocytic anemia.<sup>(29)</sup>

## IRF IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS BETWEEN HEREDITARY SPHEROCYTOSIS AND OTHER HEMOLYTIC ANEMIAS

Differential diagnosis of hereditary hemolytic anemias is complex in mild, moderate and severe cases, and requires more specific complementary tests, in addition to the blood count. Three studies comparing the maturity of reticulocytes in patients with hereditary spherocytosis (HS) and in patients with other hemolytic anemias were found, and the IRF was shown to be an important parameter in the screening of patients with HS. Table 3 shows the main characteristics of the three studies that compared the maturity of reticulocytes between patients with HS and other hemolytic anemias.

Table 3 - Summary of cross-sectional studies comparing the maturity of reticulocytes between hereditary spherocytosis and other hemolytic anemias.

Design of the study and sample size	Participants' characteristics	Hematologic analyzer and parameter	Main results
Xu <i>et al.</i> , 2015 <sup>(30)</sup> n = 370. China.	HS (n = 53); $\alpha$ -thalassemia (n = 55); $\beta$ -thalassemia (n = 54); Anemia by deficiency of G6PD (n = 56); AIHA (n = 52); Healthy individuals (n = 100).	Beckman-Coulter LH780 (Beckman Coulter /USA) IRF	AIHA: 45.4%; Anemia by deficiency of G6PD: 42.2%; HS: 33.3%; $\alpha$ and $\beta$ -thalassemias: 30.6%; Healthy individuals: 28.0%. Significant difference among groups..
Lazarova <i>et al.</i> , 2014 <sup>(31)</sup> n = 410. Belgium.	Patients with at least one of the screening tests positive for HS.	Beckman Coulter DxH800 (Beckman Coulter/USA) Ret/ IRF	Ret/IRF ratio showed 92% of sensitivity and 89% of specificity for HS diagnosis based on the reference intervals for healthy individuals determined by authors (0.71 to 2.34 for women, 0.8 to 2.69 for men).
Mullier <i>et al.</i> , 2011 <sup>(32)</sup> n = 400. Belgium.	HS (n = 45); Other hemolytic diseases (n = 108); Microcytic anemias (n = 93): iron deficiency (n = 64) and functional iron deficiency (n = 29); Healthy individuals (n = 61).	Sysmex XE-5000 (Sysmex/Japan) Ret/IRF	All 45 confirmed cases of HS had a Ret/IRF ratio higher than 7.7. Hence, this value may be used as reference to track all spherocytosis cases. Among all 45 cases, all considered as mild spherocytosis (Hb > 12 g/dL, n = 12) had a Ret/IRF ratio higher than 19, showing to be a reference value that could be used to track mild HS.
Bobée <i>et al.</i> , 2018 <sup>(15)</sup> n = 700. France.	Severe HS (n = 9); Moderate HS (n = 25); HS without anemia (n = 13); $\beta$ -thalassemia minor (n = 30); Anemia by deficiency of G6PD (n = 23); Anemia by deficiency of PK (n = 17); Sickle cell trait (n = 28); Sickle cell disease (n = 30); Iron deficiency anemia (n = 33); Membranopathies (n = 3); Healthy individuals (n = 489).	Sysmex XE-5000 (Sysmex/Japan) Ret/IRF	Severe HS: 21.6%; Ret/IRF: 13.6 Moderate HS:13.0%; Ret/IRF: 22.8 HS without anemia: 6.5%; Ret/IRF: 37.1 $\beta$ -thalassemia minor: 10.2%; Ret/IRF: 7.5 Anemia by deficiency of G6PD: 11.6%; Ret/IRF: 9.2 Anemia by deficiency of PK: 16.5%; Ret/IRF: 36.2 Sickle cell trait: 9.6%; Ret/IRF: 7.6 Sickle cell disease: 24.8% Ret/IRF: 9.6 Iron deficiency anemia:19.9% Ret/IRF: 3.3 Membranopathies: 11.7% Ret/IRF: 10.7 Healthy individuals: 13.2% Ret/IRF:7.9 Ret/IRF ratio showed 94.1% of sensitivity and 79.6% of specificity for HS screening.

HS: hereditary spherocytosis; AIHA: autoimmune hemolytic anemia; G6PD: glucose 6 phosphate dehydrogenase; PK: pyruvate kinase; IRF: immature reticulocytes fraction, Ret: reticulocytes absolute count.

Mullier *et al.*<sup>(32)</sup> evaluated the efficiency of IRF in differentiating HS from other hemolytic anemias and compared this diagnostic tool with the current existent methods. The group with HS was compared to 108 patients with other hemolytic diseases, 93 patients with iron deficiency and 61 healthy individuals. Authors noted that patients with HS had a reticulocytes/IRF ratio higher than 7.7. The authors concluded that this limit could be used as a pre-condition for HS screening. Moreover, all cases of mild HS (Hb > 12g/dL) had a Ret/IRF ratio higher than 19 and, consequently, this value could be used for mild HS screening. The efficacy of the diagnostic tool used to differentiate HS from other hemolytic and iron deficiency anemias was compared to other parameters used in the diagnosis of anemias, obtaining sensibility, specificity, positive and predictive negative values of 100%, 99.3%, 75.0% and 100%, respectively. Thus, Ret/IRF ratio seems to be more efficient in the differential diagnosis among these different anemias when compared to the existing parameters. In addition, Lazarova *et al.*<sup>(31)</sup> obtained similar results, with the Ret/IRF ratio showing 92% of sensibility and 89% of specificity in the differential diagnosis of HS. Bobée *et al.*<sup>(15)</sup> after a series of analyzes, elaborated HS-optimized screening tools, and one of its parameters is reticulocytes/IRF ratio higher than 9.1.

Still concerning to the efficiency of IRF in differentiating HS from other hemolytic anemias, Xu *et al.*<sup>(30)</sup> observed that the average of IRF was significantly different among the following groups: autoimmune hemolytic anemia – AIHA (45.4%), deficiency of G6PD (42.2%), HS (33.3%), thalassemia (30.6%) and, finally, the group of healthy individuals (28.1%). These differences can be explained by the physiopathology of each disease. AIHA and anemia by deficiency of the G6P enzyme can lead to intense hemolysis, characterized by the premature destruction of erythrocytes as a result of the immunological humoral response or triggered by infections, respectively. In both cases, the bone marrow needs to show sufficient compensatory hyperplasia to try to maintain sufficient blood cells number in the bloodstream.

HS is caused by qualitative and/or quantitative changes in the proteins of erythrocyte membranes, thus it is possible to observe morphological alterations that lead to the reduction of the red blood cells lifespan. The severity of anemia is profoundly variable as it is related to the type of mutation affecting the individual. Authors did not highlight the classification of spherocytosis (mild, moderate or severe) or thalassemia (minor and major for beta; and mild, trace or disease of the hemoglobin H for alpha) of the patients included in the study. Thus, the possibility of existing moderate or mild anemia among the patients may have resulted in a lower IRF, since individuals with mild to moderate hemolysis would not have bone marrow hyperplasia in the same degree of AIHA and anemia due to G6PD deficiency.

## IRF FOR EVALUATING HEMATOLOGICAL RECOVERY

Laboratory tests indicating hematological recovery are very useful in certain clinical conditions. Effective erythropoiesis can be assessed and sequentially monitored by quantitative measurement of IRF. In 2006, Luczyński *et al.*<sup>(33)</sup> conducted a study to find the most sensitive indicator of anemia among reticulocyte subpopulations assessed by flow cytometry in children with different types of cancer. These authors have found that IRF is not only the first sign of hematologic recovery but also a very strong indicator of postchemotherapy aplasia. In addition, autologous stem cell transplant recipients at risk for infection due to neutropenia (absolute neutrophil count < or = 100/microl) can be identified by IRF several days before neutrophil recovery which reflects erythroid engraftment and hence a recovering marrow.<sup>(34)</sup> Within this context, another study,<sup>(35)</sup> reported that IRF was an early predictor of bone marrow recovery post chemotherapy in patients with acute leukemia, compared with absolute neutrophil count (ANC). As advantages, the authors emphasize that IRF is not affected by infection, is easily measured, inexpensive and reliable parameter to evaluate bone marrow regeneration. Another study developed by Rauf *et al.*<sup>(36)</sup> reported that the IRF revealed a hematopoietic recovery of the bone marrow of children with acute lymphatic leukemia after chemotherapy earlier than the ANC. Moreover, IRF can be considered as a new tool for hematopoietic evaluation after hematopoietic stem cell transplantation, since this parameter increases before absolute neutrophil count (ANC) and persists increased.<sup>(37)</sup>

In another study, Gonçalves and col. (2011) evaluated the hematologic recovery of patients after allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation and found that this recovery was detected 4 days earlier by IRF than by neutrophil count (NEU) (11 vs 15 d) and 2 days before the immature platelet fraction (10 vs 12 d). For patients undergoing a nonmyeloablative regimen (NMA), the prediction was even higher for IRF 5 days compared to NEUT (10 vs 15 d).<sup>(38)</sup>

Since parvo B19 infection may provoke aplastic anemia and that after its treatment high and medium fluorescence reticulocytes appear in the peripheral blood three to five days prior to the peak in absolute reticulocytes, IRF can be an useful tool for assessment of earlier erythroid regeneration.<sup>(39)</sup> IRF has also been used to evaluate recovery of erythropoiesis after the frequent side effects of antitumor treatment as well as by the disease itself<sup>(33)</sup> and may also reflect success of the erythroid engraftment and, therefore, a recovered marrow.<sup>(34)</sup>

Finally, from the clinical point of view, hematological recovery after treatment of hematological and oncological diseases, such as bone marrow transplantation and chemo and radiotherapy may also be evaluated early by IRF, which allows more specific treatment or individualized approach.

## IRF: DISCUSSION OF CLINICAL APPLICATIONS AND TECHNICAL LIMITATIONS

Reticulocyte count in manual method has been the assay traditionally used to evaluate the status of erythropoiesis in haematological disorders with disturbances in erythropoietic activity. However, automated reticulocyte count based on flow cytometry has provided much objective and exactly measure of percentage and absolute number of reticulocytes than microscopic method. In addition to being a fast method, evaluation of IRF presents advantage in comparison to other parameters for discriminating anemias due to the precocity with which the information is obtained which represents the bone marrow activity in real time.

In addition to the parameters that describe reticulocyte maturation and potential use in various clinical conditions, other indexes derived from reticulocytes such as MCVr, CHR and MCHCr, have been described. They allow the evaluation of the functional status of erythropoiesis, a useful parameter in the diagnosis and treatment of iron deficiency, in addition to rhEPO therapy.

Studies addressed in this review showed that the evaluation of the IRF assists in the differential diagnosis of anemias, showing more efficiency in iron deficiency anemia on its severe and moderate forms and in hemolytic anemias of greater intensity, such as anemia by deficiency of G6PD and severe hereditary spherocytosis. Moreover, it is an early marker for iron deficiency anemia, since it increases gradually as the iron supplies decrease. IRF is a parameter related to bone marrow activity, that is, it is directly related to the intensity of the erythropoiesis which varies according to the physiopathology of each type of anemia.

However, although there are studies being published on the subject since 1989,<sup>(40)</sup> limitations still exist. Lack of reference values both for healthy individuals and for individuals with different anemias makes IRF use difficult in clinical practice. Reference values vary among researchers depending on the type of hematological analyzer used and, therefore, diagnostic cutoff are method dependent.<sup>(8)</sup> For example, an analysis of the data presented in Tables 1, 2 and 3 revealed great variability of the IRF according to the hematological analyzer. For example, for the control group the IRF ranged from <0.35%, using Cell-Dyn 3700 (Abbott Diagnostics, Santa Clara, CA) for healthy women, to 28.0% in healthy subjects, using the LH780 (Beckman Coulter, Miami, FL). Even in Sysmex hematological analyzers (Toa Medical Electronics Co, Kobe, Japan) IRF values ranging from 0.73% (R-3000) to 8.8% (XE 2100) were observed. Likewise, discrepancies among hematological analyzers were also observed for iron deficiency anemia, thalassemias and other anemias. Several hematological analyzers showed very high IRF values for anemia, such as iron deficiency anemia and thalassemias: ADVIA 120 (Bayer, Tarrytown,

USA), Sysmex XE 5000 (Toa Medical Electronics Co, Kobe, Japan), Sysmex 2100 (Toa Medical Electronics Co, Kobe, Japan); while others such as Sysmex 3000 (Toa Medical Electronics Co, Kobe, Japan) showed much lower IRF values, which did not differed significantly from healthy controls.

In agreement with Butarello,<sup>(8)</sup> an analysis of the data presented in Tables 1, 2 and 3 have confirmed that the results are still very discrepant when supplied by different analyzers. This fact implies the urgency of the standardization of method-dependent parameters, since IRF and other more recent RBCs indices appear to be much more sensitive indicators of sudden erythropoietic changes than the conventional parameters.

According to the data presented in the current review, IRF values tended to be higher in patients with severe iron deficiency anemia compared to mild forms. Interestingly, IRF values showed a tendency to increase in patients with iron deficiency anemia in relation to those with thalassemias. Surprisingly results of IRF provided by Cell-Dyn 3500 for beta-thalassemia heterozygous, iron-deficiency anemia and healthy individuals were similar and no significant difference was observed among these groups.

On the basis of the diversity of results found in literature, it should also be noted that standardization on how to express the maturity of reticulocytes among the various hematological analyzers is imperative, i.e. some expressions as IRF, others as RMI and some only the percentage of IRF. Although all parameters are capable of reflecting bone marrow activity, they are obtained differently which may compromise comparability of the results. Another limitation of these indices is the lack of an accredited external quality assessment for such indices as well as internal quality control, which hinders the interpretation and clinical decision making.

However, new reticulocyte parameters are likely to improve the diagnosis and monitoring of many hematological diseases. Different hematological analyzers produce different results for IRF and this is a critical point related to the possible clinical applications. Once this limitation is overcome IRF and other reticulocyte indices certainly will assume an essential role in differential diagnosis of different types of anemia and in the monitoring of their treatment.

As mentioned by Morkis *et al.* 2016,<sup>(41)</sup> and many others<sup>(8,20,42,43)</sup> clinical application can only occur when the reference intervals were determined according to the pre-analytical variables (time, temperature, anticoagulants) and standardization of the methodology, that although it has already been pointed out as required nearly two decades ago,<sup>(44)</sup> it has not yet been realized.

In summary, although IRF is of recognized importance in many clinical situations, caution is required in interpreting the results considering the lack of consistency between data provided by laboratories using different hematological analyzers. Thus, the great variability of the IRF values as a

function of the method prevents any comparison of results and the correct interpretation is impaired.

## FUNDING SOURCES

This study was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001; and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq) (Research Fellowship MGC 311185/2019-3).

### Resumo

*Novos parâmetros hematológicos, como a fração de reticulócitos imaturos (IRF), tendem a se tornar ferramentas importantes na prática clínica. O IRF identifica os reticulócitos mais imaturos, que contêm grande quantidade de ácido ribonucleico, sendo um importante parâmetro para avaliar a atividade da medula óssea, em tempo real, para o diagnóstico diferencial das anemias, acompanhamento do seu tratamento, e para o acompanhamento ou recuperação da medula óssea em diversas condições clínicas. No entanto, ainda há um longo caminho a percorrer antes que a IRF possa ser usada na prática clínica. Assim sendo, é urgente estabelecer os valores de referência e padronizar as metodologias utilizadas pelos diferentes analisadores hematológicos e como expressar seus resultados. Esta revisão narrativa fornece uma perspectiva crítica sobre o IRF e seu potencial para o uso clínico, bem como suas limitações.*

### Palavras-chave

*Reticulócitos; Anemia Ferropriva; Anemia Hemolítica; Medula Óssea; Talassemia*

## REFERENCES

- Hoffmann JJML, Urrechaga E, Aguirre U. Microcytaire anemie: thalassemie of ijzergebrek? Een meta-analyse van diagnostische indices. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk*. 2015;40:213-4.
- Lozoff B. Iron deficiency and child development. *Food Nutr Bull*. 2007;28(4 Suppl):S560-71. Epub 2008/02/27.
- WHO. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia. Benoist B, McLean E, Egli I, Cogswell M, editors. Geneva 2008.
- Portaria nº 1247, de 10 de novembro de 2014. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Anemia por Deficiência de Ferro., (2014).
- Cascio MJ, DeLoughery TG. Anemia: Evaluation and Diagnostic Tests. *Med Clin North Am*. 2017;101(2):263-84. Epub 2016/12/08.
- Iolascon A, De Falco L, Beaumont C. Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis. *Haematologica*. 2009;94(3):395-408. Epub 2009/02/03.
- Massey AC. Microcytic anemia. Differential diagnosis and management of iron deficiency anemia. *Med Clin North Am*. 1992;76(3):549-66. Epub 1992/05/01.
- Buttarelo M. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *Int J Lab Hematol*. 2016;38 Suppl 1:123-32. Epub 2016/05/16.
- Piva E, Brugnara C, Spolaore F, Plebani M. Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clin Lab Med*. 2015;35(1):133-63. Epub 2015/02/14.
- Wollmann M, Gerzson BM, Schwert V, Figuera RW, Ritzel Gde O. Reticulocyte maturity indices in iron deficiency anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2014;36(1):25-8. Epub 2014/03/14.
- Joao AR, Pinto S, E C. Subpopulações dos reticulócitos e fração de reticulócitos imaturos como indicadores de aumento da eritropoese em doentes com anemia por deficiência de ferro. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(3):188-92.
- van Houste AJ, Bartels PC, Schoorl M, Mulder C. Methodology-dependent variations in reticulocyte counts using a manual and two different flow cytometric procedures. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1994;32(11):859-63. Epub 1994/11/01.
- Oliveira RAG. Hemograma. Como fazer e interpretar. 2ª ed: LMP; 2016. 643 p.
- Grotto HZ. Platelet and reticulocyte new parameters: why and how to use them? *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2016;38(4):283-4. Epub 2016/11/20.
- Bobee V, Daliphard S, Schrapp A, Lahary A. Screening of hereditary spherocytosis and pyruvate kinase deficiency by automated blood count using erythrocytic and reticulocytic parameters. *Int J Lab Hematol*. 2018;40(6):697-703. Epub 2018/09/06.
- Liao L, Xu Y, Wei H, Qiu Y, Chen W, Huang J, et al. Blood cell parameters for screening and diagnosis of hereditary spherocytosis. *J Clin Lab Anal*. 2019;33(4):e22844. Epub 2019/04/05.
- Brugnara C. Reticulocyte cellular indices: a new approach in the diagnosis of anemias and monitoring of erythropoietic function. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2000;37(2):93-130. Epub 2000/05/16.
- Chang CC, Kass L. Clinical significance of immature reticulocyte fraction determined by automated reticulocyte counting. *Am J Clin Pathol*. 1997;108(1):69-73. Epub 1997/07/01.
- Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Analysis of reticulocyte parameters on the Sysmex XE 5000 and LH 750 analyzers in the diagnosis of inefficient erythropoiesis. *Int J Lab Hematol*. 2011;33(1):37-44. Epub 2010/05/25.
- Piva E, Brugnara C, Chiandetti L, Plebani M. Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(10):1369-80. Epub 2010/07/30.
- Velasco-Rodriguez D, Alonso-Dominguez JM, Gonzalez-Fernandez FA, Villarrubia J, Sopena M, Abalo L, et al. Reticulocyte parameters of delta beta thalassaemia trait, beta thalassaemia trait and iron deficiency anaemia. *J Clin Pathol*. 2016;69(2):149-54. Epub 2015/08/13.
- Hoffmann JJ, Urrechaga E, Aguirre U. Discriminant indices for distinguishing thalassemia and iron deficiency in patients with microcytic anemia: a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53(12):1883-94. Epub 2015/11/05.
- Noronha JF, Grotto HZ. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in patients with iron deficiency anemia and beta-thalassemia minor. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(2):195-7. Epub 2005/04/22.
- Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Erythrocyte and reticulocyte parameters in iron deficiency and thalassemia. *J Clin Lab Anal*. 2011;25(3):223-8. Epub 2011/05/14.
- de Lima GA, Grotto HZ. Soluble transferrin receptor and immature reticulocytes are not useful for distinguishing iron-deficiency anemia from heterozygous beta-thalassemia. *Sao Paulo Med J*. 2003;121(2):90-1. Epub 2003/07/19.
- Canalejo K, Aixalá M, Casella A, Capanera P, Medina J, Jelen A. Evaluación de la fracción de reticulocitos inmaduros como parámetro de ferropenia en el embarazo. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 2011;45:81-5.
- Choi JW, Son BK. Soluble transferrin receptor concentration is not superior to log ferritin for evaluating erythropoiesis in adolescents with iron deficiency anemia. *Clin Chim Acta*. 2005;355(1-2):83-9.
- Butthep P, Wisedpanichkij R, Jindadamrongwech S, Fucharoen S. Elevated erythropoietin and cytokines levels are related to impaired reticulocyte maturation in thalassemic patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2015;54(2):170-6. Epub 2014/12/06.
- Torres Gomez A, Casaño J, Sánchez J, Madrigal E, Blanco F, Alvarez MA. Utility of reticulocyte maturation parameters in the differential diagnosis of macrocytic anemias. *Clin Lab Haematol*. 2003;25(5):283-8.

30. Xu Y, Yang W, Liao L, Deng Z, Qiu Y, Chen W, *et al.* Mean reticulocyte volume: a specific parameter to screen for hereditary spherocytosis. *Eur J Haematol.* 2016;96(2):170-4. Epub 2015/05/06.
31. Lazarova E, Pradier O, Cotton F, Gulbis B. Automated reticulocyte parameters for hereditary spherocytosis screening. *Ann Hematol.* 2014;93(11):1809-18. Epub 2014/06/10.
32. Mullier F, Lainey E, Fenneteau O, Da Costa L, Schillinger F, Bailly N, *et al.* Additional erythrocytic and reticulocytic parameters helpful for diagnosis of hereditary spherocytosis: results of a multicentre study. *Ann Hematol.* 2011;90(7):759-68. Epub 2010/12/22.
33. Luczynski W, Ratomski K, Wysocka J, Krawczuk-Rybak M, Jankiewicz P. Immature reticulocyte fraction (IRF)--an universal marker of hemopoiesis in children with cancer? *Adv Med Sci.* 2006;51:188-90. Epub 2007/03/16.
34. Graziutti ML, Dong L, Miceli MH, Cottler-Fox M, Krishna SG, Fassas A, *et al.* Recovery from neutropenia can be predicted by the immature reticulocyte fraction several days before neutrophil recovery in autologous stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37(4):403-9. Epub 2006/01/10.
35. Raja-Sabudin RZ, Othman A, Ahmed-Mohamed KA, Ithnin A, Alauddin H, Alias H, *et al.* Immature reticulocyte fraction is an early predictor of bone marrow recovery post chemotherapy in patients with acute leukemia. *Saudi Med J.* 2014;35(4):346-9. Epub 2014/04/22.
36. Rauf SE, Khan SA, Ali N, Afridi NK, Haroon M, Arslan A. Immature Reticulocyte Fraction and Absolute Neutrophil Count as Predictor of Hemopoietic Recovery in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia on Remission Induction Chemotherapy. *Turk J Haematol.* 2016;33(2):131-4. Epub 2015/08/06.
37. Morkis IV, Farias MG, Rigoni LD, Scotti L, Gregianin LJ, Daudt LE, *et al.* Assessment of immature platelet fraction and immature reticulocyte fraction as predictors of engraftment after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Lab Hematol.* 2015;37(2):259-64. Epub 2014/07/30.
38. Goncalo AP, Barbosa IL, Campilho F, Campos A, Mendes C. Predictive value of immature reticulocyte and platelet fractions in hematopoietic recovery of allograft patients. *Transplant Proc.* 2011;43(1):241-3. Epub 2011/02/22.
39. Wyrick-Glatzel J, Conway-Klaassen J. Clinical utility of the IRF: assessment of erythroid regeneration following parvo B19 infection. *Clin Lab Sci.* 2002;15(4):208-12. Epub 2003/06/05.
40. Tsuda I, Tatsumi N. Maturity of reticulocytes in various hematological disorders. *Eur J Haematol.* 1989;43(3):252-4.
41. Morkis I, Farias M, Scotti L. Determination of reference ranges for immature platelet and reticulocyte fractions and reticulocyte hemoglobin equivalent. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2016;38.
42. Brugnara C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. *Clin Chem.* 2003;49(10):1573-8. Epub 2003/09/23.
43. Watanabe K, Kawai Y, Takeuchi K, Shimizu N, Iri H, Ikeda Y, *et al.* Reticulocyte maturity as an indicator for estimating qualitative abnormality of erythropoiesis. *J Clin Pathol.* 1994;47(8):736-9. Epub 1994/08/01.
44. Buttarello M, Bulian P, Farina G, Petris MG, Temporin V, Toffolo L. Five fully automated methods for performing immature reticulocyte fraction: comparison in diagnosis of bone marrow aplasia. *Am J Clin Pathol.* 2002;117(6):871-9. Epub 2002/06/06.

---

Correspondência

**Danyelle Romana Alves Rios**

Rua Sebastião Gonçalves Coelho, 400 - Chanadour

CEP: 35501-296 Divinópolis-MG

Email: danyelleromana@gmail.com

# Interferências do gel separador em análises bioquímicas e possíveis soluções: uma revisão bibliográfica

## *Separator Gel interferences in biochemical analysis and possible solutions: a bibliographic review*

Thalita Silva de Oliveira<sup>1</sup>

Derick Mendes Bandeira<sup>2</sup>

Elem Batista<sup>3</sup>

Patrick Menezes<sup>4</sup>

### Resumo

Este trabalho é uma revisão bibliográfica sobre as interferências dos tubos de coleta com gel separador em análises bioquímicas, comparando estes resultados com os obtidos em tubos com separador mecânico (Barricor). Para tanto, buscamos artigos nas bases de dados PubMed, Google acadêmico, Scielo e LILACS. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 21 artigos para a escrita da revisão. Estes trabalhos mostraram que o gel pode causar instabilidade nas dosagens de íons e de diversas substâncias orgânicas. Além disso, em alguns casos a análise da amostra fica impossibilitada devido ao fenômeno de formação do gel flutuante. No entanto, através do uso do tubo com separador mecânico foi possível minimizar essas interferências e instabilidades. Outra vantagem está relacionada ao tempo reduzido de centrifugação da amostra com o tubo de separador mecânico (3 min. vs. 10 min.). Este tipo de separação também permite uma centrifugação mais eficaz da amostra, com menor contaminação do plasma com células e plaquetas, quando comparada à centrifugação do soro obtido nos tubos tradicionais com gel separador. Por estas razões, fica evidente que as amostras de plasma obtidas em tubos de separação mecânica demonstram ser de melhor qualidade para as análises bioquímicas.

### Palavras-chave

Bioquímica; Erros de Diagnóstico; Fase Pré-Analítica

## INTRODUÇÃO

A medicina laboratorial é uma especialidade responsável pela realização de exames complementares no auxílio ao diagnóstico. O principal objetivo do laboratório é garantir um atendimento seguro e eficiente, com laudos rápidos e confiáveis nos diferentes estágios da cadeia da saúde: prevenção, diagnóstico, prognóstico e acompanhamento terapêutico. Com isto, facilita a tomada de decisão dos médicos em relação à conduta clínica dos seus pacientes.<sup>(1,2)</sup> Estima-se que cerca de 60% a 70% das decisões médicas mais importantes são baseadas nos resultados laboratoriais.<sup>(3)</sup>

Tecnicamente, o teste de laboratório consiste em três etapas diferentes: pré-analítica, analítica e pós-analítica. Todas são fundamentais para a qualidade do resultado final.

<sup>(4)</sup> Na primeira delas, que se inicia na requisição do exame, orientação quanto à coleta do material para o paciente, a obtenção da amostra biológica, acondicionamento, transporte e triagem,<sup>(5,6)</sup> ocorriam 70% dos erros nos testes de laboratório. Entretanto, houve uma redução de 10 vezes na taxa de erros analíticos nas últimas décadas.<sup>(7)</sup>

De acordo com Lippi,<sup>(8)</sup> os erros em laboratórios de análises clínicas podem ser fatais, principalmente quando o teste irá definir um diagnóstico que vai determinar resultados falsos negativos ou falsos positivos. Os dois quadros colocam em risco a vida do paciente, além de trazerem custos desnecessários ao laboratório.

Segundo Guimarães *et al.*,<sup>(9)</sup> muitos destes erros geram a rejeição da amostra, com necessidade da recoleta. Esta interferência no processo laboratorial pode ocorrer desde o

<sup>1</sup> Graduada em Biomedicina, Centro Universitário CBM – UNICBE, Analista – Laboratório Neurolife. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>2</sup> Biomédico analista clínico pela Universidade Federal Fluminense (UFF). Mestre em ciências pela pós-graduação em Medicina Tropical (IOC/FIOCRUZ). Pesquisador colaborador do Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral (LMMV/IOC-FIOCRUZ). Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>3</sup> Bióloga e especialista pela Universidade Castelo Branco. Coordenadora do Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer (Laboratório Plasma). Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>4</sup> Biólogo Clínico doutorando no Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo De Meis (IBqM/UFRJ). Mestre em Medicina Laboratorial (MPSMLTF /UERJ), Diretor adjunto e coordenador do Curso de Aperfeiçoamento Profissional Biomédico (CAPBio). Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido em 08/02/2021

Aprovado em 21/12/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102106

primeiro atendimento, seja ele emergencial ou ambulatorial.

<sup>(10)</sup> Além da insatisfação, os erros podem trazer constrangimento ao paciente e causar perda de credibilidade do médico e/ou paciente com o laboratório. Acrescenta-se, ainda, que o atraso do laudo pode postergar o início do tratamento, ocasionar um tratamento inadequado ou fazer com que ele não aconteça.<sup>(9)</sup>

No entanto, devido ao avanço da tecnologia, os testes laboratoriais têm se aprimorado constantemente. Tanto os reagentes quanto os equipamentos proporcionam resultados cada vez mais específicos e em tempo reduzido.<sup>(9)</sup>

Um das fontes potenciais de distorção na fase pré-analítica que ainda permanece é o tipo de tubo usado para amostragem de soro, em particular tubos com gel de barreira, em que os analitos podem ser adsorvidos durante o armazenamento.<sup>(7)</sup>

O gel separador tem como função proporcionar uma barreira entre o soro ou plasma e as células durante o processo de centrifugação.<sup>(11)</sup> Há algumas décadas, quando este tubo chegou ao mercado, os laboratórios tiveram muitos benefícios, como maior eficiência dos processos e aumento da segurança dos profissionais de saúde. Além disso, foi possível o processamento e armazenamento das amostras em um tubo primário.<sup>(12)</sup>

Os primeiros tubos com barreira tinham o gel de silicone, mas se mostraram instáveis após a esterilização. Por isso, o gel de silicone foi substituído por um gel à base de poliéster. Atualmente, o gel é composto por uma resina e uma mistura estabilizadora, necessária para ajustar a densidade do gel.<sup>(12)</sup>

De acordo com Wang *et al.*,<sup>(13)</sup> o gel de separação no BD Vacutainer é composto principalmente de borracha de silicone, hidrocarbonetos macromoleculares e adesivo hidrofóbico, com densidade intermediária entre 1,04 e 1,05 mmol/L.

A tecnologia de um separador de gel para os tubos de soro foi algo tão promissor que começou a se pensar na produção de tubos de heparina lítica, tubos de EDTA geradores de plasma com a barreira de gel. Dessa forma, foi possível usufruir dos benefícios do gel separador juntamente com a rapidez do plasma, pois não era necessário aguardar a retração do coágulo, que é necessário no tubo que gera soro.<sup>(11,12)</sup>

Devido a esses benefícios começou-se a pensar na possibilidade de um tubo com rolha mecânica, sendo criado então os tubos Barricor. Neles, a parte superior consiste, em sua maioria, por elastômero, permitindo o alongamento e a manipulação durante a centrifugação para criar uma vedação, e uma pequena base de plástico de alta densidade que permite separar o plasma das células por meio de fluabilidade diferencial. Desta forma, garante-se maior estabilidade da amostra.<sup>(14)</sup> Além disso, estes tubos requerem

um tempo de centrifugação mais curto em comparação com os tubos com gel separador (3 min. vs. 10 min.).

Alguns estudos sugerem que os tubos Barricor são uma alternativa aceitável ao tubo com gel separador, que atualmente está em uso para testes químicos. Ao mesmo tempo, oferecem o benefício adicional de redução do tempo de processamento pré-analítico, maior estabilidade de certos analitos e possivelmente menor contaminação celular.<sup>(14,15)</sup>

Faz-se necessário estruturar e buscar os conhecimentos adquiridos nos últimos anos sobre este tema para possibilitar futuras pesquisas e monitoramentos na área, de forma que este conhecimento possa ser sistematizado e utilizado para promover melhorias na fase pré-analítica.<sup>(16)</sup> E, por essa razão, este trabalho tem como objetivo geral realizar uma revisão bibliográfica de artigos científicos sobre as interferências do gel separador de tubos de coleta em analitos de química clínica. Também será feito o comparativo dos resultados obtidos em tubos com gel separador em relação aos que realizam a separação mecânica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Essa pesquisa foi realizada nas bases de dados do PubMed, Google acadêmico, Scielo e LILACS. Na Tabela 1 é possível observar os termos de busca utilizados em cada uma dessas plataformas.

Tabela 1 – Códigos de busca utilizados em cada base de dados para a realização da revisão bibliográfica.

Base de dados	Código de busca utilizado
PubMed	Separator gel tube NOT review
Google acadêmico	allintitle: gel separator tube
Scielo	gel separator tube
LILACS	gel separator tube

Os artigos foram selecionados a partir de análise do título e do resumo. Foram excluídos todos os que não abordavam a influência do gel separador nas dosagens bioquímicas ou possíveis soluções para este problema, além dos artigos publicados há mais de 10 anos, focados na área veterinária, artigos de revisão ou escritos em outros idiomas que não fossem o inglês, português ou espanhol. Também foram excluídos todos os documentos de patentes, os artigos pagos e/ou bloqueados aos quais não pudemos ter acesso ao conteúdo completo e os que disponibilizavam apenas o resumo ou apenas a citação.

Após a separação do material, foi realizado um fichamento dos principais resultados de cada artigo, organização destes dados e escrita da revisão. Toda a revisão bibliográfica foi realizada tendo como inspiração as recomendações do método PRISMA.<sup>(17)</sup>

## RESULTADOS

Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão descritos na metodologia foram selecionados 21 artigos. Na Figura 1 é exibido o fluxograma de seleção destes materiais e no Quadro 1 é feito um resumo das principais características de cada publicação.

## DISCUSSÃO

O tubo com gel é amplamente utilizado na rotina laboratorial há muitos anos e não apresenta alterações significativas em alguns analitos. No estudo de Ercan *et al.*,<sup>(18)</sup> por exemplo, foi observado que não havia alterações significativas nas dosagens de TSH, T3 e T4 quando

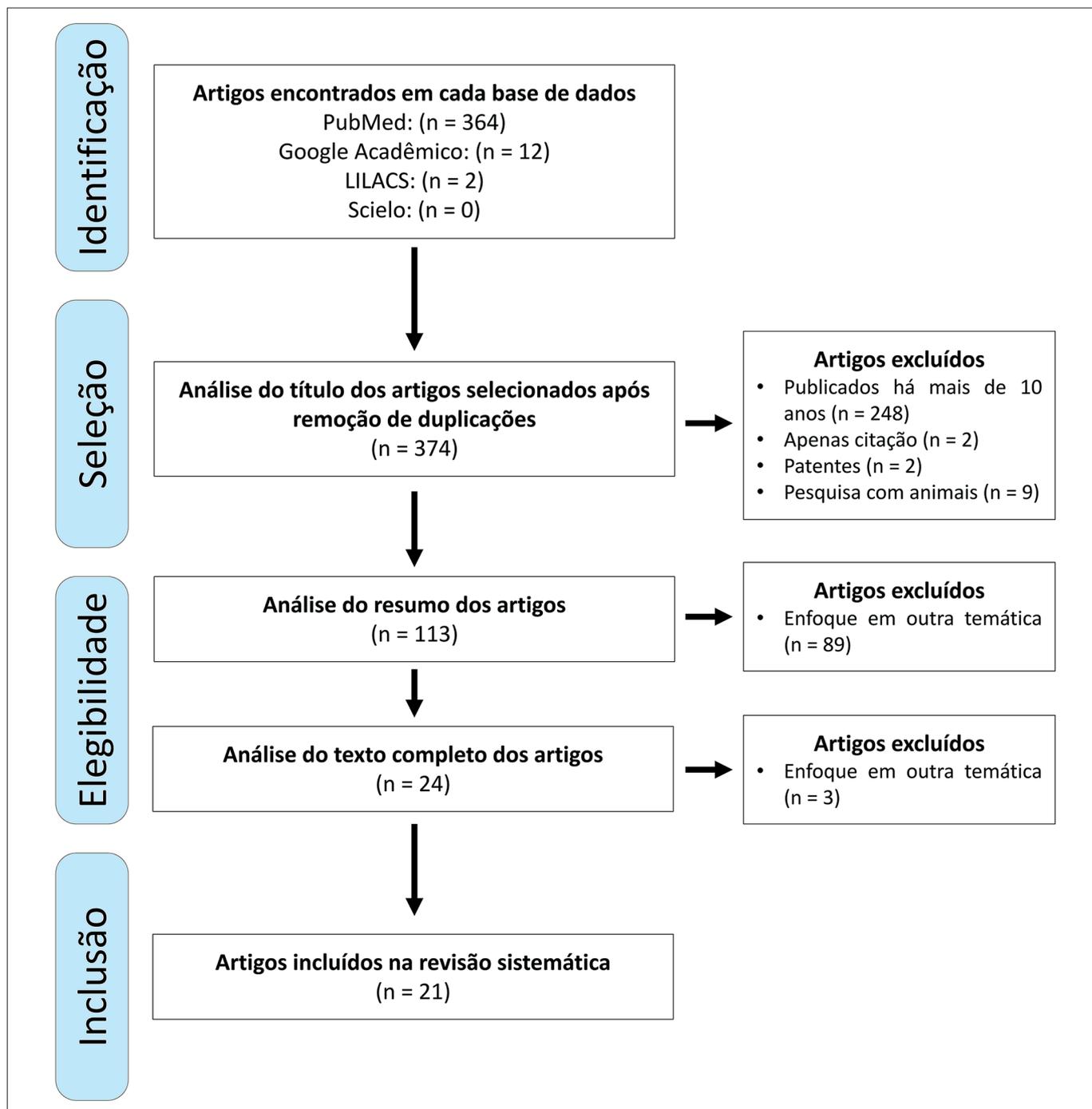


Figura 1 – Fluxograma da seleção de artigos para a revisão bibliográfica.

comparadas às dos tubos de soro sem gel. No entanto, para vários outros analitos, a presença do gel se mostrou um interferente importante, como por exemplo nas dosagens de glicose, ácido úrico, HDL, entre outros. Além disso, tubos com gel apresentam reduções importantes nas dosagens de alguns analitos com o decorrer do tempo de armazenamento.<sup>(19,20)</sup> Por essas razões, o uso desse tipo de tubo não é universalmente aceito, principalmente para monitoramento terapêutico de medicamentos. Os trabalhos de Schouwers *et al.*<sup>(19)</sup> e Schrapp *et al.*<sup>(20)</sup> mostram

que as dosagens de drogas terapêuticas sofrem grande interferência do gel.

Pelo fato de serem hidrofóbicas, são mais propensas a interagirem com o gel, o que afeta diretamente as análises.

No entanto, este não é o único interferente relevante. É preciso ter em mente que, além do gel separador, todas as partes dos dispositivos de coleta (rolha, parede do tubo, surfactante e ativador de coágulo) interagem com o sangue, podendo alterar sua composição, o que comprometeria o resultado final do exame.<sup>(21)</sup>

Quadro 1 – Resumo dos principais resultados encontrados em cada artigo selecionado para a revisão.

ID	Autor/Ano	Título	Principais resultados
1	MOROSYUK, <i>et al.</i> , 2020 <sup>(31)</sup>	A Multicenter Evaluation of a Nongel Mechanical Separator Plasma Blood Collection Tube for Testing of Selected Therapeutic Drugs	As drogas terapêuticas testadas neste estudo demonstraram estabilidade por até 7 dias no tubo BD Barricor.
2	GAWRIA, <i>et al.</i> , 2020 <sup>(30)</sup>	A comparison of stability of chemical analytes in plasma from the BD Vacutainer® Barricor™ tube with mechanical separator versus tubes containing gel separator	Diferenças significativas entre o gel BD e o tubo BD Barricor foram encontradas para AST. Existem outras desvantagens com o soro em comparação com o plasma.
3	YASAR, N; KONUKOGLU, D., 2020 <sup>(28)</sup>	Atypic separator gel flotation in blood collection tube in a patient with hyperproteinemia Nesibe	Foi possível observar que a sonda do analisador automático ocluiu devido à aspiração do gel separador em amostras coletadas de dois pacientes com diagnóstico de mieloma múltiplo.
4	HÉTU <i>et al.</i> , 2020 <sup>(33)</sup>	Improved Sample Quality and Decreased Turnaround Time When Using Plasma Blood Collection Tubes with a Mechanical Separator in a Large University Hospital	Os tubos Barricor mostraram equivalência clinicamente aceitável aos tubos de gel de soro para os analitos estudados.
5	WOLLMANN, <i>et al.</i> , 2019 <sup>(7)</sup>	Substantial Differences in Serum Concentrations of Psychoactive Drugs Measured in Samples Stored for 2 Days or More on Standard Serum Tubes Versus Serum Tubes Containing Gel Separators	Importância da fase pré-analítico para a acurácia da dosagem de medicamentos. Deve-se considerar a não utilização de tubos com separadores de gel na dosagem de medicamentos de drogas psicoativas.
6	NONKES, <i>et al.</i> , 2019 <sup>(23)</sup>	Improving home haemodialysis: Stability evaluation of routine clinical chemistry analytes in blood samples of haemodialysis patients	O sangue de pacientes hemodialisados em <i>home care</i> , quando coletados com tubo de heparina com gel separador apresentam interferência na dosagem de bicarbonato, após tempo superior a 24 horas. Apesar da comodidade de coletar em casa, há a urgência do envio do material ao laboratório.
7	RAIZMAN <i>et al.</i> , 2019 <sup>(34)</sup>	Barricor blood collection tubes are equivalent to PST for a variety of chemistry and immunoassay analytes except for lactate dehydrogenase	Tubos Barricor foram considerados o novo padrão para plasma devido a sua qualidade, sendo, em muitos aspectos, equivalente à qualidade do soro.
8	SCHRAPP, <i>et al.</i> , 2019 <sup>(20)</sup>	The right blood collection tube for therapeutic drug monitoring and toxicology screening procedures: Standard tubes, gel or mechanical separator?	O estudo mostrou que os tubos Barricor e sem gel causam menos interferência na dosagem de medicamentos, sendo recomendados para este tipo de análise.
9	FOURNIER, <i>et al.</i> , 2018 <sup>(14)</sup>	Evaluation of BD Vacutainer® Barricor™ blood collection tubes for routine chemistry testing on a Roche Cobas® 8000 Platform	Tubos Barricor podem resultar em maior estabilidade da amostra. Além disso, requerem um tempo de centrifugação mais curto em comparação com os tubos de gel (3 min. vs. 10 min.). Amostras coletadas em tubos Barricor também são estáveis por um período mais longo.
10	RICORIOS, <i>et al.</i> , 2018 <sup>(29)</sup>	Multiple myeloma and acquired von Willebrand disease: a combined cause of preanalytical interference causing gel formation?	A formação anormal de gel pode levar à oclusão das sondas do analisador ou a resultados falsamente baixos quando a amostra insuficiente é aspirada.
11	DUPUY, <i>et al.</i> , 2018 <sup>(15)</sup>	Comparison of Barricor™ vs. Lithium heparin tubes for selected routine biochemical analytes and evaluation of post centrifugation stability	Estudos sugerem que os tubos Barricor podem ser usados de forma intercambiável com tubos regulares de heparina de lítio. Os dados do trabalho demonstraram que a grande vantagem desses tubos é a estabilidade dos analitos 72 horas após a centrifugação.

Quadro 1 (continuação) – Resumo dos principais resultados encontrados em cada artigo selecionado para a revisão.

ID	Autor/Ano	Título	Principais resultados
12	PADOAN, <i>et al.</i> , 2018 <sup>(32)</sup>	Quality of plasma samples and BD Vacutainer Barricor tubes: Effects of centrifugation	Plasma coletado de tubos Barricor apresentam menos contaminação celular e de plaquetas quando comparado ao de tubos com gel separador.
13	ERCAN <i>et al.</i> , 2018 <sup>(18)</sup>	Comparison of the effect of gel used in two different serum separator tubes for thyroid function tests	Não há alterações significativas nas dosagens de TSH, T3 e T4 quando comparadas às dos tubos de soro com e sem gel.
14	MAIRE B, SCHLÜTER K. 2017 <sup>(25)</sup>	A Problem with the Separating Gel in a Blood Sample Tube in a Patient with Multiple Myeloma	Hiperproteinemia torna o soro mais denso do que o gel separador, gerando o fenômeno do gel flutuante.
15	WANG, <i>et al.</i> , 2015 <sup>(13)</sup>	The Usage of Separating Gel Vacuum Tube with Different IgG Concentration	No processo de teste clínico, foi descoberto que o sangue de pacientes com mieloma de células plasmáticas não conseguia formar uma barreira de gel normal.
16	GERIN F, <i>et al.</i> , 2014 <sup>(26)</sup>	Abnormal gel flotation in a patient with apparent pneumonia diagnosis: a case report	Flotação anormal de gel em paciente internado com diagnóstico de pneumonia. A verdadeira causa, no entanto, era o mieloma múltiplo (diagnóstico omitido).
17	DAVES, <i>et al.</i> , 2012 <sup>(24)</sup>	An Unusual Case of a Primary Blood Collection Tube with Floating Separator Gel	Pacientes com densidade de soro elevada podem apresentar problemas de gel flutuante. Por exemplo: no caso de paciente que fez uso de contraste radiológico.
18	SCHOUWERS, <i>et al.</i> 2012 <sup>(19)</sup>	Influence of separator gel in Sarstedt S-Monovette® serum tubes on various therapeutic drugs, hormones, and proteins	Influência do gel separador na dosagem de várias drogas terapêuticas em tubos de soro.
19	CUHADAR, <i>et al.</i> , 2012 <sup>(21)</sup>	Stability studies of common biochemical analytes in serum separator tubes with or without gel barrier subjected to various storage conditions	Todas as partes dos dispositivos de coleta (rolha, parede do tubo, surfactante e ativador de coágulo) interagem com o sangue, podendo alterar sua composição.
20	LI, <i>et al.</i> , 2011 <sup>(22)</sup>	Evaluation of BD Vacutainer SST™ II Plus Tubes for Special Proteins Testing	Dependendo das condições de coleta, manuseio e processamento da amostra, alterações clinicamente significativas nas concentrações de analito podem ocorrer nos tubos separadores de soro.
21	FAUGHT, <i>et al.</i> , 2011 <sup>(27)</sup>	Solution densities and estimated total protein contents associated with inappropriate flotation of separator gel in different blood collection tubes	Pacientes com mieloma múltiplo (hiperproteinemia) fornecem amostras que podem causar o problema do gel flutuante e, conseqüentemente, o entupimento da probe pelo gel.

Além destes, os aditivos para tubos de coleta de sangue também podem ser uma fonte de erros analíticos. Os silicatos inorgânicos (ou ácido elágico), trombina e tromboplastina são ativadores de coágulo frequentemente usados. Ocasionalmente, as partículas do ativador de coágulo podem não se aglomerar completamente com ele e permanecerem na camada de soro, causando interferências ao revestir os dispositivos de pipetagem, principalmente durante o armazenamento do tubo de coleta em temperaturas inadequadas.<sup>(19,21,22)</sup>

Essa é uma das muitas causas responsáveis por aproximadamente 70% do total de erros em testes laboratoriais ainda ocorrerem na fase pré-analítica, sendo uma fonte potencial de distorção dos resultados. Vale salientar que o tipo de tubo usado para amostragem de soro, em particular tubos com gel de barreira (tubos de gel), pode fazer com que os analitos sejam adsorvidos durante o armazenamento. Na dosagem de drogas psicoativas, por exemplo, essa interferência prejudicaria consideravelmente a acurácia da dosagem. Portanto, nestes casos, deve-se considerar a utilização de tubos mais adequados.<sup>(7)</sup>

Soma-se a isso o caso dos pacientes dialisados, pois é necessária a determinação da concentração de bicarbonato

para manter o estado ácido-básico. Essas concentrações são importantes para prescrever a dose apropriada dessa substância para administrar ao paciente. No estudo de Nonkes *et al.*,<sup>(23)</sup> realizado com pacientes que faziam hemodiálise em *home care*, foi observado que o armazenamento noturno de plasma resfriado, separado em gel no tubo de heparina de lítio (LH) é uma alternativa aceitável por 24 horas, havendo, depois disso, interferência considerável do gel na quantificação do analito. Neste cenário, o novo tubo Barricor poderia substituir o tubo com gel para este tipo de dosagens, uma vez que causa menos alterações e possui maior estabilidade.<sup>(20)</sup>

Outro ponto importante a ser destacado é que existem situações nas quais a separação entre o soro e a parte celular do sangue sequer é possível através do gel. Exemplos destes casos são o efeito iatrogênico após administração de contrastante radiológico iodado;<sup>(24)</sup> e pacientes em diálise nos quais o sangue é retirado de sistemas de cateter com citrato de sódio usado de forma concentrada em solução de bloqueio.<sup>(25)</sup> Em ambas as situações, o soro passa a ter uma densidade aumentada, deslocando-se para baixo do gel e em contato direto com a parte celular, fenômeno conhecido como gel flutuante.

Wang *et al.*<sup>(13)</sup> descreveram o mesmo padrão em pacientes com mieloma de células plasmáticas, pois esta doença ocasiona aumento da dosagem de proteínas plasmáticas (hiperproteinemia marcada). Dessa forma, o soro se torna mais denso que o gel separador, posicionando-se acima dele durante a centrifugação. Maire e Schlüter<sup>(25)</sup> também observaram esta anormalidade com certa frequência em casos muito avançados de mieloma múltiplo.

Em um relato de caso publicado por Gerin *et al.*,<sup>(26)</sup> um paciente foi internado devido ao diagnóstico de pneumonia, porém o mesmo possuía mieloma múltiplo simultaneamente e essa condição não foi informada à equipe médica ou à laboratorial. Como consequência, durante a realização da centrifugação da amostra, houve a formação do gel flutuante. Devido a estas limitações dos tubos separadores com gel, fica evidente que é de suma importância relatar todas as comorbidades do paciente para o laboratório clínico e não apenas os motivos aparentes de internação ou de requisição de um determinado exame.

A formação anormal do gel também pode gerar o problema do entupimento da probe,<sup>(27)</sup> levar à oclusão das sondas do analisador ou a resultados falsamente baixos quando a amostra insuficiente é aspirada.<sup>(28)</sup> A formação incompleta ou retardada do coágulo de fibrina pode resultar na presença de fibrina latente na forma de fios finos ou massas gelatinosas, o que pode ser suficiente para causar interferência na análise bioquímica de pacientes em terapia anticoagulante, como os que possuem doença de Von Willebrand. As amostras destes pacientes podem exigir mais tempo para coagular antes da centrifugação.<sup>(28,29)</sup>

Os tubos Barricor, por sua vez, parecem não causar tão fortemente tais tipos de alterações nos exames laboratoriais. Diversos estudos têm mostrado que seu uso permite maior estabilidade nas dosagens de diversos analitos, como por exemplo glicose, ácido úrico, HDL, bicarbonato, potássio e do fosfato, no plasma, nas dosagens de medicamentos (drogas psicoativas), entre outros.<sup>(14,20,30,31)</sup>

Além disso, nos tubos Barricor é possível realizar a centrifugação imediatamente, ao passo que nos tubos com gel separador o sangue deve ser deixado em repouso, verificando se há coagulação suficiente.<sup>(30)</sup>

O estudo de Dupuy *et al.*<sup>(15)</sup> testou nove parâmetros químicos de rotina: alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST), proteína C-reativa (PC-R), troponina cardíaca, subunidade T, de alta sensibilidade (hs-cTnT), lactato desidrogenase (LD), N-peptídeo natriurético cerebral pró-terminal (NT-pró-BNP), potássio (K) e sódio (Na). Foi observado que, em tubos Barricor, os analitos se mantinham estáveis 72 horas após centrifugação, permitindo reanálises ou análises adicionais. Tubos Barricor também possibilitam menor contaminação do plasma com conteúdo da parte celular do sangue. Um estudo observou uma redução acentuada das contagens de hemácias, leucócitos e

plaquetas neste tipo de tubo com separação mecânica quando comparado ao tubo de separação com gel.<sup>(32)</sup>

Hétu *et al.*<sup>(33)</sup> ratificaram a vantagem do uso desse material ao mostrar que, antes da implementação do tubo Barricor, foram identificados 1.375 erros de aspiração durante um período de dois meses (dezembro de 2017 e janeiro 2018). Após a implementação destes tubos, o número total de erros de aspiração em um período de dois meses (dezembro de 2018 e janeiro de 2019) diminuiu significativamente: 579 erros. Esses resultados levaram a equipe a passar a amostras de plasma para estudos bioquímicos.

E apesar de os tubos Barricor possuírem custo ligeiramente maior que os tubos com gel separador, o investimento compensa. Uma vez que a qualidade da amostra é maior, menos gerenciamento de erros se faz necessário. Isso gera economia não apenas de tempo, como também de dinheiro, pois reduzirá o número de tubos necessários para cada teste. Tubos Barricor foram considerados o novo padrão para exames bioquímicos devido à qualidade encontrada no plasma formado, que, para grande variedade de analitos, possui resultados equivalentes às amostras de soro.<sup>(34)</sup>

## CONCLUSÃO

O plasma obtido pelo tubo Barricor é uma amostra mais adequada para diversos tipos de análises laboratoriais. Embora possua maior custo, seu uso traz muitas vantagens ao laboratório quando comparado ao tubo de soro, uma vez que há menos contaminação com células e plaquetas, além do fato de que a separação mecânica permite uma centrifugação mais eficaz e proporciona maior estabilidade à amostra. No entanto, para que essa substituição possa ocorrer na rotina laboratorial, maiores estudos devem ser realizados, já que publicações nessa área ainda são escassas.

### Abstract

*This work is a bibliographic review about the interferences of the collection tubes with separating gel in biochemical analyzes, comparing these results with those obtained with a mechanical separator (Barricor). For that, we searched for articles in the databases Pubmed, Google scholar, Scielo, and LILACS. After applying the inclusion and exclusion criteria, we selected 21 papers to write the review. These studies showed that the gel might cause instability in the dosage of ions and various organic substances. Besides, in some cases, the analysis of the sample is impossible due to the phenomenon of floating gel formation. However, through the use of the tube with a mechanical separator, it was possible to minimize these interferences and instabilities. Another advantage is related to the reduced time of centrifugation of the sample with the mechanical separator tube (3 min vs. 10 min). This type of separation also allows more efficient centrifugation of the specimen, with less contamination of the plasma with cells and platelets when compared to the serum obtained in traditional tubes with separator gel. For these reasons, the plasma samples obtained in mechanical separation tubes prove to be of better quality for biochemical analyzes.*

### Keywords

*Biochemistry; Diagnostic Errors; Pre-Analytical Phase*

## REFERÊNCIAS

- McCay L, Lemer C, Wu AW. Laboratory safety and the WHO World Alliance for Patient Safety. *Clin Chim Acta*. 2009;404(1):6-11.
- Campana GA, Oplustil CP, Faro LBD. Tendências em medicina laboratorial. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2011;47(4):399-408.
- Plebani M, Ceriotti F, Messeri G, Ottomano C, Pansini N, Bonini P. Laboratory network of excellence: enhancing patient safety and service effectiveness. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(2):150-60.
- Costa VGd, Moreli ML. Principais parâmetros biológicos avaliados em erros na fase pré-analítica de laboratórios clínicos: revisão sistemática. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2012;48(3):163-8.
- Shcolnik W. Erros laboratoriais e segurança do paciente: Revisão Sistemática. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2012.
- Rivello VV, Menezes PL. A prevalência de erro na fase pré-analítica nos laboratórios de análises clínicas. *Revista de Saúde*. 2013;4(1/2):13-6.
- Wollmann BM, Lunde HA, Støten LK, Lunder N, Molden E. Substantial Differences in Serum Concentrations of Psychoactive Drugs Measured in Samples Stored for 2 Days or More on Standard Serum Tubes Versus Serum Tubes Containing Gel Separators. *Ther Drug Monit*. 2019;41(3):396-400.
- Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, Green S, Kitchen S, Palicka V, et al. Causes, consequences, detection, and prevention of identification errors in laboratory diagnostics. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(2):143-53.
- Guimarães AC, Wolfart M, Brisolara MLL, Dani C. O Laboratório Clínico e os Erros Pré-Analíticos. *Clinical & Biomedical Research*. 2011;31(1).
- Elston DM. Opportunities to improve quality in laboratory medicine. *Clin Lab Med*. 2008;28(2):173-7, v.
- SBPC/ML. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Coleta e preparo da amostra biológica. 1st ed. Barueri, SP: Manole; 2013.
- Andriolo A. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Fatores pré-analíticos e interferentes em ensaios laboratoriais. 1st ed. Barueri: Manole; 2018.
- Wang ZE, Song XF, Zou JW, Duan WB, Wang Y, Zhang BC, et al. The Usage of Separating Gel Vacuum Tube with Different IgG Concentration. *Ann Clin Lab Sci*. 2015;45(4):438-40.
- Fournier JE, Northrup V, Clark C, Fraser J, Howlett M, Atkinson P, et al. Evaluation of BD Vacutainer® Barricor™ blood collection tubes for routine chemistry testing on a Roche Cobas® 8000 Platform. *Clin Biochem*. 2018;58:94-9.
- Dupuy AM, Badiou S, Daubin D, Bargnoux AS, Magnan C, Klouche K, et al. Comparison of Barricor™ vs. Lithium heparin tubes for selected routine biochemical analytes and evaluation of post centrifugation stability. *Biochem Med (Zagreb)*. 2018;28(2):020902.
- Menezes PL. Erros pré-analíticos em medicina laboratorial: uma revisão sistemática. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense] - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; 2013.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *BMJ*. 2009;339:b2535.
- Ercan M, Firat Oğuz E, Akbulut ED, Yilmaz M, Turhan T. Comparison of the effect of gel used in two different serum separator tubes for thyroid function tests. *J Clin Lab Anal*. 2018;32(6):e22427.
- Schouwens S, Brandt I, Willemsse J, Van Regenmortel N, Uyttenbroeck W, Wauters A, et al. Influence of separator gel in Sarstedt S-Monovette® serum tubes on various therapeutic drugs, hormones, and proteins. *Clin Chim Acta*. 2012;413(1-2):100-4.
- Schrapp A, Mory C, Duflot T, Pereira T, Imbert L, Lamoureux F. The right blood collection tube for therapeutic drug monitoring and toxicology screening procedures: Standard tubes, gel or mechanical separator? *Clin Chim Acta*. 2019;488:196-201.
- Cuhadar S, Atay A, Koseoglu M, Dirican A, Hur A. Stability studies of common biochemical analytes in serum separator tubes with or without gel barrier subjected to various storage conditions. *Biochem Med (Zagreb)*. 2012;22(2):202-14.
- Li Z, Yan C, Yan R, Zheng X, Feng Z. Evaluation of BD Vacutainer SST™ II plus tubes for special proteins testing. *J Clin Lab Anal*. 2011;25(3):203-6.
- Nonkes LJP, van Gelder MK, Kemperman H, Abrahams AC, Boereboom FTJ, Ten Berg MJ, et al. Improving home haemodialysis: Stability evaluation of routine clinical chemistry analytes in blood samples of haemodialysis patients. *Biochem Med (Zagreb)*. 2019;29(1):010709.
- Daves M, Lippi G, Cosio G, Raffagnini A, Peer E, Dangella A, et al. An unusual case of a primary blood collection tube with floating separator gel. *J Clin Lab Anal*. 2012;26(4):246-7.
- Maire B, Schlüter K. Problem with the Separating Gel in a Blood Sample Tube in a Patient with Multiple Myeloma. *Dtsch Arztebl Int*. 2017;114(29-30):507. doi:10.3238/arztebl.2017.0507.
- Gerin F, Ramazan DC, Baykan O, Siricki O, Haklar G. Abnormal gel flotation in a patient with apparent pneumonia diagnosis: a case report. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014;24(1):180-2.
- Faught RC, Marshall J, Bornhorst J. Solution densities and estimated total protein contents associated with inappropriate flotation of separator gel in different blood collection tubes. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(9):1081-4.
- Yasar NE, Konukoglu D. Atypic separator gel flotation in blood collection tube in a patient with hyperproteinemia. *Int J Med Biochem*. 2020;3(3):186-8.
- RicoRios N, Bowles L, Ayling RM. Multiple myeloma and acquired von Willebrand disease: a combined cause of preanalytical interference causing gel formation? *Ann Clin Biochem*. 2018;55(1):181-4.
- Gawria G, Tillmar L, Landberg E. A comparison of stability of chemical analytes in plasma from the BD Vacutainer® Barricor™ tube with mechanical separator versus tubes containing gel separator. *J Clin Lab Anal*. 2020;34(2):e23060.
- Morosyuk S, Berube J, Christenson R, Wu AHB, Uettwiller-Geiger D, Palicka V, et al. A Multicenter Evaluation of a Nongel Mechanical Separator Plasma Blood Collection Tube for Testing of Selected Therapeutic Drugs. *J Appl Lab Med*. 2020;5(4):671-85.
- Padoan A, Zaninotto M, Piva E, Sciacovelli L, Aita A, Tasinato A, et al. Quality of plasma samples and BD Vacutainer Barricor tubes: Effects of centrifugation. *Clin Chim Acta*. 2018;483:271-4.
- Héty P-O, Hobeila S, Larivière F, Bélanger M-C. Improved Sample Quality and Decreased Turnaround Time When Using Plasma Blood Collection Tubes with a Mechanical Separator in a Large University Hospital. 2020:1-12.
- Raizman JE, Goudreau BL, Füzéry AK, Cembrowski GS. Barricor blood collection tubes are equivalent to PST for a variety of chemistry and immunoassay analytes except for lactate dehydrogenase. *Clin Chim Acta*. 2019;496:18-24.

Correspondência

**Derick Mendes Bandeira**

Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz)  
Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral  
Avenida Brasil, 4365. Manguinhos  
Rio de Janeiro - RJ - Brasil CEP: 21040-360  
E-mail: derick\_mendes@live.com

# Métrica Seis Sigma em análises clínicas e a qualidade na rotina laboratorial

## Six Sigma Metrics in Clinical Analysis and Quality in Laboratory Routine

Ânderson Ramos Carvalho<sup>1</sup>

Osmar Luiz Magalhães de Oliveira<sup>2,3</sup>

### Resumo

Objetivo: Existe uma demanda por laboratórios de análises clínicas para mostrar as qualidades de sua rotina. Assim, os laboratórios se preocupam com os principais atributos que impactam a qualidade analítica: precisão e exatidão. A métrica sigma é uma ferramenta para acessar o desempenho analítico de forma fácil e inequívoca. No entanto, os laboratórios têm dificuldade em calcular e divulgar suas qualidades sigma. Métodos: Assim, objetivamos mostrar como obter e interpretar a qualidade sigma em um laboratório de análises clínicas localizado no sul do Brasil. Nosso trabalho analisou 19 parâmetros bioquímicos e dois hematológicos em relação às qualidades sigma obtidas. Além disso, sugerimos ações e estratégias de controle de qualidade que impactam positivamente a qualidade sigma por meio do índice de qualidade. Portanto, o conhecimento da qualidade sigma permite melhores estratégias de controle de qualidade e referências para metodologias de laboratório sobre qualidade. Resultados: Diferentes métricas sigma foram encontradas de 9 a 0,2 sigma. Essas métricas indicaram ótimos desempenhos, bem como espaço para melhorias significativas, conforme indicado pelo Índice de Qualidade. Portanto, o conhecimento das métricas sigma fornece uma referência de qualidade para o laboratório e permite que você avalie a eficiência analítica. Conclusão: Com base nessas constatações, esperamos que os laboratórios calculem suas qualidades, demonstrando o alcance da qualidade sigma. Além disso, podem estabelecer estratégias de controle de qualidade com o objetivo de melhoria contínua nas análises clínicas.

### Palavras-chave

Gestão da Qualidade Total; Controle de Qualidade; Melhoria de Qualidade

## INTRODUÇÃO

Existe uma demanda para que os laboratórios clínicos apresentem, cada vez mais, uma alta qualidade analítica. Uma das formas de obter esse parâmetro é através da métrica sigma. Essa metodologia foi amplamente implementada na indústria, na saúde e na medicina laboratorial, representando a evolução na gestão da qualidade. Seis sigma está baseado em dois importantes princípios: resolução de problemas através do ciclo de melhoria contínua e pela análise estatística quantitativa.<sup>(1)</sup> Além disso, também é uma metodologia utilizada para a minimização de erros e maximização de valores, onde toda falha produzida por

uma organização ou uma pessoa gera um custo. Essa falha pode ser seguida ou não por retrabalho que poderá ocasionar perda de material e/ou diminuição da eficiência. A metodologia seis sigma foi aplicada pioneiramente pela Motorola no decorrer da década de 1980, quando as novas teorias foram combinadas com as metodologias estatísticas proporcionando uma ferramenta que mudaria a história da qualidade.<sup>(2)</sup> As indústrias foram as primeiras a utilizar a metodologia Seis Sigma, como a General Electric, IBM, Texas Instruments<sup>(3)</sup> e Toyota.<sup>(4)</sup> A partir dos anos 1990, outras áreas também começaram a utilizar o seis sigma, principalmente a área da saúde, em suas rotinas, com destaque para os hospitais e laboratórios clínicos nos anos 2000.<sup>(5,6,1)</sup>

<sup>1</sup> Doutorando - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Prof. Dr. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório Mont'serrat, Porto Alegre, RS, Brasil.

Recebido em 17/08/2021

Aprovado em 12/11/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102175

Com o uso cada vez maior da métrica seis sigma, os laboratórios clínicos puderam comparar as diferentes qualidades dos exames praticados em suas rotinas. A desafiadora métrica seis sigma, conhecida também como de classe mundial, é o valor a ser buscado por todos os laboratórios clínicos, visto que a partir desse valor espera-se cometer cerca de até 3,4 erros por milhão. Além do número reduzido de erros, uma menor rotina de controles é recomendada em processos que superam a qualidade seis sigma.<sup>(7)</sup> Assim, a busca pela qualidade mundial associada ao processo contínuo de monitoramento da qualidade necessita que seja calculado periodicamente a qualidade sigma dos diferentes mensurandos no laboratório clínico.

O cálculo da métrica seis sigma é uma combinação dos erros aleatórios (imprecisão) e dos erros sistemáticos (inexatidão) com as especificações da qualidade (erro total permitido – ETp), em que todos estes são convertidos na avaliação geral de qualidade. Os testes que atingem o nível seis sigma são ditos quase livres de erro e exibem a chamada qualidade de “classe mundial”. Contudo, estatisticamente seria esperado que ocorressem 0,002 erros por milhão, mas em razão da introdução de uma possível variação da média em 1,5 desvios padrões pela variação aleatória, na prática teríamos um processo com 4,5 sigmas que exibe 3,4 defeitos por milhão de oportunidades. Já para métricas sigma em torno de 3 podemos produzir cerca de 67.000 erros por milhão de oportunidades. Devido a esse alto valor de erros que são produzidos é que a métrica seis sigma é frequentemente considerada uma metodologia primordial para o conhecimento da qualidade nos laboratórios clínicos e conseqüente diminuição de gastos com controle da qualidade e reanálise de amostras.

Nosso trabalho avaliou o desempenho de 21 analitos por meio do cálculo da métrica sigma obtidos através do coeficiente de variação, viés% e ETp. Assim, mostramos procedimentos específicos para cada um dos analitos baseados no índice da qualidade modificando a estratégia de controle da qualidade interno para os diferentes analitos. Assim, buscamos apresentar o cálculo da métrica sigma permitindo que laboratórios clínicos obtenham mais facilmente essa ferramenta da qualidade analítica. A partir disso, objetivamos estimular o cálculo do sigma e do índice da qualidade como indicadores analíticos da qualidade laboratorial para que estejam acessíveis a todos os laboratórios que se interessem em conhecer suas qualidades analíticas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Dados do controle da qualidade interno (CQI) utilizados nesse estudo foram extraídos entre janeiro e maio de 2021 usando um analisador AU680 (Beckman Coulter) do nosso laboratório (Mont’Serrat, Porto Alegre, Brazil). O analisador

bioquímico AU680 foi usado para testar os analitos: ácido úrico (AUS), albumina (ALB), amilase (AMI), bilirrubina direta (BD), bilirrubina total (BT), cálcio (CA), colesterol (COL), creatinina (CRE), ferritina (FERR), frutossamina (FRU), glicose (GLI), lipoproteína de alta densidade (HDL), aspartato aminotransferase (TGO), alanina aminotransferase (TGP), triglicerídeos (TRI), ureia (UR), sódio (NA) e potássio (K). Já o analisador hematológico DxH 500 (Beckman Coulter) foi utilizado para estimar os parâmetros sanguíneos: eritrócitos (ERI) e leucócitos (LEU).

Os dados do controle da qualidade externo (CQE) foram coletados também durante quatro meses a partir dos relatórios do PNCQ (Programa Nacional de Controle de Qualidade, Brasil). As médias desses quatro meses dos dados coletados para cada analito foram utilizados para conhecer o viés médio.

Os dados provenientes do CQI durante os quatro meses foram utilizados para se obter o coeficiente de variação médio (imprecisão). Já os relatórios do CQE foram utilizados para calcular o viés%, e posteriormente calcular o viés médio no período de quatro meses (inexatidão).

### Análise Estatística

O coeficiente de variação (CV%) foi utilizado para indicar a precisão dos métodos utilizados de acordo com a fórmula que segue:

$$CV\% = (\text{Desvio Padrão} / \text{Média}) \times 100$$

Já o viés foi calculado utilizando a fórmula:

$$\text{Viés}\% = (\text{valor obtido} - \text{média de consenso} / \text{média de consenso}) \times 100$$

O ETp foi o critério publicado pela *American Clinical Laboratory Improvement Amendment* (CLIA 2003).<sup>(8)</sup> A partir dos dados anteriores estimamos o valor do sigma através da equação:

$$\text{Sigma} = (\text{ETp}\% - \text{Viés}\%) / CV\%$$

O índice da qualidade (IQ) foi calculado usando a fórmula:

$$IQ = \text{Viés} / (1,5 \times CV)$$

A abordagem da utilização de indicadores da qualidade para montar estratégias para o controle da qualidade é encorajada por nosso grupo em outra publicação.<sup>(9)</sup> O índice pode ajudar a determinar a razão principal da modificação do desempenho no laboratório clínico para sigmas de valor baixo e ajudar na seleção nos melhores planos de controle. Assim, valores de IQ menor que 0,8 indicam que a precisão do analito necessita ser melhorada, já um valor maior que 1,2 indica que a exatidão do analito precisa ser melhorada. Enquanto valores entre 0,8 e 1,2 indicam que a exatidão e a precisão do analito necessitam ser melhorados.<sup>(10)</sup>

## RESULTADOS

As métricas sigmas foram obtidas através dos resultados médios de inexatidão (viés%) subtraído do valor do ETp dividido pela imprecisão (CV%). O resultado dessa equação nos concede o valor da métrica sigma de cada mensurando. A partir desses dados obtidos (CQE e CQI) e os dados da ETp apresentamos a Tabela 1.

Os diferentes valores de sigma obtidos pelos analitos apresentam as divergentes qualidades associadas. De maneira geral a média das qualidades sigmas ficou em torno de 3, o que representa uma qualidade aceitável, em muito dependente das métricas de inexatidão e imprecisão. Outro parâmetro importante é o índice da qualidade (IQ), que nos informa se a inexatidão, imprecisão ou ambos devem ser melhorados para que a qualidade global do analito atinja valores superiores.

Alguns dos analitos estudados (AUS, AMI, COL e TRI) apresentaram qualidade sigmas superiores à qualidade

mundial ( $> 6\sigma$ ), não sendo necessária intervenção quanto à melhoria de qualidade, apenas a sua manutenção. O restante dos analitos necessitam de ações para sua melhoria, alguns diminuindo suas inexatidões (CRE), outros diminuindo suas imprecisões (BD, BT, CAL, HDL, K, GLI, TGO, TGP, LDH, FRU, ERI, LEU) e outros ambas intervenções (ALB, FERR, NA, UR).

Os resultados mostram baixas métricas sigmas para os parâmetros hematológicos, sendo os leucócitos o que obtiveram o melhor desempenho da hematologia e, conseqüentemente, a menor taxa de erros. Muitos outros analitos também apresentaram baixas métricas sigma, logo possuem uma taxa de defeitos por milhão de oportunidades (DPMO) mais acentuada. É sabido que devido a variância dos processos analíticos as taxas de defeitos podem sofrer uma modificação, e assim encontramos o DPMO de longo prazo, onde a métrica de classe mundial apresenta cerca de 3,4 defeitos por milhão de oportunidades (Tabela 2).

Tabela 1 - Métrica sigma calculada para os diferentes analitos estudados através dos dados de imprecisão e inexatidão. Índice de qualidade, capacidade e defeitos por milhão de oportunidades (DPMO).

Analitos	CQE (%)	CQI (%)	ETp (%)	Sigma	IQ	Cpk	DPMO	% Erros
AUS	4,51	1,609	17	7,76	1,87	2,59	0,0000000082	0,00
ALB	3,36	1,974	10	3,36	1,13	1,12	766,43	0,08
BD	6,33	17,41	50	2,51	0,24	0,84	12130,38	1,21
BT	8,95	8,4	20	1,32	0,71	0,44	188287,13	18,83
CA	2,03	2,41	2,55	0,22	0,56	0,07	827568,59	82,76
CRE	8,59	4,672	15	1,37	1,23	0,46	169983,57	17,00
FERR	3,89	2,838	17,3	4,72	0,91	1,57	2,31	0,00
HDL	4,36	6,639	30	3,86	0,44	1,29	112,26	0,01
K	1,96	2,681	5,8	1,43	0,49	0,48	151763,61	15,18
NA	1,90	1,463	5	2,12	0,87	0,71	34356,57	3,44
UR	3,88	2,628	9	1,95	0,98	0,65	51411,36	5,14
GLI	2,03	2,42	10	3,29	0,56	1,10	989,88	0,10
TGO	4,27	8,35	20	1,88	0,34	0,63	59587,66	5,96
TGP	1,36	14,49	20	1,29	0,06	0,43	198301,96	19,83
AMI	2,76	4,40	30	6,19	0,42	2,06	0,000598	0,00
LDH	5,83	11,24	20	1,26	0,35	0,42	207425,55	20,74
FRU	2,72	5,41	10	1,35	0,34	0,45	178413,42	17,84
COL	1,27	1,247	10	7,00	0,68	2,33	0,00000	0,00
TRI	2,26	2,47	25	9,21	0,61	3,07	0,000000000	0,00
ERI	1,74	3,46	6	1,23	0,34	0,41	218354,46	21,84
LEU	1,97	4,09	15	3,18	0,32	1,06	1459,90	0,15

CQE: Controle da Qualidade Externo; CQI: Controle da Qualidade Interno; ETp: Erro Total Permitido; IQ: índice de Qualidade; Cpk: Índice de Capabilidade; DPMO: Defeitos por milhão de oportunidades; %Erros: Percentual de erros cometidos em cada uma das metodologias.

Tabela 2 - Qualidade sigma e sua relação com a porcentagem e a incidência de defeitos por milhão de oportunidade de curto e longo prazo.

Sigma	%	DPMO Curto prazo	DPMO Longo Prazo
		DPMO	DPMO
1	31,73	317311	691462
2	4,55	45500	308538
3	0,27	2700	66807
4	0,0063	63,34	6210
5	0,0000573	0,57	233
6	0,0000002	0,002	3,4

## DISCUSSÃO

Nosso estudo buscou incentivar o cálculo das métricas sigmas e do índice da qualidade por laboratórios clínicos com a finalidade de melhorar a confiabilidade dos resultados obtidos na rotina laboratorial. Assim, avaliou-se a qualidade sigma de analitos tanto da bioquímica como da hematologia, totalizando 21 analitos, durante quatro meses. Nossos resultados mostram que a média sigma é aceitável e se encontra em torno de três. Apenas 19% dos analitos apresentaram um desempenho superior ( $> 6\sigma$ ), enquanto os demais precisam de maior atenção nos seus controles da qualidade para alcançar métricas mais satisfatórias.

Há diferentes fontes de ETp, como a CLIA, RiiBÄK, Ricós, variação biológica, entre outros. Optamos pela utilização do CLIA devido ao maior número de especificações para amplo número de analitos. Apontamos através do índice da qualidade como esses controles devem interagir com os analitos para que um sigma cada vez maior seja alcançado. Além disso, o conhecimento da qualidade sigma permite controles mais adequados aos diferentes analitos e seus prováveis defeitos por milhão de oportunidades (DPMO). No caso das análises clínicas, diferentemente da indústria, os DPMO devem ser interpretados como resultados fora dos valores especificados, ou seja, possuir um benchmark para comparação de metodologias, processos e produtos além de uma métrica de melhoria contínua nas análises clínicas.

De acordo com nossos resultados, o analito que apresentou a melhor métrica sigma foi triglicerídeos com 9,21 e o mais baixo foi cálcio com 0,22. Possivelmente esse fraco desempenho do cálcio seja devido ao pequeno ETp, e assim variações diminutas na precisão ou exatidão impactam mais fortemente sobre esse analito. Analitos como BD, BT, CA, CRE, K, NA, UR, TGO, TGP, LDH, FRU e ERI apresentaram métricas sigmas menores que o aceitável ( $< 3\sigma$ ). Melhorias significativas na precisão precisam ser alcançadas para que primeiramente esses analitos atinjam a métrica aceitável. Para que esse desempenho seja melhorado deverão ser

executadas análises com três níveis de controle e duas medidas com aplicação das regras múltiplas como  $1_{3S}/2_{2S}/R_{4S}/4_{1S}$ . Para os analitos que mostraram qualidades entre 3 e 4 sigmas (ALB, HDL, GLI, LEU) devemos utilizar as mesmas regras múltiplas anteriores, contudo com dois níveis e medidas em duplicata. Já para os analitos que foram superiores aos 4 sigma, mas ainda não alcançaram os 6 sigma (FERR), o controle pode ser realizado a partir da regra  $1_{2,5S}$  dois níveis e uma medida. Para os analitos com desempenho superior a seis sigma sugere-se dois níveis de controle em medida única e apenas a regra múltipla  $1_{3S}$ .<sup>(11,9)</sup>

Os resultados mostram que 40,9% dos analitos estudados apresentaram métricas sigma maiores que 3, indicando desempenho de aceitável a ótimo. Em análises clínicas, diferentemente da indústria onde produtos são vistos como defeitos, vemos resultados aquém das especificações. Os analitos com métricas sigmas em torno de um apresentam taxas de falhas próximas a 20%, o que é um marcador importante para uma mudança significativa da qualidade. São nesses analitos que o laboratório deve elaborar estratégias que modifiquem substancialmente as precisões ou exatidões a fim de alcançar métricas sigmas mais altas e, assim, menores erros associados.

A grande busca por qualidade que os laboratórios clínicos passam ao longo dos últimos anos coloca os setores envolvidos na qualidade sob influência das dinâmicas da qualidade. A busca por indicadores analíticos que possam servir no benchmarking e na escolha de melhores metodologias sempre foi um desafio a ser superado. A métrica sigma permite essa comparação entre diferentes metodologias, laboratórios, sistemas analíticos, entre outros. Contudo, em razão da demanda por qualidade de classe mundial muitos laboratórios têm dificuldade em reportar suas qualidades com receio do julgamento da falha.

Alguns trabalhos têm avaliado periodicamente a qualidade sigma dos analitos realizados em diferentes laboratórios (hospitalares e ambulatoriais). No trabalho de Maksane *et al.*, (2017), por exemplo, os autores relatam qualidades sigma muito superiores à qualidade mundial, alguns na ordem de 50, como do AST.<sup>(12)</sup> Contudo, em outros artigos encontramos valores mais modestos para esse analito, como 0,1,<sup>(13)</sup> 4,48,<sup>(14)</sup> 1,33,<sup>(15)</sup> 7,7,<sup>(16)</sup> 5,59<sup>(17)</sup> e 4,80.<sup>(18)</sup> Em todos esses trabalhos foi utilizado o ETp da CLIA mostrando a grande variabilidade encontrada para essa enzima. Nesse mesmo trabalho de Maksane *et al.* (2017), os autores apresentaram sigmas para o cálcio na ordem de 46, contudo eles utilizam um ETp de 25%, ao passo que nós utilizamos 2,4%, e assim, recalculando os dados apresentados por eles, teriam sigma em torno de 2 em vez de 46.<sup>(12)</sup>

Outro ponto importante para a melhoria contínua da qualidade sigma são diminuições da imprecisão das diferentes técnicas analíticas, visto que a imprecisão (CV%) é o numerador da fórmula onde melhores desempenhos na

precisão se traduzem em sigmas superiores. Majoritariamente em análises clínicas, a imprecisão é o erro a ser combatido nos diferentes analitos, como pode ser visto também nesse trabalho. Os exemplos em que a exatidão impacta na qualidade sigma também chamam a atenção, contudo de maneira menos contundente.<sup>(19)</sup> Há muitos trabalhos que apresentam valores de sigma bastante variados.<sup>(12,13,17-19)</sup>

O papel do laboratório clínico é apoiar o diagnóstico de doenças e que esse seja feito com a maior qualidade e acurácia possível. Assim, a métrica seis sigma serve tanto como ponto de partida do controle da qualidade como fim, pois pode guiar a estratégia do CQ bem como sua frequência. Essas estratégias permitem ao laboratório estimar os melhores resultados com menores imprecisões e inexatidões.

O cálculo sigma foi obtido através das métricas de viés, imprecisão e erro total permitido. Não é a melhor estimativa sobre a qualidade “verdadeira” sobre um mensurando, que pode ser obtido através da comparação com metodologias padrões, contudo é a mais prática de se alcançar a qualidade de um analito de forma rápida. Além disso, o impacto da qualidade sigma é traduzida em melhores escolhas de controle a fim de minimizar os índices de falsas rejeições em cada analito e aprimorar o uso de controles para o estabelecimento da rotina de controle da qualidade interno e externo.

Nosso estudo mostra que a métrica sigma é uma ferramenta de qualidade essencial para acessar a qualidade analítica dos laboratórios clínicos. A comparabilidade que a métrica sigma oferece aos diferentes analitos, metodologias e equipamentos permite a busca pela qualidade de classe mundial. Isso proporciona um benchmarking para auxiliar na escolha das metodologias com maiores métricas sigma. Além disso, demonstra que a métrica sigma pode fazer parte tanto da estratégia do CQ como de um indicador que demonstra a melhora contínua na pesquisa de cada analito. Esperamos que outros laboratórios meçam suas qualidades e compartilhem suas métricas com o objetivo de que a qualidade global aumente, proporcionando a troca de experiências e melhor visibilidade dos fatores que mais influenciam a qualidade dos exames clínicos.

## CONCLUSÃO

Nosso trabalho buscou, através do cálculo da métrica seis sigma, encorajar os laboratórios a calcular os seus índices de qualidade com a finalidade de melhor gerir a qualidade analítica nos laboratórios clínicos. Dessa forma, cremos que a melhor escolha dos controles e das estratégias de controle interno e externo pode ser feita quando obtemos o conhecimento da métrica sigma. Em nosso laboratório, o desempenho de classe mundial foi observado para ácido úrico, amilase, colesterol e triglicerídeos. Outros analitos obtiveram métricas sigmas menores que 3 e recomendou-se

intervenções na precisão ou exatidão de acordo com cada analito. Portanto, o conhecimento da métrica sigma fornece uma referência para o laboratório projetar um protocolo para o controle da qualidade interno e avaliar o eficiência do processo de laboratório existente, permitindo ganho analítico, tempo e custos dentro da rotina laboratorial.

### Abstract

*Objective: There is a demand for clinical analysis laboratories to display the qualities of their routine. Thus, laboratories are concerned with the main attributes that impact analytical quality: precision and accuracy. The sigma metric is a tool to easily and unambiguously assess analytical performance. However, laboratories have difficulties in calculating and disclosing their sigma qualities. Thus, we aim to show how to obtain and interpret sigma quality in a clinical analysis laboratory located in southern Brazil. Methods: Our work analyzed 19 biochemical and two hematological parameters regarding the achieved sigma qualities. In addition, we suggest quality control actions and strategies that positively impact sigma quality through the quality index. Therefore, knowledge of sigma quality allows for better quality control strategies and benchmarks for laboratory methodologies about quality. Results: Different sigma metrics were found from 9 to 0.2 sigma. These metrics indicated great performances as well as room for significant improvement as indicated by the Quality Score. Therefore, knowledge of sigma metrics provides a quality benchmark for the laboratory and allows you to assess analytical efficiency. Conclusion: Based on these findings, we hope that laboratories will calculate their qualities, demonstrating the reach of sigma quality. In addition, they can establish quality control strategies with the objective of continuous improvement in clinical analyses.*

### Keywords

Total Quality Management; Quality Control; Quality Improvement

## REFERÊNCIAS

1. Coskun A, Oosterhuis WP, Serteser M, Unsal I. Sigma metric or defects per million opportunities (DPMO): the performance of clinical laboratories should be evaluated by the Sigma metrics at decimal level with DPMOs. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54:e217-9. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-1219>.
2. Smith B. Six-sigma design (quality control). *IEEE Spectrum,* 1993;30(9), 43-47. doi:10.1109/6.275174.
3. Fontenot G, Behara RS, Gresham A. Six Sigma in Customer Satisfaction. *Quality Progress,* 1994, 27 (12): 73-75.
4. Chiarini A, Baccarani C, Mascherpa V. Lean production, Toyota Production System and Kaizen philosophy: a conceptual analysis from the perspective of Zen Buddhism. *TQM J* 2018;30(4):425-38.
5. Nevalainen D, Berte L, Kraft C, Leigh E, Picaso L, Morgan T. Evaluating laboratory performance on quality indicators with the six sigma scale. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Apr;124(4):516-9. doi: 10.5858/2000-124-0516-ELPOQI. PMID: 10747306.
- 6 - Antony J, Palsuk P, Gupta S, Mishra D, Barach P. Six Sigma in healthcare: a systematic review of the literature. *Int J Qual Reliab Manage* 018;35(5):1075-92.
7. Aggarwal K, Patra S, Acharya V, Agrawal M, Mahapatra S. Application of six sigma metrics and method decision charts in improvising clinical Chemistry laboratory performance enhancement. *International Journal of Advances in Medicine,* 2019, 6(5), 1524-1530. doi:http://dx.doi.org/10.18203/2349-3933.ijam20194155
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Centers for Medicare & Medicaid Services (CMS), HHS. Medicare, Medicaid, and CLIA programs: laboratory requirements relating to quality systems and certain personnel qualifications: final rule. *Fed Regist.* 2003;68:3640-3714.

9. Oliveira OLM. Controle da Qualidade em Análises Clínicas. Caxias do Sul, RS: São Miguel, 2021, 512 p.
10. Westgard JO, Westgard SA. An assessment of  $\sigma$ metrics for analytic quality using performance data from proficiency testing surveys and the CLIA criteria for acceptable performance. *J Vet Diagn Invest* 2008;20:536-44.
11. Westgard JO. Six Sigma Quality Design and Control. 2nd ed. Madison, WI: Westgard QC Inc.; 2006.
12. Maksane SN, Parikh R, Vaswani L. Quantitative Assessment of Analytical Phase Quality of Clinical Biochemistry Parameters Using Sigma Metrics. *IJML*. 2017; 4 (2):81-90.
13. Berlitz F de A, Haussen ML. Seis sigma no laboratório clínico: impacto na gestão de performance analítica dos processos técnicos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2005, 41(5), 301-312. doi:10.1590/s1676-24442005000500004
14. Kumar BV, Mohan T. Sigma metrics as a tool for evaluating the performance of internal quality control in a clinical chemistry laboratory. *J Lab Physicians*. 2018 Apr-Jun;10(2):194-199. doi: 10.4103/JLP.JLP\_102\_17. PMID: 29692587; PMCID: PMC5896188.
15. Afrifa J, Gyekye SA, Owiredu WK, Ephraim RK, Essien-Baidoo S, Amoah S, *et al*. Application of sigma metrics for the assessment of quality control in clinical chemistry laboratory in Ghana: A pilot study. *Niger Med J*. 2015 Jan-Feb;56(1):54-8. doi: 10.4103/0300-1652.149172. PMID: 25657495; PMCID: PMC4314861.
16. Rasheed MK, Rasheed MK, Mahmood B, Khazal A. Assessment of Sigma Metric Results of Serum Parameters of Liver and Kidney Function Tested by Automated Chemistry Analyzer in Medical City Hospital. *Iraqi Postgraduate Medical Journal*, 2018; 17(3): 307-314.
17. Xia J, Chen SF, Xu F, Zhou YL. Quality specifications of routine clinical chemistry methods based on sigma metrics in performance evaluation. *J Clin Lab Anal*. 2018 Mar;32(3):e22284. doi: 10.1002/jcla.22284. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28643351; PMCID: PMC6816973.
18. Peng S, Zhang J, Zhou W, Mao W, Han Z. Practical application of Westgard Sigma rules with run size in analytical biochemistry processes in clinical settings. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2020;00:e23665: 1:5. doi:10.1002/jcla.23665
19. Zeng Y, He H, Qin K, Zhang M, An Z, Huang H. Practical application of the sigma-metric run size nomogram for multistage bracketed statistical quality control analysis of eight enzymes. *Clin Chim Acta*. 2019 May;492:57-61. doi: 10.1016/j.cca.2019.02.006. Epub 2019 Feb 8. PMID: 30738955.
20. Han Z, Zhou WQ, Mao WL, Zheng WW. Sigma Metrics used to Evaluate the Performance of Internal Quality Control in a Clinical Biochemistry Laboratory. *Clin Lab*. 2020 Dec 1;66(12). doi: 10.7754/Clin.Lab.2020.200301. PMID: 33337832.

---

Correspondência

**Ânderson Ramos Carvalho**

Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada,

Faculdade de Farmácia, Anexo II,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, São Luís, 154

CEP: 90470-440, Porto Alegre - RS, Brasil.

E-mail: andersonrc87@gmail.com

# Análise comparativa dos parâmetros de testes rápidos para o diagnóstico da Hepatite B

## Comparative analysis of the rapid test parameters for Hepatitis B diagnosis

Suelin Korb<sup>1</sup>

Allyne Cristina Grando<sup>2</sup>

### Resumo

**Objetivo:** Determinar qual teste rápido (TR) é mais sensível/específico, qual possui maior valor de precisão, maior valor preditivo positivo e negativo e seus interferentes para orientar os responsáveis técnicos na hora de adquirir um TR. **Métodos:** Realizou-se uma busca na plataforma online da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) onde foram selecionadas nove bulas para uma análise comparativa. **Resultados:** Entre as bulas analisadas somente três testes (HBsAg ECO Teste, Teste Rápido OnSite HBsAg Combo e HBsAg Bioclin) estariam em concordância com os critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde (MS). **Conclusão:** É importante a padronização dos critérios para a validação destes testes para que todos possam ser comparados mediante um número aproximado de amostras totais, podendo assim apresentar informações claras ao consumidor. Em geral, os resultados demonstram que os TR podem ser favoráveis para investigação do vírus da hepatite B (HBV) em áreas com pouca infraestrutura e baixos recursos, mesmo que ainda existam limitações nesses testes.

### Palavras-chave

Hepatite B; Sensibilidade e Especificidade; Precisão da Medição Dimensional; Valor Preditivo dos Testes; Cromatografia de Afinidade

## INTRODUÇÃO

Durante uma pesquisa de proteínas no sangue, em 1963, Baruch Blumberg identificou a presença de um antígeno no soro de um indivíduo australiano, denominando na época como “antígeno Austrália”, o HBsAg, conhecido hoje como antígeno de superfície do vírus da hepatite B. Desde então, com o avanço das pesquisas, foi possível descobrir diferentes vírus capazes de ocasionar as hepatites.<sup>(1)</sup>

O vírus causador da hepatite B (HBV) faz parte da família *Hepadnaviridae*, sendo um vírus de ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita dupla, hepatotrópico, onde as células hepáticas são o alvo principal de infecção.<sup>(2)</sup> Apresenta-se revestido por duas camadas: uma externa (envelope), constituída pelo antígeno de superfície (HBsAg), e uma camada interna, o core (HBcAg). Tem associado ao seu core outra proteína, o antígeno E (HBeAg), e sua partícula viral é envolta por um envelope lipoproteico.<sup>(1)</sup>

Este vírus está presente nos líquidos corporais como sangue, saliva, sêmen, secreção vaginal, e em pequena concentração também pode ser encontrado no suor, leite materno, lágrima e urina de indivíduos portadores. Além disso, é resistente a temperaturas elevadas, consegue sobreviver fora do corpo e é de fácil transmissão pelo contato dos líquidos infectados,<sup>(3)</sup> principalmente através de relações sexuais, transfusões de sangue, transmissão vertical, uso de drogas injetáveis, entre outras.<sup>(5)</sup>

Considerada uma das infecções virais mais comuns e a principal causa de doenças hepáticas em todo o mundo, a hepatite B pode apresentar-se de forma aguda ou crônica e ser assintomática ou sintomática.<sup>(4)</sup>

### Hepatite B aguda

Nos casos de infecção aguda em adultos, 70% dos pacientes encontram-se anictéricos, assintomáticos ou apresentam sintomas leves, que geralmente duram de duas

<sup>1</sup> Graduação/ULBRA - (Esteticista). Universidade Luterana do Brasil. Canoas, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Mestre/ULBRA. Universidade Luterana do Brasil. Canoas, RS, Brasil.

Recebido em 15/06/2020

Aprovado em 02/03/2022

DOI: 10.21877/2448-3877.202202009

a quatro semanas, podendo apresentar fadiga, inapetência, náusea, dor ou desconforto abdominal, febre baixa, icterícia, colúria e acolia. Pode-se identificar hepatomegalia e, raramente, esplenomegalia durante o exame físico.<sup>(6)</sup> Os sintomas tendem a desaparecer gradualmente. Algumas pessoas desenvolvem a forma crônica, na qual o risco é correlacionado com a faixa etária do paciente.<sup>(7)</sup>

Em 95% dos casos de infecção aguda há resolução espontânea; todavia, 5% dos adultos evoluem para a forma crônica<sup>(6)</sup> e em crianças menores de um ano esse risco chega a 90%. Ainda em pacientes imunodeprimidos, a evolução para a fase crônica da doença pode ocorrer com maior frequência.<sup>(7)</sup>

### Hepatite B crônica

A fase crônica da doença ocorre, principalmente, quando a contaminação se dá via transmissão vertical ou durante a infância e é caracterizada pela persistência de no mínimo seis meses do HBsAg, sendo o principal marcador de risco para o desenvolvimento de doença hepática crônica e carcinoma hepatocelular durante a vida.<sup>(2)</sup> Entre os indivíduos com infecção crônica por HBV que não são tratados, 15% a 40% progridem para cirrose, o que pode levar à insuficiência hepática e a carcinoma hepatocelular.<sup>(8)</sup>

Portadores de HBV crônica geralmente não apresentam sintomas até que ocorra uma hepatopatia avançada com suspeita de cirrose.<sup>(6)</sup> Pelo menos 50% dos casos de carcinoma hepatocelular são decorrentes da fase crônica da Hepatite B, que também é causadora de câncer primário de fígado (aproximadamente 75% a 90% dos casos são carcinoma hepatocelular), sendo a segunda causa mais comum de morte por câncer no mundo. Entre os pacientes com infecção pelo HBV, o carcinoma hepatocelular pode desenvolver-se na ausência de cirrose, porém ele é geralmente precedido por esta.<sup>(8)</sup>

Dentre algumas das estratégias para combater a infecção está o tratamento destes pacientes crônicos, interrompendo a via de transmissão e o agravamento da doença.<sup>(9)</sup>

### Prevalência

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2015 aproximadamente 257 milhões de pessoas possuíam a forma crônica da infecção pela hepatite B. Neste mesmo ano, estima-se que a doença resultou em 887.000 mortes, principalmente por decorrência do desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular. No ano seguinte, 27 milhões de pessoas infectadas estavam cientes de sua situação, sendo que 4,5 milhões dos indivíduos diagnosticados encontravam-se em tratamento.<sup>(10)</sup>

No Brasil, entre as hepatites virais, a hepatite B é a segunda maior causa de óbitos. Foram registrados 15.033 entre os anos de 2000 e 2017; desses, 54,8% apresentaram hepatite B como causa básica. Na Região Sudeste foi

detectada maior concentração (41,5%), porém os maiores coeficientes de mortalidade neste período foram registrados na Região Norte, 0,4 óbito por 100 mil habitantes em 2017.<sup>(11)</sup>

Entre 1999 e 2018, foram notificados 233.027 casos confirmados de hepatite B. A Região Sul apresentou 31,6% destes casos, sendo a segunda região mais afetada, estando atrás apenas da Região Sudeste, com 34,9%. As demais regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste apresentaram 14,4%, 9,9% e 9,1%, respectivamente.<sup>(11)</sup>

De 2008 a 2018, as taxas de detecção de hepatite B nas regiões Sul, Norte e Centro-Oeste mostraram-se superiores à taxa nacional, que é de 6,7 casos por 100 mil habitantes. Essas taxas pouco variaram na última década, apesar de apresentar leve tendência à queda após 2014.<sup>(11)</sup>

### Diagnóstico por Testes Rápidos

O vírus é capaz de secretar três tipos de antígenos (HBsAg, HBcAg e HBeAg) simultaneamente com seus respectivos anticorpos (anti-HBs, anti-HBc e anti-HBe)<sup>(12)</sup> que, por meio de imunoenaios, é realizada a detecção destes marcadores podendo ser identificados os distintos estágios da infecção pelo HBV.<sup>(2)</sup> O HBsAg é o principal marcador clínico que detecta infecções agudas ou crônicas, sendo utilizado para indicar dados de prevalência, bem como endemicidade da infecção.<sup>(13)</sup>

O diagnóstico prévio da infecção por HBV é de suma importância, pois permite traçar um tratamento conveniente ao paciente gerando impacto direto na qualidade de vida deste, além de ser um método eficaz na prevenção de cronificação da doença e de possíveis complicações como a cirrose e o carcinoma hepatocelular. Porém, a maioria dos indivíduos com infecção crônica por HBV não tem conhecimento de sua condição sorológica, resultando no atraso do diagnóstico e danos mais severos.<sup>(14)</sup>

No ano de 2011, o Ministério da Saúde (MS) introduziu os testes rápidos (TR) para triagem das hepatites virais B e C, fazendo parte de estratégias adotadas para o enfrentamento das complicações geradas pela doença,<sup>(14)</sup> pois são considerados uma das principais formas de diagnóstico precoce, realizando um papel importante no controle da infecção, permitindo interromper a cadeia de transmissão por meio de prevenção e tratamento.<sup>(9)</sup>

Os TR são ensaios imunocromatográficos capazes de detectar antígenos ou anticorpos presentes no sangue, soro ou fluido oral. Quando destinados à pesquisa de anticorpos, haverá uma membrana de nitrocelulose para captura de anticorpos presentes na amostra; nela estarão fixados antígenos (geralmente proteínas sintéticas). No caso de identificação de antígenos, haverá anticorpos fixados na membrana, possibilitando a captura dos antígenos presentes na amostra.<sup>(2)</sup>

Esses testes possuem alta sensibilidade (98,6% a 100%) e especificidade (98,9% a 99,8%), além de serem testes de fácil realização e com tempo de execução mais

rápido do que os testes convencionais laboratoriais, que obtêm o resultado em até 30 minutos.<sup>(15)</sup> Sendo assim, também podem ser uma importante ferramenta para facilitar e aumentar o acesso ao diagnóstico em indivíduos residentes de áreas de difícil acesso, pois podem ser realizados em locais com pouca estrutura e não é necessário equipamento complexo.<sup>(16)</sup>

A fim de obter um encaminhamento rápido do paciente ao especialista, o Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais, publicado pelo MS em 2018, determina que o diagnóstico do HBV inicie com a realização dos testes rápidos.<sup>(2)</sup> Ao analisarmos a história da infecção e a evolução de seu diagnóstico, é possível perceber um crescente número de realizações de TR para Hepatite B no Rio Grande do Sul. Em 2015 foram realizados 119.578 testes, em 2016 aumentou para 193.798 e em 2017 este número cresceu ainda mais, totalizando 235.697 Testes Rápidos para Hepatite B no Estado.<sup>(17)</sup>

Atualmente, existem no mercado inúmeros TR para detecção de marcadores da infecção por HBV que são produzidos por diversos fabricantes e estão disponíveis em diferentes regiões do mundo.<sup>(16)</sup> No Brasil, o Ministério da Saúde distribui TR capazes de detectar o HBsAg.<sup>(14)</sup> Este trabalho teve como objetivo reunir dados e determinar qual TR é mais sensível/específico, qual possui maior valor de acurácia, maior valor preditivo positivo e negativo e quais os interferentes para orientar os responsáveis técnicos na hora de adquirir um TR.

## MATERIAL E MÉTODOS

Através da plataforma online da Anvisa foi realizada uma busca por testes imunocromatográficos registrados. No total foram encontradas nove bulas em plataforma online. A revisão da literatura foi efetuada nas bibliotecas eletrônicas Scielo e Pubmed, nos idiomas português, inglês e espanhol, utilizando os seguintes descritores: Hepatite B (sempre no primeiro campo da busca), combinado com os demais descritores, um por vez: HBsAg, sintomas, transmissão, diagnóstico, epidemiologia. Também foi realizada uma busca utilizando como descritores testes rápidos, sensibilidade, especificidade, acurácia. Foram utilizados artigos dos últimos oito anos.

## RESULTADOS

Foram selecionadas, por meio eletrônico, e avaliadas as bulas dos seguintes testes rápidos: HBsAg Eco Teste,<sup>(18)</sup> Imuno-Rápido Anti-HBsAg,<sup>(19)</sup> HBsAg Rápido,<sup>(20)</sup> HBsAg Rapid Test,<sup>(21)</sup> HBsAg – EIC,<sup>(22)</sup> Teste Rápido OnSite HBsAg Combo,<sup>(23)</sup> HBsAg Bioclin,<sup>(24)</sup> HBsAg Teste Rápido,<sup>(25)</sup> BioPix HBsAg.<sup>(26)</sup> Todos os fabricantes possuem autorização para a comercialização dos kits pela Anvisa.

A partir destas nove bulas, foi avaliado o total de amostras testadas, a quantidade obtida de verdadeiro positivo (VP), verdadeiro negativo (VN), falso positivo (FP) e falso negativo (FN). Também foram avaliados os valores estabelecidos para os parâmetros que garantem a credibilidade de um teste: sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN). Os resultados são expostos na Tabela 1.

Entre os testes, oito deles (HBsAg Eco Teste, HBsAg Rápido, HBsAg Rapid Test, HBsAg – EIC, Teste Rápido OnSite HBsAg Combo, HBsAg Bioclin, HBsAg Teste Rápido, BioPix HBsAg) apresentaram valores superiores a 98% para sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN. Apenas um deles (Imuno-Rápido Anti-HBsAg) apresentou o VPP abaixo de 98% (97,95%). Oito dos testes (HBsAg Eco Teste, Imuno-Rápido Anti-HBsAg, HBsAg Rápido, HBsAg Rapid Test, HBsAg – EIC, Teste Rápido OnSite HBsAg Combo, HBsAg Teste Rápido, BioPix HBsAg) afirmam serem 100% sensíveis e um teste (Teste Rápido OnSite HBsAg Combo) afirma ser 100% sensível e específico.

Todos os testes relatam a possibilidade de intercorrências quando o armazenamento do *kit* e das amostras for em temperatura incorreta, quando a utilização dos materiais de ensaio estiver fora da temperatura ambiente e quando realizada leitura dos resultados após o tempo indicado. Lipemia e hemólise são citados como interferentes em seis dos testes (HBsAg Eco Teste, Imuno-Rápido Anti-HBsAg, HBsAg Rápido, HBsAg – EIC, Teste Rápido OnSite HBsAg Combo, BioPix HBsAg). Somente um dos testes (HBsAg Bioclin) não aponta múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento das amostras como possível causa de alteração nos resultados. Os possíveis interferentes provenientes do *kit* e das amostras para cada teste são descritos nas Tabelas 2 e 3.

## DISCUSSÃO

São diversos os testes rápidos para identificação de marcadores de doenças infecciosas disponíveis comercialmente para realização de diagnósticos, permitindo a liberação rápida dos resultados. Sua aprovação para diagnóstico da hepatite B, assim como a análise do seu desempenho na detecção de marcadores do vírus, é de suma importância.<sup>(16)</sup>

No Brasil, desde 2011, são adquiridos e distribuídos os testes rápidos para hepatite B pelo MS à rede do Sistema Único de Saúde (SUS). Para isso, foram estabelecidos critérios mínimos de sensibilidade e especificidade (99,5% e 99,4%, respectivamente), sendo que para outros parâmetros não há critérios mínimos.<sup>(2)</sup>

A sensibilidade e a especificidade são parâmetros importantes para avaliação do desempenho de um teste diagnóstico, sendo que a sensibilidade é a probabilidade de o resultado ser positivo em paciente doente (VP) e a

Tabela 1 - Tabela comparativa entre as informações contidas nas bulas de testes rápidos para o diagnóstico da Hepatite B.

Nome comercial do teste	Fabricante	Total de amostras testadas	VP	VN	FP	FN	S (%)	E (%)	Acurácia (%)	VPP (%)	VPN (%)
<b>HBsAg ECO Teste</b> <sup>18</sup>	ECO Diagnóstica Ltda.	588	131	455	2	0	100	99,5	99,65	98,49	100
<b>Imuno-Rápido Anti-HBsAg</b> <sup>19</sup>	WAMA Diagnóstica	96	48	47	1	0	100	98	98,95	97,95	100
<b>HBsAg Rápido</b> <sup>20</sup>	VIDA Biotecnologia	250	150	99	1	0	100	99	99,60	99,33	100
<b>HBsAg Rapid Test</b> <sup>21</sup>	Diagnóstica Indústria e Comércio Ltda.	449	19	427	0	3	100	99,	99,33	100	99,30
<b>HBsAg – EIC</b> <sup>22</sup>	Gold Analisa Diagnóstica Ltda.	NI	NI	NI	NI	NI	100	99	NI	NI	NI
<b>Teste Rápido OnSite HBsAg Combo</b> <sup>23</sup>	CTK Biotech Inc.	915	208	707	0	0	100	100	100	100	100
<b>HBsAg Bioclin</b> <sup>24</sup>	QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda.	1365	349	1014	2	0	>99,9	99,8	99,85	99,43	100
<b>HBsAg Teste Rápido</b> <sup>25</sup>	Doles Reag. Equip. para Laboratórios	250	150	100	0	0	100	99	100	100	100
<b>BioPix® HbsAg</b> <sup>26</sup>	Wama Produtos p/ Laboratório Ltda.	250	150	99	0	1	100	99	99,60	100	9
<b>HBsAg Bioclin</b> <sup>24</sup>	QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda.	1365	349	1014	2	0	>99,9	99,8	99,85	99,43	100

VP: Verdadeiro Positivo; VN: Verdadeiro Negativo; FP: Falso Positivo; FN: Falso Negativo; S: Sensibilidade; E: Especificidade; VPP: Valor Preditivo Positivo; VPN: Valor Preditivo Negativo; NI: Não informado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 - Interferentes da amostra citados em bulas de testes rápidos para o diagnóstico da Hepatite C.

Nome comercial do teste	Interferentes da amostra
<b>HBsAg ECO Teste</b> <sup>18</sup>	Múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento, turbidez, hemólise, lipemia. Amostras de soro ou plasma devem ser armazenadas entre 2°C e 8°C por até 5 dias. Para longos períodos de armazenamento, deverão ser congeladas a -20°C.
<b>Imuno-Rápido anti-HBsAg</b> <sup>19</sup>	Hemólise, lipemia, contaminação. Baixa reatividade. Diluição. Repetidos congelamentos e descongelamentos. Amostras podem ser conservadas em geladeira entre 2°C e 8°C por 48 horas. Para armazenagem mais longa, as amostras de soro ou plasma devem ser mantidas no freezer a -20°C.
<b>HBsAg Rápido</b> <sup>20</sup>	Hemólise, lipemia e contaminação. Diluição. Repetidos congelamentos e descongelamentos. Amostras conservadas à temperatura de 2°C a 8°C por até 7 dias ou à temperatura de -20°C (soro e plasma) por período indeterminado.
<b>HBsAg Rapid Test</b> <sup>21</sup>	Hemólise. Contaminação, ciclos repetidos de congelamento e descongelamento. Amostras podem ser conservadas refrigeradas entre 2°C e 8°C por até 3 dias. O plasma pode ser armazenado por períodos maiores à -20°C. Amostras de sangue total não podem ser congeladas.
<b>HBsAg-EIC</b> <sup>22</sup>	Hemólise, lipemia, contaminação. Repetidos congelamentos e descongelamentos. Amostras podem ser conservadas em geladeira por até 3 dias entre 2°C e 8°C ou congeladas a -20°C.
<b>Teste Rápido OnSite HBsAg Combo</b> <sup>23</sup>	Lipemia severa, hemólise e turbidez. Múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento. Amostras podem ser conservadas por até 5 dias em temperatura entre 2 e 8°C. Para armazenamento mais prolongado, as amostras devem ser congeladas a -20°C.
<b>HBsAg Bioclin</b> <sup>24</sup>	Amostras podem ser conservadas sob refrigeração entre 2°C e 8°C por até 3 dias. Podem ser estocadas por até 30 dias à temperatura de -20°C. Amostras de sangue total não podem ser congeladas.
<b>HBsAg Teste Rápido</b> <sup>25</sup>	Hemólise. Diluição. Repetidos congelamentos e descongelamentos. Amostras com anticoagulante. Amostras podem ser refrigeradas à temperatura de 2°C a 8°C. Para períodos de armazenamento superior a três dias, o congelamento (-20°C) é recomendado.
<b>BioPix® HbsAg</b> <sup>26</sup>	Hemólise, lipemia e contaminação. Diluição. Amostras com anticoagulante. Repetidos congelamentos e descongelamentos. Podem ser conservadas em geladeira (2°C -8°C) por até 3 dias ou freezer (-20°C).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 - Interferentes do *kit* citados em bulas de testes rápidos para o diagnóstico da Hepatite B.

Nome comercial do teste	Interferentes do kit
<b>HBsAg ECO Teste<sup>18</sup></b>	Armazenamento do <i>kit</i> fora da temperatura de 2°C a 30°C. Congelados. Contaminação biológica ou microbiológica do <i>kit</i> , pipetas, coletores ou reagentes. Materiais de ensaio fora da temperatura ambiente na hora do uso. Interpretação do resultado após 25 minutos.
<b>Imuno-Rápido anti-HBsAg<sup>19</sup></b>	Armazenamento do <i>kit</i> fora da temperatura de 2°C a 30°C. Congelados. Materiais de ensaio fora da temperatura ambiente na hora do uso. Interpretação do resultado após 20 minutos.
<b>HBsAg Rápido<sup>20</sup></b>	Armazenamento do <i>kit</i> fora da temperatura de 2°C a 30°C. Congelados. Transporte e entrega após 7 dias. Materiais de ensaio fora da temperatura ambiente na hora do uso. Interpretação de resultado após 20 minutos.
<b>HBsAg Rapid Test<sup>21</sup></b>	Armazenamento do <i>kit</i> fora da temperatura de 4°C a 30°C. Exposição à luz solar direta, umidade e calor. Congelados. Materiais de ensaio fora da temperatura ambiente na hora do uso. Após abertos, possuem estabilidade por até uma hora em temperatura ambiente. Interpretação do resultado após 30 minutos.
<b>HBsAg-EIC<sup>22</sup></b>	Reagentes armazenados fora da temperatura de 2°C a 30°C ou congelados. Exposição a temperaturas elevadas, bem como diretamente ao sol. Congelamento da placa teste gera deterioração irreversível. Materiais de ensaio fora da temperatura ambiente na hora do uso. Interpretação do resultado após 30 minutos.
<b>Teste Rápido OnSite HBsAg Combo<sup>23</sup></b>	Controles armazenados fora da temperatura de 2°C -8°C. <i>Kits</i> congelados ou exposição a temperaturas acima de 30°C. Materiais de ensaio fora da temperatura de 15°C -30°C na hora do uso. Interpretação do resultado após 20 minutos.
<b>HBsAg Bioclin<sup>24</sup></b>	Armazenamento do <i>kit</i> fora da temperatura de 2°C a 30°C. Umidade. Transporte por mais de 45 dias a temperaturas superiores a 45°C. Armazenamento em temperaturas acima de 45°C causam deterioração do <i>kit</i> . Congelados. Materiais de ensaio fora da temperatura ambiente na hora do uso. Interpretação do resultado após 30 minutos.
<b>HBsAg Teste Rápido<sup>25</sup></b>	Armazenamento do <i>kit</i> fora da temperatura de 2°C a 30°C. Congelados. Umidade. Materiais de ensaio fora da temperatura ambiente na hora do uso. Interpretação do resultado após 20 minutos.
<b>BioPix® HbsAg<sup>26</sup></b>	Armazenamento do <i>kit</i> fora da temperatura de 2°C a 30°C. Congelados. Transporte e entrega após 144 horas. Materiais de ensaio fora da temperatura ambiente na hora do uso. Interpretação do resultado após 20 minutos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

especificidade é a probabilidade do teste apresentar resultado negativo em paciente não doente (VN).<sup>(27)</sup> Entre as bulas analisadas, apenas uma (HBsAg Bioclin – QUIBASA) apresentou sensibilidade de > 99,9%; todas as demais apresentam 100% de sensibilidade. Quanto à especificidade, todas as bulas mostraram ter valores  $\geq$  98%.

O Teste Rápido OnSite HBsAg Combo apresentou 100% de sensibilidade e especificidade, mostrando que esses valores não são confiáveis, visto que não é possível atingir este resultado, pois há um antagonismo entre ambos parâmetros onde o aumento da sensibilidade pode aumentar os interferentes e, como consequência, apresentar resultados falsos-positivos.<sup>(27)</sup>

De acordo com os critérios mínimos de sensibilidade e especificidade determinados pelo MS, somente três testes estariam em concordância, uma vez que apresentam valores superiores a 99,4%, sendo eles HBsAg ECO Teste, Teste Rápido OnSite HBsAg Combo e HBsAg Bioclin. Os demais testes apresentam valores inferiores ao critério mínimo (99,4%).<sup>(2)</sup> Neste estudo, o teste que apresentou menor valor de especificidade foi o Imuno-Rápido Anti-HBsAg – Wama com 98%.

Um estudo de Cruz (2015) testou os parâmetros de testes rápidos onde foram encontrados baixos valores de sensibilidade (Imuno-rápido HBsAg 95,15% e HBsAg Teste Rápido 93,20%) comparados com os valores expostos

nas bulas dos fabricantes (Wama e Doles), que neste trabalho descreve 100% em ambos os casos, mostrando que a informação contida nas bulas não condiz com os resultados apresentados.<sup>(16)</sup>

Visto também que estes resultados estão bem abaixo do critério mínimo estipulado pelo MS, isso demonstra a necessidade de melhor avaliação neste tipo de teste antes do seu uso em larga escala.<sup>(2)</sup> Em diferentes países, a sensibilidade dos TR apresenta diferenças. Este fato pode estar relacionado com a deficiência na detecção de genótipos do HBV nos testes. A grande heterogeneidade encontrada nos resultados do TR também dificulta uma melhor comparação entre eles.<sup>(16)</sup>

É possível descrever a acurácia (precisão) de um teste a partir dos seus valores de sensibilidade e especificidade.<sup>(28)</sup> O Teste Rápido OnSite HbsAg Combo e o HBsAg Teste Rápido apresentaram 100% de acurácia, gerando dúvida quanto à sua credibilidade. O estudo de Cruz (2015) também mostra que, quando se trata do valor de acurácia, a bula também apresenta valores diferentes e mais elevados (Imuno-Rápido HBsAg 98,95% e HBsAg Teste Rápido 100%) em relação aos valores encontrados no estudo (Imuno-Rápido HBsAg 94,7% e HBsAg Teste Rápido 93,34%), trazendo que a bula pode não estar sendo real em comparação aos resultados encontrados.<sup>(16)</sup> O teste HbsAg – EIC não fornece as informações para obtenção deste parâmetro; o menor

valor encontrado foi 98,95% do Imuno-Rápido Anti-HbsAg e os demais testes apresentaram valores superiores a 99%.

O valor preditivo positivo (VPP) de um teste refere-se à probabilidade de um resultado positivo ser verdadeiro, ou seja, indica a presença da doença.<sup>(27)</sup> Se o teste apresentar um resultado de VPP elevado, é provável que o paciente que obtiver um resultado positivo realmente esteja com a patologia investigada.<sup>(28)</sup> O único teste que não fornece as informações para obtenção deste parâmetro é o HBsAg – EIC. Os testes HBsAg Rapid Test, Teste Rápido OnSite HBsAg Combo, HBsAg Teste Rápido e Biopix HBsAg mostram valor de 100% para VPP e os demais apontam valores superior a 97,9%.

O valor preditivo negativo (VPN) indica a probabilidade de que um resultado negativo seja verdadeiro.<sup>(27)</sup> Um teste com VPN elevado sugere que o paciente cujo teste apresente resultado negativo realmente não seja portador da doença investigada.<sup>(28)</sup> Apenas o HBsAg – EIC não fornece as informações necessárias para obtenção deste dado. Os testes HBsAg Rapid Test e BioPix® HBsAg apresentaram 99,3% e 99%, respectivamente. Os demais testes apresentaram VPN de 100%.

Não há critério que estabeleça um valor mínimo de amostragem para validação de testes de diagnóstico, incluindo os TR. Entre as bulas, notou-se uma diferença significativa no total de amostras testadas, principalmente entre o Imuno-Rápido Anti-HbsAg que testou 96 amostras enquanto no HBsAg Bioclin foram testadas 1.365 amostras. Já os testes HBsAg Rápido, HBsAg Teste Rápido e BioPix HbsAg apresentaram os mesmos valores para total de amostras, VP, sensibilidade e especificidade, sendo que HBsAg Rápido e BioPix HbsAg tiveram os mesmos valores também para VN e acurácia.

No caso do teste HBsAg – EIC não consta na sua bula o número de amostras testadas, bem como VP, VN, FP e FN não são informados. Não há dados na literatura informando sobre o controle de qualidade aplicado aos TRs, bem como alguma informação onde testes podem ter achados idênticos para seus parâmetros. Sendo assim, torna-se questionável a validação destes resultados.

Foram encontrados resultados FP nos testes HBsAg ECO Teste (dois), Imuno-Rápido Anti-HbsAg (um), HBsAg Rápido (um) e HBsAg Bioclin (dois), e resultados FN foram detectados nos testes HBsAg Rapid Test (três) e BioPix HbsAg (um). Esses dados são consideravelmente bons, pois supõem maior autenticidade nos resultados, visto que, como já citado, não é possível atingir um resultado 100% sensível e específico já que há um antagonismo entre ambos os parâmetros.<sup>(27)</sup> Porém, o número de amostras para VN é muito maior comparado ao VP em quatro dos testes (HBsAg ECO teste, HBsAg Rapid Test, Teste Rápido On Site HBsAg Combo, HBsAg Bioclin), o que não é o ideal para se obter o VPP.

Interferentes durante os processos de um teste podem gerar consequências graves na interpretação dos resultados, principalmente quando o exame laboratorial é utilizado para definição de um diagnóstico. Erros causados por possíveis interferências comprometem a saúde e o tratamento do paciente.<sup>(29)</sup> Neste trabalho foi observado que todos os testes relatam possíveis intercorrências causadas pelo uso do material de ensaio fora da temperatura ambiente, bem como a leitura dos resultados após o tempo indicado e o armazenamento das amostras e dos kits em temperaturas incorretas, sendo que sete testes (HBsAg ECO Teste, Imuno-Rápido Anti-HBsAg, HBsAg Rápido, HBsAg – EIC, HBsAg Bioclin, HBsAg Teste Rápido, BioPix HbsAg) indicam armazenamento entre 2°C e 30°C, o HBsAg Rapid Test indica entre 4°C e 30°C e o HBsAg – EIC indica a temperatura de 2°C a 30°C para os reagentes. Estudos destacam que a exposição à temperatura inadequada durante o armazenamento de kits e reagentes pode ocasionar a deterioração dos mesmos e interferir nos resultados de exames laboratoriais e, por conseguinte, nos TR.<sup>(27)</sup>

Todos os testes indicam que as amostras devem ser armazenadas na temperatura de 2°C a 8°C e, após o tempo determinado, podem ser congeladas a -20°C, sendo que os testes HBsAg Rapid Test e HBsAg Bioclin destacam que amostras de sangue total não podem ser congeladas. Além disso, múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento são relatados como interferentes em oito testes, apenas o HBsAg Bioclin não relata este interferente. A literatura comprova que expor o material biológico a condições inadequadas de temperatura pode acarretar alterações do mesmo e divergências nos resultados de testes laboratoriais.<sup>(27)</sup>

A lipemia resulta turbidez da amostra por consequência do acúmulo de partículas de lipoproteínas (especialmente triglicerídeos), sendo citada em seis dos testes como interferente; a hemólise caracterizada pela lise dos eritrócitos ocasionando cor avermelhada no soro é citada em oito dos testes.<sup>(27)</sup> Segundo a literatura, a composição da membrana de nitrocelulose (membrana da amostra) encontrada nos TR possibilita a filtração de certos interferentes, como as hemácias.<sup>(30)</sup> Contudo, em amostras lipêmicas e/ou hemolisadas ainda será possível que ocorram resultados FP e FN.<sup>(27)</sup>

## CONCLUSÃO

Não existem critérios estabelecidos que determinem um padrão de pesquisa de TR quando feitos os testes para validação de cada kit. Cada fabricante utiliza uma quantidade de amostras, sendo que alguns ainda não informam esses números, tornando inviável a realização de uma comparação verídica entre os resultados de VP, VN, VPP, VPN e acurácia. Ainda, três dos testes apresentam os valores de seus parâmetros praticamente idênticos, tornando questionável

a forma de validação do *kit* adotado por eles. É de suma importância que a Anvisa padronize critérios para a aprovação e validação destes testes para que todos possam ser comparados mediante um número mínimo e máximo de amostras totais, podendo assim apresentar informações claras ao consumidor.

Todos os testes encontram-se dentro dos critérios de sensibilidade, porém apenas três estão dentro dos critérios quanto à especificidade. Isso comprova ainda mais que há uma necessidade de estabelecer um padrão de aceitação, assim como uma fiscalização perante os critérios hoje adotados pelos órgãos responsáveis.

Em geral, os resultados demonstram que os testes rápidos podem ser favoráveis para investigação do HBV em áreas com pouca infraestrutura e baixos recursos para a realização de estudos de prevalência da infecção deste vírus, mesmo que ainda existam limitações nos testes quanto aos resultados encontrados.

#### Abstract

*Objective: to gather data and determine which RT is more sensitive / specific, which has the highest accuracy value, the highest positive and negative predictive value and its interference to guide technical managers when acquiring a TR. Methods: a search was carried out on Anvisa's online platform where 9 package inserts were selected for comparative analysis. Results: Among the package inserts analyzed, only three tests (HBsAg ECO Test, Rapid OnSite Test HBsAg Combo and HBsAg Bioclin) would be in agreement with the criteria established by the MS. Conclusion: It is important that the criteria for the validation of these tests are standardized so that all can be compared using an approximate number of total samples, thus being able to present clear information to the consumer. In general, the results demonstrate that RT can be favorable for investigating HBV in areas with little infrastructure and low resources, even though there are still limitations in these tests.*

#### Keywords

*Hepatitis B; Sensitivity and Specificity; Dimensional Measurement Accuracy; Predictive Value of Tests; Chromatography, Affinity*

## REFERÊNCIAS

- Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Diagnóstico das hepatites virais. Santa Catarina: UFSC; 2014.
- Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
- Gomes AS, Araújo NM, Cavalheiro NP, Fainboin HA, Estepo C, Junior FLG, *et al.* Hepatite B. In: Focaccia, R. Tratado de Infectologia. 5. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015:552-81.
- Jacquet S, Pons J-B, De Bernardo A, Ngoubangoye B, Cosset F-L, Régis C, Etienne L, Pontier D. Evolution of hepatitis B virus receptor NTCP reveals differential pathogenicities and species specificities of hepadnaviruses in primates, rodents, and bats. *J Virol.* 2019; 93:e1738-18.
- Viana DR, Veloso NM, Neto OC. Hepatite B e C: diagnóstico e tratamento. *Revista de Patologia do Tocantins.* 2017, 4(3): 73-9.
- Oliveira E, Oliveira J, Santos L, Agostinho M, Katz N. TeleConduas Hepatite B [Internet]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2017 [citado em 29 de fevereiro de 2020]. <http://www.telessauders.ufrgs.br>.
- Silva AP. Hepatites virais e assistência de enfermagem na prevenção de infecções relacionadas à assistência à saúde. São Paulo. Monografia [MBA em Gestão em Saúde e Controle de Infecção] – Faculdade Método de São Paulo; 2015.
- Tang LSY, Covert E, Wilson E, Kottlilil S. Chronic Hepatitis B Infection. *JAMA.* 2018;319(17):1802.
- Locarnini S, Hatzakis A, Chen DS, Lok A. Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. *J Hepatol* 2015; 62:S76-S86.
- World Health Organization [internet]. Hepatitis B: Key facts; 2019. [citado em 01 de março de 2020]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b#>.
- Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim epidemiológico de hepatites virais. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
- Oliveira MS, Silva RPM, Valle SCN, Souza RM, Figueiredo EN, Taminato M, *et al.* Hepatitis B and Delta: clinical aspects of patients in the Brazilian Western Amazonia. *Rev Bras Enferm.* 2019;72(5):1265-70.
- Ott J, Stevens G, Groeger J, Wiersma S. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* 2012;30(12):2212-19.
- Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.120 p.
- Barbosa KF, Batista AP, Nacife MBPSL, Vianna VN, Oliveira WW, Machado EL, *et al.* Fatores associados ao não uso de preservativo e prevalência de HIV, hepatites virais B e C e sífilis: estudo transversal em comunidades rurais de Ouro Preto, Minas Gerais, entre 2014 e 2016\*. *Epidemiologia e Serviços de Saúde.* 2019;28(2).
- Cruz, HM. Avaliação do desempenho de testes rápidos na detecção de marcadores do vírus da hepatite B. [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Oswaldo Cruz, 2015.
- Governo do Estado do Rio Grande do Sul. Secretaria de Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Divisão de Vigilância Epidemiológica. Programa Estadual de Hepatites Virais. Panorama das hepatites virais no Rio Grande do Sul. Ministério da Saúde, 2018.
- HBsAg ECO Teste [bula] Corinto (MG): ECO Diagnóstica Ltda. <http://ecodiagnostica.com.br/diagnostico-rapido/hb-eco-teste/>. Acesso em: 07.03.2020.
- Imuno-Rápido anti-HBsAg [bula] São Carlos (SP): WAMA Diagnóstica. <https://www.wamadiagnostica.com.br/bulas/imuno-rapido/Anti-HBsAg-1.pdf>. Acesso em: 07.03.2020.
- HBsAg RÁPIDO [bula] Belo Horizonte (MG): VIDA Biotecnologia. [http://www.vidabiotecnologia.com.br/novo\\_site/content/uploads/2015/08/HBsAg-RAPIDO.pdf](http://www.vidabiotecnologia.com.br/novo_site/content/uploads/2015/08/HBsAg-RAPIDO.pdf). Acesso em: 07.03.2020.
- HBsAg Rapid Test [bula] Belo Horizonte (MG): DIAGNÓSTICA INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA. <https://www.biocondiagnosticos.com.br/doencas-infeciosas>. Acesso em: 07.03.2020.
- HBsAg-EIC [bula] Belo Horizonte (MG): Gold Analisa Diagnóstica Ltda. [http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/{DD12741C-E8D4-48C6-A19B-25C0B709F235}\\_HBSAG\\_EIC.PDF](http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/{DD12741C-E8D4-48C6-A19B-25C0B709F235}_HBSAG_EIC.PDF). Acesso em: 07.03.2020.
- Teste Rápido OnSite HBsAg Combo [bula] San Diego (CA): CTK Biotech, Inc. <http://www.reagelabor.com.br/pdf/1523022377hepatite-b-teste-rapido-hbsag-30-det-onsite.pdf>. Acesso em: 07.03.2020.
- HBsAg Bioclin [bula] Belo Horizonte (MG): QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda. [https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/INSTRUcoes\\_HBSAG.pdf](https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/INSTRUcoes_HBSAG.pdf). Acesso em: 07.03.2020.

25. HBsAg TESTE RÁPIDO [bula] Goiânia (GO): Doles Reag. Equip. para Laboratórios Ltda. <http://www.doles.com.br/produtos/instrucoes/hbsag.pdf>. Acesso em: 07.03.2020.
26. BioPix® - HBsAg [bula] São Carlos (SP): Wama Produtos para Laboratório Ltda. [https://www.biomedix.com.br/assets/bulas/BioPix\\_HBSAG.pdf](https://www.biomedix.com.br/assets/bulas/BioPix_HBSAG.pdf). Acesso em: 07.03.2020.
27. Diretrizes para a gestão e garantia da qualidade de Testes Laboratoriais Remotos (TLR) da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). 2.ed. – Barueri, SP: Minha Editora, 2016.
28. Ferreira JC, Patino CM. Entendendo os testes diagnósticos. Parte 2. J Bras Pneumol. 2017;43(6):408.
29. Ramos LR, Oliveira MV, Souza CL. Avaliação de variáveis pré-analíticas em exames laboratoriais de pacientes atendidos no Laboratório Central de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. J Bras Patol Med Lab. 2020; 56: 1-8.
30. Filho GHH. Diagnósticos de imunoenaios de fluxo lateral por meio de reconhecimento de padrões [dissertação]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2018.

---

Correspondência

**Suelin Korb**

Universidade Luterana do Brasil - ULBRA  
Avenida Farroupilha, 8001 - Bairro São José  
Canoas/RS - CEP 92425-900  
E-mail: [suelin.korb@rede.ulbra.br](mailto:suelin.korb@rede.ulbra.br)

# Verificação *in vitro* da ação dos antiagregantes plaquetários ticagrelor, bissulfato de clopidogrel e cloridrato de prasugrel como agente antibacteriano frente ao *Staphylococcus aureus*

*In vitro* verification of the action of the antiplatelet agents ticagrelor, clopidogrel bisulfate and prasugrel hydrochloride as an antibacterial agent against *Staphylococcus aureus*

Ana Carolina Amaral Coutinho<sup>1</sup>

Luiz Francisley de Paiva<sup>2</sup>

Emerentina Maria Machado Fonseca<sup>3</sup>

Matheus Henrique Fernandes<sup>3</sup>

Sérgio Rodrigo Beraldo<sup>4</sup>

## Resumo

**Objetivo:** Verificar *in vitro* a atividade antibacteriana de antiagregantes plaquetários contra cepas padrão de *Staphylococcus aureus*. **Métodos:** Foram utilizados três medicamentos similares, pertencentes à classe de antiagregantes plaquetários: Ticagrelor, Bissulfato de Clopidogrel e Cloridrato de Prasugrel. Os microrganismos utilizados foram *S. aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* ATCC 25923. Para a verificação do efeito antimicrobiano dos medicamentos, foram utilizados dois métodos: Método de disco-difusão, no qual foi testado 50µL do fármaco diluído, correspondendo a 4,5mg para Ticagrelor; 3,75mg para Bissulfato de Clopidogrel; 0,5mg de Cloridrato de Prasugrel; e pelo método de macrodiluição em caldo, realizada com o objetivo de verificar a concentração inibitória mínima, no qual foram utilizados 10 tubos com diferentes concentrações de cada fármaco. Os tubos foram incubados por 24 horas a 37°C. Após esse período, foi retirada uma alíquota de 10µL da cultura de cada tubo, sendo em seguida plaqueados em meio Ágar Mueller-Hinton. As placas foram incubadas sob as condições anteriormente citadas e, após 24 horas, foi verificada a concentração bactericida mínima. **Resultados:** Pelo método de disco-difusão não foram observados halos de inibição em nenhuma amostra testada. Pelo método de macrodiluição, os fármacos Ticagrelor e Cloridrato de Prasugrel não demonstraram atividade antibacteriana, entretanto, o Bissulfato de Clopidogrel apresentou ação antibacteriana a partir da concentração 9,37mg/mL. **Conclusão:** Foi verificada uma ação antibacteriana frente ao *Staphylococcus aureus* pelo antiagregante plaquetário Bissulfato de Clopidogrel.

## Palavras-chave

Endocardite; Antibacterianos; Inibidores da Agregação de Plaquetas.

## INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é a uma bactéria comum que acomete seres humanos. Sua versatilidade aliada ao seu potencial patogênico faz com que esta espécie se torne uma das principais bactérias responsáveis por infecções sistêmicas nos seres humanos.<sup>(1,2)</sup>

O potencial patogênico da *Staphylococcus aureus* é determinado por um conjunto de componentes e produtos

próprios de seu metabolismo que, atuando sozinhos ou em conjunto, são capazes de promover uma infecção no indivíduo. Dessa forma, as características da infecção desenvolvida pelo microrganismo dependerá da interação dos componentes do patógeno com os mecanismos de defesa do hospedeiro.<sup>(3-5)</sup>

O perfil oportunista desse patógeno permite o desenvolvimento de infecções em vários locais do organismo, apresentando distintas manifestações clínicas.

<sup>1</sup> Acadêmico. Farmácia. Universidade do Vale do Sapucaí - Univás. Pouso Alegre - MG, Brasil.

<sup>2</sup> Mestre. Professor. Biólogo especialista em Análises Clínicas. Universidade do Vale do Sapucaí - Univás. Pouso Alegre - MG, Brasil.

<sup>3</sup> Acadêmico. Medicina. Universidade do Vale do Sapucaí - Univás. Pouso Alegre - MG, Brasil.

<sup>4</sup> Doutorando. Professor. Médico especialista em Cardiologia. Universidade do Vale do Sapucaí - Univás. Pouso Alegre - MG, Brasil.

Recebido em 26/06/2021

Aprovado em 02/03/2022

DOI: 10.21877/2448-3877.202202160

As manifestações clínicas podem ser apresentadas por indivíduos saudáveis e imunologicamente competentes convivendo em sociedade, mas principalmente por aqueles que se encontram em ambientes hospitalares.<sup>(6)</sup> Uma das complicações mais consideráveis decorrentes da colonização do *S. aureus* é a endocardite infecciosa, que apresenta como manifestações clínicas vegetações valvulares, abscessos, miopericardite, dentre outras.<sup>(7)</sup>

A endocardite infecciosa consiste em uma doença que atinge o tecido cardíaco, especificamente a superfície endocardial do coração, envolvendo principalmente as válvulas cardíacas, seja nativa ou protética.<sup>(7)</sup> Segundo Fowler e colaboradores<sup>(8)</sup>, *S. aureus* é a principal causa das endocardites infecciosas no mundo, correspondendo a aproximadamente 31% dos casos já relatados.

O endotélio cardíaco é altamente resistente às infecções.<sup>(9)</sup> Havendo bacteremia, entretanto, a célula endotelial torna-se alvo de lesões, o que contribui para a evolução da doença. A presença de rupturas ou lesões nas células endoteliais do tecido cardíaco, incluindo válvulas cardíacas, favorece a adesão de microrganismos circulantes a essas superfícies danificadas. As plaquetas são as células responsáveis por promover a ligação do patógeno às células endoteliais danificadas, uma vez que estas proveem ao microrganismo a superfície adesiva necessária.<sup>(10)</sup>

A efetividade do *S. aureus* encontra-se intimamente ligada a sua capacidade em promover agregação plaquetária, desempenhando um importante papel na patogênese da endocardite infecciosa, uma vez que é capaz de interagir fortemente com os componentes do hospedeiro, aderindo ao endotélio cardiovascular danificado, plaquetas e proteínas plasmáticas, como fibrinogênio e fibronectina.<sup>(10)</sup>

Os principais métodos empregados no tratamento da endocardite infecciosa incluem antibióticos e procedimentos cirúrgicos. Entretanto, distúrbios embolíticos associados à endocardite infecciosa ainda apresentam alto índice de mortalidade. Estudos *in vitro* recentes, associados a estudos experimentais e estudos clínicos, comprovam a eficácia do uso de antiagregantes plaquetários no tratamento dos eventos decorrentes da endocardite infecciosa, sendo seu uso proposto também como uma possível prevenção para a doença.<sup>(11)</sup>

Trombos podem ser definidos como coágulos formados a partir de uma lesão vascular, ou ainda a partir da ativação do processo de coagulação e de distúrbios da corrente sanguínea. Especificamente no cenário de uma endocardite infecciosa, as vegetações formadas ou “trombos” são decorrentes da interação entre as plaquetas e os microrganismos circulantes na corrente sanguínea.<sup>(12)</sup>

Antiagregantes plaquetários são agentes capazes de inibir a formação de trombos que são induzidos pelo acúmulo de plaquetas. Dessa forma, eles atuam inibindo a formação desses coágulos por meio de mecanismos de

inibição das funções plaquetárias, como adesividade e agregação, e liberação ou secreção de substâncias, através de diferentes vias.<sup>(13)</sup> Ticagrelor, Bissulfato de Clopidogrel e Cloridrato de Prasugrel são princípios ativos comumente empregados para a prevenção de eventos cardiovasculares caracterizados por trombose, e atuam inibindo os receptores de adenosina difosfato (ADP) presentes na superfície das plaquetas.<sup>(14)</sup> Estudos recentes indicam que o agente anticoagulante plaquetário Ticagrelor em dosagens convencionais como antiplaquetário pode exercer atividade antimicrobiana, adicionalmente, a sua principal função preventiva, assim como também já foi associado à melhora da função pulmonar em pacientes hospitalizados por pneumonia.<sup>(15)</sup>

Contudo, este estudo tem como objetivo verificar *in vitro* a atividade antibacteriana de Ticagrelor e outros antiagregantes plaquetários, como Bissulfato de Clopidogrel e Cloridrato de Prasugrel contra cepas padrão de *Staphylococcus aureus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismos utilizados e padronização dos inóculos

Foram utilizadas cepas referências de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* ATCC 25923. As cepas foram reativadas em Ágar Mueller-Hinton, incubados a 37°C durante 24 horas. Em seguida um pequeno fragmento das colônias foi colocado em uma solução salina de 0,85%. A suspensão resultante foi homogeneizada em agitador tipo Vórtex durante um minuto. A turbidez foi ajustada ao tubo 0,5 da escala de McFarland com auxílio de um espectrofotômetro (CELM E-225 D) com absorvância de 625nm. Este procedimento foi realizado de forma a fornecer uma suspensão padrão de bactérias contendo  $1 \times 10^8$  a  $2 \times 10^8$  UFC/mL.<sup>(16,17)</sup>

### Preparo da solução farmacológica

Para este estudo, foram utilizados três antiagregantes plaquetários de diferentes marcas provenientes de indústrias farmacêuticas distintas com princípios ativos diferentes e de concentrações não equivalentes, sendo eles: Ticagrelor 90mg, Bissulfato de Clopidogrel 75mg e Cloridrato de prasugrel 10mg.

Inicialmente, os comprimidos de cada fármaco foram delicadamente esmagados ainda em suas embalagens individuais com o auxílio de grau e pistilo de forma que não houvesse rompimento da embalagem. Em seguida, o conteúdo de cada comprimido foi assepticamente transferido para tubos de ensaio com tampa contendo 1mL de água destilada estéril. Os tubos foram agitados em agitador tipo Vórtex até que o material fosse totalmente dissolvido. A esta solução foi dado o nome de solução estoque.

### Avaliação da atividade antibacteriana por disco-difusão

A verificação da atividade antibacteriana dos fármacos foi realizada pela técnica de disco-difusão de acordo com a metodologia de Kirby-Bauer seguindo o documento M02<sup>(17)</sup> com modificações. O meio de cultura utilizado foi o Ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA). Cada placa de Petri de 90mm de diâmetro continha 25mL do meio de cultura, deixando-as com uma profundidade padronizada de 4mm igualmente em todas as placas.

Com auxílio de um *swab* estéril embebido na suspensão bacteriana padronizada, o inóculo foi espalhado sobre toda a superfície do meio. As placas ficaram 5 minutos entreabertas dentro de um fluxo laminar para a secagem e, após esse período, foi colocado no centro de cada placa um disco de papel de filtro Whatman nº 1 estéril de 6mm de diâmetro. Em seguida, foi dispensado sobre cada disco um volume de 50µL da solução estoque (que corresponde a 4,5mg para Ticagrelor; 3,75mg para Bissulfato de Clopidogrel; 0,5 mg de Cloridrato de Prasugrel). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e após esse período foi verificado se houve a formação do halo de inibição.

### Determinação da concentração inibitória mínima - CIM

A concentração inibitória mínima dos fármacos foi determinada pela técnica de macrodiluição em tubos de acordo com a norma M07-A10<sup>(16)</sup> com modificações. Inicialmente, a solução estoque dos fármacos foi diluída 1:1 (v/v) em água destilada estéril em 10 concentrações diferentes, de acordo com a Tabela 1. Em seguida, a suspensão padrão de *S. aureus* foi diluída em 1:100 em Caldo Mueller-Hinton (HIMEDIA) 2x concentrado. A CIM foi realizada transferindo 1mL da suspensão bacteriana diluída para os tubos contendo os fármacos. O volume final de cada tubo foi de

2mL, resultando em uma concentração final do inóculo de  $5 \times 10^5$  UFC/mL de *S. aureus*. Para o controle negativo de crescimento, foi utilizado um tubo com as mesmas concentrações dos fármacos do tubo 1 (mais concentrado), porém sem o inóculo, e para o controle positivo de crescimento, foi utilizado um tubo com apenas 2mL do meio sem os fármacos, porém com o inóculo.

Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas. Após esse período, foram adicionados 200µL de Cloreto de Trifenil Tetrazólio (TTC) a 2% a cada tubo, corante que promove a coloração das colônias sem comprometer sua viabilidade, e os tubos foram reincubados por mais duas horas. Após esse período, os tubos que apresentam atividade antimicrobiana permanecem incolores, enquanto os tubos em que houve crescimento microbiano coram-se em vermelho. A CIM foi determinada como a menor concentração dos fármacos que não demonstra crescimento microbiano.

### Determinação da concentração bactericida mínima - CBM

Antes da adição do indicador TTC, 10µL de cada tubo foram inoculados em meio Ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA) e incubados a 35°C durante 24-48 horas. A concentração bactericida mínima é a concentração de um antimicrobiano que leva à morte de um microrganismo e será definida como a concentração do fármaco mais baixo capaz de matar a totalidade das unidades bacterianas.

## RESULTADO

Neste estudo, as cepas de *S. aureus* testadas não demonstraram sensibilidade aos antiagregantes testados pelo método de disco-difusão evidenciado pela ausência de halos de inibição, entretanto as cepas foram suscetíveis ao Bissulfato de Clopidogrel pelo método de microdiluição em caldo, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 1 - Esquema de preparação de séries de diluições dos fármacos para uso em testes de sensibilidade por diluição em caldo.

Tubo	Ticagrelor	Bissulfato de Clopidogrel	Cloridrato de Prasugrel
1	90mg/mL	75mg/mL	10mg/mL
2	45mg/mL	37,5mg/mL	5mg/mL
3	22,5mg/mL	18,75mg/mL	2,5mg/mL
4	11,25mg/mL	9,37mg/mL	1,25mg/mL
5	5,62mg/mL	4,68mg/mL	0,62mg/mL
6	2,81mg/mL	2,34mg/mL	0,31mg/mL
7	1,40mg/mL	1,17mg/mL	0,15mg/mL
8	0,70mg/mL	0,58mg/mL	0,07mg/mL
9	0,35mg/mL	0,29mg/mL	0,03mg/mL
10	0,17mg/mL	0,14mg/mL	0,01mg/mL

Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade de *S. aureus* frente aos antiagregantes plaquetários: Ticagrelor, Bissulfato de Clopidogrel e Cloridrato de Prasugrel.

Cepa	Ticagrelor	Bissulfato de Clopidogrel	Cloridrato de Prasugrel
<b>Concentração inibitória mínima</b>			
ATCC 6538	-	9,37mg/mL	-
ATCC 25923	-	9,37mg/mL	-
<b>Concentração bactericida mínima</b>			
ATCC 6538	-	9,37mg/mL	-
ATCC 25923	-	9,37mg/mL	-

## DISCUSSÃO

Pelo método de disco-difusão não foram constatados halos de inibição de nenhum fármaco testado, mas foi observado em todas as placas o crescimento uniforme de *S. aureus*. Entretanto, pelo método de macrodiluição em caldo, observam-se resultados positivos para o Bissulfato de Clopidogrel. Tal resultado não surpreendeu, uma vez que o método de disco-difusão foi realizado com uma concentração de 3,75mg para o Bissulfato de Clopidogrel sendo 2,5 vezes menor que a CIM encontrada pelo método de macrodiluição.

Diversos métodos laboratoriais podem ser empregados para prever a suscetibilidade *in vitro* de bactérias aos agentes antimicrobianos. Muitos laboratórios de microbiologia clínica usam, de forma rotineira, o método de disco-difusão em ágar para testar patógenos comuns de crescimento rápido e certas bactérias fastidiosas.<sup>(17)</sup> Contudo, existem outros métodos que fornecem resultados essencialmente equivalentes ou até mais precisos, como a microdiluição em caldo, entretanto demandam um tempo maior para liberação de resultados.

O teste de disco-difusão é um método reprodutivo, padronizado, de execução simples e baixo custo. Os diâmetros dos halos de inibição, quando presentes, são medidos em milímetros e os resultados são interpretados comparando-os com os valores de referência publicados anualmente no Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Este método fornece um resultado qualitativo que na maioria das situações clínicas é suficiente para orientar a escolha terapêutica. Entretanto, quando utilizamos o método de disco-difusão para pesquisa de novos agentes antimicrobianos, naturais ou sintéticos, que ainda não têm parâmetros que o classifique em sensível, intermediários ou resistentes, resultados baseados apenas na presença ou ausência de um halo de inibição, sem consideração do tamanho do halo, podem ser úteis como uma espécie de triagem em que a presença do halo de inibição indica atividade antimicrobiana. Já a ausência do halo não necessariamente pode ser um resultado negativo, sendo necessária a realização de novos testes por outros métodos para a confirmação. Os métodos

de diluição em caldo são mais elaborados, demandam tempo e cuidados para a realização, entretanto são aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano.

Com relação à atividade antimicrobiana dos agentes antiplaquetários, Li *et al.*,<sup>(18)</sup> e Lancellotti *et al.*,<sup>(15)</sup> relatam efeito antimicrobiano de Ticagrelor em cepas bacterianas Gram-positivas, entretanto neste estudo não foi demonstrado tal atividade. Vale ressaltar que neste estudo o medicamento foi avaliado *in vitro* na sua forma de comprimido, diferente do estudo de Lancellotti *et al.*,<sup>(15)</sup> que utilizou o princípio ativo do fármaco e experimento com modelo animal.

Neste estudo foi verificado o efeito antimicrobiano de Clopidogrel e tal resultado condiz com os estudos de Swoboda *et al.*,<sup>(19)</sup> em que os agentes antiplaquetário Tienopiridina, Ticlopidina e seu análogo, Clopidogrel, mostraram potencialização da ação de antibióticos beta-lactâmicos, revertendo o fenótipo de resistência à metilina do *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), *in vitro*. Esse efeito antimicrobiano observado para o Clopidogrel durante os experimentos pode estar associado a fatores de virulência do patógeno, os quais são determinantes na patogenicidade do microrganismo. Sabe-se que os fatores de virulência encontrados na maioria das espécies bacterianas não são fatores essenciais a sua sobrevivência no interior das células hospedeiras, entretanto são necessários para a promoção de uma infecção efetiva. Segundo Swoboda *et al.*,<sup>(19)</sup> em se tratando da espécie *Staphylococcus aureus*, o ácido teicoico da parede (WTA) é uma das moléculas responsáveis pela patogenicidade exercida, estando esta localizada na parede celular bacteriana. A ausência de WTA dificulta a colonização do patógeno nos tecidos hospedeiros, além de apresentar uma diminuição significativa na capacidade de promover infecção em modelos animais. WTA são polissacarídeos aniônicos da superfície celular de bactérias Gram-positivas necessários para a colonização do hospedeiro e já foram sugeridos como alvos para novos antimicrobianos. Ao contrário do peptidoglicano, os polímeros de WTA não são essenciais para a viabilidade, no entanto os genes em muitas das vias biossintética são condicionalmente essenciais.<sup>(19)</sup>

A Ticlopidina e seu análogo Clopidogrel são pró-drogas Tienopiridinas que inibem a agregação plaquetária mediada pela adenosina-5'-difosfato (ADP). De acordo com Farha *et al.*,<sup>(20)</sup> essas Tienopiridinas também inibem a ação do TarO, a primeira enzima na síntese do WTA. Nos estudos de Swoboda *et al.*,<sup>(19)</sup> a Ticlopidina foi antagônica aos bloqueios genéticos da síntese de WTA de ação tardia e, de forma semelhante, antagonizou a inibição pelo Targocil, um inibidor da enzima de ação tardia TarG. *In vitro*, a Ticlopidina também inibiu a função do TarO recombinante. Os autores ainda demonstram que evitar a conclusão da biossíntese de WTA, uma vez que tenha sido iniciada, desencadeia a parada do crescimento microbiano.

Bissulfato de Clopidogrel é um fármaco pertencente à classe de medicamentos dos antiagregantes plaquetários que apresenta mecanismo de ação semelhante ao da Ticlopidina.<sup>(14)</sup> Estudos realizados por Nicolau *et al.*<sup>(21)</sup> demonstraram, em modelos animais, o potencial desta classe de medicamentos no tratamento da endocardite infecciosa, como uma terapia antiplaquetária adjuvante. Os experimentos obtiveram resultados positivos quando utilizados como terapia única e resultados ainda melhores quando combinados a outras terapias antimicrobianas, proporcionando uma redução no tamanho de vegetações presentes nas válvulas aórticas e, com isso, uma maior exposição bacteriana aos antibióticos administrados em paralelo. Em contrapartida, Li *et al.*<sup>(18)</sup> acreditam que o uso de inibidores orais P2Y12 é uma das causas responsáveis pelo aumento no risco de infecções bacterianas em pacientes que fazem uso desses medicamentos. Ticagrelor e Clopidogrel são fármacos pertencentes a essa classe de inibidores plaquetários, sendo empregados com o intuito de prevenir eventos cardiovasculares decorrentes da agregação plaquetária. Para Lancellotti *et al.*,<sup>(15)</sup> o risco de infecção estaria associado aos seus mecanismos farmacodinâmicos, que envolvem a redução na liberação de plaquetas pró-inflamatórias nos grânulos alfa e a formação de agregados pró-inflamatórios de leucócitos plaquetários. Entretanto, Ticagrelor, mas não o Clopidogrel, foi sugerido por ter efeitos protetores contra infecções. O ensaio de Inibição de Plaquetas e Resultados do Paciente (PLATO) mostrou que os pacientes tratados com Ticagrelor tinham menor risco de pneumonia, morte por pneumonia e sepse do que o Clopidogrel.<sup>(22,23)</sup>

## CONCLUSÃO

Foi verificada *in vitro* uma ação antibacteriana frente ao *Staphylococcus aureus* utilizando o comprimido do antiagregante plaquetário Bissulfato de Clopidogrel. O resultado deste estudo não encoraja a prescrição de Clopidogrel como antimicrobiano em casos de bacteremia por *S. aureus*, mas sem a continuação do estudo por outros métodos analíticos e de associações farmacológicas.

## Abstract

**Objective:** Check *in vitro* the antibacterial activity of antiplatelet agents against standard strains of *Staphylococcus aureus*. **Methods:** Three similar drugs were used, belonging to the class of antiplatelet agents: Ticagrelor, Clopidogrel bisulfate and Prasugrel hydrochloride. The microorganisms used were *S. aureus* ATCC 6538 and *S. aureus* ATCC 25923. To check the antimicrobial effect of drugs, two methods were used: Disc-diffusion method, in which 50  $\mu$ L of the diluted drug was tested, corresponding to 4.5 mg for Ticagrelor; 3.75 mg for Clopidogrel Bisulfate; 0.5 mg of Prasugrel hydrochloride; and by the broth macrodilution method, performed with the objective of verifying the minimum inhibitory concentration in which 10 tubes with different concentrations of each drug were used. The tubes were incubated for 24 hours at 37°C. After this period, a 10  $\mu$ L aliquot of the culture was removed from each tube and then sown in Agar Muller-Hinton medium. The plates were incubated under the conditions mentioned above and after 24 hours, the minimum bactericidal concentration was verified. **Results:** By the disk-diffusion method, no inhibition halos were observed in any tested sample. By the macrodilution method, the drugs Ticagrelor and prasugrel hydrochloride did not demonstrate antibacterial activity, however, Clopidogrel Bisulfate showed antibacterial action from the concentration 9.37 mg / mL. **Conclusion:** An antibacterial action against *Staphylococcus aureus* was verified by the antiplatelet agent Clopidogrel bisulfate.

## Keywords

Endocarditis; Anti-Bacterial Agents; Platelet Aggregation Inhibitors.

## REFERÊNCIAS

- Pollitt E, West SA, Cruz SA, Burton-Chellew MN, Diggle SP. Cooperation, quorum sensing, and evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2014 Mar;82(3):1045-51. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3957977/pdf/zii1045.pdf>
- Pollitt E, Szkuta PT, Burns N, Foster SJ. *Staphylococcus aureus* infection dynamics. *PLoS Pathogens*. 2018 Jun;13(8):e1006532. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1007112>
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*. 1998 ago;339(8):520-532. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199808203390806?articleTools=true>
- Foster T. *Staphylococcus*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/>
- Foster TJ. Immune Evasion By *Staphylococci*. *Nature Reviews Microbiology*. 2005 dez; 03(12):948-958. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1289#citeas>
- Chang FY. *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis. *J Microbiol Immunol Infect*. 2000 Jun; 33(2):63-68.
- Hubers SA, DeSimone DC, Gersh BJ, Anavekar NS. Infective Endocarditis: A Contemporary Review. *Mayo Clin*. 2020 May;95(5):982-997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002561961931081X?via%3Dihub>
- Fowler Jr VG, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E, Corey GR, *et al.* *Staphylococcus aureus* Endocarditis: A Consequence of Medical Progress. *JAMA*. 2005 Jun; 293(24):3012-3022. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/201122>
- Liesenborghs L, Meyers S, Lox M, Criel M, Claes J, Peetermans M, *et al.* *Staphylococcus aureus* endocarditis: distinct mechanisms of bacterial adhesion to damaged and inflamed heart valves. *European Heart Journal*. 2019 Oct;40(39):3248-3259. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7963134/pdf/ehz175.pdf>

10. Bayer AS, Sullam PM, Ramos M, Li C, Cheung AL, Yeaman MR. *Staphylococcus aureus* Induces Platelet Aggregation via a Fibrinogen-Dependent Mechanism Which Is Independent of Principal Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Fibrinogen-Binding Domains. *Infection And Immunity*, 1995 sep; 63(9):3634-3641. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC173504/pdf/633634.pdf>
11. Hannachi N, Habib G, Camoin-Jau L. Aspirin Effect on *Staphylococcus aureus* - Platelet Interactions During Infectious Endocarditis. *Frontiers in Medicine*, 2019 out; 6:217. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2019.00217/full>
12. Hoerr V, Franz M, Pletz MW, Diab M, Niemann S, Faber C, et al. *S. aureus* endocarditis: Clinical aspects and experimental approaches. *International Journal of Medical Microbiology*, 2018 ago; 308(6):640-652. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S143842211730396X?via%3Dihub>
13. Grassi EA, Araújo, MC. Antiagregantes Plaquetários: Ampliando Conhecimento. *Disc. Scientia. Série: Ciências da Saúde*, Santa Maria, 2012; 13(1):131-143. Disponível em: <https://periodicos.ufn.br/index.php/disciplinarumS/article/view/997/941>
14. Silva MVF, Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Antiagregantes Plaquetários na Prevenção Primária e Secundária de Eventos Aterotrombóticos. *Arq Bras Cardiol*. 2013 jun; 100(6):78-84. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/RnBqnK96YQyJr9GnHwmMrpw/?lang=pt&format=pdf>
15. Lancellotti P, Musumeci L, Jacques N, Servais L, Goffin E, Piroette B, Oury C. Antibacterial Activity of Ticagrelor in Conventional Antiplatelet Dosages Against Antibiotic-Resistant Gram-Positive Bacteria. *JAMA Cardiology*, 2019 jun; 4(6):596-599. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamacardiology/fullarticle/2732487>
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Document M07-A10. Methods for Dilution antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 10<sup>th</sup> edition. Wayne, Pennsylvania: CLSI; 2015.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Document M02. Performance Standards for Antimicrobial Disk susceptibility Test. 13<sup>th</sup> edition. Wayne, Pennsylvania: CLSI; 2018.
18. Li HL, Feng Q, Tsoi MF, Yue FEI, Cheung BMY. Risk of infections in patients treated with ticagrelor versus clopidogrel: a systematic review and meta-analysis. *European Heart Journal Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2021 may;7(3):171-179. Disponível em: <https://academic.oup.com/ehjcvp/article-abstract/7/3/171/5860832?redirectedFrom=fulltext>
19. Swoboda JG, Meredith TC, Campbell J, Brown S, Suzuki T, Bollenbach T, et al. Discovery of a Small Molecule that Blocks Wall Teichoic Acid Biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *Acs Chemical Biology*, 2009 out; 4(10):875-883. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2787957/#:~:text=We%20have%20identified%20a%20small,aureus%20\(MRSA\)%20isolates](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2787957/#:~:text=We%20have%20identified%20a%20small,aureus%20(MRSA)%20isolates).
20. Farha MA, Koteva K, Gale RT, Sewell EW, Wright GD, Brown ED. Designing analogs of ticlopidine, a wall teichoic acid inhibitor, to avoid formation of its oxidative metabolites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2014 feb; 24(3):905-910. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X13014534?via%3Dihub>
21. Nicolau DP, Tessier PR, Nightingale CH, Quintiliani R. Influence of adjunctive ticlopidine on the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Int J Antimicrob Agents*, 1998 fev; 9(4):227-229. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857997000563?via%3Dihub>
22. Storey RF, James SK, Siegbahn A, Varenhorst C, Held C, Ycas J, et al. Lower mortality following pulmonary adverse events and sepsis with ticagrelor compared to clopidogrel in the PLATO study. *Platelets*. 2014 nov; 25(7):517-525. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4220996/>
23. Varenhorst C, Alstrom U, Braun OO, Storey RF, Mahaffey KW, Bertilsson M, et al. Causes of mortality with ticagrelor compared with clopidogrel in acute coronary syndromes. *Heart* 2014 nov; 100(22):1762-1769. Disponível em: <https://heart.bmj.com/content/100/22/1762.long>

Correspondência

**Prof. Luiz Francisley de Paiva**

Laboratório de Pesquisa Unidade Central

Av. Alfredo Custódio de Paula N°320

Pouso Alegre - MG CEP: 37.553-068

E-mail: [francisleybiologo@yahoo.com.br](mailto:francisleybiologo@yahoo.com.br)

# A importância da sedimentoscopia em amostras de urina com exame físico-químico negativo

## *The importance of sedimentoscopy in urine samples with negative physical-chemical examination*

Fernanda Kézia de Sousa Silva<sup>1</sup>  
Alexandre de Almeida Monteiro<sup>2</sup>

### Resumo

**Objetivo:** Identificar a existência de elementos clinicamente importantes no sedimento urinário de amostras de urinas com exame físico-químico negativo como os cristais, leveduras e bactérias. **Métodos:** O presente estudo concebeu uma análise descritiva quali-quantitativa de dados clínicos contidos no sistema do laboratório. Foram analisados dados do período de julho a dezembro de 2019. **Resultados:** Foram extraídos dados referentes a 48.755 sumários de urina, e foi constatado que 9.160 exames (18,79%) não apresentaram alterações na sedimentoscopia. **Conclusão:** A técnica é necessária para triar possíveis doenças e por isso é indispensável, pois pode mostrar ao clínico que existem elementos anormais, mesmo em urinas com o exame físico-químico negativo.

### Palavras-chave

Urina; Glomerulonefrite; Urinálise

## INTRODUÇÃO

A medicina laboratorial iniciou-se com análise da urina. Um dos primeiros testes a serem realizados foi a observação da aparência da urina.<sup>(1)</sup> Nas primeiras descrições, na idade da pedra, a prática de examinar a urina era vista como uma forma de diagnosticar e determinar o tratamento para diversas doenças.<sup>(1)</sup> Desenhos nas paredes das cavernas dos primeiros povos indicavam algumas doenças e alterações na urina.<sup>(1)</sup>

O estudo da urina em um laboratório é dividido em três fases: exame físico, químico e análise do sedimento urinário. Em um laboratório de análises clínicas, quando se recebe uma amostra de urina, a primeira análise a ser feita é a físico-química. Os primeiros atributos a serem verificados na análise física é a cor e a turbidez da amostra. Após ser feito o exame físico, é feita a análise bioquímica por meio da fita reagente, e esse tipo de análise é apontada como uma opção rápida e de baixo custo, pois avalia presença ou não de proteína, glicose, nitrito, esterase leucocitária, leucócitos, pH (potencial hidrogeniônico), urobilinogênio e bilirrubina.<sup>(2,3)</sup>

A doença renal pode ser estudada pela análise do sedimento urinário. Embora não seja possível medir o grau da função renal, a análise se faz necessária para contribuir no diagnóstico clínico.<sup>(4,5)</sup> A análise do sedimento urinário mostra a distinção na interpretação de doenças renais, sendo um recurso favorável para analisar a aparência morfológica dos componentes contidos na amostra de urina, podendo ser encontradas hemácias, leucócitos, cristais, bactérias, leveduras e cilindros.<sup>(4,5)</sup>

A análise do sedimento é um dos processos que requer mais recursos na rotina laboratorial. As três etapas da análise de urina são essenciais, porém duas se destacam por serem mais econômicas e de fácil desempenho. No entanto, a microscopia da urina é considerada mais complexa e/ou de alto custo para a sua realização.<sup>(6)</sup>

Em diversos países, quando se tem uma urina com aspecto físico claro, sem turbidez, com aparência normal e com o exame químico negativo, opta-se por não realizar a sedimentoscopia, sempre seguindo as indicações médicas.<sup>(5)</sup> A metodologia seguida no Brasil é diferente, uma vez que os laboratórios sempre realizam os três métodos de análise.<sup>(5)</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Biomedicina/ Centro Universitário Christus - Unichristus. Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>2</sup> Mestre em Patologia pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre / Professor do Curso de Biomedicina - Unichristus. Fortaleza, CE, Brasil.

Recebido em 30/07/2020

Aprovado em 02/03/2022

DOI: 10.21877/2448-3877.202202053

Novas linhas de estudos vêm mostrando que a análise do sedimento de urinas negativas é desnecessária, embora sejam estudos limitados pelo baixo número de amostras que são analisadas. Sendo assim, o estudo é relevante e se faz necessário para comprovar que a análise do sedimento urinário é importante para detectar a presença de cristais, leveduras e bactérias que não são detectados pelo exame físico-químico.

Este trabalho visa identificar a existência de elementos clinicamente importantes no sedimento urinário de amostras de urinas com exame físico-químico negativo, como os cristais, as leveduras e as bactérias.

## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em um laboratório particular de Fortaleza – CE. As amostras são analisadas em um período de até duas horas após a coleta. Todas as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas com a temperatura ideal para o transporte e armazenamento das urinas.

A análise das urinas foi realizada seguindo o protocolo validado no laboratório. Todas as amostras foram submetidas ao exame físico, à leitura da fita reativa e à sedimentoscopia, todas realizadas em equipamento de automação total – FUS 2000 (Dirui Industrial Co., Changchun, China). Quando necessário, algumas amostras são revisadas através de sedimentoscopia manual. O preparo das amostras segue as normas de acordo com a ABNT NBR 15268.<sup>(7)</sup> Para tal, são utilizados tubos plásticos de 12mL, os quais são identificados e, logo após centrifugação de 1.500 RPM por 5 minutos, é desprezado o sobrenadante. O volume restante (cerca de 0,5mL) do sedimento é ressuspendido utilizando um agitador de tubos tipo Vortex.

O laboratório possui critérios para classificação dos elementos, cuja presença ou quantificação foi considerada alterada na sedimentoscopia, considerando os seguintes parâmetros:

- Raros – 0 a 4 por campo;
- Poucos – 5 a 10 por campo;
- Frequentes – 11 a 30 por campo;
- Numerosos – > 30 por campo.

As informações dos sumários de urinas foram planilhadas no programa Microsoft Excel® 2007. Utilizamos também dados demográficos de exames físico-químico e sedimentoscopia dos pacientes.

## ÉTICA

O projeto possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Christus (CAAE 24764619.0.0000.5049) e também obteve o apoio de um laboratório de referência particular de Fortaleza.

## RESULTADOS

Foram extraídos dados referentes a 48.755 sumários de urina, do período de julho a dezembro de 2019, e foi constatado que 9.160 exames (18,79%) não apresentaram alterações na sedimentoscopia, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Números de amostras de urinas sem alterações físico-químicas

	Valor absoluto	Valor percentual
Normais	39.595	81,21%
Anormais	9.160	18,79%
TOTAL	48.755	100,00%

## DISCUSSÃO

O exame de urina é um dos exames mais importantes para triagem e avaliação do estado geral de saúde dos indivíduos e pode sinalizar alterações renais e/ou hepáticas.

<sup>(2)</sup> A análise da urina na história médica sempre foi conhecida como um ótimo indicador para se avaliar o estado de saúde do paciente, sendo a urina um material de fácil obtenção, sem causar nenhum tipo de dor ou desconforto ao paciente, tornando sua análise um dos exames mais solicitados em ambientes hospitalares.<sup>(8)</sup> O sumário de urina não é um exame frequentemente solicitado em pacientes que não possuam algum tipo de sinal ou sintoma clínico. Nessa circunstância, o sumário é indicado apenas em pacientes que possuam sintomas como pacientes diabéticos, crianças e grávidas.<sup>(6)</sup>

Foram estudados dois artigos científicos que realizaram o mesmo tipo de análise que a do presente estudo. Nesses artigos, o número de amostras utilizadas foram bem inferiores ao nosso trabalho, como o de Heggendornn,<sup>(9)</sup> que analisou cerca de 317 urinas com o objetivo de avaliar a importância da realização da análise microscópica do sedimento urinário frente aos valores normais obtidos nos exames físico-químicos de triagem. Já Costaval<sup>(6)</sup> utilizou cerca de 10.234 amostras e avaliou a importância da análise do sedimento em amostras de urinas com características físico-químicas normais.

Segundo Heggendornn,<sup>(9)</sup> todos os resultados apontaram a relevância em se realizar a sedimentoscopia de todas as amostras de urina, mesmo não apresentando nenhum parâmetro positivo na análise físico-química. O resultado que apresentou um maior valor de anormalidade dentre os elementos foi a presença de bactérias. Comparando os dados do estudo de Heggendornn, que obteve 2,02% de microbiota aumentada, nosso estudo encontrou cerca 5,50% das amostras com a presença de bactérias, valores maiores que o do estudo analisado.<sup>(10)</sup>

No presente estudo, avaliamos os resultados de 39.595 exames de sumários de urinas, todos com a análise físico-química negativa. Do número total de exames, cerca de 5.403 exames obtiveram resultados positivos na sedimentoscopia. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que 13,67% das amostras de urinas das quais acreditava-se que não possuiriam nenhum tipo de anormalidade, na verdade apresentaram, sim, tais características (Tabela 2).

Tabela 2 - Elementos encontrados na sedimentoscopia de 39.595 urinas sem alterações físico-químicas

	Valor absoluto	Valor percentual
Cilindro hialino	03	0,01%
Cilindro granuloso	07	0,02%
Hemácias	20	0,05%
Piócitos	14	0,04%
Bactérias	2.176	5,50%
Leveduras	03	0,01%
Células epiteliais escamosas	125	0,32%
Sais amorfos	1140	2,88%
Cristais de ácido úrico	434	1,10%
Cristais de fosfato de cálcio	<b>10</b>	<b>0,03%</b>
Cristais de fosfato triplo	<b>08</b>	<b>0,02%</b>
Cristais de oxalato de cálcio	<b>1.463</b>	<b>3,69%</b>
TOTAL	<b>5.403</b>	<b>13,67%</b>

Os resultados obtidos nos mostraram a presença de muitos cristais no sedimento urinário. Um cristal que foi encontrado com maior frequência foi o oxalato de cálcio, importante achado para a clínica, e que é formado em razão do agrupamento de solutos na urina.<sup>(10)</sup> Esse cristal pode estar associado à litíase, doença que se dá pela formação de cálculos renais.<sup>(11)</sup>

Outro achado bastante relevante e de importância clínica foram os cilindros granulados, encontrados em sete amostras, que podem ter significado clínico ou não. Os grânulos em situação não patológica podem ser originados dos lisossomos excretados pelas células epiteliais tubulares renais durante o metabolismo normal.<sup>(10)</sup> Em condições patológicas, o cilindro granuloso pode aparecer por conta da desintegração do cilindro celular e de células tubulares, ou agregados de proteínas filtradas pelo glomérulo.<sup>(10)</sup>

## CONCLUSÃO

A sedimentoscopia, exame frequentemente solicitado pelos médicos, pode trazer um custo maior para os laboratórios. Contudo, tal técnica é necessária para triar possíveis doenças, sendo, portanto, uma etapa indispensável do exame da urina, pois pode mostrar ao clínico que existem

elementos anormais, mesmo em amostras com o exame físico-químico negativo.

### Abstract

*Objective: To identify the existence of clinically important elements in the urine sediment of urine samples with negative physical-chemical examination such as crystals, yeasts and bacteria. Methods: The present study designed a qualitative and quantitative descriptive analysis of clinical data contained in the laboratory system. Data from July to December 2019 were analyzed. Results: Data referring to 48,755 urine summaries were extracted, and it was found that 9,160 tests (18.79%) did not show changes in sedimentcopy. Conclusion: However, such a technique is necessary to screen for possible diseases and is therefore essential, as it can show the clinician that there are abnormal elements, even in urines with negative physical-chemical examination.*

### Keywords

Urine; Glomerulonephritis; Urinalysis

## REFERÊNCIAS

- Andriolo A, Ballarati CAF, Galoro CAO, Mendes ME, Melo MR, Sumita NM. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): coleta e preparo da amostra biológica; (2014).
- Siqueira LDO, Muccini T, Dall AI, *et al.* Análise de parâmetros bioquímicos séricos e urinários em atletas de meia maratona. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. 2009; 53(7), 844-852.
- Marques AG, Pasternak J, Damascena MDS, França CN, Martino MDV. Desempenho da fita de urina como resultado presuntivo para cultura de urina negativa. Einstein (São Paulo). 2017; 15(1), 34-39.
- Poloni JAT. Análise do sedimento urinário para identificação de insuficiência renal aguda e diagnóstico diferencial de necrose tubular aguda e síndrome hepatorenal em pacientes com doença hepática severa. 2019. [Doctoral dissertation]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; 2019.
- Alves MAR. Diagnóstico de doença renal crônica: avaliação de proteinúria e sedimento urinário. J Bras Nefrol. 2004; 26(3 Suppl 1), 6-8.
- da Costaval JA, de Pádua Massote A, Cerqueira CMM, da Costaval AP, Auler A, Martins GJ. Qual o valor da sedimentoscopia em urinas com características físico-químicas normais? J Bras Patol. 2001; 37(4):261-5.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas. Norma Brasileira 15268. Laboratório Clínico – Requisitos e recomendações para exame de urina. Rio de Janeiro: ABNT; 2005.
- Mundt LA, Shanahan K. Exame de Urina e de Fluidos Corporais de Graff. 2ª Edição. Artmed Editora; 2016.
- Heggendorrn LH, Almeida SN, Cunha GA. Urinálise: a importância da sedimentoscopia em exames físico-químicos normais. Revista Eletrônica de Biologia. 2014. ; (REB). ISSN 1983-7682, 7(4), 431-443.
- Strasinger SK, Lorenzo M. Urinálise e fluidos corporais. 5ª ed. São Paulo: Editorial Premier; 2009.
- Lopata VJ, Hofelmann SJ, Hauser AB. Análise de dados clínicos e laboratoriais associados à litíase urinária em pacientes de um laboratório de análises clínicas. 2017. Visão Acadêmica, 17(3).

Correspondência

**Alexandre de Almeida Monteiro**  
R. João Adolfo Gurgel, 133 - Cocó  
Fortaleza - CE, CEP: 60190-180  
E-mail: monteiro.aa@gmail.com

# Comparação das metodologias óptica e de impedância para a determinação de parâmetros hematológicos no analisador Sysmex-XN

## Comparison of optical and impedance methodologies for the determination of hematological parameters on the Sysmex-XN analyzer

Jennifer Tassoni Staehler<sup>1</sup>

Luana Moro<sup>2</sup>

Gabriel Giron Corrêa<sup>1</sup>

Luciana Scotti<sup>2</sup>

Iuri Vicente Camargo Morkis<sup>3</sup>

Carine Ghem<sup>4</sup>

### Resumo

Objetivo: Comparar as metodologias de impedância e óptica para contagem de eritrócitos (RBC) e dosagem de hemoglobina (HGB) como forma de corrigir a contagem de eritrócitos em casos de pacientes que apresentam índice de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) acima do ponto de corte. Métodos: Para comparar as metodologias, foram utilizadas amostras com CHCM normal e aumentado. Os parâmetros avaliados foram RBC, HGB e CHCM. Resultados: As amostras com valores de CHCM aumentado demonstraram uma correlação significativa entre RBC e HGB, porém o CHCM apresentou uma correlação fraca. Observamos que a metodologia por impedância obteve maior sucesso na correção do CHCM quando as amostras apresentavam aglutinação. Conclusão: A metodologia óptica é uma boa alternativa para correção de valores aumentados de CHCM em situações específicas, mas para casos de aglutinação não se mostrou efetiva.

### Palavras-chave

Hematologia; Hemograma; Eritrócitos

## INTRODUÇÃO

Um hemograma é determinado por um conjunto de testes realizados em laboratório que estabelece aspectos qualitativos e quantitativos das células do sangue, sendo de grande importância no diagnóstico de diversas doenças.<sup>(1)</sup> Em um hemograma é possível avaliar as três linhagens de células presentes na corrente sanguínea: células vermelhas ou eritrócitos; células brancas ou leucócitos e as plaquetas.<sup>(2)</sup>

A análise relacionada à série vermelha do sangue é chamada de eritrograma, e nela se encontram os índices hematimétricos que determinam o perfil hematológico das células vermelhas. São eles: contagem total de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina (HGB), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hematócrito (HT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), estimativa de anisocitose (RDW).

Além disso, é feita a avaliação morfológica das hemácias a partir da microscopia<sup>(1)</sup>

A determinação analítica de células sanguíneas e parâmetros hematológicos de interesse pode ser realizada através de analisadores hematológicos automatizados, cujo princípio de detecção baseia-se no método elétrico (impedância elétrica) ou óptico.<sup>(1)</sup> Com base nos parâmetros medidos do hemograma (RBC, HGB e VCM) é possível obter por cálculo indireto o CHCM, índice que avalia a saturação de hemoglobina nos eritrócitos.<sup>(3)</sup> Algumas situações podem levar a uma medida errônea dos eritrócitos e, conseqüentemente, gerar índices calculados incorretamente, especialmente o CHCM.<sup>(4)</sup>

Resultados errôneos de RBC ou HGB podem ser causados por alguma anormalidade dos eritrócitos (aglutinação) ou por interferentes do plasma (lipemia, icterícia, hemólise) e, assim, gerar um aumento espúrio do CHCM.<sup>(5)</sup>

<sup>1</sup> Graduação em Farmácia/Unidade de Bioquímica Clínica, Serviço de Diagnóstico Laboratorial - Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Mestrado em Ciências Biológicas/Unidade de Bioquímica Clínica, Serviço de Diagnóstico Laboratorial - Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e Adolescente/Unidade de Bioquímica Clínica, Serviço de Diagnóstico Laboratorial - Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup> Doutorado em Ciências da Saúde/Unidade de Bioquímica Clínica, Serviço de Diagnóstico Laboratorial - Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS, Brasil.

Recebido em 08/04/2021

Aprovado em 27/09/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102133

A contagem anormal de eritrócitos pode estar relacionada à presença de crioaglutininas na amostra, as quais causam a aglutinação dos eritrócitos em temperaturas menores que 37°C, e geralmente a presença desses autoanticorpos são associados clinicamente à anemia hemolítica autoimune.

<sup>(6)</sup> Além das crioaglutininas, desordens que desregulam o volume eritrocitário, tanto hereditárias quanto adquiridas (p. ex.: esferocitose, anemia falciforme) também levam a um aumento do CHCM.<sup>(7)</sup> Portanto, na rotina laboratorial, a elevação do índice CHCM deve ser avaliada cuidadosamente, a fim de determinar se a alteração do CHCM está relacionada a uma patologia, ou apenas a algum artefato da amostra.

Recentemente, vem sendo descrito na literatura a separação espontânea dos eritrócitos aglutinados no canal óptico.<sup>(4)</sup> Isso se deve ao fato da amostra de sangue ser aquecida a 41°C durante um minuto no momento de transferência da amostra para a câmara de leitura.<sup>(8)</sup> Essa particularidade torna o canal óptico uma alternativa interessante ao protocolo realizado atualmente nas amostras que apresentam o CHCM alto.

Na rotina laboratorial, a correção da contagem dos eritrócitos, bem como a dos índices eritrocitários calculados indiretamente como o CHCM, pode ser revertida através do pré-aquecimento do sangue.<sup>(9)</sup> Amostras que apresentam o valor de CHCM superior a 37,5g/dL (valor sugerido no manual do fabricante)<sup>(10)</sup> são incubadas em banho-maria na temperatura de 37°C durante 60 minutos e, posteriormente, um novo hemograma é realizado no equipamento. Nas situações em que o pré-aquecimento da amostra não seja capaz de reverter o aumento do CHCM devido ao alto grau de aglutinação ou outros interferentes, o procedimento indicado é a realização do micro-hematócrito por microcentrifugação e liberação de um hemograma sem os índices hematimétricos. Em casos de amostra lipêmica, os índices derivados da HGB não são liberados em razão da interferência na reação colorimétrica.

Sendo assim, este trabalho tem o propósito de comparar as metodologias para contagem de RBC pela metodologia de impedância e método óptico, com a finalidade de utilizar o canal óptico presente no equipamento Sysmex XN como forma de correção da contagem de RBC nos casos de pacientes que apresentam o índice de CHCM acima do ponto de corte. Além disso, a implementação da metodologia da contagem de RBC através do canal óptico diminuiria o tempo estimado para liberação do hemograma.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Tipo de estudo

Estudo transversal prospectivo no período de novembro de 2019 a agosto de 2020 na unidade de Bioquímica Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### População e amostra

Para comparação das metodologias em indivíduos saudáveis do ponto de vista hematológico, que possuem CHCM na faixa normal, foram avaliados resultados de amostras de indivíduos adultos de ambos os sexos, utilizadas diariamente em nossa rotina para controle interno de qualidade do equipamento Sysmex XN. Também foi verificada a estabilidade dos parâmetros com amostras de controle interno de qualidade, e para essa avaliação a mesma amostra de controle interno diário foi processada nos turnos manhã, tarde e noite.

Além da comparação em indivíduos normais, realizamos a análise dessa metodologia em pacientes que apresentaram o índice CHCM elevado. Foram incluídos todos os pacientes que realizaram exame de hemograma no laboratório com primeira dosagem de CHCM maior que 37,5g/dL. Aqueles que não possuam volume suficiente de sangue total para uma terceira dosagem foram excluídos do estudo.

Todas as amostras utilizadas nesse estudo foram coletadas em tubo com anticoagulante K2EDTA e processadas dentro do período de oito horas após coleta.

Para avaliação da metodologia óptica em valores normais de CHCM, foram coletados os dados do controle interno da qualidade dos analisadores hematológicos, que consistem em indivíduos adultos com parâmetros hematológicos normais. As amostras com valores de CHCM normais foram dosadas através da metodologia por impedância elétrica e por citometria de fluxo e os valores obtidos através das duas metodologias foram comparados e avaliados.

A rotina do laboratório estabelece que todas as amostras com resultado de CHCM maior que 37,5g/dL sejam incubadas em banho-maria a 37°C por 60 minutos, para realizar uma segunda dosagem. Tal valor é sugerido no manual do fabricante como crítico e que gera *flag* de possível turbidez na amostra,<sup>(10)</sup> e sendo assim o aquecimento visa eliminar a interferência de crioaglutininas nos índices hematimétricos. Neste estudo, todas as amostras com CHCM maior que 37,5g/dL foram dosadas no canal óptico. Este canal utiliza a metodologia de citometria de fluxo com fluorescência para contagem de eritrócitos (RBC-O), incluindo também os reticulócitos. A hemoglobina (HB-O) é calculada a partir dos parâmetros RBC-O e do conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos. Estes resultados foram comparados com os valores obtidos por impedância na dosagem após a incubação por uma hora a 37°C. Todas as amostras foram revisadas por microscopia para avaliação da morfologia da série vermelha, bem como avaliação visual do plasma para verificação de turbidez e lipemia. Essa avaliação tem como objetivo agrupar as causas que elevam o índice CHCM (seja por interferentes, doenças eritrocitárias ou outras causas não identificadas) e analisar em quais situações a metodologia óptica pode ou não normalizar o valor do CHCM. Todas

as avaliações referentes a esta pesquisa foram realizadas após a liberação dos resultados dos exames solicitados, sem interferência na rotina da unidade.

Para a avaliação da estabilidade dos parâmetros hematológicos, a mesma amostra com valores hematimétricos normais foi avaliada pelo equipamento Sysmex XN três vezes ao dia (manhã, tarde e noite), pelas metodologias de impedância elétrica e citometria de fluxo e os valores obtidos foram comparados para se observar as possíveis variações.

Todos os dados foram coletados diretamente do equipamento; nenhuma coleta em dados de prontuário foi realizada.

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa estatístico SPSS 20.0 (Statistical Package for Social Sciences - Professional Statistics™). As variáveis numéricas estão descritas sob a forma de medianas e as variáveis categóricas estão descritas sob a forma de proporções. Para avaliar a correlação entre as duas metodologias foi utilizado o teste de Spearman e para avaliar a concordância foram utilizados os testes de Wilcoxon e McNemar. Para verificar a estabilidade da amostra ao longo do dia foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Para todas as análises foi considerado um nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

### Tamanho amostral

Para detectar um valor mínimo de  $p = 0,65$  no teste de correlação em amostras de indivíduos saudáveis do ponto de vista hematológico, considerando hipótese nula  $p = 0,5$  e os parâmetros para o cálculo de poder de 90% e de  $\alpha$  de 0,01, foi determinado o tamanho amostral de 293, utilizando o programa R 3.5.1.

A referência utilizada para o cálculo amostral dos indivíduos com CHCM elevado e para a avaliação do CHCM normal seguiu o protocolo estabelecido para validação de métodos de acordo com “Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial” (SBPC/ML 2018), que prevê número amostral de no mínimo 120 amostras para comparação.<sup>(11)</sup>

### Aspectos éticos

Este projeto foi encaminhado para aprovação ao Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Projeto nº 2019-0293), e para a Plataforma Brasil (CAAE: 12894919.6.000.5327). O presente projeto envolve riscos mínimos relacionados à quebra de confidencialidade dos dados obtidos, portanto os pesquisadores assinaram o Termo de Compromisso de Utilização de Dados, no qual se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes, o Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico

e Informações Associadas e a carta de aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## RESULTADOS

Foram avaliadas 293 amostras com valores de CHCM dentro da normalidade, onde observou-se que os parâmetros RBC, HGB e CHCM apresentaram uma boa e significativa correlação entre as metodologias avaliadas (Figura 1). Apesar das correlações se mostrarem significativas, utilizamos o teste de Wilcoxon para avaliar as diferenças entre as dosagens nas metodologias utilizadas. Verificamos que não houve diferença significativa para as medianas dos parâmetros HGB e CHCM, permitindo concluir que esses parâmetros são equivalentes nas metodologias analisadas (Tabela 1). Os dados também indicam que para RBC a hipótese nula foi rejeitada, demonstrando que os métodos não são equivalentes para esse parâmetro.

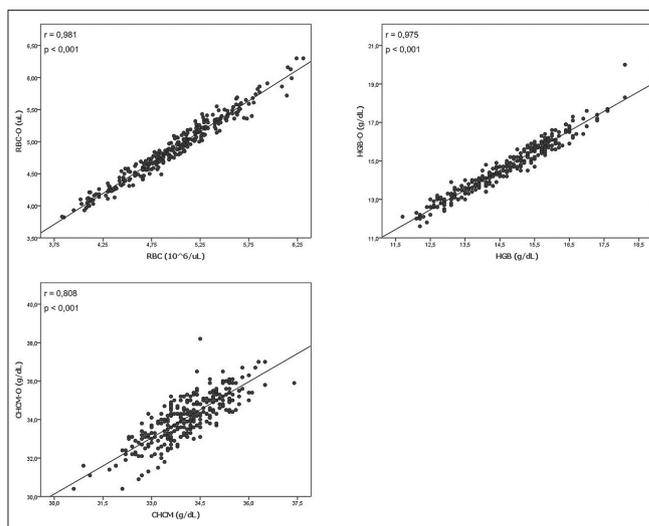


Figura 1. Correção entre as metodologias impedância e óptica em amostras com CHCM normal.

Tabela 1 - Comparação entre os parâmetros realizada nas metodologias de impedância e óptica em amostras com valores normais de CHCM.

Parâmetros	Mediana (mín-máx)	p-valor
RBC-I	5,00 (3,83 - 6,31)	< 0,001
RBC-O	4,88 (3,82 - 6,30)	-
HGB-I	14,70 (11,70 - 18,10)	0,526
HGB-O	14,70 (11,60 - 20,00)	-
CHCM-I	34,10 (30,60 - 37,40)	0,652
CHCM-O	34,20 (30,40 - 38,20)	-

Teste de Wilcoxon

Na Figura 2 podemos observar a estabilidade das amostras ao longo do dia. As análises foram feitas nos três turnos e as medianas obtidas foram comparadas. Nas duas metodologias pode-se observar uma boa estabilidade

para os parâmetros RBC e HGB, que não demonstraram oscilações significativas ao longo do dia, ao contrário do CHCM, que demonstrou maior variação com o passar do tempo.

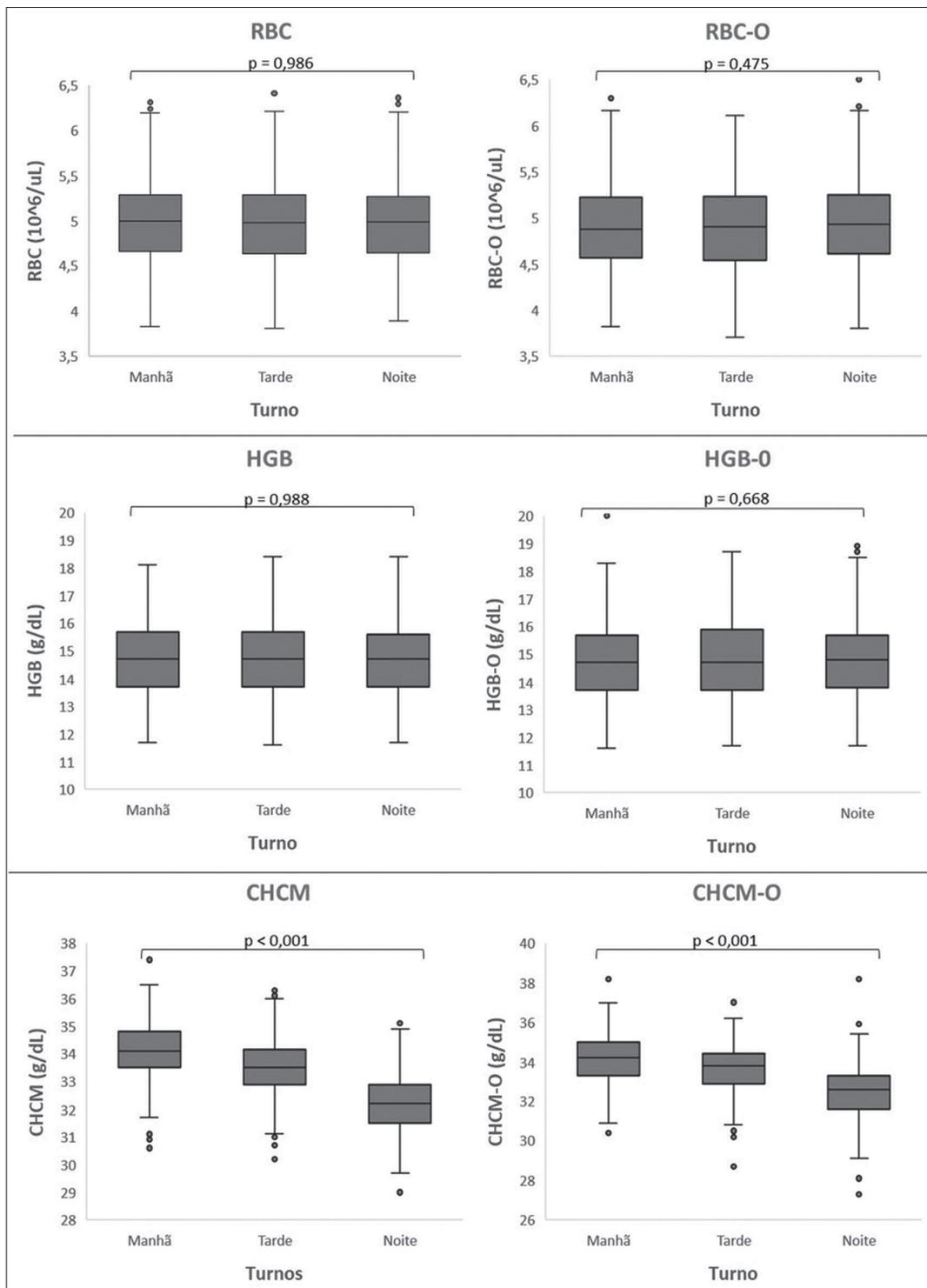


Figura 2. Representação da estabilidade dos parâmetros RBC, HGB e CHCM ao longo do dia na metodologia por impedância e óptica, realizado a partir do teste de Kruskal-Wallis.

As amostras com valores de CHCM alterado demonstraram uma correlação significativa entre RBC e HGB quando comparamos a metodologia por impedância após uma hora de banho a 37°C e metodologia óptica (Figura 3), porém houve diferença significativa entre as medianas para esses parâmetros, verificado no teste de Wilcoxon. O parâmetro CHCM apresentou uma correlação fraca e inversamente proporcional, entretanto verificamos que não houve diferença significativa entre as medianas do CHCM no teste de Wilcoxon (Tabela 2).

Entre as amostras com valores espúrios de CHCM, as principais causas observadas que elevam o CHCM foram a presença de eritrócitos aglutinados, anemia falciforme, amostras de recém-nascidos (RN) e outras causas, que incluem leucemias, linfomas, tumores de órgãos sólidos, transplantes, infecções, hiperleucocitose, hipernatremia, lipemia e esferocitose. Pode-se observar que o protocolo de incubação a 37°C seguido de repetição na metodologia por impedância obteve maior sucesso na correção do CHCM quando as amostras apresentavam aglutinação. Porém, nos demais grupos a metodologia óptica obteve mais sucesso na correção do CHCM (Tabela 3).

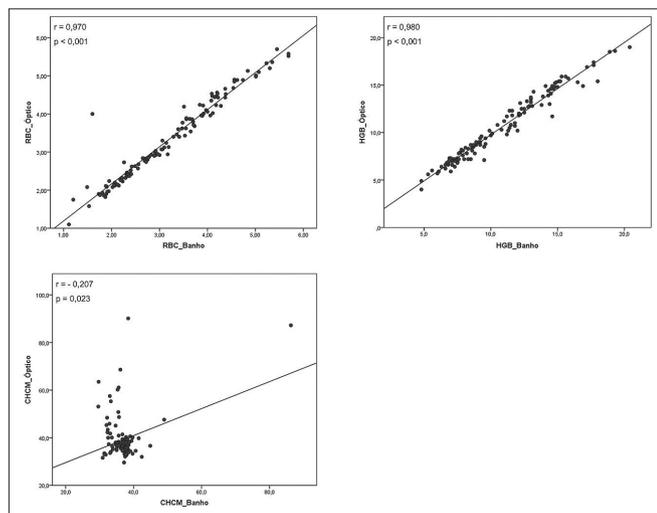


Figura 3. Comparação entre as metodologias impedância após banho-maria a 37°C por uma hora e óptica, em amostras com CHCM alterado.

Tabela 2 - Comparação entre os parâmetros, realizada nas metodologias impedância após banho-maria a 37°C por uma hora e óptica em amostras com valores de CHCM alterados.

Parâmetros	Mediana (mín-máx)	p-valor
RBC-B	3,06 (1,11 – 5,69)	< 0,001
RBC-O	3,09 (1,10 – 5,70)	-
HGB-B	10,30 (4,80 – 20,40)	0,001
HGB-O	10,05 (4,00 – 19,00)	-
CHCM-B	37,25 (29,60 – 86,30)	0,811
CHCM-O	36,85 (29,60 – 90,10)	-

Teste de Wilcoxon

Tabela 3 - Perfil de correção do CHCM de acordo com o interferente encontrado

	Banho n (%)	Óptico n (%)	p-valor
<b>Agglutinação (n = 30)</b>	24 (80)	9 (30)	< 0,001
<b>Anemia falciforme (n = 21)</b>	3 (14,3)	18 (85,7)	0,001
<b>RN (n = 14)</b>	3 (21,4)	12 (85,7)	0,012
<b>Outros (n = 55)</b>	33 (60,0)	38 (69,1)	0,424
<b>Todos (n = 120)</b>	63 (52,5)	77 (64,2)	0,126

Teste de McNemar

## DISCUSSÃO

A presença de interferentes na amostra tem sido associada a dificuldades na contagem de RBC, HGB e aos índices hematimétricos derivados desses, bem como o CHCM.<sup>(1)</sup> A principal causa que eleva os valores de CHCM e que está bem descrita na literatura é a presença de crioaglutininas; desordens na membrana dos eritrócitos, anemia falciforme e em recém-nascidos também já foram descritos.<sup>(12)</sup> Porém pode-se observar na rotina laboratorial o aumento dos valores de CHCM em casos que ainda não estão claros na literatura, como em pacientes acometidos por infecções virais, neoplasias, pacientes transplantados ou com distúrbios eletrolíticos, pacientes em uso de quimioterapia, imunossupressores ou em tratamento antirretroviral. Nesses casos há um estado transitório de CHCM alterado, em que não são observadas anormalidades nos eritrócitos ou outros interferentes analíticos.<sup>(5)</sup> Uma tabela com possíveis causas de alteração nos valores de CHCM pode ser vista na publicação de Alban Godon *et al.*, de 2012.<sup>(13)</sup>

A principal técnica que vem sendo empregada na tentativa de corrigir valores errôneos de CHCM obtidos de amostras com interferentes é o banho-maria a 37°C por uma hora, sugerido por Finland em 1945.<sup>(14)</sup> Entretanto, o uso do protocolo padrão do banho-maria nem sempre consegue corrigir a presença de interferentes e os índices hematimétricos calculados não são confiáveis, pois não podem ser considerados valores verdadeiros e não devem ser liberados no laudo. Recentemente, o avanço da tecnologia e o uso de equipamentos automatizados para a realização dos hemogramas permitiram que a metodologia óptica fosse estudada para substituir protocolo de incubação a 37°C seguido de repetição na metodologia de impedância. No presente estudo a metodologia óptica demonstrou boa concordância com a metodologia por impedância quando comparadas em amostras sem alterações, de pacientes com valores dentro dos limites de referência. Esse achado possibilita seu uso como controle interno da metodologia e dos equipamentos analisadores em uso no laboratório e qualifica a metodologia como equivalente ao método padrão.

A metodologia óptica, utilizada no canal de reticulócitos, demonstrou também que pode ser utilizada na presença de certos interferentes, e conseguimos elucidar em quais casos a nova metodologia pode ser aplicada. Com esse estudo foi possível observar que, de forma geral, as duas metodologias empregadas não demonstram diferenças significativas, porém quando estratificamos os grupos, a metodologia óptica corrigiu os valores de CHCM alterado nos grupos de amostras de pacientes com anemia falciforme e RN. Esse achado pode ser justificado pelo aumento da densidade sanguínea causada pelos eritrócitos falcizados, que ao serem aquecidos, diminuem sua densidade e o valor de CHCM é corrigido. Em 1984, Embury *et al.* demonstrou que há associação diretamente proporcional entre o CHCM e a densidade dos eritrócitos falcizados.<sup>(15)</sup> Já Linderkamp *et al.* em 1982 concluiu que os eritrócitos em RN são menos maleáveis e mais densos do que eritrócitos de adultos, gerando um aumento no CHCM.<sup>(16)</sup>

Além disso, o grupo Outros, onde se encontram causas não tão bem descritas na literatura, apresentou resultados sem diferença significativa da metodologia padrão, e dessa forma podemos levar em consideração que o tempo de processamento da amostra é inferior na metodologia óptica, e que nesse caso poderíamos utilizar a nova metodologia na rotina laboratorial. A hipótese da densidade também se aplica aos pacientes desse grupo de estudos, pois hipernatremia, leucocitose e uso de alguns medicamentos podem causar essa mesma interferência nos valores de CHCM. Essa hipótese pode ser verificada utilizando o teste de osmolalidade, que reflete a concentração de substâncias presentes no sangue.

Diferentemente do esperado, o grupo de amostras com eritrócitos aglutinados demonstrou que o banho-maria por uma hora ainda é a melhor opção, portanto sugere-se que em casos de amostras muito agregadas deve-se manter a metodologia padrão.

Outros estudos foram realizados utilizando a metodologia óptica como forma de corrigir o CHCM, como Goia que demonstrou que amostras com aglutinação tiveram correção da contagem de RBC por desagregação dos eritrócitos após o aquecimento, levando à correção do CHCM.<sup>(17)</sup> Ferrero-Vacher demonstrou que o uso do canal de reticulócitos é importante nos casos de crioaglutininas, porém deve-se sempre prestar atenção aos *flags* reportados pelo aparelho como o de "RET Scattergram", pois podem haver outros interferentes, como hemólise, e o resultado liberado, mesmo pela metodologia óptica, pode não ser confiável.<sup>(18)</sup>

Análise da estabilidade demonstrou que os parâmetros RBC e HGB se mantêm constantes ao longo de um dia e podem ser dosados dentro desse período caso seja necessário, porém o CHCM perde estabilidade e seu resultado passa a não ser confiável com o passar do tempo. Isso pode ser devido a esse parâmetro ser derivado do cálculo

CHCM = HGB / (RBC/VCM), e o aumento do VCM gerado pela absorção de líquido extracelular pelos eritrócitos resulta na redução do CHCM ao longo do tempo.

Outros estudos vêm sendo realizados sobre o canal de reticulócitos com o intuito de utilizá-lo como ferramenta de monitoramento de pacientes ou até mesmo no uso cotidiano do laboratório de análises clínicas, em casos específicos de anemias, anemias hemolíticas e crioaglutininas. Susane Franck *et al.* mostrou potencial utilidade do canal de reticulócitos no diagnóstico de anemia por deficiência de ferro, em que foi possível observar correlação entre os parâmetros oferecidos por essa metodologia e a quantidade de hemoglobina nos reticulócitos, que é um indicador precoce de anemia por deficiência de ferro.<sup>(19)</sup> Outro estudo que corrobora com o achado anterior foi o de Mauro Butarello *et al.*, mostrando que o uso do canal de reticulócitos pode ser utilizado como acompanhamento da terapia com administração de ferro.<sup>(20)</sup> E, ainda, Berda-Haddad *et al.* observou que o uso do canal de reticulócitos para contagem de RBC é possível em casos de crioaglutinação, e para a dosagem de HGB em casos de interferência óptica.

O presente estudo apresentou como limitação o número amostral na classificação dos interferentes, sendo necessários estudos com número amostral maior e com outros tipos de interferentes para que se possa elucidar as aplicações do canal de reticulócitos na rotina laboratorial, não gerando prejuízo nos resultados e com alta sensibilidade e especificidade. A determinação de um ponto de corte no uso da metodologia óptica para as amostras aglutinadas seria de grande valor, pois desta forma poderíamos estabelecer para quais casos a metodologia padrão ainda deve ser a escolhida na tentativa de corrigir o valor espúrio de CHCM. Além disso, mais testes que avaliam a densidade das amostras seriam úteis para correlacionar valores alterados de CHCM com outros interferentes que não a aglutinação, já que vários desses interferentes não estão bem descritos na literatura.

## CONCLUSÕES

Foi possível observar que o canal de reticulócitos tem a capacidade de corrigir o valor de CHCM nos casos de anemia falciforme, para amostras de recém-nascidos e na presença de outros interferentes, porém o mesmo não pode ser dito em relação às amostras aglutinadas, já que os testes não foram conclusivos. Nossos resultados não corroboram aos já apresentados em outras pesquisas, e sendo assim mais estudos são necessários para elucidar a aplicação da metodologia óptica na rotina laboratorial. Entretanto, o uso da metodologia óptica presente no canal de reticulócitos dá uma excelente oportunidade de melhoria na rotina laboratorial, otimizando o tempo de liberação de resultado e fornecendo um hemograma completo com todos os índices hematimétricos.

## SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho teve apoio financeiro da empresa Sysmex.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Sysmex que apoiou a execução desse trabalho e aos autores envolvidos na execução do mesmo.

### Abstract

*Objective: Compare the impedance and optical methodologies for red blood cells (RBC) count and hemoglobin (HGB) measurement as a way to correct the RBC count in cases of patients who have a MCHC index above the cutoff. Methods: To compare the methodologies, samples with normal and augmented MCHC were used. The parameters evaluated were RBC, HGB and MCHC. Results: Samples with increased MCHC values demonstrated a significant correlation between RBC and HGB, but the MCHC showed a weak correlation. We observed that the impedance methodology was more successful in correcting the MCHC when the samples presented agglutination. Conclusion: Optical methodology is a good alternative for correction of increased CHCM values in specific situations, but for cases of agglutination it has not been shown to be effective.*

### Keywords

Hematology; Hemogram; Erythrocytes

## REFERÊNCIAS

1. Oliveira RAG. Hemograma: Como fazer e interpretar. 2nd ed. São Paulo, 2015.
2. Online LT. Complete Blood Count (CBC) 2015 February 10th 2020. Available from: <https://labtestsonline.org/tests/complete-blood-count-cbc>.
3. Ermens AA, et al. New erythrocyte and reticulocyte parameters on CELL-DYN Sapphire: analytical and preanalytical aspects. *Int J Lab Hematol*. 2012;34(3):274-82.
4. Zandecki M, et al. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *Int J Lab Hematol*. 2007;29(1):21-41.
5. Berda-Haddad Y, et al. Increased mean corpuscular haemoglobin concentration: artefact or pathological condition? *Int J Lab Hematol*. 2017;39(1):32-41.
6. Berentsen S e Tjonnfjord GE. Diagnosis and treatment of cold agglutinin mediated autoimmune hemolytic anemia. *Blood Rev*. 2012;26(3):107-15.
7. Glogowska E e Gallagher PG. Disorders of Erythrocyte Volume Homeostasis. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(0 1):85-91.
8. La Gioia A, et al. Short preheating at 41 degrees C leads to a red blood cells count comparable to that in RET channel of Sysmex analysers in samples showing cold agglutination. *J Clin Pathol*. 2018;71(8):729-34.
9. Costa BMB, et al. Interference of cold agglutinin autoantibodies in erythrogram interpretation: a case report and literature review. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2018;54(4).
10. Systems SX-SAH. Flagging Interpretation Guide, 2017.
11. Sumita NM, et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). Automação laboratorial: histórico, seleção, implantação e gestão.: Manole; 2018.
12. Failace R. Hemograma manual de interpretação. 6 ed ed. Porto Alegre, 2015.
13. Godon A, et al. [Automated hematology analysers and spurious counts Part 3. Haemoglobin, red blood cells, cell count and indices, reticulocytes]. *Annales de Biologie Clinique*. 2012;70(2):155-68.
14. Finland M, et al. Cold agglutinins. I. occurrence of cold isohemagglutinins in various conditions. *The Journal of Clinical Investigation*. 1945;24(4):451-7.
15. Embury SH, et al. Concurrent sickle cell anemia and alpha-thalassemia. Effect on pathological properties of sickle erythrocytes. *The Journal of Clinical Investigation*. 1984;73(1):116-23.
16. Linderkamp O, et al. Deformability of density separated red blood cells in normal newborn infants and adults. *Pediatric Research*. 1982;11:964-8.
17. Goia AL. Eliminating or Minimizing the Effects of Cold Agglutinins on the Accuracy of Complete Blood Count Results. *Annals of Laboratory Medicine*. 2019;39(499-500).
18. Ferrero-Vacher C, et al. [Erythrocytic parameters Sysmex in a case of severe haemolysis]. *Biologie au Quotidien* 2015;73(6):729-32.
19. Franck S, et al. Potential utility of Ret-Y in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. *Clinical Chemistry*. 2004;50(7):1240-2.
20. Buttarello M, et al. The new reticulocyte parameter (RET-Y) of the Sysmex XE 2100: its use in the diagnosis and monitoring of posttreatment sideropenic anemia. *American Journal of Clinical Pathology*. 2004;121(4):489-95.

Correspondência

**Jennifer Tassoni Stahler**  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Ramiro Barcelos, 2350  
Porto Alegre - RS CEP: 90630-000  
E-mail: [jennits@gmail.com](mailto:jennits@gmail.com)

# Prevalência de Enterobacterales isoladas em amostras de hemoculturas de pacientes em um hospital privado de Juiz de Fora-MG

## Prevalence of Enterobacterales isolated from patient blood culture samples in a private hospital in Juiz de Fora-MG

Adrielli Alves Carneiro<sup>1</sup>  
Patrícia Guedes Garcia<sup>2</sup>  
Patrícia Ganimi Tavella<sup>3</sup>

### Resumo

**Objetivo:** Avaliar a prevalência de *Enterobacterales* isoladas de amostras de hemoculturas provenientes das Unidades de Terapia Intensiva; Definir o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas bacterianas de maior prevalência. **Métodos:** Foram coletados dados de todas as hemoculturas positivas com crescimento de enterobactérias das UTI's Adulto, Neonatal e UC de um hospital privado, em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, de janeiro de 2017 a janeiro de 2019. **Resultados:** Foram encontradas 3.535 amostras de hemoculturas onde 2.464 (69,7%) foram negativas e 1.071 (30,3%) positivas para algum microrganismo. Dessas, 237 (21,3%) eram enterobactérias, com prevalência de *Klebsiella pneumoniae* (33,3%), *Serratia marcescens* (21,9%), *Escherichia coli* (18,1%) e *Enterobacter cloacae* (9,3%). Dentre essas bactérias, as cefalosporinas foram as drogas menos efetivas e colistina e tigeciclina as que apresentaram maior sensibilidade nas cepas analisadas. **Conclusão:** o presente estudo alerta para o elevado grau de multirresistência aos antimicrobianos das cepas advindas das UTI's e UC, demonstrando um cenário atual preocupante e a necessidade de desenvolvimento de novas drogas e novas medidas de controle.

### Palavras-chave

Farmacorresistência Bacteriana; Hemocultura; Sepses

## INTRODUÇÃO

O termo sepsis é caracterizado por uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada com disfunção orgânica, desencadeada por reação inadequada do organismo frente a um agente agressor.<sup>(1,2,3)</sup>

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2010), a hemocultura é o exame padrão-ouro para o diagnóstico de sepsis, no entanto, por ser um exame longo e pela clínica inespecífica, faz-se necessário o início de terapias empíricas.<sup>(4,5)</sup> Contudo, regimes terapêuticos inadequados induzem pressão seletiva, resultando no aumento de cepas resistentes, elevação dos custos de hospitalização e maiores taxas de mortalidade, especialmente em pacientes críticos.<sup>(6,7,8,9,10,20)</sup>

No Brasil, aproximadamente um terço dos leitos de Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) é ocupado por pacientes com sepsis, resultando em cerca de 420 mil casos por ano, dos quais aproximadamente 50% evoluem para óbito. Como consequência, observa-se um custo de 17,3 milhões de reais por ano, tornando tal comorbidade um desafio global e um problema de saúde pública.<sup>(1)</sup>

Bactérias Gram-negativas pertencentes à ordem Enterobacterales estão associadas a vários tipos de infecções, desde uma infecção urinária branda até sepsis com alto grau de letalidade. Esses microrganismos estão se tornando uma ameaça devido à alta capacidade de adquirir resistência aos antibióticos atuais, entre eles as cefalosporinas, através da produção de  $\beta$ -lactamases de Espectro Estendido (ESBL).<sup>(6,11,13)</sup>

<sup>1</sup> Microbiologista/Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde-SUPREMA. Juiz de Fora, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Doutora em Saúde Coletiva/Universidade Federal de Juiz de Fora-UFJF. Juiz de Fora, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Especialista/Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus - (Farmacêutica). Juiz de Fora, MG, Brasil.

Recebido em 24/04/2020

Aprovado em 02/03/2022

DOI: 10.21877/2448-3877.202201985

Perante o exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência de Enterobacterales isoladas em amostras de hemoculturas de pacientes das Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) adulto e neonatal e Unidade Coronariana (UC) de um hospital privado da cidade de Juiz de Fora – MG e avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas de enterobactérias prevalentes, contribuindo assim com pesquisas na área de prevenção de sepse, além do incentivo ao Uso Racional de Medicamentos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é de natureza descritiva, do tipo retrospectivo transversal, e teve por objetivo analisar amostras de hemoculturas realizadas no laboratório de análises clínicas de um hospital privado localizado na cidade de Juiz de Fora-MG, no período de janeiro de 2017 a janeiro de 2019.

Como critério de inclusão considerou-se todas as amostras de hemoculturas positivas para microrganismos pertencentes à ordem Enterobacterales. Os dados que fazem parte da pesquisa foram obtidos através dos arquivos digitais do software laboratorial Shift Lis® utilizado pelo Laboratório. Por se tratar de uma análise estatística de dados de exames já realizados, esta pesquisa representa riscos mínimos aos pacientes, porém significativos em relação à manipulação dos dados digitais.

Esse estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética Institucional de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sob o parecer número 3.735.713.

As hemoculturas incluídas foram detectadas de forma automatizada pelo aparelho BACT/ALERT® 3D 60 da empresa bioMérieux, com posterior identificação e antibiograma no sistema VITEK® 2 compact da mesma empresa, com os cartões de identificação GN para Gram-negativos fermentadores com cartões de antibiograma AST-N238 e AST-N239.<sup>(12)</sup>

## RESULTADOS

Foram coletadas 3.535 amostras de hemoculturas provenientes das UTIs e UC no período de dois anos, sendo 2.591 (73,3%) da UTI Adulto, 539 (15,2%) da UTI Neonatal e 405 (11,5%) da UC. Do total de amostras coletadas, 1.071 (30,3%) apresentaram crescimento positivo, das quais 237 (22,1%) eram Enterobacterales e contemplaram o presente estudo.

Na UTI Adulto, 866 amostras positivaram, as quais correspondem a 80,9% do total de amostras incluídas no estudo, sendo, dessas, 199 (84%) da ordem Enterobacterales. O restante das amostras que preencheram o critério de inclusão, foi proveniente da UC (112/10,4%) e UTI Neonatal (93/8,7%), sendo, respectivamente, 17 (7,2%) e 21 (8,8%) amostras com crescimento de enterobactérias.

Tabela 1 - Prevalência de enterobactérias na UTI adulto

	n=199/100%	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	63	31,7%
<i>Serratia marcescens</i>	51	25,7%
<i>Escherichia coli</i>	38	19,1%
<i>Enterobacter cloacae</i>	12	6,0%
<i>Proteus mirabilis</i>	9	4,5%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	8	4,0%
<i>Providencia stuartii</i>	4	2,0%
<i>Morganella morganii</i>	3	1,5%
Grupo <i>Salmonella</i>	3	1,5%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	1,0%
<i>Citrobacter braaki</i>	2	1,0%
<i>Citrobacter koserii</i>	1	0,5%
<i>Enterobacter asboriae</i>	1	0,5%
<i>Serratia fonticola</i>	1	0,5%
<i>Serratia rubidaea</i>	1	0,5%

Fonte: elaborada pelos autores.

Tabela 2 - Prevalência de enterobactérias na Unidade Coronariana

	n=17 /100%	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	35,3%
<i>Escherichia coli</i>	4	23,4%
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	11,8%
<i>Enterobacter gergoviae</i>	2	11,8%
<i>Serratia marcescens</i>	1	5,9%
<i>Proteus mirabilis</i>	1	5,9%
<i>Citrobacter freudii</i>	1	5,9%

Fonte: elaborada pelos autores.

Tabela 3 - Prevalência de enterobactérias na UTI neonatal

	n=21/100%	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	47,6%
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	38,0%
<i>Escherichia coli</i>	1	4,8%
<i>Proteus mirabilis</i>	1	4,8%
<i>Serratia rubidaea</i>	1	4,8%

Fonte: elaborada pelos autores.

De acordo com a Tabela 1, as enterobactérias prevalentes na UTI adulto foram: *Klebsiella pneumoniae* (31,7%), *Serratia marcescens* (25,7%), *Escherichia coli* (19,1%) e *Enterobacter cloacae* (6,0%).

De acordo com a Tabela 2, as enterobactérias prevalentes na unidade coronariana foram: *Klebsiella pneumoniae* (35,3%), *Escherichia coli* (23,4%) e *Enterobacter cloacae* (11,8%).

De acordo com a Tabela 3, as enterobactérias prevalentes na UTI neonatal foram: *Klebsiella pneumoniae* (47,6%) e *Enterobacter cloacae* (38,0%).

Ao analisar as Tabelas 1, 2 e 3 concomitantemente, percebeu-se a prevalência de crescimento dos mesmos microrganismos nas UTIs e UC. São eles: *Klebsiella pneumoniae* (33,3%), *Serratia marcescens* (21,9%), *Escherichia coli* (18,1%) e *Enterobacter cloacae* (9,3%). Sendo assim, tais microrganismos foram escolhidos para o estudo de suscetibilidade (Tabelas 4, 5, 6 e 7).

Tabela 4 - Perfil de suscetibilidade *Klebsiella pneumoniae*

	R	I	S
AMI	10/79 (16,7%)		69/79 (87,3%)
AMC			3/3 (100,0%)
NAL			3/3 (100,0%)
AMP	79/79 (100,0%)		
CFL			3/3 (100,0%)
CIP	47/79 (59,5%)	3/79 (3,8%)	29/79 (36,7%)
CPM	57/79 (72,1%)	1/79 (1,3%)	21/79 (26,6%)
CRO	57/79 (72,1%)		22/79 (27,9%)
CRX	59/79 (74,7%)		20/79 (25,3%)
ERT			40/40 (100,0%)
GEN	19/79 (24,0%)	1/79 (1,3%)	59/79 (74,7%)
MER	40/79 (50,6%)		39/79 (49,4%)
NOR			3/3 (100,0%)
NIT		2/3 (66,7%)	1/3 (33,3%)
PPT	48/79 (60,8%)	11/79 (13,9%)	20/79 (25,3%)
SUT			3/3 (100,0%)
SBA	61/76 (77,2%)		15/76 (22,8%)
CAZ	59/76 (74,7%)		17/76 (25,3%)
CFO	38/75 (50,7%)	1/75 (1,3%)	36/75 (48,0%)
IPM	40/76 (52,6%)	1/76 (1,4%)	35/76 (46,0%)
TIG			46/46 (100,0%)
COL	2/78 (2,6%)		76/78 (97,4%)

Fonte: elaborada pelos autores.

Legenda: R – Resistente; I – Intermediário; S – Sensível

AMI – Amicacina; AMC – Amoxicilina com clavulanato; AMP – Ampicilina; COL – Colistina; CFL – Cefalotina; CIP – Ciprofloxacino; CPM – Cefepime; CAZ – Ceftazidima; CFO – Cefoxitina; CRO – Ceftriaxona; CRX – Cefuroxima; ERT – Ertapenem; GEN – Gentamicina; IPM – Imipenem; MER – Meropenem; NAL – Ácido nalidixico; NOR – Norfloxacin; NIT – Nitrofurantoína; PPT – Piperacilina com tazobactam; SUT – Sulfametoxazol com trimetoprim; SBA – Ampicilina com sulbactam; TIG – Tigeciclina.

No teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, os microrganismos identificados como *Klebsiella pneumoniae* apresentaram elevada resistência às cefalosporinas (73,4%), seguida dos carbapenêmicos imipenem (52,6%) e

meropenem (50,6%), e sensibilidade à tigeciclina (100,0%) e colistina (97,4%), como observou-se na Tabela 4.

Tabela 5 - Perfil de suscetibilidade *Escherichia coli*

	R	I	S
AMI			43/43 (100,0%)
AMC			4/4 (100,0%)
NAL	2/4 (50,0%)		2/4 (50,0%)
AMP	26/43 (60,5%)		17/43 (39,5%)
CFL	2/4 (50,0%)		2/4 (50,0%)
CIP	21/43 (48,8%)		22/43 (51,2%)
CPM	11/43 (25,6%)		32/43 (74,4%)
CRO	15/43 (34,9%)		28/43 (27,9%)
CRX	15/43 (34,9%)	7/43 (16,3%)	21/43 (48,8%)
ERT			43/43 (100,0%)
GEN	8/43 (18,6%)		35/43 (81,4%)
MER			43/43 (100,0%)
NOR	2/4 (50,0%)		2/4 (50,0%)
NIT			4/4 (100,0%)
PPT	2/43 (4,6%)		41/43 (95,4%)
SUT	2/4 (50,0%)		2/4 (50,0%)
SBA	20/39 (51,3%)	4/39 (10,3%)	15/39 (38,4%)
CAZ	11/39 (28,2%)	2/39 (5,1%)	26/39 (66,7%)
CFO	4/39 (10,3%)	2/39 (5,1%)	33/39 (84,6%)
IPM			39/39 (100,0%)
TIG			39/39 (100,0%)
COL			41/41 (100,0%)

Fonte: elaborada pelos autores.

Legenda: R – Resistente; I – Intermediário; S – Sensível

AMI – Amicacina; AMC – Amoxicilina com clavulanato; AMP – Ampicilina; COL – Colistina; CFL – Cefalotina; CIP – Ciprofloxacino; CPM – Cefepime; CAZ – Ceftazidima; CFO – Cefoxitina; CRO – Ceftriaxona; CRX – Cefuroxima; ERT – Ertapenem; GEN – Gentamicina; IPM – Imipenem; MER – Meropenem; NAL – Ácido nalidixico; NOR – Norfloxacin; NIT – Nitrofurantoína; PPT – Piperacilina com tazobactam; SUT – Sulfametoxazol com trimetoprim; SBA – Ampicilina com sulbactam; TIG – Tigeciclina.

De acordo com a Tabela 5, os antibióticos com maior perfil de resistência para o microrganismo *Escherichia coli* foram pertencentes à classe das quinolonas (49,6%). Além disso, encontrou-se um alto perfil de sensibilidade perante a maioria dos antibióticos testados.

Das 237 enterobactérias isoladas, 14,4% (34/237) apresentaram mecanismo de resistência do tipo  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL). Dessas, 73,5% (25/34) eram *Klebsiella pneumoniae* e 26,5% (9/34) *Escherichia coli*. Sendo assim, vê-se que 31,6% das cepas de *Klebsiella pneumoniae* e 20,9% das cepas de *Escherichia coli* produziram ESBL.

Tabela 6 - Perfil de suscetibilidade *Serratia marcescens*

	R	I	S
AMI	34/52 (65,4%)	5/52(9,6%)	13/52 (25,0%)
AMC	5/5 (100,0%)		
NAL	5/5 (100,0%)		
CFL	5/5 (100,0%)		
CIP	20/52 (38,5%)	17/52 (32,7%)	15/52 (28,8%)
CPM	45/52 (86,5%)		7/52 (13,5%)
CRO	45/52 (86,5%)		7/52 (13,5%)
CRX	52/52 (100,0%)		
ERT			7/7 (100,0%)
GEN	6/52 (11,5%)		48/52 (88,5%)
MER	45/52 (86,5%)		7/52 (13,5%)
NOR	1/5 (20,0%)		4/5 (80,0%)
NIT	5/5 (100,0%)		
SUT	1/5 (20,0%)		4/5 (80,0%)
CAZ	40/47 (85,1%)		7/47 (14,9%)
CFO	47/47 (100,0%)		
IPM			2/2 (100,0%)
TIG			21/21 (100,0%)
COL	47/47 (100,0%)		

Fonte: elaborada pelos autores.

Legenda: R – Resistente; I – Intermediário; S – Sensível

AMI – Amicacina; AMC – Amoxicilina com clavulanato; COL – Colistina; CFL – Cefalotina; CIP – Ciprofloxacino; CPM – Cefepime; CAZ – Ceftazidima; CFO – Cefoxitina; CRO – Ceftriaxona; CRX – Cefuroxima; ERT – Ertapenem; GEN – Gentamicina; IPM – Imipenem; MER – Meropenem; NAL – Ácido nalidixico; NOR – Norfloxacino; NIT – Nitrofurantoina; SUT – Sulfametoxazol com trimetoprim; TIG – Tigeciclina.

Os microrganismos identificados como *Serratia marcescens* apresentaram resistência às cefalosporinas de todas as gerações (cerca de 90,0%) e também ao meropenem (86,5%). Em contrapartida, de acordo com a Tabela 6, 100% das cepas testadas foram sensíveis à tigeciclina.

Em relação às cepas de *Enterobacter cloacae*, pôde-se observar através da Tabela 7, maior resistência à cefoxitina (100,0%) e cefuroxima (100,0%). Já antibióticos como colistina e tigeciclina apresentaram 100,0% de sensibilidade nas cepas estudadas.

## DISCUSSÃO

Em um estudo realizado por Rodríguez *et al.* (2011),<sup>(17)</sup> dentre as hemoculturas analisadas, cerca de 35% eram positivas e 65%, negativas. Segundo Chen *et al.* (2015)<sup>(16)</sup> e Weiss *et al.* (2016),<sup>(15)</sup> a proporcionalidade das hemoculturas apresentou um resultado similar, onde a taxa de positividade varia entre 10% e 30%. Desse modo, é possível afirmar que os resultados obtidos no presente estudo

Tabela 7 - Perfil de suscetibilidade *Enterobacter cloacae*

	R	I	S
AMI		1/22 (4,5%)	21/22 (95,5%)
AMC	1/1 (100,0%)		
NAL			1/1 (100,0%)
CFL	1/1 (100,0%)		
CIP		2/22 (9,1%)	20/22 (90,9%)
CPM	7/22 (31,8%)		15/22 (68,2%)
CRO	7/22 (31,8%)		15/22 (68,2%)
CRX	22/22 (100,0%)		
ERT			18/18 (100,0%)
GEN	6/22 (27,3%)		16/22 (72,7%)
MER	4/22 (18,2%)		18/22 (81,8%)
NOR			1/1 (100,0%)
NIT			1/1 (100,0%)
PPT	5/22 (22,7%)	2/22 (9,1%)	15/22 (68,2%)
SUT			1/1 (100,0%)
CAZ	6/21 (28,6%)	1/21 (4,7%)	14/21 (66,7%)
CFO	21/21 (100,0%)		
IPM	4/21 (19,0%)	3/21 (14,3%)	14/21 (66,7%)
TIG			20/20 (100,0%)
COL			21/21 (100,0%)

Fonte: elaborada pelos autores.

Legenda: R – Resistente; I – Intermediário; S – Sensível

AMI – Amicacina; AMC – Amoxicilina com clavulanato; COL – Colistina; CFL – Cefalotina; CIP – Ciprofloxacino; CPM – Cefepime; CAZ – Ceftazidima; CFO – Cefoxitina; CRO – Ceftriaxona; CRX – Cefuroxima; ERT – Ertapenem; GEN – Gentamicina; IPM – Imipenem; MER – Meropenem; NAL – Ácido nalidixico; NOR – Norfloxacino; NIT – Nitrofurantoina; SUT – Sulfametoxazol com trimetoprim; TIG – Tigeciclina.

foram compatíveis, uma vez que 30,3% das hemoculturas tiveram resultado positivo para o crescimento de algum microrganismo e 69,7% negativo.

Os bacilos Gram-negativos pertencentes à ordem Enterobacterales prevalentes encontrados no presente estudo foram: *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae*. Essa prevalência foi semelhante à reportada por Mota *et al.* (2018),<sup>(14)</sup> que encontrou *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus mirabilis* e *Serratia marcescens*.

Segundo Durdu *et al.* (2016),<sup>(19)</sup> cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de hemoculturas apresentaram o seguinte perfil de resistência: meropenem 41,6%, piperacilina-tazobactam 74,2%, ceftazidima 89,5%, cefepime 90,5% e ampicilina/sulbactam 92,6%. Esse perfil de resistência se repete no estudo em questão com relação aos mesmos antibióticos.

Entre os isolados de *Escherichia coli* no sangue, de acordo com Mota *et al.* (2018),<sup>(14)</sup> a taxa de resistência variou entre 50% a 70% para ampicilina e ciprofloxacina, 30% a 40% para ácido nalidíxico, trimetropim/sulfametoxazol, norfloxacina, cefuroxima, ceftriaxona, cefepime e cefalotina.

Quanto às cepas produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL), Chang *et al.* (2020)<sup>(11)</sup> mostraram em estudo uma porcentagem de cerca de 20,0%, com predominância de enterobactérias identificadas como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Além disso, Myat *et al.* (2017)<sup>(18)</sup> encontraram em seu estudo que 43,0% das cepas de *Klebsiella pneumoniae* e 50,0% das cepas *Escherichia coli* eram produtoras de ESBL. Ambas pesquisas são semelhantes aos dados levantados no presente estudo. De acordo com Perianes-Díaz *et al.* (2014),<sup>(22)</sup> as sepse por *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL estão ligadas a um alto risco de mortalidade e readmissão hospitalar, sendo o tratamento empírico o principal fator associado a um mau desfecho.

Além disso, Restrepo-Álvarez *et al.* (2019)<sup>(21)</sup> justifica a terapia empírica com piperacilina/tazobactam para sepse causadas por *Escherichia coli* com a alta sensibilidade desse medicamento frente a esse microrganismo (cerca de 90,0%) e também pela significativa resistência à ampicilina/sulbactam (cerca de 60,0%). A suscetibilidade desses antimicrobianos se confirma no estudo.

No que diz respeito à *Serratia marcescens*, viu-se que a mesma apresentou elevada resistência a diversos antimicrobianos, entre eles as cefalosporinas de todas as gerações (cerca de 80,0%), amicacina (65,4%) e meropenem (86,5%), mostrando assim multirresistência. Através do estudo de Domínguez *et al.* (1990)<sup>(23)</sup> essa resistência se assemelha, uma vez que foram encontrados 98% das cepas de *Serratia marcescens* resistentes à cefalotina e 78% à ampicilina.

Haddy *et al.* (1991)<sup>(24)</sup> relataram que cerca de 80,0% das espécies de *Enterobacter spp.* mostraram sensibilidade aos aminoglicosídeos e resistência à ampicilina, cefalosporinas de primeira geração e cefoxitina. No estudo em questão, os testes de suscetibilidade se confirmam.

Segundo Al Mayahi *et al.* (2019),<sup>(25)</sup> vale ressaltar que microrganismos resistentes à múltiplas drogas têm sido de preocupação mundial, uma vez que o número de casos com resistência à colistina vem aumentando substancialmente. No estudo em questão foi observado resistência à colistina de 2,6% em cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

## CONCLUSÃO

O estudo revelou número significativo de bactérias da ordem Enterobacterales e um perfil de resistência elevado, uma vez que há um crescente aumento na porcentagem

de microrganismos com produção de ESBL. Tal fato alerta e incentiva o uso racional de medicamentos.

O aumento de cepas multirresistentes se torna preocupante, uma vez que a resistência à colistina tem começado a aparecer no cenário mundial, desafiando as práticas de controle de infecção e exigindo investigação completa de surtos.

Novas drogas e novas medidas de controle se fazem necessárias, tendo em vista que a crescente resistência tornou-se um problema de saúde pública.

### Abstract

**Objective:** Evaluate the prevalence of Enterobacterales isolated from blood culture samples from the Intensive Care Units; Define the antimicrobial susceptibility profile of the most prevalent bacterial strains. **Methods:** Were collected on all positive blood cultures with growth of enterobacteria from the Adult, Neonatal and UC ICUs of a private hospital in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, from January 2017 to January 2019. **Results:** 3535 blood culture samples were found where 2464 (69.7%) were negative and 1071 (30.3%) positive for some microorganism. Of these, 237 (21.3%) were enterobacteria, with a prevalence of *Klebsiella pneumoniae* (33.3%), *Serratia marcescens* (21.9%), *Escherichia coli* (18.1%) and *Enterobacter cloacae* (9.3%). Among these bacteria, cephalosporins were the least effective drugs and colistin and tigecycline were the most sensitive in the strains analyzed. **Conclusion:** the present study warns of the high degree of multidrug resistance to the antimicrobials of the strains from the ICUs and UC, demonstrating a worrying current scenario and the need to develop new drugs and new control measures.

**Keywords:** Drug Resistance, Blood Culture; Sepsis

## REFERÊNCIAS

- Correa F, Silveira LM, Lopes NAP, Netto AR, Stabile AM. Perfil de termorregulação e desfecho clínico em pacientes críticos com sepse. *Av Enferm.* 2019; 37(3): 293-302.
- Santos MR, Cunha CC, Ishitani LH, França EB. Mortes por sepse: causas básicas do óbito após investigação em 60 municípios do Brasil em 2017. *Rev Bras Epidemiol.* 2019; 22(3): 1-14.
- Yan ST, Sun LC, Jia HB, Gao W, Yang JP, Zhang GQ. Procalcitonin levels in bloodstream infections caused by different sources and species of bacteria. *American Journal of Emergency Medicine.* 2017; 35: 579-583.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- Araujo MRE. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação de resultados. *J Infect Control.* 2012; 1(1): 08-19.
- Ferreira LE, Dalposso K, Hackbarth BB, Gonçalves AR, Westphal GA, França PHC *et al.* Pannel molecular para detecção de microrganismos associados à sepse. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2011; 23(1): 36-40.
- Sitnik R, Marra AR, Petroni RC, Ramos OPS, Martino MDV, Pasternak J *et al.* Uso do SeptiFast para diagnóstico de sepse em doentes graves de um hospital brasileiro. *Einstein.* 2014; 12(2): 191-7.
- Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Boas práticas em microbiologia clínica. Barueri: Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, 2015.
- Siqueira JPZ, Almeida MAG. Molecular biology as a tool for fungal detection on blood: diagnostic aid and cost reduction. *Arch. Health Sci.* 2018; 25(3):41-45.

10. Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *J Bras Patol Med Lab.* 2010; 46:225-34.
11. Chang K, Rattavong S, Mayxay M, Keoluangkhot V, Davong V, Vongsouvath M, Luangraj M, Simpson AJH, Newton PN, Dance DAB. Bacteremia Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase–Producing Enterobacteriaceae in Vientiane, Lao PDR: A 5-Year Study. *Am. J. Trop. Med.* 2020; 00(0): 1–7.
12. bioMérieux Brasil. Produtos e Serviços. Disponível em: URL: <http://www.biomerieux.com.br/diagnostico-clinico/produtos-e-servicos>. Acesso em 20 março 2020.
13. Burnham JP, Lane MA, Kollef MH. Impact of sepsis classification and multidrug resistance status on outcome among patients treated with appropriate therapy. *Crit Care Med.* 2015; 43(8): 1580–1586.
14. Mota FS, Oliveira HÁ, Souto RCF. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. *Rev Bras Anal Clin.* 2018; 50(3): 270-2.
15. Weiss SL, Fitzgerald JC, Pappachan J, Wheeler D, Jaramillo-Bustamante JC, Salloo A, Singhi SC, Erickson S, Roy JA, Bush JL, Nadkarni VM, Thomas NJ; Sepsis Prevalence, Outcomes, and Therapies (SPROUT) Study Investigators and Pediatric Acute Lung Injury and Sepsis Investigators (PALISI) Network. Global epidemiology of pediatric severe sepsis: the sepsis prevalence, outcomes, and therapies study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015; 191(10):1147-57. Erratum in: *Am J Respir Crit Care Med.* 2016; 193(2):223-4.
16. Chen XC, Yang YF, Wang R, Gou HF, Chen XZ. Epidemiology and microbiology of sepsis in mainland China in the first decade of the 21st century. *Int J Infect Dis.* 2015; 3: 9-14.
17. Rodríguez F, Barrera L, De La Rosa G, Dennis R, Duenas C, Granados M, *et al.* The epidemiology of sepsis in Colombia: a prospective multicenter cohort study in ten university hospitals. *Crit Care Med.* 2011; 39(7):1675-82.
18. Myat TO, Hannaway RF, Zin KN, Htike WW, Win KK, Crump JA, Murdoch DR, Ussher JE. ESBL- and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Patients with Bacteremia, Yangon, Myanmar, 2014. *Emerging Infectious Diseases.* 2017; 23(5): 857-859.
19. Durdu B, Hakyemez IN, Bolukcu S, Okay G, Gultepe B, Aslan T. Mortality markers in nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. *SpringerPlus.* 2016; 5:1892.
20. Nagarjuna D, Mittal G, Dhanda RS, Gaiind R, Yadav M. Alarming levels of antimicrobial resistance among sepsis patients admitted to ICU in a tertiary care hospital in India – a case control retrospective study. *Antimicrobial Resistance and Infection Control.* 2018; 7:150.
21. Restrepo-Álvarez CA, Bernal E, Ascuntar-Tello J, Jaimes F. Análisis clínico y microbiológico de la sepsis grave y el choque séptico por *Escherichia coli* en Medellín, Colombia. *Rev Chilena Infectol.* 2019; 36 (4): 447-454.
22. Perianes-Díaz ME, Novo-Veleiro I, Solís-Díaz K, Prolo-Acosta A, García-García I, Alonso-Claudio G. Bacteremia caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum betalactamases: mortality and readmission-related factors. *Med Clin (Barc).* 2014; 142(9): 381-6.
23. Domínguez A, Arribas JR, Folgueira MD, Peña P, Luengo S, Peña JM, Vázquez JJ. Nosocomial bacteremia caused by *Serratia marcescens*: analysis of 44 cases. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1990; 8(9):553-9.
24. Haddy RI, Cecil ML, Norris LL, Markert RJ. Enterobacter bacteremia in the community hospital. *J Fam Pract.* 1991; 32(6):601-6.
25. Al Mayahi Z, Kamel S, Amer H, Beatty M. Outbreak of colistin-resistant organisms at a tertiary hospital in Riyadh, Saudi Arabia, 2016. *Pan Afr Med J.* 2019; 34: 162.

---

Correspondência

**Patrícia Ganimi Tavella**  
Rua Guaçuí, 525 / 301 - São Mateus  
Juiz de Fora/MG – CEP: 36025-190  
E-mail: [patiganimi@yahoo.com.br](mailto:patiganimi@yahoo.com.br)

# **Staphylococcus aureus Resistente à Meticilina: uma análise da presença na microbiota nasal de estudantes de saúde em período de estágio**

## **Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an analysis of the presence in the nasal microbiota of health students in the internship period**

Bruno Janke do Nascimento<sup>1</sup>  
Suzana Carstensen<sup>2</sup>

### **Resumo**

Objetivo: A disseminação da resistência bacteriana se tornou o principal obstáculo no tratamento das infecções em todo o mundo. As infecções relacionadas aos cuidados de saúde (IRCS) constituem grande parte do total de infecções diagnosticadas no Brasil. A principal causa para a elevação deste índice é a disseminação bacteriana por profissionais de saúde. O principal patógeno isolado nas IRCS no Brasil é o *Staphylococcus aureus* e em grande parte dos casos é confirmado seu perfil multirresistente a diversos antibióticos, sendo que algumas destas cepas são denominadas *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). O objetivo deste estudo foi analisar a prevalência de *S. aureus* e MRSA na microbiota nasal dos acadêmicos de biomedicina, enfermagem e fisioterapia da instituição de ensino superior de Araucária (PR) em período de estágio. Métodos: Foram coletadas amostras de swab nasal de 51 indivíduos, semeadas em ágar manitol salgado 7,5%. As colônias sugestivas de *S. aureus* tiveram confirmação com bacterioscopia, testes de catalase e coagulase. Após confirmadas, as cepas de *S. aureus* foram semeadas em ágar cromogênico seletivo e diferencial para MRSA. Resultados: A taxa de colonização nasal por *S. aureus* foi de 45,1%; destas cepas 91,3% eram MRSA, o que representa 41,2% do total de indivíduos. Conclusão: Os dados alcançados evidenciam a necessidade de vigilância de resistência bacteriana em profissionais e estudantes de saúde para evitar a ocorrência de IRCS.

Palavras-chave  
*Staphylococcus aureus*; Resistência; Infecção Hospitalar

## **INTRODUÇÃO**

Nas últimas décadas a resistência bacteriana se tornou uma grande preocupação no tratamento das infecções. O uso incorreto de antibióticos propicia um ambiente ideal para a evolução destes patógenos, que por meio de mutações aleatórias ou adquiridas garantem vantagens na competição evolutiva e podem proliferar de maneira mais eficaz do que as bactérias sensíveis aos medicamentos.<sup>(1,2)</sup>

O gênero *Staphylococcus* compreende 52 espécies e 28 subespécies, porém o *Staphylococcus aureus* é a bactéria de maior importância clínica. Apesar de compor a microbiota nasal de cerca de 40% da população em geral,

o *S. aureus* em contato com lesões ou com a corrente sanguínea pode desencadear diversas manifestações no hospedeiro, desde impetigo, foliculites e furúnculos até abscessos, endocardites e septicemias que podem levar à síndrome do choque tóxico e outras complicações.<sup>(1,3-5)</sup>

O *S. aureus* resistente à meticilina, ou simplesmente MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), foi originalmente descrito na Inglaterra em 1961, no período posterior à inserção da meticilina no tratamento de infecções, e com isto ocorreu a descontinuidade do uso da meticilina na prática médica em vários países, devido também a sua toxicidade, sendo substituída por penicilinas mais estáveis, como a flucloxacilina, oxacilina e dicloxacilina.<sup>(1,4,6)</sup>

<sup>1</sup> Graduando em Biomedicina, Centro Universitário UNIFACEAR. Araucária, PR, Brasil.

<sup>2</sup> Bióloga, Especialista em Biotecnologia e Mestre em Medicina Interna. Docente do Centro Universitário UNIFACEAR. Araucária, PR, Brasil.

Recebido em 30/12/2020  
Aprovado em 02/03/2022  
DOI: 10.21877/2448-3877.202202092

Mesmo com o fim da utilização da metilina, o termo MRSA foi mantido em relação às bactérias resistentes a diversas penicilinas e cefalosporinas, além das cepas bacterianas resistentes a penicilinas e/ou inibidoras de beta-lactamases.<sup>(6,7)</sup> Uma metanálise evidenciou que o Brasil está entre os piores índices de prevalência de MRSA no mundo, sendo mais de 50% dos *S. aureus* isolados categorizados como MRSA.<sup>(1)</sup>

Dentre as infecções relacionadas aos cuidados de saúde (IRCS), responsáveis por mais de 15% das infecções anuais do Brasil, o *S. aureus* destaca-se entre os patógenos mais prevalentes. Além disto, as instituições de saúde pública do país detêm uma condição mais agravante, pois as IRCS são responsáveis pela prevalência de 18,4% das infecções anuais nestes locais.<sup>(8,9)</sup> O contato com os ambientes contaminados, aliado à desinformação sobre IRCS, sua prevalência, resistência bacteriana e mortalidade, são fatores diretamente responsáveis pela vetorização de patógenos por profissionais de saúde.<sup>(8,10,11)</sup>

É descrito em estudos recentes que cerca de 80% dos profissionais de saúde são acometidos pela colonização nasal de *S. aureus*, sendo até 20% portadores das cepas MRSA.<sup>(10,11)</sup> Com isto, o aumento na incidência de *S. aureus* vem sendo associado à disseminação por profissionais de saúde, sendo essas infecções por MRSA derivadas da atenção à saúde descritas como HA-MRSA (*health-care-associated*) na academia científica.<sup>(1)</sup>

Diante da necessidade de combater as infecções de HA-MRSA, é fundamental o desenvolvimento de estudos de prevalência entre acadêmicos e profissionais de saúde, principalmente entre áreas de atuação distintas, além de determinar os fatores de risco mais prevalentes entre os profissionais.<sup>(1,5,6,12)</sup> Diante de tal demanda, a presente pesquisa buscou avaliar a prevalência de *S. aureus* e MRSA na mucosa nasal dos acadêmicos de biomedicina, enfermagem e fisioterapia em período de estágio, de uma instituição de ensino superior de Araucária (PR).

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada em campo, de forma transversal e descritiva, e buscou analisar de forma qualitativa e quantitativa a prevalência da colonização nasal de *S. aureus* e MRSA em voluntários selecionados. Os voluntários foram acadêmicos de biomedicina, de enfermagem e de fisioterapia da instituição de ensino superior de Araucária (PR), que no momento da coleta estavam realizando estágio obrigatório ou não obrigatório em área de atuação do curso em que estavam matriculados.

Os critérios para inclusão dos voluntários do estudo foram: ser maior de idade; estar matriculado e frequentando o curso de biomedicina, enfermagem ou fisioterapia

da instituição de ensino superior de Araucária (PR), no período de estudo; estar realizando estágio, obrigatório ou não obrigatório, em alguma área de atuação de seu respectivo curso de graduação; aceitar participar do estudo mediante o aceite e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido; estar disposto a fornecer uma ou mais amostras de *swab* nasal para investigação microbiológica.

Foram excluídos da pesquisa os voluntários com idade inferior a 18 anos; os que não possuíam vínculo acadêmico com a instituição de ensino superior de Araucária (PR); os que eram acadêmicos de quaisquer outros cursos que não seja biomedicina, enfermagem ou fisioterapia; os que não estavam realizando estágio em área de atuação do curso em que estava matriculado; os que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido; os que possuíam alguma limitação física ou patológica que impediu as coletas de amostras de *swab* de ambas as fossas nasais; os que efetuaram o uso de antibiótico nos últimos quinze dias que antecederam a coleta e; os que rejeitaram as coletas necessárias de *swab* nasal.

A seleção dos voluntários foi realizada com a aplicação de questionário adaptado de dois autores,<sup>(13,14)</sup> com o objetivo de obter o histórico de exposição microbiológica hospitalar e/ou utilização de antimicrobianos, além da caracterização da amostragem. Os questionários foram preenchidos pelos voluntários, sem intervenção do pesquisador, e foram compostos por questões objetivas, aplicadas de forma física na instituição de ensino superior de Araucária (PR).

A coleta das amostras foi realizada pelo pesquisador, na instituição de ensino superior, campus Araucária, e seguiu os procedimentos do Laboratório Central do Estado do Paraná, em conformidade com o Manual de Microbiologia Clínica para Controle de Infecção em Serviços de Saúde da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e com a Resolução RDC nº 20 da SBPC.<sup>(15-17)</sup>

O procedimento consistiu na inserção de um *swab* estéril nas fossas nasais anteriores, promovendo o contato com a mucosa nasal através de movimentos giratórios contínuos e delicados durante a coleta, seguido pela retirada do *swab* das fossas nasais e sua inserção em meio de transporte Stuart, identificado com numeração individual estabelecida nos questionários.<sup>(15,16)</sup>

A análise microbiológica foi realizada, primeiramente, através da semeadura qualitativa das amostras em 24 horas após a coleta, e durante este período as amostras tiveram o crescimento de seu volume com o meio Stuart em estufa a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Visando o isolamento de *S. aureus*, de acordo com o manual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e com as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, a semeadura do volume cultivado foi realizada em ágar manitol contendo 7,5% de cloreto de sódio, com posterior incubação por no mínimo 24 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  em estufa.<sup>(16,17)</sup>

Foi realizada a comprovação morfológica das cepas que cresceram no manitol com a bacterioscopia precedida por coloração de Gram. As cepas cujas características morfológicas não comprovaram em conjunto com a fermentação do manitol a presença de *S. aureus* foram submetidas às análises bioquímicas de produção de catalase e coagulase.

Após a comprovação da presença de *S. aureus* nas amostras, a pesquisa de MRSA foi feita através do inóculo das cepas confirmadas em ágar cromogênico seletivo e diferencial para MRSA, incubadas por no mínimo 24 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  em estufa bacteriológica, algumas cepas necessitaram de 48 horas de incubação para a formação característica em acordo com a Bula.<sup>(18,19)</sup>

O controle de dados foi realizado através do *software Microsoft Excel*<sup>®</sup> e para a análise e estudo de associação das variáveis foi adotado o teste qui-quadrado de Pearson (teste  $\chi^2$ ) em nível de significância de 5,0%, com resultados considerados estatisticamente significativos para  $p \leq 0,05$ . A análise estatística foi realizada através do *software BioEstat*<sup>®</sup>, versão 5.0.

## ÉTICA

Em virtude da participação de voluntários na pesquisa, visando o cumprimento das diretrizes do Conselho Nacional de Saúde, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro Universitário UNIFACEAR, e aprovado sob o CAAE nº 26167719.4.0000.5620.

## RESULTADOS

No período de fevereiro a março de 2020, 53 indivíduos se voluntariaram para participar na presente pesquisa. Para adequar os participantes nos critérios de inclusão e exclusão do estudo foram aplicados os questionários aos voluntários. Foram identificados 2 voluntários fazendo o uso de antibióticos no período e com isto os mesmos foram excluídos da pesquisa, totalizando 51 voluntários elegíveis, sendo 43,1% (22/51) do curso de enfermagem, 31,4% (16/51) do curso de biomedicina e 25,5% (13/51) do curso de fisioterapia. Observou-se que 86,3% (44/51) dos participantes eram do gênero feminino e 13,7% (7/51) do gênero masculino. Além disto, a faixa etária predominante na população estudada foi entre 18 e 24 anos, representando 74,5% (38/51), enquanto 25,5% (13/51) dos indivíduos possuíam entre 25 e 44 anos.

A análise por meio da estatística descritiva demonstrou que a prevalência geral de colonização nasal de *S. aureus* encontrada nos indivíduos que participaram da pesquisa foi de 45,1% (23/51). Entre os colonizados, 91,3% (21/23) eram do gênero feminino e 8,7% (2/23) do gênero masculino. Os acadêmicos do curso de enfermagem representaram 43,5% (10/23), os de biomedicina 39,1% (9/23) e os de fisioterapia 17,4% (4/23).

A faixa etária mais prevalente foi a de 18 a 24 anos, que representou 78,3% (18/23) dos colonizados, enquanto os de 25 a 44 anos representam 21,7% (5/23). Não houve diferenças significativas entre o tempo de realização de estágio e índice de colonização, sendo 39,1% (9/23) dos indivíduos com um período de 6 a 11 meses de estágio, 34,8% (8/23) dos indivíduos com período  $\leq 5$  meses de estágio e 26,1% (6/23) dos indivíduos com período  $\geq 18$  meses de estágio. As características gerais da análise estatística dos indivíduos colonizados por *S. aureus* encontram-se apresentadas na Tabela 1.

Após a identificação de *S. aureus* nas amostras dos voluntários da pesquisa, se realizou a identificação da característica de resistência ou sensibilidade à oxacilina das cepas isoladas, utilizando o meio específico para triagem de MRSA. As análises revelaram que 91,3% (21/23) das cepas de *S. aureus* isoladas eram MRSA, o que representa 41,2% (21/51) dos indivíduos da pesquisa.

A análise estatística descritiva revelou que 90,5% (19/21) dos indivíduos com MRSA positivo nas amostras coletadas eram do gênero feminino e 9,5% (2/21), do gênero masculino. Os acadêmicos com maior incidência eram os alunos dos cursos de enfermagem com 42,9% (9/21) e biomedicina com 42,9% (9/21), enquanto os graduandos em fisioterapia representaram 14,2% (3/21) dos indivíduos acometidos. A faixa etária mais afetada foi a de 18 a 24 anos com 76,2% (16/21) dos casos, enquanto 23,8% (5/21) tinham entre 25 a 44 anos.

O tempo de estágio não apresentou diferença significativa na incidência encontrada, sendo 38,1% (8/21) com período entre 6 a 11 meses, 33,3% (7/21) com período  $\leq 5$  meses e 28,6% (6/21) dos indivíduos com período  $\geq 18$  meses de estágio supervisionado. As análises estatísticas sobre a incidência de MRSA do estudo encontram-se na Tabela 2.

## DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que no período da coleta 45,1% (23/51) dos voluntários se encontravam colonizados por *S. aureus*, índice que está próximo ao relatado na literatura para a prevalência na população em geral que se estima entre 20% e 40% dos indivíduos. Entretanto, os voluntários eram acadêmicos em período final de cursos da saúde e eram esperados índices próximos ao encontrado em profissionais de saúde, superior a 80% dos indivíduos.<sup>(7,10)</sup>

Uma revisão de literatura<sup>(3)</sup> demonstrou que entre os fatores de risco para a aquisição das bactérias multirresistentes está o tempo de exposição ao ambiente hospitalar, algo que não foi predominante entre os indivíduos do estudo tendo em vista que 72,5% (37/51) dos voluntários possuíam menos de um ano de estágio no ambiente profissional. O índice de colonização nasal inferior ao de profissionais

Tabela 1 - Perfil epidemiológico e índice de colonização nasal por *Staphylococcus aureus* em acadêmicos dos cursos da saúde em período de estágio da instituição de ensino superior de Araucária (PR), 2020

Variáveis	Colonizados (n)	%	Não Colonizados (n)	%	Total (n)	%	$\chi^2$	OR (IC95%)	p
<b>Gênero</b>									
Masculino	2	8,7	5	17,9	7	13,7		–	
Feminino	21	91,3	23	82,1	44	86,3	0,89	2,28 (0,40-13,05)	0,34
<b>Faixa etária (anos)</b>									
<18	0	0	0	0	0	0			
18 a 24	18	78,3	20	71,4	38	74,5		–	
25 a 44	5	21,7	8	28,6	13	25,5	0,31	0,69 (0,19-2,51)	0,57
>45	0	0	0	0	0	0			
<b>Curso</b>									
Biomedicina	9	39,1	7	25	16	31,4	0,43	1,54 (0,42-5,63)	0,51
Enfermagem	10	43,5	12	42,9	22	43,1		–	
Fisioterapia	4	17,4	9	32,1	13	25,5	0,73	0,53 (0,12-2,26)	0,39
<b>Tempo de estágio (meses)</b>									
≤5	8	34,8	9	32,1	17	33,3		–	
6 a 11	9	39,1	11	39,3	20	39,2	0,02	0,92 (0,25-3,36)	0,9
12 a 17	0	0	0	0	0	0			
≥18	6	26,1	8	28,6	14	27,5	0,05	0,84 (0,20-3,50)	0,81
<b>Total</b>	<b>23</b>		<b>28</b>		<b>51</b>				

Legenda:  $\chi^2$ : Qui-quadrado de Pearson; OR: OddsRatio; IC: Intervalo de Confiança;  $p < 0,05$ : Estatisticamente significativo.

Tabela 2. Perfil epidemiológico e índice de resistência à oxacilina das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas dos acadêmicos dos cursos da saúde em período de estágio da instituição de ensino superior de Araucária (PR), 2020.

Variáveis	MRSA (n)	%	MSSA (n)	%	Total (n)	%	$\chi^2$	OR (IC95%)	p
<b>Gênero</b>									
Masculino	2	9,5	0	0	2	8,7		#	
Feminino	19	90,5	2	100	21	91,3	0,2	#	0,65
<b>Faixa Etária (anos)</b>									
<18	0	0	0	0	0	0			
18 a 24	16	76,2	2	100	18	78,3		#	
25 a 44	5	23,8	0	0	5	21,7	0,61	#	0,43
>45	0	0	0	0	0	0			
<b>Curso</b>									
Biomedicina	9	42,9	0	0	9	39,1	0,95	#	0,33
Enfermagem	9	42,9	1	50	10	43,5		–	
Fisioterapia	3	14,3	1	50	4	17,4	0,52	0,33 (*)	0,47
<b>Tempo de estágio (meses)</b>									
≤5	7	33,3	1	50	8	34,8		–	
6 a 11	8	38,1	1	50	9	39,1	0,008	1,14 (*)	0,93
12 a 17	0	0	0	0	0	0			
≥18	6	28,6	0	0	6	26,1	0,81	#	0,37
<b>Total</b>	<b>21</b>		<b>2</b>		<b>23</b>				

Legenda: MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível a metilina;  $\chi^2$ : Qui-quadrado de Pearson; OR: OddsRatio; IC: Intervalo de Confiança; #: não foi possível calcular o OR; \*: o IC não foi calculado pois  $n \cdot p \cdot q^1$  ou  $n^2 \cdot p^2 \cdot q^2 < 5$ ;  $p < 0,05$ : Estatisticamente significativo.

de saúde pode também estar associado à faixa etária dos voluntários, já que 74,5% (38/51) dos indivíduos do estudo possuíam entre 18 a 24 anos, sendo também os jovens a maioria entre os voluntários colonizados com 78,3% (18/23) dos casos.

O curso de biomedicina foi o que teve o maior índice de colonização nasal proporcionalmente ao total de voluntários do curso, com 56,2% (9/16) dos indivíduos colonizados com *S. aureus*, seguido pelo curso de enfermagem que teve proporcionalmente 45,4% (10/22), enquanto o curso de fisioterapia teve somente 30,8% (4/13) dos indivíduos acometidos com o patógeno. Entretanto estas diferenças não se mostraram estatisticamente relevantes ( $p > 0,05$ ).

Com relação ao índice de prevalência de MRSA de 41,2% (21/51) dos voluntários da pesquisa, o valor encontrado está superior ao descrito na literatura para profissionais de saúde, que é em torno de 20% dos indivíduos.<sup>(10,20,21)</sup> Entretanto outros estudos, também realizados de forma transversal e com amostragem similar, encontraram valores superiores a 50% nos indivíduos estudados, reforçando que a incidência de MRSA nos isolados de *S. aureus* está se tornando cada vez mais comum.<sup>(22,23)</sup>

Uma metanálise global<sup>(1)</sup> colocou o Brasil entre os piores índices de presença de MRSA em infecções de *S. aureus* no mundo, onde mais de 50% das cepas isoladas foram caracterizadas como multirresistentes. Valor similar foi encontrado em um estudo sobre a América Latina, que colocou o Brasil entre os piores índices da região.<sup>(18)</sup> Estes dados mostram a importância do monitoramento contínuo da resistência bacteriana, pois a disseminação destas cepas está se tornando cada vez mais constante na comunidade.<sup>(24)</sup>

Os alunos de biomedicina tiveram proporcionalmente o pior índice de caracterização de MRSA nas cepas isoladas de *S. aureus*, pois todas as cepas de *S. aureus* analisadas se estabeleceram no meio de cultura específico para triagem de MRSA (9/9), conforme mostra a Tabela 2. Os demais cursos também mantiveram altos índices de amostras com resistência bacteriana, pois os alunos de enfermagem tiveram 90% (9/10) das cepas de *S. aureus* isoladas caracterizadas como MRSA, enquanto os acadêmicos de fisioterapia tiveram 75% (3/4) das cepas de *S. aureus* isoladas caracterizadas como MRSA.

Apesar das diferenças não apresentarem relevância estatística ( $p > 0,05$ ), um estudo focou na prevalência de colonização de MRSA em técnicos de análises clínicas e saúde pública, que desempenham atividades laboratoriais em Portugal, e mostrou uma alta incidência nestes profissionais em relação ao relatado na literatura, pois 43% dos indivíduos tiveram isolados laboratoriais de MRSA.<sup>(25)</sup> Esta correlação, apesar da ausência de causalidade evidenciada, pode ser um fator que demonstre uma maior prevalência de contaminação entre profissionais que realizam análises microbiológicas, como o profissional biomédico, em relação às demais áreas

da saúde estudadas, entretanto são necessários maiores pesquisas para a definição desta diferença epidemiológica.

Entre os diversos fatores que estão relacionados com a crescente prevalência de resistência bacteriana e sua disseminação no âmbito profissional (HA-MRSA) e comunitário (CA-MRSA), estão as infecções adquiridas por bioaerossóis, responsáveis pela propagação de diversos microrganismos nos ambientes.<sup>(26)</sup> A contaminação nos ambientes é diretamente responsável pela disseminação entre os profissionais e estudantes de saúde, pois as medidas preventivas nem sempre são adotadas corretamente.<sup>(26,27)</sup>

Quando os voluntários foram questionados sobre o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) no estágio, 90,2% (46/51) afirmaram fazer o uso como medida de prevenção, entretanto apenas 70,6% (36/51) lembraram de pelo menos três EPI utilizados. Entre os equipamentos mais citados destacam-se o uso de jalecos, luvas e máscaras cirúrgicas. Todos os participantes afirmaram realizar a higienização das mãos periodicamente no ambiente de estágio.

Os portadores de MRSA possuem um risco até 10 vezes maior para o desenvolvimento de doenças clínicas geradas por uma infecção desta bactéria e, além disto, o fato do hospedeiro se tornar reservatório bacteriano possibilita um aumento do risco de disseminação do patógeno para outras pessoas ou a contaminação de alimentos e/ou superfícies.<sup>(27)</sup> Este fato, diante da crescente prevalência de resistência bacteriana na microbiota dos profissionais da saúde, torna fundamental a realização de medidas de prevenção e monitoramento dos profissionais e pacientes, visando a redução das IRCS como definido pelo Ministério da Saúde e pela Organização Mundial da Saúde.<sup>(28,29)</sup>

Dentre as variáveis investigadas no presente estudo, entre elas o gênero, idade, curso, tempo de estágio e conhecimentos sobre o assunto e prevenção, não foi verificada uma relação estatística com a colonização de *S. aureus* ou sua variante resistente MRSA ( $p > 0,05$ ).

## LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Apesar de esta pesquisa demonstrar uma grande prevalência pontual de MRSA entre estagiários de cursos distintos na área da saúde, algumas limitações favorecem a realização de novos estudos a respeito do tema. A realização de coleta de apenas um sítio anatômico impede a comparação da prevalência do patógeno na microbiota, entretanto alguns estudos apontam para a maior prevalência nasal em relação a outros locais coletados.<sup>(5,30)</sup>

A característica transversal do estudo demonstra a colonização no período da coleta, impossibilitando a definição de infecção transitória ou definitiva, devido a isto é importante que novos estudos façam a comparação entre períodos distintos dos cursos com o acompanhamento dos indivíduos ao longo da graduação.

O meio de cultura cromogênico específico para MRSA utilizado possui a seletividade e diferenciação para a cepa pesquisada, entretanto a ausência de realização de testes com outros antimicrobianos por meio de discos de difusão e/ou testes de concentração mínima inibitória impede que sejam determinados outros níveis de resistência bacteriana do *S. aureus*, como por exemplo o *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) que também se tornou um grande problema de saúde pública.<sup>(19,29,31)</sup>

A impossibilidade de pesquisa por técnicas de biologia molecular no estudo impede a definição e caracterização de tipos de MRSA encontrados, não sendo possível compará-los com os tipos descritos na literatura, como realizado em outros estudos.<sup>(11,30,32)</sup>

Apesar das limitações, este estudo é pioneiro na instigação e demonstra a necessidade de acompanhamento dos acadêmicos no período de estágio, visando à contenção da aquisição e disseminação bacteriana durante este período. O estudo da resistência bacteriana propicia uma visão crítica sobre o uso inadequado de antibióticos, além de evidenciar a necessidade de reforço nas medidas de contenção como a higienização das mãos e uso de EPI durante o estágio e também durante as aulas práticas nos cursos de saúde.<sup>(9,28,29,33)</sup>

## CONCLUSÃO

A resistência bacteriana é um dos maiores problemas de saúde global. Diante disto, ressaltar a importância deste tema com pesquisas e desenvolvimentos de medidas preventivas é fundamental para a segurança da sociedade em geral. O estudo contou com a participação de 51 indivíduos e evidenciou que 45,1% dos voluntários tiveram a presença de *S. aureus* na amostra nasal coletada. Além disto, foi isolado o MRSA em 41,2% do total das amostras analisadas, ou seja, 91,3% dos indivíduos colonizados por *S. aureus* possuíam caracterização de resistência do MRSA. Apesar da prevalência de *S. aureus* estar próximo ao encontrado na comunidade (20% a 40%) e inferior ao de profissionais de saúde (> 80%), o índice de MRSA é superior ao relatado pela literatura em ambos os grupos (1% e 20%, respectivamente).

Os acadêmicos de saúde em período de estágio estão diretamente em contato com ambientes propícios à aquisição de patógenos. Além disto, o contato próximo com os pacientes torna os estagiários vetores de diversos microrganismos e diretamente responsáveis pelas IRCS, caso medidas de controle não sejam adotadas. Os valores encontrados neste estudo mostram a necessidade de monitoramento de profissionais e acadêmicos de saúde para evitar as IRCS, além de transparecer a carência de educação continuada sobre as medidas de prevenção e uso racional dos antibióticos para a contenção deste problema de saúde global.

## SUPORTE FINANCEIRO

A Laborclin – Produtos Para Laboratórios LTDA apoiou a pesquisa com os insumos utilizados.

## AGRADECIMENTOS

À Laborclin – Produtos Para Laboratórios LTDA.  
À Francieli dos Santos Pereira.  
Ao Jozemar Delfino.

### Abstract

*Objective: The spread of bacterial resistance has become the main obstacle in the treatment of infections worldwide. Healthcare-Associated Infections (HAI) constitute a large part of the total number of infections diagnosed in Brazil and the main cause for these rates is the bacterial spread by healthcare professionals. The main pathogen isolated in the HAI in Brazil is S. aureus and, in most cases, its multi-resistant profile to several antibiotics is confirmed, some of these strains are called Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). The aim of this study was to analyze the prevalence of S. aureus and MRSA in the nasal microbiota of biomedicine, nursing and physiotherapy students at the Araucária (PR) higher education institution during the internship period. Methods: Nasal swab samples were collected from 51 individuals, sown on mannitol salt agar 7.5%. Colonies suggestive of S. aureus were confirmed with bacterioscopy, catalase and coagulase tests. After confirmed, the strains of S. aureus were sown on selective and differential chromogenic agar for MRSA. Results: The rate of nasal colonization by S. aureus was 45.1%, of these strains 91.3% were MRSA, which represents 41.2% of the total of individuals. Conclusion: The data obtained show the need for surveillance of bacterial resistance in health professionals and students to prevent the occurrence of HAI.*

### Keywords

*Staphylococcus aureus; Resistance; Hospital Infection*

## REFERÊNCIAS

1. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018;4(1):18033.
2. Carlet J, Pulcini C, Piddock LJV. Antibiotic resistance: a geopolitical issue. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(10):949-53.
3. Fracarolli IFL, Oliveira SAd, Marziale MHP. Colonização bacteriana e resistência antimicrobiana em trabalhadores de saúde: revisão integrativa. *Acta Paulista de Enfermagem*. 2017;30:651-7.
4. Bagnoli F, Grandi G, Rappuoli R. *Staphylococcus aureus: microbiology, pathology, immunology, therapy and prophylaxis*. 1st ed. 2017 ed. Cham: Springer International Publishing : Imprint: Springer; 2017. 409 p.
5. Krismer B, Weidenmaier C, Zipperer A, Peschel A. The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. 2017;15(11):675-87.
6. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*. 2019;17(4):203-18.
7. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology: an introduction*. 12 ed. Boston: Pearson; 2016.
8. Lima MFP, Borges MA, Parente RS, Victória Júnior RC, De Oliveira ME. *Staphylococcus aureus* e as Infecções Hospitalares – Revisão de Literatura. *Revista Uningá Review*. 2015;21(1).
9. OMS. Organização Mundial da Saúde. *Health care-associated*

- infections Fact Sheet. Patient Safety.2014.
10. Bullé DJ, Potter C, Arnhold GHO, Santos CE, Arcadepani T, Reuter CP, *et al.* Prevalência de Staphylococcus aureus metilicina resistentes em profissionais de saúde. Revista de Enfermagem da UFSM. 2016;6(2):198.
  11. Caboclo RMF, Cavalcante FS, Iorio NLP, Schuenck RP, Olendzki AN, Felix MJ, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: Dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. American Journal of Infection Control. 2013;41(3):e21-e6.
  12. Brasil. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Ministério da Saúde. 1ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013. p. 44.
  13. Lopes LP, Pio DPM, Reinato LAF, Gaspar GG, Prado MAd, Gir E. Staphylococcus Aureus In Nursing Professionals And The Microorganism S Susceptibility Profile To Antimicrobials. Texto & Contexto – Enfermagem. 2017;26.
  14. Silva ECBF, Samico TM, Cardoso RR, Rabelo MA, Bezerra Neto AM, Melo FLd, *et al.* Colonização pelo Staphylococcus aureus em profissionais de enfermagem de um hospital escola de Pernambuco. Revista da Escola de Enfermagem da USP. 2012;46:132-7.
  15. Paraná. Manual de Coleta e Envio de Amostras Biológicas ao LACEN/PR. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Revisão 3. Curitiba (PR): Laboratório Central do Estado do Paraná; 2017.
  16. Brasil. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Ministério da Saúde. 1 ed. Brasília (DF): Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2004.
  17. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. Resolução – RDC Nº 20, de 10 de abril de 2014. Dispõe sobre o regulamento sanitário para o transporte de material biológico humano. 2014.
  18. Zurita J, Mejía C, Guzmán-Blanco M. Diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Latin America. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2010;14:97-106.
  19. Laborclin Produtos para Laboratório LTDA. Bula: Ágar MRSA Cromogênico. Meio seletivo e diferencial para isolamento de Staphylococcus aureus Metilicina Resistente (MRSA). Registro ANVISA: 10097010-167. LB 172246. 2018.
  20. Abbasi SR, Manzoor R, Asad M, Manzoor S, Hassan A, Khan MA, *et al.* Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) nasal carriage: A comparison between health care workers as and community individuals. Rawal Medical Journal. 2019;44(4):679-82.
  21. Peres VNP, Moreira RRB, Notário J, Zanusso Júnior G. Isolamento e identificação de Staphylococcus aureus em fossas nasais e mãos de profissionais da saúde no Hospital Santa Lúcia em Maringá-PR. Revista Uningá. 2011;30(1).
  22. Linardi VR, Neto NMC, Araujo PLd, Silva EFd. Isolamento de staphylococcus aureus MRSA entre os funcionários de um hospital geral da região leste de Minas Gerais. Revista de Saúde Pública do SUS/MG. 2017;2(2):59-64.
  23. Moreira ACMG, Santos RRR, Bedendo J. Prevalence and profile of sensitivity of Staphylococcus aureus isolated from patients and staff. Ciência, Cuidado e Saúde. 2013;12(3).
  24. Kluytmans J, Harbarth S. MRSA transmission in the community: emerging from under the radar. The Lancet Infectious Diseases. 2020;20(2):147-9.
  25. Negrinho A, Ferreira B, Serrano D, Shone S, Ribeiro E. Prevalência da colonização nasal por Staphylococcus Aureus resistente à metilicina nos técnicos de análises clínicas e saúde pública num hospital do distrito de Lisboa: estudo de caso. Saúde & Tecnologia. 2020;0(22):34-41.
  26. Ghosh B, Lal H, Srivastava A. Review of bioaerosols in indoor environment with special reference to sampling, analysis and control mechanisms. Environment international. 2015;85:254-72.
  27. Ribeiro E. Human methicillin-resistant S. aureus (Mrsa) colonization: a major public health concern? Saúde & Tecnologia. 2019;0(22):05-7.
  28. Brasil. Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (2016-2020). Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2016.
  29. OMS. Organização Mundial da Saúde. Global Action Plan on AntimicrobialResistance. 2015.
  30. Silveira ACO, Cunha GR, Caierão J, Cordova CMd, d'Azevedo PA. MRSA from Santa Catarina State, Southern Brazil: intriguing epidemiological differences compared to other Brazilian regions. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2015;19:384-9.
  31. Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC, Gallegos B, Castro ALL, Martino MDV, *et al.* Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2013;17(6):672-81.
  32. Carvalho SP, Almeida JB, Andrade YMFS, Silva LSC, Chamon RC, Santos KRN, *et al.* Molecular characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from hospital and community environments in northeastern Brazil. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2019;23(2):134-8.
  33. Brasil. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 16: Incidentes Relacionados à Assistência à Saúde. Brasília (DF): Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2017.

Correspondência

**Bruno Janke do Nascimento**  
 Centro Universitário UNIFACEAR  
 Av. das Araucárias, 3803 - Thomaz Coelho  
 Araucária - PR, CEP 83707-067  
 E-mail: brunojanke@hotmail.com

# Índice de recoletas em um laboratório privado de Salvador-BA no ano de 2019

## Recollection index in a private laboratory of Salvador-BA in the year 2019

Beneli Santos Miranda<sup>1</sup>

Marissandra Santana Santos<sup>2</sup>

Vanessa da Silva Brito<sup>3</sup>

### Resumo

**Introdução:** O uso dos indicadores da qualidade faz parte do acompanhamento sistemático do desempenho nos processos analíticos laboratoriais, apresentando informações que ajudam a identificar oportunidades de melhoria. Os laboratórios clínicos têm passado por constantes aprimoramentos, especialmente através da evolução tecnológica de instrumentos e equipamentos, bem como atualização e surgimento de novas ferramentas de gestão aplicadas à análise de qualidade, proporcionando mais segurança e confiabilidade em seus processos. **Objetivo:** Apresentar os índices de recoletas gerados pelo laboratório no período de um ano em um laboratório privado na cidade de Salvador, identificando principais erros na fase pré-analítica. **Métodos:** Os resultados foram coletados através do sistema de informatização utilizado pelo laboratório para construção da base de dados. Trata-se de um estudo descritivo exploratório no qual foram utilizados dados acerca dos interferentes laboratoriais de um laboratório de análises clínicas privado na cidade de Salvador-Ba, durante o ano de 2019. **Resultados:** A partir dos parâmetros pré-analíticos avaliados foi possível observar que a falha na coleta é indicador mais frequente, seguido pela presença de coágulo na amostra e falhas na área técnica e/ou no laboratório de apoio, respectivamente. **Conclusão:** A necessidade de recoleta pode causar desconforto ao paciente, aumentando a repetição inapropriada de exames, tendo impacto direto sobre os custos dos recursos do laboratório clínico. Com a descrição desses elementos será possível construir evidências para avaliação da necessidade da implementação de um sistema de qualidade no laboratório que visem à educação continuada, possibilitando ações corretivas e preventivas para minimizar os problemas.

### Palavras-chave

Interferentes laboratoriais; recoletas; fase pré-analítica

## INTRODUÇÃO

Os exames laboratoriais são fundamentais no auxílio às decisões diagnósticas e terapêuticas. Os laboratórios clínicos vêm passando por constantes modificações na última década, com auxílio das evoluções tecnológicas objetivando garantir atendimento eficiente e seguro no menor tempo possível. Assim, conceitos administrativos foram incorporados à visão técnica para minimizar erros e melhorar a qualidade do serviço prestado.<sup>(1)</sup>

A fase pré-analítica envolve muitas etapas desde a requisição do exame e cadastro do exame na recepção do laboratório até a chegada da amostra biológica ao setor analítico. Essas etapas incluem: orientação ao paciente pelo

requisitante; preparo do paciente e orientações quanto à coleta da amostra a ser realizada; cadastro dos exames na recepção do laboratório; verificação das etiquetas e material que será usado na coleta das amostras; registro de informação sobre data e hora da coleta da amostra biológica; recolher informações sobre interferentes analíticos, como uso de medicamentos, ingestão de bebida alcoólica, atividade física nas últimas horas, dentre outras; verificação da etiquetagem para identificação correta das amostras recebidas ou coletadas possibilitando rastreabilidade; procedimento de coleta de amostra biológica realizado corretamente; transporte e armazenamento até a etapa analítica.<sup>(2,3,4)</sup>

Por incluir tantas etapas e muitos participantes, a fase pré-analítica concentra a maior frequência de erros

<sup>1,2</sup> *Biomédica, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, discente do curso de Especialização em Análises Clínicas e Gestão Laboratorial. Salvador, Bahia, Brasil.*

<sup>3</sup> *Professor Adjunto - Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, curso de Especialização em Análises Clínicas e Gestão Laboratorial. Salvador, Bahia, Brasil.*

Recebido em 25/06/2021

Aprovado em 01/12/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102158

associados a exames laboratoriais. Esta fase vem sendo apontada por diversos estudos como a grande responsável pelos erros laboratoriais, por possuir processos menos automatizados. Estes problemas estão associados a variáveis pré-analíticas, pois essas variáveis podem ser fisiológicas (sexo, idade, raça, exercício físico e jejum), variáveis de coleta e variáveis endógenas.<sup>(5,2)</sup>

Apesar do gradativo processo de automatização laboratorial, não há como substituir a figura dos coletadores (flebotomistas) em larga escala do processo de coleta do material biológico. É importante que os profissionais envolvidos nesse processo entendam que esta fase é crucial para um exame de qualidade.<sup>(6,7)</sup>

A ocorrência dos erros em qualquer uma das fases pode inferir de forma negativa no diagnóstico dos pacientes e na tomada de decisão terapêutica, sendo necessária a implantação de metodologias sistematizadas e mais rigorosas para rastreabilidade, detecção, classificação e redução destes erros, implementando indicadores laboratoriais que permitam avaliar a eficácia e eficiência do serviço. Dentre os indicadores mais comumente citados na literatura está o índice de recoletas, pois a classificação dos erros e da frequência em que ocorrem é uma medida valiosa para identificar prioridades para tomada de ações corretivas e preventivas.<sup>(8,9)</sup>

Os indicadores de recoletas são informações de natureza quantitativa ou qualitativa associada a um evento, possibilitando avaliações nas mudanças e tomadas de decisões. Além disso, o uso dos indicadores mostra falhas ou erros de um processo em relação ao número total, tendo como objetivo indicar problemas que precisam de ações preventivas e corretivas que ajudam a identificar os pontos fortes e fracos e oportunidades de melhoria e crescimento. O desempenho de um processo é satisfatório quando os indicadores estão dentro de um limite estabelecido pela organização.<sup>(10)</sup>

A busca de melhoria contínua nos serviços laboratoriais tem avançado, levando os laboratórios a participarem dos programas de Acreditação, que tem como objetivo a padronização de seus indicadores bem como a comparabilidade entre os laboratórios clínicos.<sup>(11)</sup> Tendo em vista esses aspectos, este estudo tem como objetivos descrever os índices de recoletas no período de um ano em um laboratório privado de análises clínicas, na cidade de Salvador - BA, identificando principais erros na fase pré-analítica e sua frequência.

## MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo exploratório retrospectivo, no qual foram utilizados dados existentes nos

arquivos de solicitação de recoleta do laboratório de análises clínicas, no qual foi realizado um levantamento de dados sobre interferentes laboratoriais e dados de recoletas em um laboratório clínico.

Para a realização do estudo foram considerados apenas os atendimentos das unidades ambulatoriais; os dados referentes aos atendimentos hospitalares não foram considerados nas análises estatísticas do presente estudo.

### Obtenção dos dados

Os números de recoletas do período de janeiro a dezembro de 2019 e seus respectivos motivos foram extraídos através de relatório gerado pelo sistema *SmartLab* – v20.8 do laboratório, com prévia autorização através de carta de anuência dos responsáveis.

### Análise dos dados

Após aquisição dos dados de recoletas foi realizada a tabulação através do software Microsoft Office Excel e, a partir disso, gráficos foram gerados e realizada a análise estatística descritiva através do *software GraphPad Prism v.5.0* (Estados Unidos). Os números estão expressos em número absoluto (N), frequência (%), e suas respectivas medidas de tendências centrais, como em média e desvio padrão ( $M_e \pm DP$ ) e mediana e valores mínimos e máximos [ $M_d$  (mín-máx)].

### Considerações éticas

Neste estudo foram utilizados dados secundários coletados de registro em sistema da ferramenta de gestão da qualidade laboratorial, no qual não constam informações individuais ou pessoais das amostras dos pacientes, não sendo necessária a submissão do projeto a um Comitê de Ética em Pesquisa, conforme a Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Não há conflito de interesse entre os autores do artigo e o laboratório em questão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de janeiro a dezembro de 2019 foram atendidos 567.214 pacientes, sendo estes divididos em 428.921 (75,6%) atendimentos ambulatoriais, 138.293 atendimentos hospitalares (24,4%) (Gráfico 1). Foram considerados para o presente estudo apenas os atendimentos ambulatoriais, sendo os meses de maio, julho e agosto com os maiores números de atendimentos (39.062, 39.437 e 39.545, respectivamente) e junho e dezembro os meses com menor número de atendimentos (29.676 e 28.632 respectivamente) (Tabela 1).

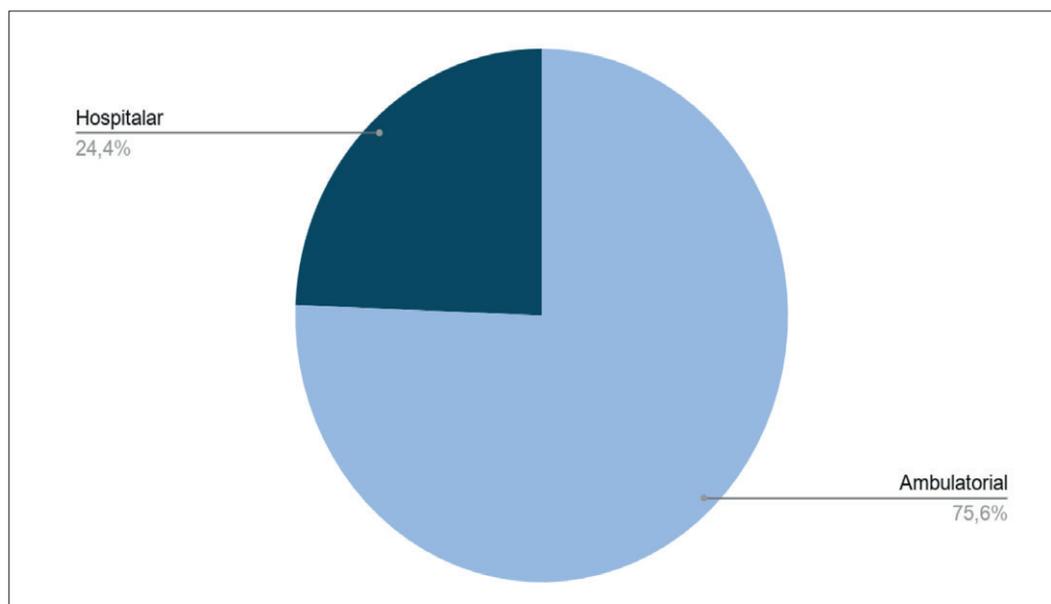


Gráfico 1. Distribuição da porcentagem anual dos atendimentos (ano 2019)

Tabela 1 – Número de atendimentos e solicitações de recoleta de amostra biológica por mês no ano de 2019

Mês/2019	N Abs. de atendimentos	N relativo de atendimentos (%)	N Abs. de recoletas	N relativo de recoletas (%)
Janeiro	37.741	8,8	67	0,18
Fevereiro	35.386	8,3	48	0,14
Março	32.640	7,6	45	0,14
Abril	37.132	8,7	77	0,21
Mai	39.062	9,1	81	0,21
Junho	29.676	6,9	58	0,20
Julho	39.437	9,2	63	0,16
Agosto	39.545	9,2	89	0,23
Setembro	36.305	8,5	66	0,18
Outubro	37.777	8,8	89	0,24
Novembro	35.588	8,3	119	0,33
Dezembro	28.632	6,7	54	0,19
TOTAL	428.921	100	856	2,387
<b>Medidas de dispersão</b>				
$M_e \pm DP$	35.743 $\pm$ 3651	8,3 $\pm$ 0,8	71 $\pm$ 21	0,20 $\pm$ 0,05
$M_d$ (mín-máx)	36.720 (28.632 – 39.545)	8,6 (6,7 – 9,2)	66 (45 – 119)	0,19 (0,14 – 0,33)

$M_e \pm DP$ : média e desvio padrão;  $M_d$  (mín-máx): mediana e valores mínimo e máximo; N Abs de atendimentos: número absoluto de pacientes atendidos a cada mês; N relativo de atendimentos: número relativo de pacientes atendidos a cada mês; N Abs de recoletas: número absoluto de recoletas solicitadas a cada mês; N relativo de recoletas (%): número relativo de recoletas solicitadas em cada mês.

No que se refere aos índices de recoleta, do total de pacientes atendidos em ambulatório (428.921) no ano de 2019, 0,2% dos pacientes em atendimento ambulatorial tiveram alguma solicitação de recoleta baseado nos indicadores de recoleta adotado pelo laboratório. Ao longo do ano de 2019 foram solicitadas em média  $72 \pm 21$  solicitações

de recoletas de amostras biológicas. O mês de novembro foi o que apresentou maior taxa de recoleta e os meses de fevereiro e março as menores taxas.

Os indicadores identificados de recoleta a cada mês são observados os valores absolutos na Tabela 2 e valores relativos no Gráfico 3, sendo falha no procedimento da coleta

o indicador mais frequente ( $19,2 \pm 8,8$ ), seguido pela presença de coágulo na amostra ( $17,4 \pm 5,8$ ) e falhas na área técnica e/ou no laboratório de apoio ( $13,5 \pm 8,8$ ), respectivamente.

O indicador com menor frequência foi falha na etiqueta ( $0,08 \pm 0,2$ ), seguido por falha da recepção ( $1,7 \pm 1,4$ ) e urina derramada ( $1,9 \pm 2,1$ ), respectivamente (Gráfico 2).

Tabela 2 – Número absoluto de recoletas por indicador a cada mês no ano de 2019

Mês/2019	Hemólise	Triagem	Material Insuf.	Urina Derramada	Falha na recepção	Falha Apoio	Falha Coleta	Coágulo	Etiqueta	Total
Janeiro	0	4	2	2	3	12	17	27	0	67
Fevereiro	7	3	2	2	2	9	11	11	1	48
Março	4	3	1	1	1	4	20	11	0	45
Abril	13	8	7	2	2	9	13	23	0	77
Maiο	10	10	7	5	0	13	20	16	0	81
Junho	14	4	3	0	1	14	8	14	0	58
Julho	7	4	2	1	1	15	21	12	0	63
Agosto	10	7	5	0	2	21	19	25	0	89
Setembro	7	6	9	0	1	16	13	15	0	67
Outubro	6	3	6	7	3	6	33	24	0	88
Novembro	12	4	2	2	5	37	39	18	0	119
Dezembro	5	6	6	1	0	6	17	13	0	54
TOTAL	95	62	52	23	21	162	231	209	1	856

#### Medidas de dispersão

$M_e \pm DP$	$7,9 \pm 4,0$	$5,2 \pm 2,2$	$4,3 \pm 2,6$	$1,9 \pm 2,1$	$1,7 \pm 1,4$	$13,5 \pm 8,8$	$19,2 \pm 8,8$	$17,4 \pm 5,8$	$0,08 \pm 0,2$	$71,3 \pm 20,9$
$M_d$ (mín-máx)	7 (0 – 14)	4 (3 – 10)	4 (1 – 9)	1,5 (0 – 7)	1,5 (0 – 5)	12,5 (4 – 37)	18 (8 – 39)	15,5 (11 – 27)	0 (0 – 1)	86,2 (45 – 119)

$M_e \pm DP$ : média e desvio padrão;  $M_d$  (mín-máx): mediana e valores mínimo e máximo

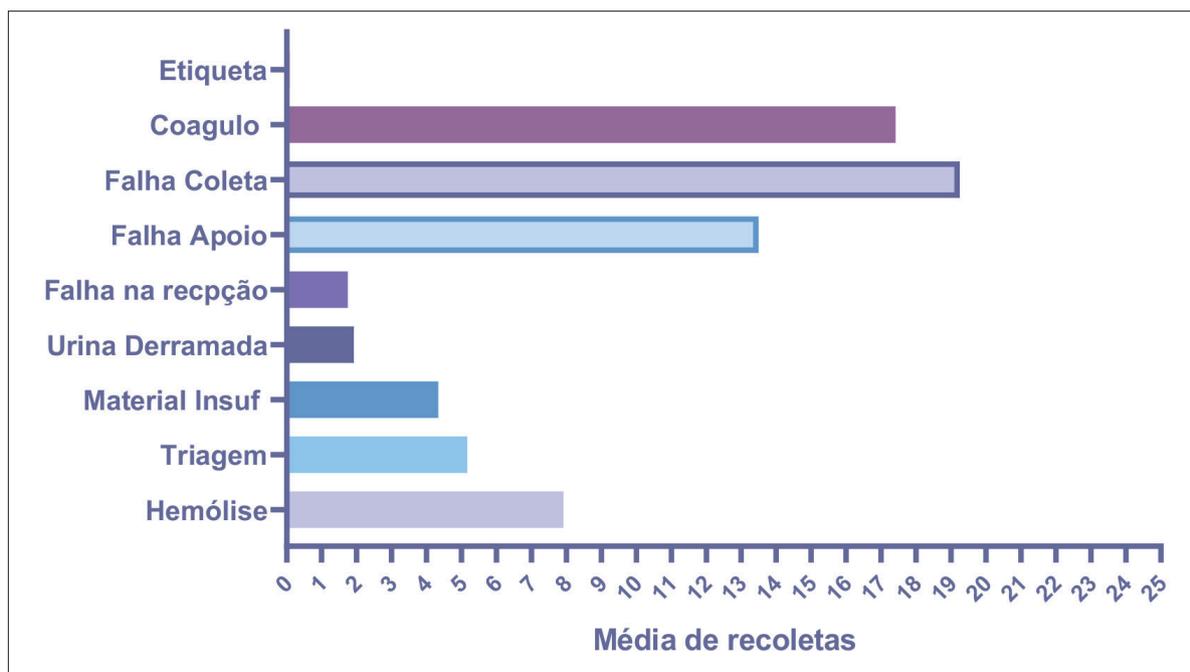


Gráfico 2. Média dos valores absolutos dos indicadores para recoletas no ano de 2019

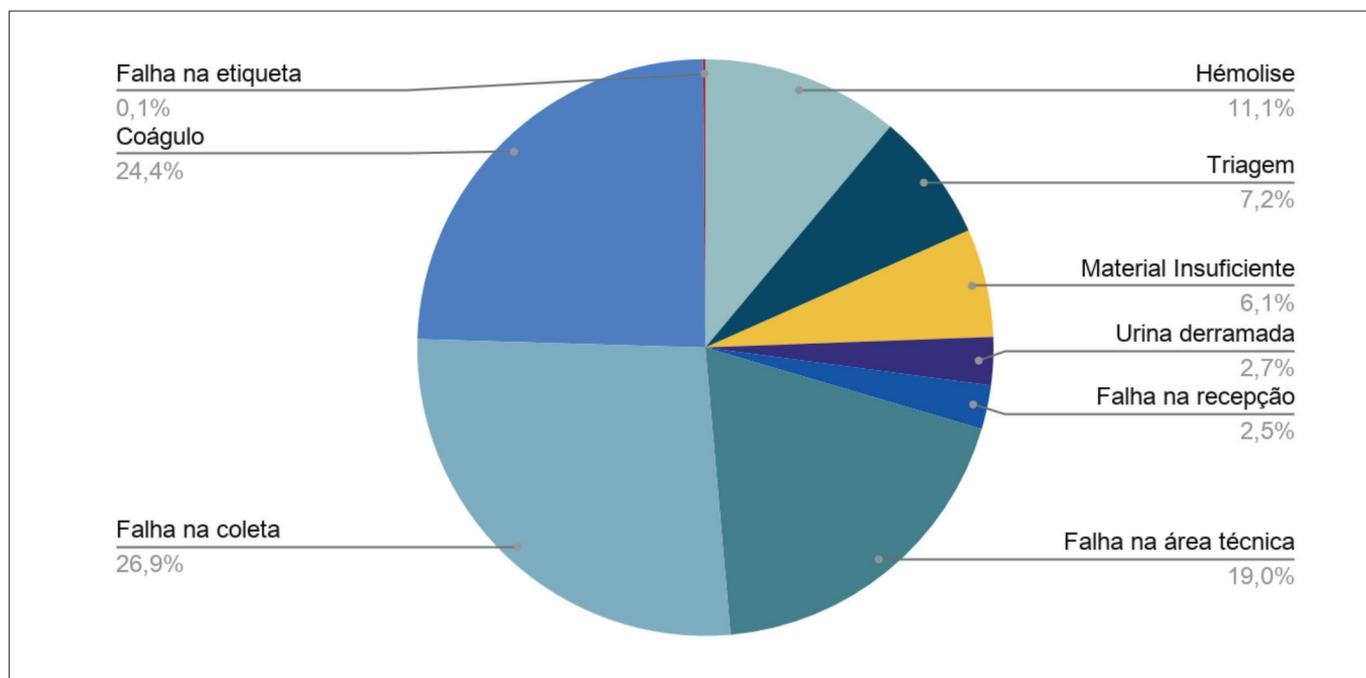


Gráfico 3. Distribuição da porcentagem dos indicadores de recoletas no ano 2019

A utilização desses indicadores no laboratório clínico permite ao gestor conhecer o desempenho das suas análises mensalmente, visando melhoria contínua da gestão da qualidade ao longo do tempo. Esses indicadores sinalizam para um bom desempenho de um processo quando confrontados com metas estabelecidas.<sup>(12)</sup>

O indicador laboratorial hemólise ocorre devido a uma série de fatores, como escolha da agulha de calibre pequeno, aspiração muito rápida (coleta com seringa), perda da veia durante a coleta, homogeneização brusca. Proporcionalmente à intensidade da hemólise, há alterações, como diminuição da contagem de eritrócitos, redução do hematócrito e da hemoglobina, interferindo nesses parâmetros da série vermelha. Além da hemoglobina, as hemácias contêm várias proteínas, enzimas, lipídios e carboidratos que podem interagir ou competir com reagentes de ensaio, ou elevar a quantidade do analito dosado em soro ou plasma. Há interferência da hemólise para alguns exames bioquímicos como: Aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), Fosfatase alcalina (ALKP), Gama-glutamilttransferase (GGT), bilirrubinas, lactato desidrogenase (LDH), magnésio, creatinoquinase (CK), troponinas e os eletrólitos.<sup>(6,13-15)</sup>

A triagem é o local de manuseio e preparação para o transporte de amostras, sendo crucial para a identificação dos interferentes laboratoriais, desse modo, é importante certificar-se de que os tubos estejam corretamente encaixados na caçamba da centrífuga para evitar acidentes com material biológico e perda de materiais.<sup>(16-18)</sup>

Os materiais denominados como insuficientes são aqueles com baixo volume e/ou qualidade para realização do exame no laboratório clínico, sendo assim as amostras biológicas, sejam elas sangue total, soro, plasma, urina, fezes ou líquor, devem conter material suficiente para a realização da análise.<sup>(19,20)</sup>

Urina derramada acontece no ato do recebimento ou no processo de triagem, e portanto deve-se certificar que o coletor com urina esteja fechado adequadamente. O frasco de coleta e o saco coletor bem vedado podem evitar quedas acidentais, saída da tampa, e consequente perda do material.<sup>(20,21,7,22)</sup>

Falha da recepção ocorre durante o cadastro do paciente e registros dos exames solicitados na guia médica. É importante confirmar dados pessoais como: endereço, telefone, idade, sexo, gestação, utilização de medicamentos e jejum. Além das informações sobre dados clínicos do paciente, a quimioterapia, a radioterapia e as doenças crônicas também fazem parte do cadastro. O preenchimento inadequado no cadastro leva a repetições de exames desnecessárias.<sup>(23,5)</sup>

Falhas na área técnica ou no laboratório de apoio estão relacionadas com processo de conservação das amostras, coletor ou tubo inadequado, envio indevido, acidente com material biológico, identificação inadequada e volume de amostra impróprio.<sup>(24)</sup>

A falha na coleta está relacionada com o flebotomista, que tem papel importante nessa fase e deve respeitar os protocolos para a obtenção do material biológico. É preciso seguir a sequência dos tubos que serão utilizados,

verificar o volume de sangue apropriado para cada tubo e realizar a homogeneização correta. Os recipientes com materiais de coletas deverão ser identificados durante o procedimento técnico.<sup>(25,26)</sup>

O coágulo ocorre devido a homogeneização insuficiente após a coleta e em situações de coleta difícil. Essas amostras são desprezadas, já que a formação do coágulo afeta os parâmetros avaliados no hemograma.<sup>(27)</sup>

Falha na etiqueta acontece durante impressão e posicionamento incorreto, levando à necessidade de reimpressão que ocasiona retrabalho na triagem de amostras, podendo gerar recoleta. O uso de código de barras para identificar amostras no ato da coleta garante a rastreabilidade de todo o processo técnico.<sup>(28,29)</sup>

### As etapas de um procedimento pré-analítico

A fase pré-analítica do processo laboratorial envolve os procedimentos de preparo e coleta das amostras. Esses processos precisam ser realizados de acordo com os manuais de coleta para que os resultados não sejam comprometidos. Essa fase exige uma série de atividades interligadas e sistematizadas, e divide-se em: extralaboratorial e intralaboratorial.<sup>(9)</sup>

Na fase extralaboratorial inicia-se com solicitação de exames, avaliação do paciente e orientações de preparo do paciente para coleta. Os requisitos de cadastro do paciente seguem as recomendações da PALC e RDC 302.<sup>(5,7)</sup>

Desse modo, no consultório médico o profissional irá fornecer ao paciente as primeiras orientações e informações sobre os exames solicitados. Na recepção do laboratório inicia-se o processo de cadastro e orientações específicas de cada exame, como horário pré-definido, jejum, ingestão de bebidas alcoólica nas últimas 72 horas, a realização de exercício físico e outros. Além de informar ao paciente essas particularidades é importante ressaltar que para evitar erros as orientações devem ser entregues por escrito.<sup>(7,26)</sup>

No cadastro do paciente deve conter o número de registro de identificação gerado pelo laboratório, nome, idade e sexo do paciente, telefone, endereço, médico solicitante, horário do atendimento, exames e tipo de amostra. Em casos de menor de idade, contato do responsável. Dados importantes como medicação, tabagismo, etilismo e condições cronobiológicas devem ser fornecidos pelo paciente e são de extrema importância para análise técnica.<sup>(5)</sup>

Na fase intralaboratorial é realizada uma nova inspeção, confrontando-se a identificação do paciente, preparo para os exames solicitados e identificação do material coletado. O flebotomista irá identificar o paciente e verificar os exames para proceder com a coleta. Na coleta de sangue venoso deve-se respeitar a ordem dos tubos para que não haja contaminação e consequente interferente na análise dos exames. O Manual clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) padroniza tubo em escala distinguindo por cor.<sup>(30,31)</sup>

Após localizar o melhor local de acesso para perfusão, o profissional de coleta deverá realizar a lavagem das mãos, calçar as luvas e preparar o material na presença do paciente. Os materiais perfurocortantes devem ser desencapados somente no processo de punção, evitando assim acidentes. Agulha ou escalpe devem ser posicionados de forma que o bisel fique com face para cima e a posição em um ângulo de 45°C. Ao concluir a punção, a agulha é retirada acionando dispositivo de segurança e posterior descarte em local apropriado. O *bloodstop* é aplicado e o paciente é orientado a pressionar o local, com o objetivo de tamponar e não causar hematomas.<sup>(26)</sup>

Na triagem técnica as amostras coletadas são conferidas, preparadas e segregadas para o encaminhamento à central de análises e processamentos. O transporte das amostras biológicas deve ser realizado em recipientes isotérmicos, higienizáveis e impermeáveis, com o devido controle de temperatura e identificado com a simbologia de risco biológico.<sup>(32,33)</sup>

Embora os motivos de recoletas sejam indicadores de qualidade importantes para o laboratório clínico, indicando problemas que precisam de ações preventivas, não há consenso de limites determinado para a aceitabilidade. A meta estabelecida pela gestão do laboratório pesquisado é de no máximo 0,23% de recoletas mensais. Portanto, os resultados da pesquisa demonstraram que a frequência de recoletas obtidas durante o período de um ano esteve dentro da meta prevista pela empresa.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No ano de 2019 houve um índice de solicitação de recoleta de amostra biológica excelente, com menos de 0,5% do total de pacientes atendidos em determinado laboratório de análises clínicas na cidade de Salvador-BA. O motivo de solicitação de recoleta mais frequente foi relacionado a erros no procedimento de coleta da amostra biológica e o menos frequente foi erro relacionado à etiqueta de identificação da amostra, indicando a necessidade de treinamentos e aprimoramentos dos profissionais que orientam ou executam a coleta de amostra biológica, e avaliação da qualidade e adequabilidade dos instrumentos e equipamentos utilizados nesta etapa.

Diversos fatores estão envolvidos nos erros pré-analíticos, por ser a fase menos automatizada no laboratório. Dada a importância da fase pré-analítica para obtenção de resultados e útil à prática médica, todos os segmentos de normas e precauções são essenciais para que erros sejam evitados. Deve haver especial atenção a todos os procedimentos dessa fase, para garantir a viabilidade das amostras a serem analisadas.

Apesar da crescente utilização de novas tecnologias, como automação e robótica, algumas atividades da coleta

influenciam decisivamente no erro total e, conseqüentemente, no resultado analítico que o laboratório irá liberar. A padronização dos processos e a educação continuada são ferramentas imprescindíveis para essa finalidade.

As recoletas causam ao paciente incômodo por necessitar de retorno ao laboratório para uma nova coleta, além de gerar custos para a empresa e afetar a credibilidade do laboratório, deixando o paciente às vezes insatisfeito. A gestão da qualidade dos laboratórios clínicos é imprescindível para a garantia da qualidade e confiabilidade dos exames oferecidos por ele.

### Abstract

**Introduction:** *The use of quality indicators is part of the systematic monitoring of performance in laboratory analytical processes, presenting information that helps identify opportunities for improvement. Clinical laboratories have undergone constant improvements, especially through the technological evolution of instruments and equipment, as well as updating and emergence of new management tools applied to quality analysis, providing more safety and reliability in their processes.*

**Objective:** *To present the recollect rates generated by the laboratory over a period of one year in a private laboratory in the city of Salvador, identifying main errors in the pre-analytical phase.* **Methods:** *This is a descriptive exploratory study in which data were used on laboratory interferences from a private clinical analysis laboratory in the city of Salvador-Ba, during 2019.* **Results:** *From the pre-analytical parameters evaluated, it was possible to observe that the failure in the collection is the most frequent indicator, followed by the presence of clot in the sample and failures in technical area and/or in the support laboratory, respectively.* **Conclusion:** *The need for recollection can cause discomfort to the patient, increasing the inappropriate repetition of tests, having a direct impact on the costs of the resources of the clinical laboratory. With the description of these elements it will be possible to build evidence to avoid the need for the implementation of a quality system in the laboratory aimed at continuing education, enabling corrective and preventive actions to minimize problems.*

### Keywords

laboratory interferences; recollects; pre-analytical phase

## REFERÊNCIAS

- Horvath, A. R. From evidence to best practice in laboratory medicine. *Clin. Biochem. Rev.* 34, 47–60 (2013).
- Costa, V. G. Da & Moreli, M. L. Principais parâmetros biológicos avaliados em erros na fase pré-analítica de laboratórios clínicos: revisão sistemática. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 48, 163–168 (2012).
- Fonseca, K. M. N. de L. Coleta de exames de rotina de urina. *Recom. da Soc. Bras. Patol. Clínica/ Med. Lab. Fatores pré-analíticos e Interf. em ensaios Lab.* 330 (2019).
- Corrêa, J. A. Garantia da Qualidade no Laboratório Clínico. (2019).
- BRASIL. MS– ANVISA. RDC 302. in RDC 302 (2005).
- Ialongo, C. & Bernardini, S. Phlebotomy, a bridge between laboratory and patient. *Biochem. Medica* 26, 17–33 (2016).
- Andriolo, Adagmar; Sumita, N. M. W. S. G. A. C. F. V. B. C. A. M. A. G. F. de O. C. E. dos S. F. C. A. de O. G. M. E. M. Recomendações da sociedade brasileira de patologia clínica/medicina laboratorial (SBPC/ML): fatores pré-analíticos e interferentes em ensaios laboratoriais. (2018).
- SANTOS, P. R., Silva, C. L., Gall, M. C., Allyne, ; & Grando, C. Impacto nos custos por erros pré-analíticos em laboratório de análises clínicas Impact of pre-analytical errors on costs of clinical analysis laboratory. *J Bras Patol Med Lab* 57, 1–4 (2021).
- Corrêa, J. A. Garantia da Qualidade no Laboratório Clínico. (2019).
- Coriolano, N. L., Silva, I. C. R. & Lamounier, T. A. C. Analysis of the frequency of biological sample recollections as quality indicators in a clinical laboratory of Distrito Federal, Brazil. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 52, 11–16 (2016).
- Tsai, E. R. *et al.* A critical review of laboratory performance indicators. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 56, 458–471 (2019).
- Maronna, A., Souza, R. A. & Montes, F. C. O. F. Description of the quality indicators defined in the national reference laboratory in tuberculosis of CRPHF/Ensp/fiocruz by means of the process mapping methodology. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 53, 165–176 (2017).
- Lippi, G. Systematic Assessment of the Hemolysis Index. in 157–170 (2015). doi:10.1016/bs.acc.2015.05.002.
- Heyer, N. J. *et al.* Effectiveness of practices to reduce blood sample hemolysis in EDs: A laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis. *Clin. Biochem.* 45, 1012–1032 (2012).
- Stankovic, A. K. & Smith, S. Elevated Serum Potassium Values. *Pathol. Patterns Rev.* 121, S105–S112 (2004).
- Lippi, G. *et al.* Preanalytical quality improvement. In pursuit of harmony, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin. Chem. Lab. Med.* 53, (2015).
- Simundic, A.-M., Baird, G., Cadamuro, J., Costelloe, S. J. & Lippi, G. Managing hemolyzed samples in clinical laboratories. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 57, 1–21 (2020).
- Lippi, G. *et al.* Recommendations for detection and management of unsuitable samples in clinical laboratories. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45, (2007).
- Zapelini, R. M. *et al.* Analysis of laboratory tests results of patients submitted to a clinical screening program. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 52, 374–381 (2016).
- Codagnone, F. T. *et al.* The use of indicators in the pre-analytical phase as a laboratory management tool. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 50, 100–104 (2014).
- Delanghe, J. R. & Speeckaert, M. M. Preanalytics in urinalysis. *Clin. Biochem.* 49, 1346–1350 (2016).
- Norma, N. & Urina, E. De. ABNT NBR 15.268:2005. 2005 (2005).
- Mrazek, C. *et al.* Errors within the total laboratory testing process, from test selection to medical decision-making - A review of causes, consequences, surveillance and solutions. *Biochem. medica* 30, 020502 (2020).
- Agarwal, R. Measurement of Errors in Clinical Laboratories. *Indian J. Clin. Biochem.* 28, 227–234 (2013).
- Lima-Oliveira, G. de S., Picheth, G., Sumita, N. M. & Scartezini, M. Controle da qualidade na coleta do espécime diagnóstico sanguíneo: iluminando uma fase escura de erros pré-analíticos. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 45, 441–447 (2009).
- Laboratorial, S. B. D. P. C. / M. & Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial. Coleta de Sangue Venoso. (2005).
- Narayanan, S. Preanalytical Issues Related to Blood Sample Mixing. *Bloodgas.Org Classen, D. C., Resar, R., Griffin, F., Federico,* (2005).
- Wagar, E. A., Stankovic, A. K., Raab, S., Nakhleh, R. E. & Walsh, M. K. Specimen Labeling Errors: A Q-Probes Analysis of 147 Clinical Laboratories. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 132, 1617–1622 (2008).
- Dock, B. Improving the accuracy of specimen labeling. *Clin. Lab. Sci.* 18, 210–212 (2005).
- Lima-Oliveira, G. *et al.* Impact of the phlebotomy training based on CLSI/NCCLS H03-A6 – procedures for the collection of diagnostic blood. *Biochemia Medica* 342–351 (2012) doi:10.11613/BM.2012.036.
- Laboratory, C. and & Standards Institute. H03 A6 Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard. vol. 27 (2014).

32. Laboratory, C. and & Institute, S. H18-A3 Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens ; Approved Guideline — Third Edition. CLSI document H18-A4 vol. 24 (2004).
33. Laboratory, C. and & Institute, S. H21 A5 -Collection , Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; CLSI Approved Guideline- Fifth Edition. H21-A5. Nccls vol. 28 H21-A5 (2008).

---

Correspondência

**Vanessa da Silva Brito**

*Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública*

*Curso de Especialização em Análises Clínicas e Gestão Laboratorial*

*Av. Dom João VI, 275 - Brotas*

*Salvador - BA, CEP: 40290-000*

*E-mail: [vanessabrito@bahiana.edu.br](mailto:vanessabrito@bahiana.edu.br)*

## Comparação de dois métodos na realização do exame de velocidade de hemossedimentação (VHS) em um hospital oncológico

### Comparison between two methods for performing the erythrocyte sedimentation test (ESR) in an oncology hospital

Tiago César Gouvêa Moreira<sup>1</sup>  
Caio Agostini Calheiros Grosso<sup>2</sup>  
Micaely Santos Stanzani<sup>3</sup>  
Paola Braga dos Santos<sup>4</sup>  
Núbia de Lima Pedrosa<sup>5</sup>

#### Resumo

Introdução: O exame de velocidade de hemossedimentação (VHS) mede a distância em que os eritrócitos caem durante 60 minutos em um tubo vertical. Objetivo: Comparar dois métodos de realização do exame de VHS em um hospital oncológico. Material e métodos: Foram coletados, de 45 pacientes, 5mL a 6mL de sangue que foram transferidos para dois tubos com anticoagulante. O sangue de ambos os tubos foi transferido para uma pipeta de vidro com capacidade de 200mm e 2,5mm de diâmetro interno, que foi adaptada em suporte vertical, aguardando por uma hora. Os resultados foram analisados pelo programa SPSS versão 25. Resultados: O nível de sedimentação em milímetros (mm) do método referência de Westergren modificado utilizando citrato de sódio 3,2% é menor quando comparado com o método alternativo utilizando anticoagulante EDTA, com Z score: -5,29 (p = 0,01) e R = 0,79. Discussão: O International Council for Standardization in Haematology (ICSH) descreveu grandes diferenças entre os métodos de Westergren e os não baseados em Westergren. Conclusão: Sugere-se a utilização do método de Westergren modificado na realização do exame. Além disso, com a padronização do melhor método de realização do exame, gerará resultados mais confiáveis, refletindo de forma positiva na rotina hospitalar.

#### Palavras-chave

Hemossedimentação; Neoplasias; Testes Hematológicos

## INTRODUÇÃO

A velocidade de hemossedimentação (VHS) é um exame utilizado como marcador de resposta inflamatória, sendo um teste simples e de baixo custo que tem sido realizado há mais de meio século.<sup>(1)</sup>

O exame de velocidade de hemossedimentação (VHS) mede a distância em que os eritrócitos caem durante 60 minutos em um tubo vertical. Seu significado foi descoberto em 1897 pelo médico Edmund Biernacki, que observou que a taxa de VHS era diferente entre os indivíduos, sendo dependente do volume e da forma dos eritrócitos e das proteínas do plasma.<sup>(2,3)</sup>

O resultado da VHS pode ser influenciado por diversos fatores intrínsecos ou extrínsecos, produzindo resultados pouco confiáveis. Apesar das limitações, o VHS vem sendo utilizado na prática clínica como marcador inespecífico para monitoramento de doenças inflamatórias e crônicas.<sup>(4)</sup>

Dentre os fatores que podem alterar o exame destacam-se a forma da coleta, o período de jejum, a viscosidade do plasma (concentração de fibrinogênio e das globulinas), a concentração de íons hidrogênio, a concentração do colesterol, o tamanho e a forma dos eritrócitos e o conteúdo hemoglobínico. Além da idade e do sexo dos pacientes, que devem ser levados em consideração na avaliação do resultado da VHS.<sup>(4)</sup>

<sup>1</sup> Bacharel em Biomedicina pelo Centro Universitário Faminas (UNIFAMINAS) - (Biomédico). Mestrando do programa de Neurologia da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO)- Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>2</sup> Bacharel em Biomedicina pelo Centro Universitário Faminas (UNIFAMINAS). Muriaé, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Bióloga-Hospital do Câncer- Fundação Cristiano Varella. Muriaé, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Bióloga- Supervisora do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital do Câncer- Fundação Cristiano Varella. Muriaé, MG, Brasil.

<sup>5</sup> Farmacêutica- Coordenadora e responsável técnica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital do Câncer- Fundação Cristiano Varella. Muriaé, MG, Brasil.

Recebido em 04/11/2020

Aprovado em 02/03/2022

DOI: 10.21877/2448-3877.202202082

A sedimentação eritrocitária depende da formação de *rouleaux* gerada pela agregação dos eritrócitos ao longo de um mesmo eixo, o que leva a um aumento da densidade promovendo uma sedimentação mais rápida.<sup>(5)</sup>

A formação de *rouleaux* está relacionada à carga negativa dos eritrócitos que tentam se repelir. Sendo assim, as macromoléculas plasmáticas, por possuírem cargas positivas, neutralizam a carga da superfície eritrocitária, ocasionando maior agregação das hemácias e a formação de *rouleaux*.<sup>(5)</sup>

O teste da VHS começou a ser utilizado em 1918 na Alemanha por Robin Fahreus, que reportou as características importantes relacionadas com a sedimentação e a capacidade do plasma em reduzir a carga eletrostática na superfície dos eritrócitos, o que proporciona maior sedimentação. Robin Fahreus também quantificou a capacidade de sedimentação das proteínas plasmáticas, avaliou o efeito da temperatura no exame e observou maior sedimentação em várias condições patológicas e fisiológicas.<sup>(1)</sup>

Em 1921, o médico sueco Alf Vilhelm Westergren definiu padrões para o desempenho do teste de VHS, sendo assim, o método de Westergren passou a ser amplamente utilizado até os dias atuais.<sup>(6)</sup>

O método de Westergren é realizado com a coleta de uma quantidade fixa de sangue que é transferida para um tubo contendo citrato de sódio a 3,8% (relação 4:1). O sangue é deixado em repouso por uma hora em um tubo graduado na vertical, com 200mm de comprimento e 2,5mm de diâmetro interno, e em seguida é analisada a distância entre o topo da coluna sanguínea (menisco) com a camada superior dos glóbulos vermelhos (coluna de eritrócitos).<sup>(5,6,7)</sup>

A VHS é utilizada no diagnóstico de duas doenças, a polimialgia reumática (PR) e da arterite temporal (AT), entretanto pode apresentar resultado acima de 100mm/h quando o paciente apresenta infecção, câncer metastático ou doenças inflamatórias do tecido conjuntivo. Embora se demonstre alterado em pacientes com câncer, o exame não deve ser utilizado como marcador para doenças malignas, pois a VHS está frequentemente dentro do valor referência nestes pacientes.<sup>(5,8)</sup>

Em 2017, o *International Council for Standardization in Haematology (ICSH)* publicou atualizações para o exame de VHS. De acordo com o ICSH, estima-se que 2/3 dos laboratórios utilizam métodos de VHS alternativos ou modificados, entretanto o método de Westergren ainda é o padrão ouro para o exame. Além disso, observou-se que os resultados obtidos por estes métodos alternativos e modificados podem diferir significativamente do observado pelo método de Westergren.<sup>(9)</sup>

Com a validação e determinação de qual método utilizar durante a realização do exame de VHS, além obter resultados mais confiáveis, refletirá no custo e tempo de liberação do exame, sendo imprescindível em um hospital oncológico,

uma vez que grande parte dos pacientes encontra-se em cuidados paliativos ou em observação na unidade de terapia intensiva (UTI) e o médico necessita de um rápido resultado para determinação de intervenção terapêutica.

O objetivo geral deste estudo é comparar dois métodos de realização do exame de VHS, o método de referência de Westergren modificado e o método alternativo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) no Hospital do Câncer de Muriaé (HCM), Fundação Cristiano Varela.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 45 amostras de sangue periférico de pacientes provenientes de atendimento do corpo clínico do HCM, as quais foram direcionadas para realização do VHS.

O critério de inclusão para a seleção dos participantes foi que o indivíduo tivesse indicação de teste de VHS pelo corpo clínico do hospital. Já o critério de exclusão foi indivíduos menores de 18 anos ou participantes que não aceitassem participar da pesquisa voluntariamente.

Foi realizada a coleta de 5mL a 6mL de sangue periférico com seringa (5mL) e agulha (25mm x 0,70mm). Após a coleta, o sangue foi transferido para dois tubos, um da marca *BD Vacutainer*, contendo 7,2mg de ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico (K2EDTA) (Figura 1A). Este tubo tem capacidade máxima de 4mL de sangue, não possuindo uma quantidade fixa de sangue a ser transferido para o tubo. O outro tubo é o da marca *Vacurette*, contendo citrato de sódio 3,2%, no qual foi adicionado sangue até a marca (Figura 1B), totalizando 2mL de sangue, mantendo a relação anticoagulante/sangue de 1:4.

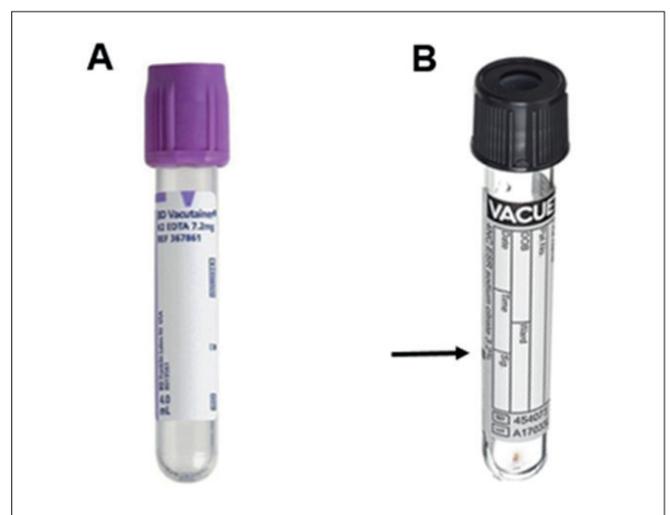


Figura 1 A e B - Tubos utilizados para coleta sanguínea dos pacientes. **A)** Tubo da marca *BD Vacutainer*, contendo 7,2mg de ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico (K2EDTA). Quantidade máxima de 4mL de sangue. **B)** Tubo da marca *Vacurette*, contendo citrato de sódio 3,2%. Seta indica a marca onde se deve colocar o sangue (2mL), mantendo uma relação anticoagulante/sangue de 1:4.

As amostras foram encaminhadas para o laboratório em temperatura ambiente em maleta de transporte biológico. As amostras dos dois tubos foram transferidas para pipeta graduada com capacidade de 200mm e 2,5mm de diâmetro interno, deixando em repouso por uma hora na vertical no suporte de pipetas. Após repouso, foi avaliada a distância do topo da coluna sanguínea (menisco) até a camada superior dos glóbulos vermelhos (camada eritrocitária).

O método de Westergren realizado neste estudo será modificado, pois, de acordo com o ICSH, na metodologia padrão ouro para o exame de VHS utiliza-se o tubo com cloreto de sódio 3,8% e não 3,2%, como utilizado neste estudo.

Os resultados dos dois métodos de coleta foram tabulados no programa SPSS Statistics Versão 25. Foram aplicadas análises descritivas e de frequência. Utilizou-se o teste de Spearman rho para análise de normalidade, e para a comparação entre os dois métodos foi aplicado o teste não paramétrico de postos de Wilcoxon. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### Ética

A pesquisa foi submetida, e aprovada, à Plataforma Brasil para avaliar a ética em pesquisas com seres humanos de acordo com a Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Essa resolução fundamenta-se nas declarações e diretrizes quando há

envolvimento com seres humanos e visa a ética em pesquisas (CAAE: 32207420.2.0000.5105).

Todos os participantes foram orientados sobre os objetivos, a confidencialidade dos dados gerados, os riscos e benefícios da pesquisa. Deixou-se clara a possibilidade de recusa de participação ou, caso desejasse, se retirar em qualquer momento por se sentir desconfortável. Após orientação, os participantes que concordaram voluntariamente a participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

## RESULTADOS

As amostras de sangue periférico dos 45 pacientes com indicação para a realização do exame velocidade de hemossedimentação (VHS) foram obtidas no Hospital do Câncer da cidade de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. Destes pacientes, 19 (42,2%) eram do sexo masculino e 26 (57,8%) do feminino.

Os resultados com o anticoagulante citrato de sódio 3,2% (método de Westergren modificado) foram considerados padrão ouro neste trabalho quando comparados com o EDTA 7,2mg (método alternativo), por se aproximar da metodologia padrão ouro na realização do exame de VHS, o método de Westergren, que utiliza citrato de sódio a 3,8%. Após a análise do exame de VHS por ambos os métodos, observou-se os resultados contidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Variação da hemossedimentação entre as amostras testadas.

Paciente	Sexo	Resultados (TUBO EDTA)	Resultados (TUBO CITRATO)	Diferença (EDTA - CITRATO)
Paciente 1	M	51	30	21
Paciente 2	M	23	13	10
Paciente 3	F	57	43	14
Paciente 4	F	38	27	11
Paciente 5	F	53	38	15
Paciente 6	M	15	10	5
Paciente 7	M	52	37	15
Paciente 8	M	4	3	1
Paciente 9	F	21	12	9
Paciente 10	F	19	12	7
Paciente 11	F	57	34	23
Paciente 12	M	14	9	5
Paciente 13	F	39	29	10
Paciente 14	M	32	19	13
Paciente 15	F	37	28	9
Paciente 16	M	18	13	5
Paciente 17	M	3	3	0

Tabela 1 (continuação) - Variação da hemossedimentação entre as amostras testadas.

Paciente	Sexo	Resultados (TUBO EDTA)	Resultados (TUBO CITRATO)	Diferença (EDTA - CITRATO)
Paciente 18	F	27	23	4
Paciente 19	M	19	13	6
Paciente 20	M	31	26	5
Paciente 21	M	31	14	17
Paciente 22	F	86	75	11
Paciente 23	F	18	14	4
Paciente 24	F	78	46	32
Paciente 25	M	70	54	16
Paciente 26	F	41	25	16
Paciente 27	M	8	4	4
Paciente 28	M	3	3	0
Paciente 29	F	34	20	14
Paciente 30	M	4	2	2
Paciente 31	M	5	5	0
Paciente 32	M	54	42	12
Paciente 33	F	112	96	16
Paciente 34	F	2	2	0
Paciente 35	F	147	157	-10
Paciente 36	F	4	1	3
Paciente 37	F	3	1	2
Paciente 38	F	28	21	7
Paciente 39	F	17	12	5
Paciente 40	F	21	12	9
Paciente 41	M	54	34	20
Paciente 42	F	60	43	17
Paciente 43	F	26	14	12
Paciente 44	F	19	5	14
Paciente 45	F	5	6	-1
<b>MEDIANA</b>		<b>27</b>	<b>14</b>	<b>9</b>

Foi possível averiguar diferença nos resultados do exame de VHS quando comparados os dois métodos. Em análise estatística, observou-se que o nível de sedimentação em milímetros (mm) do método referência de Westergren modificado utilizando citrato de sódio 3,2% é menor quando comparado com o método alternativo utilizando anticoagulante EDTA, com  $Z_{score}$ : -5,29 ( $p = 0,01$ ) e  $R = 0,79$ . A metodologia com EDTA apresentou mediana de 27mm (mín. 2 e máx. 147), já o método com citrato de sódio teve mediana de 14mm (mín 1 e máx. 157).

Quando comparada a mediana da diferença do resultado da VHS entre os métodos, observou-se que o método com EDTA quantificou 9mm (mín. -10 e máx. 32) superior

ao método utilizando citrato de sódio. Esta diferença entre os resultados dos exames dos pacientes quando comparada as duas metodologias de análise pode ser mais bem visualizada no Figura 2.

A realização de um mesmo exame com metodologias diferentes faz com que seja necessário verificar a concordância entre os resultados. Assim, um erro sistemático não altera a correlação, contudo altera a concordância, sendo necessária a análise de Bland-Altman.

A Figura 3 mostra a diferença média de 9,11mm entre os resultados dos métodos e os limites de concordância (24,20mm a -5,98mm). Ademais, não foi observado erro sistemático entre os dois métodos (IC 95% de 6,79 a 11,4).

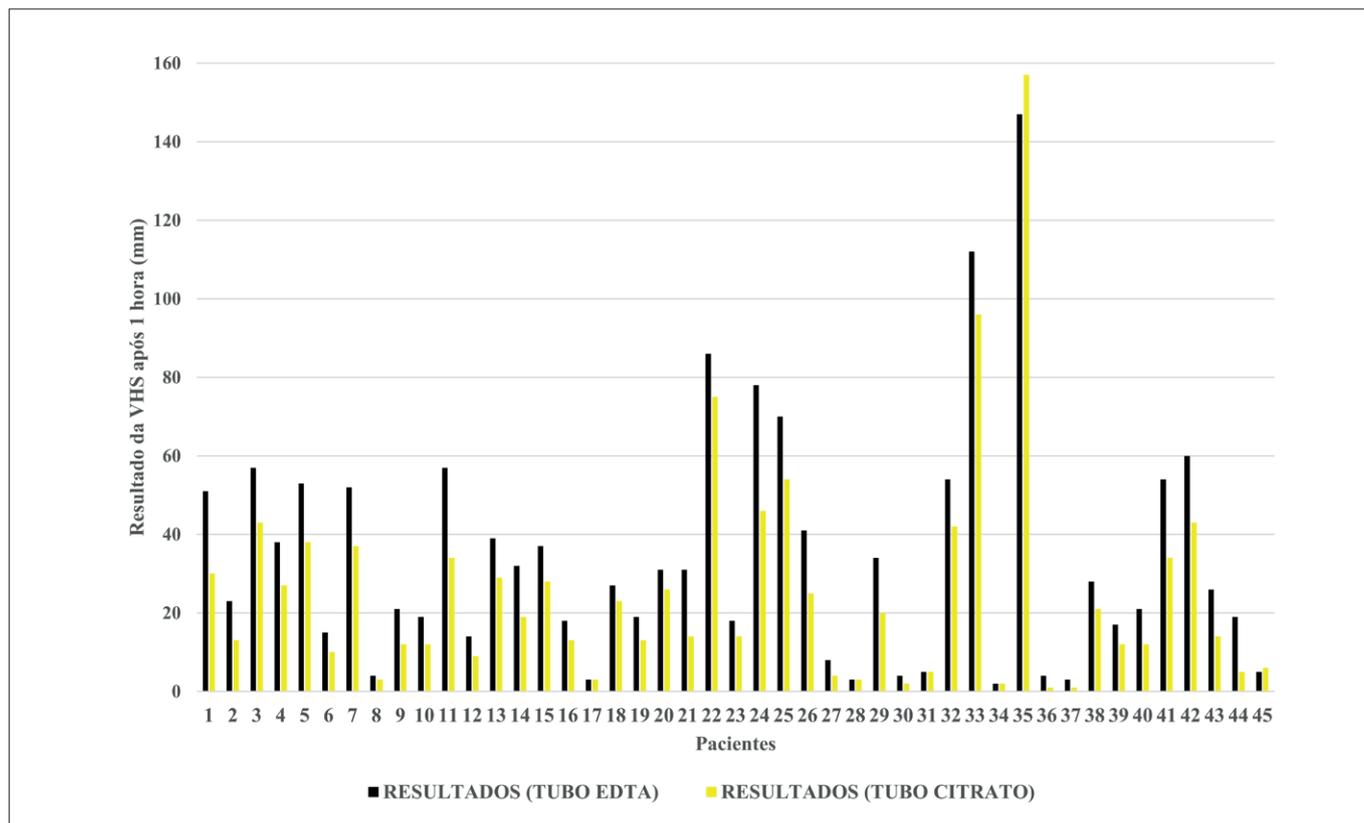


Figura 2. Comparação dos resultados da sedimentação das amostras em EDTA e o método com citrato de sódio 3,2% de todos os pacientes.

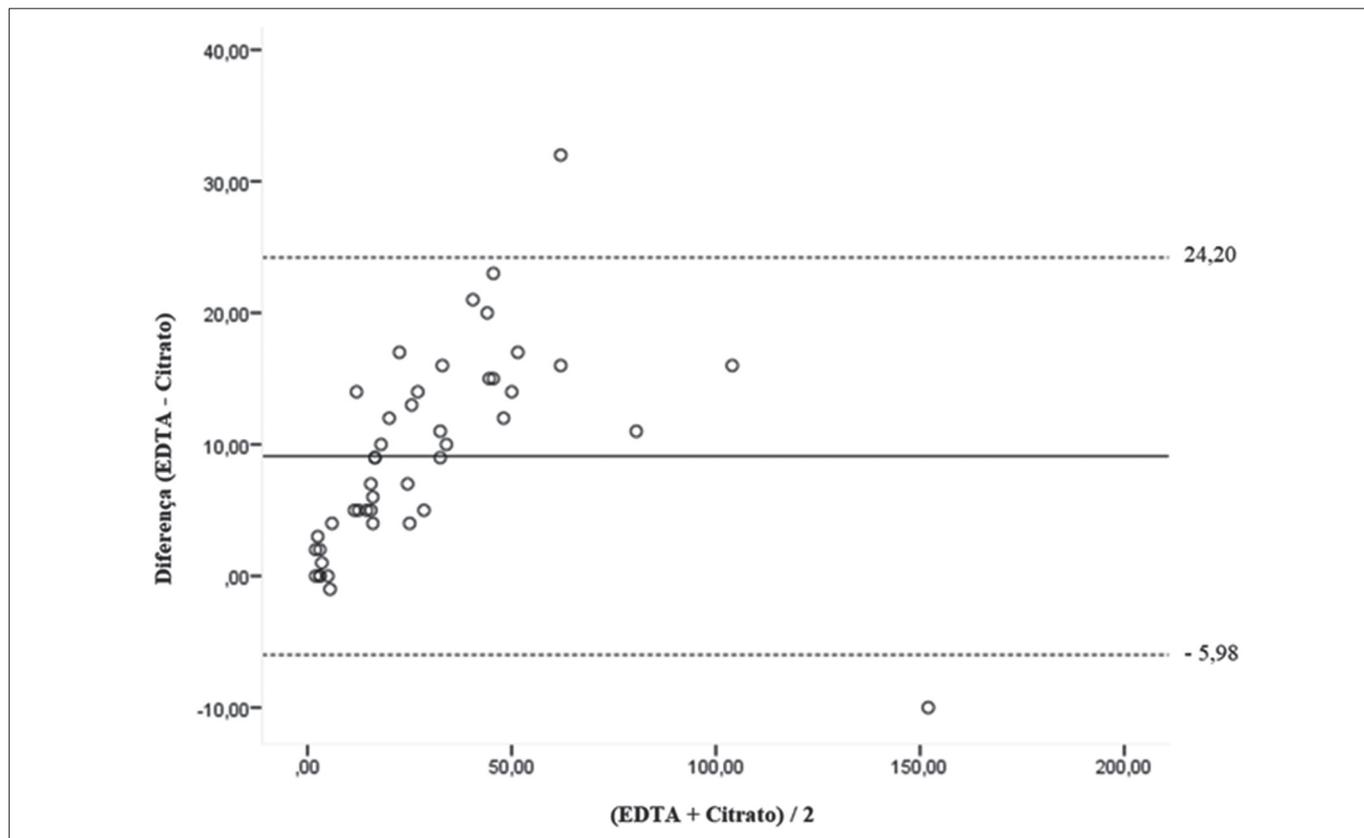


Figura 3. Diferença entre os resultados obtidos pelos dois métodos versus os valores médios dos resultados.

## DISCUSSÃO

O exame de VHS não consiste na medida de um analito, mas sim na medida de um fenômeno físico que depende de muitas variáveis,<sup>(10,11)</sup> algumas das quais podem ocorrer durante a coleta e o processamento das amostras, refletindo um resultado errôneo, como tempo de armazenamento da amostra, tempo de torniquete, técnica de flebotomia, incorreta relação de sangue e anticoagulante, tubos inadequados, amostras contaminadas, medicamentos e variações interlaboratoriais.<sup>(12)</sup>

Sendo assim, os exames devem passar por um processo de validação para que tenha o melhor método de realização do exame para obtenção de resultados confiáveis. Em média, 2/3 dos laboratórios de análises clínicas utilizam métodos alternativos ou modificados do padrão ouro na realização do exame de VHS (método de Westergren).

Em pesquisa realizada pelo *International Council for Standardization in Haematology* (ICSH), observou-se que em alguns casos os resultados obtidos por estes métodos alternativos e modificados podem diferir significativamente do observado pelo método de Westergren.<sup>(8)</sup> Neste estudo, observou-se que o nível de sedimentação em milímetros (mm) do método referência de Westergren modificado utilizando citrato de sódio 3,2% é menor quando comparado com o método alternativo utilizando anticoagulante EDTA, com Zscore: -5,29 ( $p = 0,01$ ) e  $R = 0,79$ , demonstrando que há diferença entre ambos os testes na realização do exame de VHS.

Em contrapartida, em estudo realizado por Hachem e colaboradores (2010), que analisou 326 amostras ( $n = 326$ ), em análise estatística evidenciou que não houve diferença entre o método Westergren com o utilizando sangue anticoagulado com EDTA, entretanto demonstrou que para amostras que apresentaram VHS acima de 30mm, os valores de VHS foram maiores, utilizando o método com EDTA quando comparado com o método padrão de Westergren.<sup>(13)</sup>

Merisio e Aiff (2013) apresentaram resultados parecidos, pois também demonstraram diferenças nos resultados do exame de VHS quando utilizado tubo contendo anticoagulante EDTA. Além disso, o estudo sugeriu a utilização apenas da técnica de Westergren na realização do exame.<sup>(14)</sup>

A alteração da sedimentação pode estar correlacionada com o tipo de anticoagulante utilizado para realização da VHS. Pesquisas demonstram que o citrato, nas concentrações empregadas no método de Westergren, possui capacidade de um retardamento na velocidade de sedimentação.<sup>(4)</sup>

O ICSH publicou recentemente um artigo de revisão, em que avaliou mais de 20 artigos de diversos países para a padronização do exame de VHS. Descreveu que houve grandes diferenças entre os métodos de Westergren e os não baseados em Westergren, e que alguns laboratórios apresentaram diferenças superiores a 40% nos resultados

do exame quando comparados, sendo que a maior diferença observada foi de 142%.<sup>(9)</sup>

O estudo realizado pelo ICSH concluiu que mesmo 120 anos após, o método de Westergren continua sendo o padrão ouro na realização do exame, entretanto os laboratórios podem adaptar os métodos de realização, porém devem validar o teste para que seja empregado adequadamente.<sup>(9)</sup>

Diante dos fatos, faz-se necessária compreensão e esclarecimento das possíveis diferenças apresentadas pelas metodologias utilizadas atualmente. Ressalta-se que um erro sistemático não altera a correlação, entretanto altera a concordância e, portanto, a utilização de diferentes metodologias faz com que seja relevante verificar a concordância entre os resultados obtidos.<sup>(15)</sup>

## CONCLUSÃO

Como observado neste estudo, houve grande diferença nos resultados quando comparado o método utilizando anticoagulante EDTA e o que utiliza o citrato de sódio nos exames de Velocidade de Hemossedimentação (VHS). Deste modo, sugere-se o método de Westergren modificado na realização do exame, uma vez que apresenta maior semelhança com o método padrão ouro. Além disso, com a padronização do melhor método de realização do exame, gerará resultados mais confiáveis, refletindo de forma positiva na rotina hospitalar, uma vez que o médico necessita de resultados precisos para determinação da intervenção terapêutica nestes pacientes oncológicos.

## SUPORTE FINANCEIRO

Fundação Cristiano Varella- Hospital do Câncer.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Prof<sup>a</sup> Dra. Luciana de Andrade Agostinho, que nos ajudou na análise estatística do trabalho, e ao Hospital do Câncer, Fundação Cristiano Varella (FCV), por ter disponibilizado os dados utilizados para a construção do trabalho.

### Abstract

*Introduction: The erythrocyte velocity test (ESR) the distance at which erythrocytes fall within 60 minutes in a vertical tube. Objective: to compare two methods of performing the ESR test in an oncology hospital. Material and methods: 5-6 mL of blood were collected from 45 patients transferred to two tubes with anticoagulant. The blood from both tubes was transferred to a glass pipette with a 200mm capacity and 2.5mm internal diameter, which was adapted on a vertical support, waiting for 1 hour. The results obtained by the SPSS version 25 program. Results: The level of sediment in mm (mm) of the Westergren reference method modified using sodium citrate 3.2% is lower when compared to the alternative method using EDTA anticoagulant, with Z score: -5.29 ( $p = 0.01$ ) and  $R = 0.79$ . Discussion: The International Council for Standardization in Hematology (ICSH), layouts that greatly differ*

between Westergren's methods and those not based on Westergren. *Conclusion: It is suggested to use the modified Westergren method when performing the exam. In addition, with the standardization of the best method of conducting the exam, it will generate better known results, reflecting positively on the hospital routine.*

#### Keywords

Erythrocyte Sedimentation; Neoplasms; Hematologic Tests

## REFERÊNCIAS

1. Collares GB, Vidigal PG. Recomendações para o uso da velocidade de hemossedimentação. *Rev Med Minas Gerais* 2004;14(1):52-7.
2. Grzybowski A, Sak J. A short history of the discovery of the erythrocyte sedimentation rate. *Int J Lab Hematol*. 2012;34(4):442-4.
3. Grzybowski A, Sak JJ. Who discovered the erythrocyte sedimentation rate? *J Rheumatol*. 2011;38(7):1521-2.
4. Dickinson, B. Avaliação da utilização de dois anticoagulantes e tempos diferentes para a realização do VHS, método Westergren. Sistema Vacutainer, 1998.
5. Bedell SE, Bush BT. Erythrocyte sedimentation rate. From folklore to facts. *Am J Med*. 1985;78(6 Pt 1):1001-9.
6. Janson L, Tischler M. *The Big Picture: Medical Biochemistry*. McGraw-Hill, editor 2012.
7. Batiivala SP. Focus on diagnosis: the erythrocyte sedimentation rate and the C-reactive protein test. *Pediatr Rev*. 2009;30(2):72-4.
8. Sox HC Jr., Liang MH. The erythrocyte sedimentation rate. Guidelines for rational use. *Ann Intern Med*. 1986;104(4):515-23.
9. Kratz A, Plebani M, Peng M, Lee YK, McCafferty R, Machin SJ, *et al*. ICSH recommendations for modified and alternate methods measuring the erythrocyte sedimentation rate. *Int J Lab Hematol*. 2017;39(5):448-57.
10. Romero A, Munoz M, Ramirez G. Length of sedimentation reaction in blood: a comparison of the test 1 ESR system with the ICSH reference method and the sedisystem 15. *Clin Chem Lab Med*. 2003; 41(2): 232-37.
11. Ozdem *et al*. Comparison of TEST 1 with SRS 100 and ICSH reference method for the measurement of the length of sedimentation reaction in blood. *Clin Chem Lab Med*. 2006; 44(4): 407-12.
12. Costa V, Moreli M. Principais parâmetros biológicos avaliados em erros na fase pré-analítica de laboratórios clínicos: revisão sistemática. *J Bras Patol Lab*. 2012; 48(3): 163-168.
13. Hachem *et al*. Velocidade de hemossedimentação (vhs) sem diluição: metodologia confiável?. *Visão Acadêmica*. 2010, 11(2):67-74.
14. Merisio, P. M. Alff, F. A. Comparativo das Técnicas do Exame de Velocidade de Hemossedimentação (VHS) Descrita por Westergren com Citrato e a Usual com EDTA. *NewsLab*. Ed. 120, 2013.
15. Buck A, Velasquez PG, Düsman E. Análise comparativa das diferentes diluições para avaliação da velocidade de hemossedimentação-vhs. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR, Umuarama*, n.3, v.15, p. 213-218, 2011.

Correspondência

**Tiago César Gouvêa Moreira**

Fundação Cristiano Varella - Hospital do Câncer  
Av. Cristiano Ferreira Varella, Bairro: Universitário, no. 555

E-mail: tiagoocesar@gmail.com

# A interação entre Hb B2, Hb S e beta talassemia: um relato de caso familiar

## The interaction between Hb B2, Hb S and beta thalassemia: a family case report

Raphael de Souza Santos<sup>1</sup>  
João Vinícius Moraes Costa<sup>2</sup>  
Luiz Arthur Calheiros Leite<sup>3</sup>  
Claudia R. Bonini-Domingos<sup>4</sup>

### Resumo

As hemoglobinopatias são doenças hereditárias que incluem talassemia e doença falciforme. O objetivo do presente estudo foi destacar a interação entre a variante Hb S, formas talassêmicas (beta talassemia por IVS1-6) e a variante Hb B2. Os exames realizados foram hemograma completo, eletroforese de hemoglobina em pH ácido e alcalino, dosagem de hemoglobina A2, Cromatografia Líquida de Alta Performance e investigação molecular. Esse relato evidencia a interação entre os polimorfismos de hemoglobina na população brasileira e a necessidade de adequada interpretação dos resultados de testes clássicos para a melhor compreensão dos casos.

### Palavras-chave

Hemoglobinopatias; Talassemia; Polimorfismo Genético; Anemia Falciforme

## INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias são um grupo heterogêneo de doenças genéticas hereditárias caracterizadas por defeitos qualitativos na molécula de hemoglobina (Hb), resultando em variantes por mutações pontuais ou por anormalidades quantitativas nos genes reguladores para a síntese das cadeias polipeptídicas da hemoglobina, como as doenças falciformes e as talassemias, respectivamente.<sup>(1)</sup>

A Hb S é o resultado de uma mutação pontual que leva à substituição de um resíduo de aminoácido na posição seis da subunidade da beta globina ( $\beta 6\text{Glu-Val}$ ) e que, quando herdada em homozigose (Hb SS), causa anemia falciforme. A interação entre Hb S e beta talassemia é uma condição comum decorrente da co-herança de um alelo mutante da hemoglobina S (Hb S) e de outro que carrega um dos alelos mutantes da beta talassemia, sendo representado por Hb S/ $\beta$  tal. Os portadores desta doença falciforme apresentam quadro clínico que varia de anemia levemente sintomática a grave, decorrente da

grande variedade de alelos da beta talassemia mutantes, parcialmente ( $\beta^+$ ) ou totalmente ( $\beta^0$ ) inativos para a produção da cadeia de beta globina.<sup>(2,3)</sup>

Em termos de diagnóstico laboratorial, diferenciar Hb S/ $\beta^0$  de Hb S/ $\beta^+$  apenas pelos valores hematológicos pode apresentar alguma dificuldade, resultante da variabilidade clínica individual. Exames laboratoriais específicos e teste de biologia molecular, com estudo familiar, são necessários para estabelecer heranças e definir o perfil de hemoglobina do paciente.<sup>(4)</sup>

A hemoglobina B2 (Hb B2) é uma variante decorrente da mutação no gene da delta globina, causando a troca de um aminoácido Glicina (Gly) por uma arginina (Arg) na 16<sup>a</sup> posição da cadeia delta globina.<sup>(3,4)</sup> Em portadores da variante Hb B2, os valores de hemoglobina A2 (Hb A2) são reduzidos em razão da síntese de cadeias delta globina mutantes em heterozigose. Além disso, os indivíduos portadores de Hb B2 não apresentam manifestações clínicas significativas, devido ao baixo nível de produção dessa variante e ao conteúdo total de Hb nos eritrócitos.<sup>(5)</sup>

<sup>1</sup> Aluno do Curso de Ciências Biológicas e Bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), UNESP - São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Aluno do curso de Biomedicina do Centro Universitário CESMAC, Maceió, Alagoas, Brasil.

<sup>3</sup> Doutor em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE e professor da pós-graduação lato sensu em Hematologia e Hemoterapia do Centro Universitário Cesmac, Maceió, Alagoas, Brasil.

<sup>4</sup> Professora Doutora Departamento de Biologia, Coordenadora do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), UNESP - São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Recebido em 11/05/2021

Aprovado em 02/03/2022

DOI: 10.21877/2448-3877.202202142

O objetivo do presente estudo foi descrever um caso de interação entre Hb S/ $\beta$  tal e Hb B2 em um núcleo familiar de uma criança que teve o diagnóstico primário de anemia falciforme realizado por meio de testes de triagem neonatal.

## RELATO DE CASO

Criança do sexo masculino, 1 ano e 9 meses, miscigenada, acompanhada em centro de referência em triagem neonatal, após diagnóstico prévio de anemia falciforme pelo Programa de Triagem Neonatal no Brasil. Clinicamente, a criança apresentava crises dolorosas, infecções recorrentes desde o nascimento e recebia transfusões de hemácias esporadicamente. Diante da constatação de divergência entre o quadro clínico apresentado pela criança e o esperado

para a anemia falciforme, foi solicitado estudo genético da família (pai, mãe e filho), para elucidar o diagnóstico inicial. As amostras de sangue foram submetidas a testes iniciais de triagem para hemoglobinopatias e, posteriormente, foram submetidas à confirmação do perfil eletroforético e cromatográfico por cromatografia líquida de alta performance (HPLC-BIORAD®) e pesquisa de mutações por biologia molecular. A Tabela 1 mostra o resumo dos resultados obtidos na análise das amostras.

A criança apresentava perfil eletroforético de hemoglobina em pH alcalino e ácido compatível com Hb SS mais F (Figura 1). Porém, ao comparar o perfil eletroforético da criança e dos pais, pudemos observar, no perfil de hemoglobina do pai, uma pequena fração, na posição de anidrases carbônicas, sugestiva da variante da globina de cadeia delta.

Tabela 1 – Resultados laboratoriais da família.

Testes laboratoriais	Pai	Mãe	Filho
Morfologia eritrocitária	++	N	+++
Resistência osmótica (NaCl a 0,36%)	+	-	+
Eletroforese em pH alcalino	Hb AA+B2	Hb AS	Hb SF
Eletroforese em pH ácido	Hb AA	Hb AS	Hb SF
HPLC	Hb AA+B2	Hb AS	Hb SF
Análise molecular	Talassemia b(IVS1-6) + Hb B2	AS	S/ $\beta$ talassemia (IVS1-6)

HPLC, Cromatografia líquida de alta performance. Morfologia eritrocitária (++/- microcitose e hipocromia, +++ microcitose, hipocromia e poiquilocitose). Resistência osmótica em solução de NaCl a 0,36% (+ positivo, - negativo).

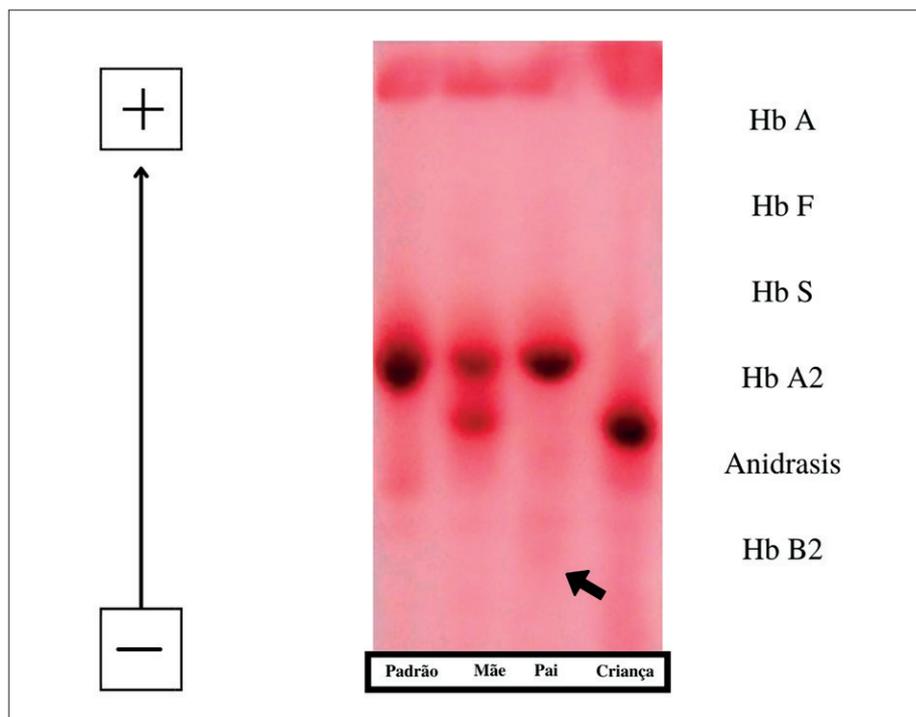


Figura 1. Perfil de hemoglobina eletroforética em acetato de celulose, pH alcalino, corado com Ponceau. Padrão: Amostra com perfil de hemoglobulina normal (Hb AA). A seta indica a fração referente à Hb B2.

O cromatograma do filho mostrou o perfil de Hb S (84,9% com tempo de retenção compatível para esta variante) (Figura 2C), Hb A2 (7,9% eluindo com a fração de Hb S acetilada), Hb A<sub>0</sub> (2,0%) e Hb F (5,5%). Ao avaliar o perfil dos pais, foi encontrado um perfil de Hb S heterozigoto na mãe, com Hb A<sub>0</sub> (51,2%), Hb A2 (4,5% eluindo com Hb S acetilada e, portanto, com valores dentro da faixa normal), Hb F (0,8%) e Hb S (38,4%). O perfil cromatográfico da mãe pode ser visto na figura 2A. O pai apresentava um perfil de Hb AA associado à variante da cadeia delta globina (Hb B2) com os valores percentuais de Hb A<sub>0</sub> (84,0%), Hb F (0,2%), Hb A2 (3,3%) e Hb B2 (2,3%); conforme mostrado na figura 2B.

A investigação molecular de mutações hereditárias mostrou a presença de Hb S em heterozigose para a mãe. Para o pai, o valor da Hb A2 adicionado ao valor percentual da variante do alelo delta globina, mostraria um valor para essa fração, acima do limite normal, sugerindo beta talassemia heterozigótica. Assim, investigou-se a presença das quatro mutações mais frequentes da beta talassemia na população brasileira, mostrando heterozigosidade para a mutação IVS1-6 associada à heterozigosidade para a variante de cadeia delta, a Hb B2. O perfil molecular da criança foi confirmado pela presença de Hb S associada à beta talassemia (IVS1-6), justificando assim a clínica mais

branda. Foi afastada a herança de alfa talassemia por testes citológicos de rotina e por análise molecular das principais mutações no Brasil.

## DISCUSSÃO

Considerando que a população brasileira é miscigenada devido ao fluxo migratório de seus grupos populacionais formadores e que os métodos utilizados para identificar variantes de hemoglobina e talassemia na fase neonatal não permitem a identificação completa das interações entre essas diferentes hemoglobinas anormais; faz-se necessário o uso de métodos mais precisos com treinamento técnico específico para identificar as interações menos frequentes da hemoglobina. Assim, este artigo pode contribuir para a elucidação diagnóstica e orientação clínica dos casos que apresentam interações entre hemoglobinas anormais não detectadas no teste de triagem neonatal.

A interação entre Hb S/ $\beta$  tal caracteriza a doença falciforme, bastante comum em nossa população, devido à contribuição dos grupos originais na sua formação, principalmente em regiões onde o fluxo migratório de mediterrâneos e africanos foi intensificado. No diagnóstico laboratorial, a Hb S/ $\beta$  tal apresenta diminuição dos níveis do volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM),

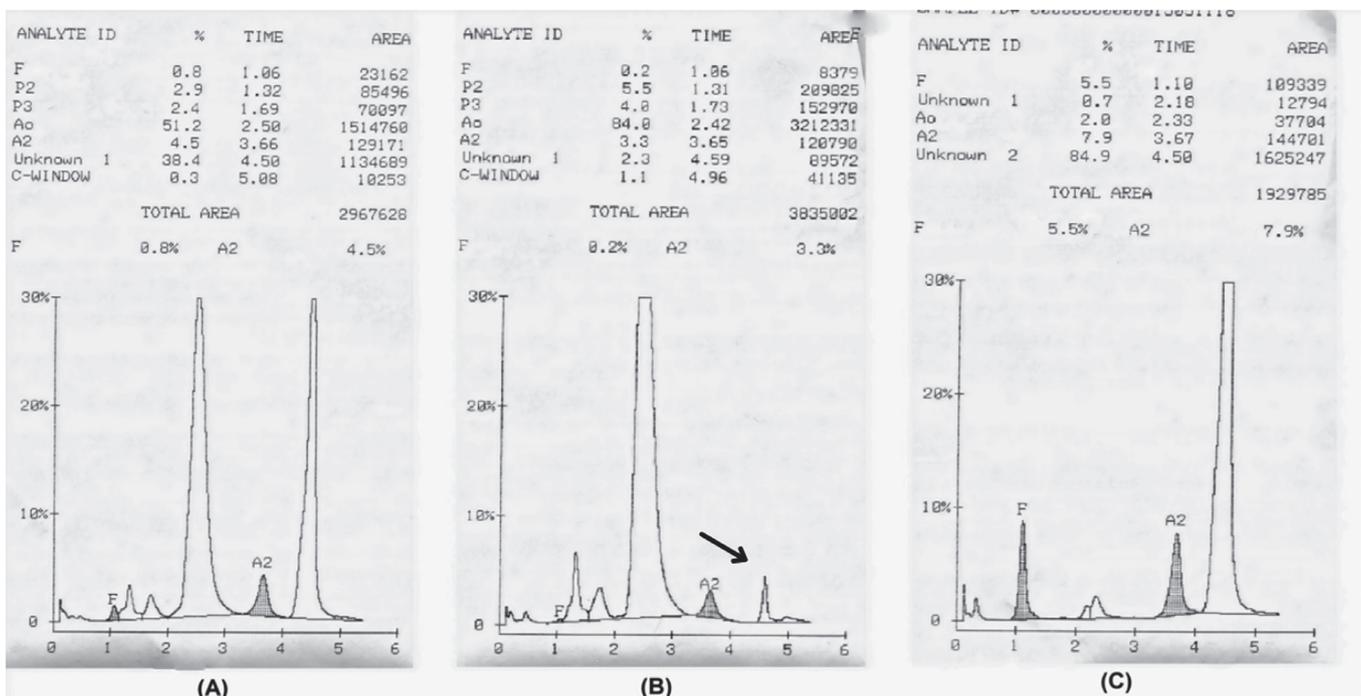


Figura 2. Cromatogramas de cada membro da família, obtidos por equipamentos de HPLC automatizado e kit diagnóstico para variantes e talassemia (BIORAD®).

Em A – perfil cromatográfico e valores percentuais das frações de hemoglobina obtidas na amostra da mãe; Em B – análises da amostra do pai; em C – análise da amostra da criança.

caracterizando uma anemia microcítica hipocrômica, sendo necessários métodos complementares para obtenção do perfil hereditário. A associação de metodologias eletroforéticas e cromatográficas permite a separação de proteínas, com boa resolução, como evidenciado no presente relato de caso.

A migração de hemoglobinas anormais com posições semelhantes pode resultar em um problema no diagnóstico laboratorial, principalmente na associação entre anemia falciforme e talassemia, bem como nos dados hematológicos. Os testes de triagem e o estudo eletroforético convencional não são capazes de distinguir essa interação, sendo necessário um estudo familiar e molecular para confirmação diagnóstica.

<sup>(2)</sup> Outro estudo mostra que os índices hematimétricos da população duplo heterozigótica, como entre Hb S e Hb B<sub>2</sub>, nem sempre mostram a presença de anemia.<sup>(6)</sup>

Khalil MSN *et al.*,<sup>(6)</sup> 2014 determinaram o espectro mutacional do gene delta globina na população do Reino Unido, e 77% dos casos avaliados foram considerados heterozigotos para a variante de cadeia delta, Hb B2. A hemoglobina foi relatada como a variante da cadeia delta mais comum, observada em quase 1% dos afro-americanos. A origem étnica dos casos foi descrita como afro-caribenha, indígena ou africana. O pico de Hb A2 para esses pacientes teve um tempo de retenção do HPLC entre 4,58 e 4,62 minutos, o que sugere que o HPCL pode ser usado para fazer um pré-diagnóstico da variante anormal, antes da confirmação por técnicas moleculares.

Os resultados do estudo de Khalil MSN *et al.* 2014,<sup>(6)</sup> reafirmam a importância de se considerar cuidadosamente o perfil do cromatograma, obtido por HPLC, nos casos com pico de Hb A2 dividido ou com valor de Hb A2 baixo, com índices hematimétricos diminuídos para evitar um diagnóstico incorreto de traço de beta talassemia. Eles também enfatizam a importância de validar os casos suspeitos por análise molecular.

A Hb B2 pode ser confundida ou identificada como Hb A2 e é uma variante silenciosa da cadeia da globina delta com uma frequência de 9,2% em Bantus sul-africanos e entre 1% e 3% em afro-americanos. Na Amazônia brasileira a frequência desta variante correspondeu a 1% dos caucasoides.<sup>(7)</sup>

Um equívoco bastante comum em testes laboratoriais reside no fato de serem observados os perfis eletroforéticos ou cromatográficos, e não atentar para os valores percentuais e/ou frações minoritárias como a da Hb B2, que interferem nas demais frações e no perfil genético herdado. Valores diminuídos de Hb A2 devem sempre ser objeto de observação cuidadosa, tanto pela herança da alfa talassemia e outras variantes de Hb, como a Hb B2, quanto para perfis de ferro diminuídos, que interferem na produção de todas as hemoglobinas, incluindo aquelas frações que são patognomônicas para diagnósticos mais frequentes.<sup>(8-10)</sup>

A observação cuidadosa de pequenas frações e/ou picos cromatográficos deve ser uma rotina a ser incorporada na prática laboratorial, pois informações importantes podem ser perdidas no diagnóstico.

Ressaltamos também que o olhar atento do clínico quanto ao que esperar da pessoa com hemoglobinopatias e a boa integração com os laboratórios e seus profissionais possibilitam a troca de conhecimentos que facilita a elucidação de casos difíceis e, posteriormente, a orientação adequada para cada caso. O estudo da família é essencial nos casos de heranças complexas dessas proteínas, como a que relatamos neste trabalho.

Os diferentes tipos de associação genética da Hb S, com ênfase na homozigose (Hb SS), interação com beta talassemia, interação com alfa talassemia (Hb SH) e dupla heterozigiosidade (Hb SC e Hb SD, principalmente), requerem métodos complementares (eletroforese em pH-ágar ácido, dosagem de Hb fetal, teste de Hb H) e, em particular, o eritrograma, perfil cromatográfico e pesquisa de mutação para estabelecer o diagnóstico real e assim prever o prognóstico para o indivíduo.<sup>(11)</sup>

Nesse caso específico, a observação clínica do desenvolvimento da criança e o perfil de hemoglobina obtido inicialmente pelos pais já alertavam para uma possível complicação no diagnóstico laboratorial. A criança foi identificada como portadora de anemia falciforme pela presença de Hb SS (SIC) com uma semana de vida (na triagem neonatal). Como não respondeu clinicamente conforme o esperado, novos exames foram realizados, inclusive de seus pais, e os perfis não eram compatíveis para o caso. A investigação aprofundada permitiu o esclarecimento diagnóstico da criança e dos pais, amenizando estresses socioemocionais por diagnósticos equivocados. Os valores percentuais das frações de hemoglobina da criança sugerem a interação da Hb S com a beta talassemia. Porém, o pai foi considerado portador de hemoglobina normal (Hb AA), o que não foi comprovado após a identificação da interação da talassemia  $\beta^+$  (IVS1-6) e variante de cadeia delta (Hb B2), colocando a hemoglobina A2 dentro da normalidade e justificando a discreta microcitose e hipocromia. O perfil mais facilmente identificado foi o da mãe (Hb AS), heterozigota para Hb S.

Com a descrição deste caso, pretendemos chamar atenção para as diferentes nuances do fenótipo da hemoglobina e o quanto a variabilidade genética populacional pode contribuir para a presença de formas interativas.

## CONCLUSÃO

Ressaltamos que a identificação das hemoglobinas variantes menos comuns requer uma análise minuciosa com a associação de dados clínicos e diferentes metodologias laboratoriais precisas.

**Abstract**

*Hemoglobinopathies are a hereditary disease that includes thalassemia and sickle cell disease. The present study aimed to show the interaction between the Hb S variant, thalassemia forms (Beta-thalassemia by IVS1-6), and the Hb B2 variant. The tests performed were complete blood count, hemoglobin electrophoresis at acid and alkaline pH, hemoglobin A2 dosage, High-Performance Liquid Chromatography, and molecular investigation. This report highlights the interaction between hemoglobin polymorphisms in the Brazilian population and the need for an adequate interpretation of the results of classical tests for a better understanding of the cases.*

**Keywords**

*Hemoglobinopathies; Thalassemia; Polymorphism Genetic; Anemia, Sickle Cell*

**REFERÊNCIAS**

- Orlando GM, Naoum PC, Siqueira FAM, Bonini-Domingos CR. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2000; 22(2):111-121.
- Figueiredo MS. The compound state: Hb S/beta-thalassemia. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2015; 37(3):150-152.
- Melo-Reis PR, Araújo LMM, Dias-Penna KGB, Mesquita MM, Castro FS, Costa SHN. A importância do diagnóstico precoce na prevenção das anemias hereditárias. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2006; 28(2):149-152.
- Silva LCM, Castro FS. Hemoglobinopatias: Relato de caso familiar. *RBAC.* 2017;49(3):307-11.
- Vinciguerra M, Passarello M, Leto F, *et al.* Coinheritance of a rare nucleotide substitution on the  $\beta$ -globin gene and other known mutations in the globin clusters: management in genetic counseling. *Hemoglobin.* 2016; 40(4):231-235.
- Khaili MSM, Marouf S, Element D, *et al.* A study of  $\delta$ -globin gene mutations in the UK population: identification of three novel variants and development of a novel DNA test for Hb A<sup>2</sup>. *Hemoglobin.* 2014; 38(3):201-206.
- Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med.* 2010; 12:61-76.
- Van Kirk R, Sandhaus LM, Hoyer JD. The detection and diagnosis of hemoglobin A<sup>2</sup> by high-performance liquid chromatography. *Am J Clin Pathol.* 2005;123(5):657-61.
- Torres FR, Ondeí LS, Zamaro PJA, *et al.* Identificação de HbAB2 em dois caucasianos da região amazônica por procedimentos eletroforéticos e cromatográficos. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2005;27(2):138-47.
- Naoum PC, Bonini-Domingos CR. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* [Internet]. 2007; 29(3): 226-228.
- Ferreira N, Zamaro PJA, Bonini-Domingos RR. Interação entre Hb B2 e Hb S. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2010; 32 (1): 80-82.

Correspondência

**Luiz Arthur Calheiros Leite**

Avenida Fernandes Lima, 4º andar, Farol

CEP 57050-000 - Maceió - AL - Brasil

Tel.: (55 82) 3432-3230

E-mail: lahemato@gmail.com



## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [RBAC], criada em 1969, é o órgão oficial de divulgação científica da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas [SBAC]. A RBAC tem circulação trimestral e seus artigos estão indexados no LILACS [Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde].

### NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [RBAC] é publicada em português e inglês e é dedicada à divulgação de pesquisa científica de qualidade metodológica reconhecida, relacionada às várias áreas das análises clínicas e da patologia clínica veterinária.

Ao submeter o original do manuscrito, os autores assumem a responsabilidade do manuscrito não ter sido previamente publicado e nem estar sendo simultaneamente analisado por outro periódico, quer na íntegra ou parcialmente, excetuando-se resumos ou relatórios preliminares publicados em anais de reuniões científicas. Todos os autores deverão assinar e encaminhar a Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais, assumindo formalmente a autoria pelo manuscrito e oficializando a cessão do copyright. A declaração assinada deverá ser remetida sob a forma de documento em “.pdf”. As opiniões, asserções e conclusões emitidas nos manuscritos, bem como a veracidade das informações e citações bibliográficas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

Os autores deverão declarar no manuscrito qualquer potencial conflito de interesse, incluindo aqueles de natureza política e financeira. O documento formal de conflito de interesse é a Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais mencionada acima.

Os autores deverão declarar todas as fontes de financiamento ou suporte público ou privado recebidas para a realização do estudo. No caso de estudos realizados sem recursos financeiros, da mesma forma, os autores deverão declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

Quando a investigação envolver seres humanos, a publicação do manuscrito estará condicionada ao cumprimento irrestrito das diretrizes normativas do Conselho Nacional de Saúde [CNS] e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa [CONEP]. A declaração de que os procedimentos seguidos nos experimentos estão em consonância com os princípios éticos aceitos pelas normativas nacional (Resolução CNS 466/2012) e internacional (Declaração de Helsinki/ World Medical Association) deverá ser explicitamente firmada no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética em Pesquisa [CEP] da instituição responsável pela investigação deverá ser também aí declarado. Uma cópia em “.pdf” da autorização do CEP deverá ser encaminhada juntamente com o manuscrito. Quando se tratar de pesquisa com animais, as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal [CONCEA] e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal [COBEA], bem como do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Institute for Laboratory Animal Research/ National Academy of Science - USA] deverão ser incondicionalmente respeitadas e seu cumprimento também deverá ser declarado, explicitamente, no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais [CEUA] da instituição responsável pela pesquisa deverá ser igualmente declarado e uma cópia em “.pdf” da autorização do CEUA deverá ser, da mesma forma, encaminhada com o manuscrito. Quando os autores forem filiados a instituições não brasileiras, estes deverão declarar no manuscrito o cumprimento de diretrizes normativas e remeter documentação local de mesmo efeito legal.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial de Saúde [OMS], do International Committee of Medical Journal Editor [ICMJE] e do Workshop ICTRP. Desse modo, somente serão aceitos para publicação os artigos de ensaios clínico-laboratoriais que tenham recebido um número de identificação em um dos registros de ensaios clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE. Entidades que registram ensaios clínicos segundo os critérios do ICMJE são: Australian New Zealand Clinical Trials Registry [ANZCTR], International Standard Randomised Controlled Trial Number [SRCTN], Netherlands Trial Register [NTR], UMIN Clinical Trials Registry [UMIN-CTR], WHO International Clinical Trials Registry Platform [ICTRP]. No entanto, o número de identificação obtido no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC (<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>) do Ministério da Saúde [DECIT/MS], Organização Panamericana de Saúde [OPAS] e Fundação Oswaldo Cruz [Fiocruz] é igualmente aceito pela RBAC. O número

de identificação/ identificador primário deverá ser declarado ao final da seção Material e Métodos.

Apenas serão recebidos manuscritos que estejam rigorosamente de acordo com as normas aqui especificadas. Os manuscritos serão avaliados por pareceristas/ revisores indicados pelo Conselho Editorial e/ou, eventualmente, pelos autores. Quando indicados pelos autores, deverá ser informado nome completo dos pareceristas/ revisores, e-mail e instituição de origem. O Conselho Editorial se reserva o direito, no entanto, de acatar ou não a sugestão de pareceristas/ revisores por parte dos autores. A aceitação dos manuscritos será feita em função da originalidade, importância e contribuição científica para o desenvolvimento da área. Manuscritos aprovados poderão sofrer alterações de ordem editorial, desde que não alterem o mérito do trabalho. Manuscritos recusados pelos pareceristas/ revisores serão informados imediatamente aos autores.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* está estruturada em 15 seções ou áreas temáticas, cuja indicação deverá ser feita pelos autores, no momento da submissão do manuscrito, sendo elas:

1. Bacteriologia Clínica
2. Virologia Clínica
3. Micologia Clínica
4. Parasitologia Clínica
5. Imunologia Clínica
6. Bioquímica Clínica e Biologia Molecular
7. Hematologia Clínica e Imunohematologia
8. Citologia Clínica e Anatomia Patológica
9. Boas Práticas de Laboratório Clínico e Biossegurança
10. Gestão e Controle da Qualidade no Laboratório Clínico
11. Bioética e Ética em Pesquisa
12. História da Saúde e Ensino das Análises Clínicas
13. Microbiologia de Alimentos
14. Patologia Clínica Veterinária/ Medicina Veterinária Laboratorial
15. Toxicologia Clínica e Biologia Forense

Os manuscritos poderão ser submetidos dentro das categorias de comunicação científica designadas abaixo:

**ARTIGOS ORIGINAIS:** trabalhos nos quais são informados os resultados obtidos em pesquisas de natureza empírica ou experimental original, cujos resultados possam ser replicados e/ou generalizados. Deverão atender aos princípios de objetividade e clareza da questão norteadora. Os artigos originais deverão ser estruturados de maneira a conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 250 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

**ARTIGOS DE REVISÃO:** trabalhos com avaliações críticas e sistematizadas da literatura sobre um determinado assunto que deverá dar ao leitor uma cobertura geral acerca do tema apresentado. Os artigos de revisão deverão conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract não estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), texto ordenado (títulos e subtítulos), opiniões e conclusões (quando couber) e referências bibliográficas (até 30 referências). O trabalho não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências. Estes trabalhos são escritos a convite do editor.

**ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO:** trabalhos descritivos e interpretativos com base em literatura recente sobre o estado atual de determinado assunto. Os critérios técnicos que deverão ser utilizados são os mesmos definidos para os Artigos de Revisão. Estes trabalhos são também escritos a convite do editor.

**COMUNICAÇÃO BREVE:** trabalhos originais cuja relevância para o conhecimento de determinado tema justifica a apresentação científica de dados iniciais de pequenas séries ou dados parciais de ensaios clínico-laboratoriais. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/abstract estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves/keywords (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

**RELATO DE CASO:** trabalhos com descrição detalhada e análise crítica de casos clínico-laboratoriais atípicos que, pela sua raridade na literatura ou apresentação não usual, merecem uma divulgação e discussão científica. Os relatos de casos deverão conter: título (até 200 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract com contexto e relato contendo descrição, discussão e conclusão (até 200 palavras), introdução, apresentação e relato do caso, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

**NOTA TÉCNICA:** Descrição/ validação de instrumentos, métodos e técnicas. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 200 palavras), introdução, metodologia e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto ordenado (títulos e subtítulos) não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

**RESENHA:** Revisão crítica de obra recém publicada (até 3 anos), orientando o leitor quanto a suas características e usos potenciais. É fundamental que não se trate apenas de um sumário ou revisão dos capítulos da obra, mas efetivamente uma crítica. Este tipo de contribuição está limitado a 6 páginas, incluindo todos os seus elementos. Não há resumo/abstract.

**IMAGENS EM ANÁLISES CLÍNICAS:** máximo de duas figuras com qualidade de 300 dpi gravadas em “.jpg”, “.tif” ou “.png” e até 3 autores e três referências que não deverão ser citadas no texto. As imagens deverão conter título descritivo. O texto deverá conter um máximo de 300 palavras com ênfase na caracterização das figuras. Agradecimentos não deverão ser declarados.

**CARTA AO EDITOR:** correspondências de conteúdo científico com comentários, discussões ou críticas a artigos recentes (dois números anteriores) publicados na *Revista Brasileira de Análises Clínicas* ou ainda com relatos de pesquisas originais, achados técnico-científicos significativos, opiniões qualificadas sobre um tema específico das análises clínicas, bem como menções ou obituários de personalidades da área da saúde e análises clínicas onde deverá ser destacado seu perfil científico e sua contribuição acadêmica e profissional. Os autores de artigos originais citados por terceiros serão convidados a responder aos comentários e críticas a eles dirigidos. Nesta categoria, o texto tem formato livre, mas não deverá exceder 500 palavras e 5 referências.

**EDITORIAIS:** escritos a convite do editor, sob tema específico, mas considerando a área de enfoque da *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. Deverão conter um máximo de 2000 palavras e até 10 referências bibliográficas. Não serão aceitos editoriais enviados espontaneamente.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* avalia manuscritos para publicação em português e inglês. Manuscritos em português devem estar em consonância com a norma culta. A submissão de manuscritos em inglês é **enfaticamente** estimulada pelo Conselho Editorial. Quando neste idioma, recomenda-se a revisão por profissional que tenha o inglês como primeira língua e de preferência, familiarizado com a área do trabalho. O Conselho Editorial, caso considere necessário, poderá enviar os manuscritos submetidos em inglês para um revisor do idioma, repassando os custos aos autores, após a autorização expressa dos mesmos. em inglês para um revisor do idioma, repassando os custos aos autores, após a autorização expressa dos mesmos.

A estrutura geral do manuscrito deverá acompanhar a normalização técnica conforme o quadro abaixo.

ESTRUTURA DOS ARTIGOS	
Português	Inglês
<b>Título Completo</b> <i>Incluir versão em Inglês</i>	<b>Complete Title</b> <i>Incluir versão em Português</i>
<b>Título Corrido</b> <i>Incluir versão em Inglês</i>	<b>Running Title</b> <i>Incluir versão em Português</i>
<b>Autores</b>	<b>Authors</b>
<b>Resumo</b> <i>Incluir versão em Inglês</i>	<b>Abstract</b> <i>Incluir versão em Português</i>
<b>Palavras-Chave</b> <i>Incluir versão em Inglês</i>	<b>Keywords</b> <i>Incluir versão em Português</i>
<b>Introdução</b>	<b>Introduction</b>
<b>Material e Métodos</b>	<b>Material and Methods</b>
<b>Ética</b>	<b>Ethics</b>
<b>Resultados</b>	<b>Results</b>
<b>Discussão</b>	<b>Discussion</b>
<b>Conclusão</b>	<b>Conclusion</b>
<b>Conflito de interesse</b>	<b>Conflicts of Interests</b>
<b>Suporte Financeiro</b>	<b>Funding Sources</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>Acknowledgements</b>
<b>Referências</b>	<b>References</b>

**TÍTULO COMPLETO:** Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho. Recomenda-se iniciar pelo termo que representa o aspecto mais relevante da pesquisa com os demais termos em ordem decrescente de importância. O título não deverá conter nenhuma abreviatura e os nomes das espécies ou palavras em latim deverão vir em letras minúsculas (excetuando-se, quando for o caso, a primeira letra da palavra) e em itálico.

**TÍTULO CORRIDO:** Deverá ser resumido e conter a ideia central do trabalho.  
**AUTORES:** Os nomes completos dos autores por extenso, graus acadêmicos e filiação institucional deverão ser mencionados. O nome completo, endereço profissional, telefone e e-mail do autor responsável pelo manuscrito deverá ser especificado.

**RESUMO:** Deverá ser redigido de forma impessoal, bem como ser conciso e claro, pondo em relevo, de forma precisa, os fatos de maior importância encontrados e as conclusões obtidas. Deverá ser elaborado ainda de forma estruturada, contendo introdução, objetivos, material e métodos, resultados, discussão e conclusões. Referências não deverão ser citadas e o emprego de acrônimos e abreviaturas deverá ser limitado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Deverão ser indicados termos que permitam a identificação do assunto tratado no trabalho. As palavras-chaves deverão ser extraídas do vocabulário DeCS [Descritores em Ciências da Saúde], elaborado pela Bireme, e/ou MeSH [Medical Subject Headings], elaborado pelo NLM [National Library of Medicine]. Os vocabulários DeCS (<http://decs.bvs.br/>) e MeSH (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>) deverão ser consultados, pois nenhuma outra palavra-chave será aceita.

**INTRODUÇÃO:** Deverá apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto. Nesta seção, as citações deverão ser restringidas ao mínimo necessário. A introdução não deverá incluir ainda dados ou conclusões do trabalho em referência. O último parágrafo deverá expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do resumo.

**MATERIAL E MÉTODOS:** Deverão ser apresentados de forma breve, porém suficiente para possibilitar a reprodução e replicação do trabalho. Nesta seção, deverão ser informados o desenho experimental e o material envolvido, bem como deverá ser feita a descrição dos métodos utilizados. Métodos já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referidos apenas por citação. Fontes de reagentes e equipamentos (empresa, cidade, estado e país) deverão ser mencionados. Nomes que são marcas registradas deverão ser também, claramente, indicados. Para melhor leitura e compreensão, subtítulos poderão ser estabelecidos.

**ÉTICA:** Nesta seção, deverá ser declarado, textualmente, o cumprimento da legislação, quando estudos com seres humanos ou animais forem procedidos. Deverá ser mencionado também a aprovação do Comitê de Ética correspondente da instituição a qual pertencem os autores responsáveis pelos experimentos, inclusive, informando, claramente, o número do parecer. O Corpo Editorial da Revista poderá recusar artigos que não cumpram rigorosamente os preceitos éticos da pesquisa.

**RESULTADOS:** Deverão ser apresentados em sequência lógica e com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e acompanhados de gráficos, tabelas, quadros e ilustrações. Os dados constantes nesses elementos gráficos, no entanto, não deverão ser repetidos integralmente no texto, evitando-se, desse modo, superposições. Apenas as informações mais relevantes deverão ser transcritas e enfatizadas.

**DISCUSSÃO:** Deverá ficar restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, procurando, sempre que possível, uma correlação com a literatura da área. Não deverá ser incluída uma revisão geral sobre o assunto. A repetição de resultados ou informações já apresentadas em outras seções, bem como especulações que não encontram justificativa para os dados obtidos deverão ser evitadas.

**CONCLUSÕES:** Deverão ser concisas, fundamentadas nos resultados e na discussão, contendo deduções lógicas e correspondentes aos objetivos propostos. Em alguns casos, poderá ser incluída no item discussão, não havendo necessidade de repeti-la em item a parte.

**CONFLITOS DE INTERESSE:** Deverá ser informada, de maneira explícita, por todos os autores, a existência ou não de conflitos de interesse que podem derivar do trabalho. Não havendo conflitos de interesse, deverá ser escrito “Não há conflitos de interesse”.

**SUORTE FINANCEIRO:** Deverão ser informados todos os tipos de apoio, fomento ou financiamento obtidos para a realização do projeto de pesquisa.

**AGRADECIMENTOS:** Deverão ser curtos, concisos e restritos àquelas pessoas e/ou instituições que colaboraram com auxílio técnico e/ou recursos. No caso de órgãos de fomento, não deverão ser utilizadas siglas.

**TABELAS:** O título deverá ser breve e descritivo, apresentando de maneira precisa seu conteúdo e o contexto (ou amostra) a partir do qual a informação foi obtida. Deverá estar ainda inserido na parte superior da ilustração e ser precedido pela palavra “Tabela”, seguida por um número identificador em algarismos arábicos. A numeração das tabelas deverá ser feita consecutivamente, a partir da ordem de citação no texto. Serão permitidas notas explicativas de rodapé (legendas), indicadas por asteriscos e dispostas ao final da tabela. Para

notas de rodapé, deverá ser utilizado algarismos romanos. As tabelas deverão ser elaboradas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e em sua parte inferior e sem linhas verticais. Não deverão ser utilizadas também linhas horizontais internas. Os dados das tabelas deverão ser digitados em tamanho 10 e com minúsculas, excetuando-se as letras do início das palavras e as siglas. Nas tabelas, deverá ser empregado espaçamento entrelinhas 1,5, sem qualquer forma de tabulação ou recuos de parágrafos. O comprimento da tabela não deverá exceder 55 linhas, incluindo título, e apresentar largura máxima de 17cm. Os dados apresentados em tabelas não deverão ser repetidos em gráficos. As tabelas deverão ser compostas em programa Word ou MS-Excel e enviadas em arquivo separado. Deverá ser evitado um número excessivo de tabelas.

**FIGURAS:** Todas as ilustrações que não se enquadram no conceito de tabela são consideradas figuras, portanto: quadros, gráficos, desenhos, imagens e fotografias. Deverão ter um título breve e descritivo, disposto em sua parte inferior. Deverão ainda ser numeradas com algarismos arábicos, consecutivamente, na ordem de aparecimento no texto e citadas como figuras. As figuras deverão ter boa resolução (mínimo de 300 dpi), ser gravadas em formato “.jpg”, “.tif” ou “.png” e medir no mínimo 12 x 17cm e no máximo 20 x 25cm. As escalas deverão ser indicadas por uma linha ou barra na figura e referenciadas, se necessário, na legenda. Os gráficos deverão ser preparados nos programas Microsoft Word ou MS-Excel em formato “.doc”, “.docx” ou “.xls” e não como imagem. Imagens produzidas em software estatístico devem ser convertidas para formato MS-Excel, caso não seja possível converter para formato “.tif”. Ilustrações coloridas somente poderão ser aceitas se os autores assumirem os custos. Os dados apresentados nas figuras não deverão repetir aqueles já descritos nas tabelas. Os locais aproximados onde as ilustrações serão colocadas deverão ser determinados no texto. As figuras deverão ser enviadas em arquivos separados. Não deverão ser enviados um número excessivo de figuras.

**REFERÊNCIAS:** As referências, em todas as categorias de trabalho científico, deverão ser normalizadas de acordo com o estilo Vancouver publicado em *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* [Normas para Uniformização de Manuscritos Submetidos às Revistas Biomédica] pelo *International Committee of Medical Journal Editors [ICMJE]* (<http://www.icmje.org>) e que pode ser consultado em [www.scielo.br/pdf/rbc/v35n6/v35n6a14.pdf](http://www.scielo.br/pdf/rbc/v35n6/v35n6a14.pdf) (Versão em Português) ou em [www.icmje.org/urm\\_full.pdf](http://www.icmje.org/urm_full.pdf) (Versão em Inglês). A abreviação dos títulos dos periódicos deverá seguir o recomendado em *List of Journals Indexed in Index Medicus [National Library For Medicine]* (<http://www.nlm.gov/tsd/serials/lji.html>) ou no Portal de Revistas Científicas em Ciências da Saúde [Biblioteca Virtual em Saúde] (<http://portal.revistas.bvs.br/index.php?lang=pt>). Sugere-se incluir aquelas referências estritamente pertinentes à problemática abordada e evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. **A lista das referências deverá ser numerada de acordo com a ordem em que os autores foram citados no texto e não em ordem alfabética.** Deverão ser listados somente os trabalhos consultados e citados no texto. Citações de “resumo”, “dados não publicados”, “comunicações pessoais” ou “no prelo” poderão ser adequadamente mencionados no texto, mas não serão aceitos como referências bibliográficas. A exatidão das referências será de responsabilidade exclusiva dos autores.

As citações e menções no texto de informações colhidas em outras fontes, bem como as referências bibliográficas deverão seguir o exposto abaixo:

**TEXTO:** Deverá ser utilizado em todo o manuscrito o Sistema de Chamada Numérico. Neste sistema, as citações dos documentos deverão ter numeração única e consecutiva, indicada pelo número da referência em expoente e entre parênteses. Os autores serão numerados por ordem de sua citação no texto, independentemente da ordem alfabética. As referências citadas em legendas de tabelas e figuras deverão manter a sequência com as referências citadas no texto. O mesmo trabalho mencionado mais de uma vez deverá manter, sempre que aparecer, o primeiro número a ele atribuído.

#### Observações Gerais:

- Quando houver dois autores, deverá ser utilizada a partícula “e” entre os sobrenomes;
- Quando houver 3 ou mais autores, deverá ser indicado apenas o primeiro sobrenome seguido da expressão latina “et al.”;
- Quando uma entidade, corporação, editores ou projetos editoriais assumirem a responsabilidade integral pelo documento deverão ser indicados/tratados como autores;
- Nomes contendo mais de um sobrenome deverá ser indicado o último sobrenome, sem partícula de ligação como “de” ou “da”;
- Sobrenomes duplos, com hífens ou apóstrofes ou que formem uma expressão deverão ser indicados em seu conjunto;
- Termos relacionados a graus de parentesco (filho, júnior, neto, sobrinho), deverão ser indicados após os sobrenomes e por extenso.

Alguns exemplos de citações:

- **Um/duos autores:** No mesmo ano, Nishimura e Miyajiri<sup>(26)</sup> mudaram a denominação do fungo para *Hortaea werneckii*, em homenagem a Parreiras Horta.
- **Mais de dois autores:** Giannopoulos et al.<sup>(32)</sup> também observaram maior prevalência de NIC 1 em mulheres na faixa etária de 20 a 30 anos enquanto NIC 3 foi mais frequente em mulheres com mais de 50 anos.

- **Autores corporativos:** De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes,<sup>(17)</sup> os sinais e sintomas de hiperglicemia incluem: polidipsia, poliúria, perda de peso, fome exagerada, visão embaçada, infecções repetidas na pele e mucosas, dificuldade na cicatrização de ferimentos, fadiga e dores nas pernas (má circulação).

- **Editores/ Projetos editoriais:** Conforme o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas,<sup>(6)</sup> a meia-vida inicial da anfotericina B é de 24-48 horas e sua meia-vida terminal é de 15 dias.

- **Sem indicação de nome de autor:** O diagnóstico de hipertireoidismo, por sua vez, é dado a partir de resultados baixos de T4 livre e elevados de TSH.<sup>(14)</sup>

**AUTORES:** Os autores deverão ser referenciados por seu sobrenome, tendo apenas a primeira letra em maiúscula, seguido do(s) nome(s) abreviado(s) e sem vírgulas e pontos. **Todos os autores** deverão ser referenciados e separados por vírgulas (o mesmo é válido para livros), apesar do estilo Vancouver recomendar que apenas sejam indicados os 6 primeiros autores, quando o número de autores for maior. Deverão ser dados espaços após as vírgulas.

#### Observações Gerais:

- Quando o documento consultado possuir apenas editores ou compiladores, esta condição deverá ser indicada logo após os nomes dos autores;
- Quando a autoria do documento for de uma organização, a referência deverá ser iniciada diretamente pelo nome da entidade. Se houver mais de uma entidade com subordinação entre elas, estas deverão entrar em ordem decrescente de hierarquia e serem separadas por pontos. Se as entidades não apresentarem subordinação, estas deverão ser separadas por ponto e vírgula;
- Quando o documento consultado não possuir autoria, a referência deverá ser iniciada por seu título;
- Quando o documento consultado for tese, dissertação ou monografia deverá ser empregada a seguinte correspondência entre tipo e grau: tese: doutorado, tese: livre-docência, tese: PhD, dissertação: mestrado, monografia: especialização, monografia: graduação;
- Quando o documento consultado for de natureza jurídica (Constituição Federal ou Estadual, Emenda Constitucional, Medida Provisória, Leis, Decretos, Portarias, Resoluções e Códigos), deverão ser seguidos os padrões de autoria/emissão recomendados pela NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT, 2002), com a apresentação gráfica adaptada ao estilo de Vancouver.

- Toda informação adicionada à referência que for encontrada em alguma fonte que não o documento consultado ou informação complementar à referência com suporte do documento ou tradução de alguma expressão deve ser adicionada entre [colchetes].

**TÍTULO DE ARTIGOS/ DOCUMENTOS:** Os títulos dos artigos/ documentos consultados deverão ser referenciados em letras minúsculas, no entanto, a primeira palavra deverá ser iniciada por letra maiúscula. O texto do título não deverá vir nem em negrito e nem em itálico e deverá ser finalizado por ponto.

**TÍTULO DE PERIÓDICOS/ REVISTAS E ANO:** Os títulos de periódicos/ revistas consultados deverão ser referenciados abreviados e finalizados com ponto. Importante considerar que todos os pontos da abreviatura do título deverão ser eliminados, com exceção do último, empregado para separar o título do ano. Um espaço deverá ser dado entre o ponto colocado ao final do título e o ano. A separação entre ano e volume deverá ser feita com a utilização de ponto e vírgula.

**MÊS, VOLUME, NÚMERO E PÁGINAS:** O estilo Vancouver recomenda que os meses sejam referenciados em inglês e de forma abreviada, independente da língua do texto: *Jan, Feb, Mar, Apr, May, Jun, Jul, Aug, Sep, Oct, Nov, Dec*. No entanto, a RBAC aceita a abreviação em português daqueles manuscritos nesse idioma. Quando o periódico apresentar paginação contínua ao longo de um volume, o mês e o número poderão ser omitidos. Ano, volume, número e páginas deverão ser escritos sem qualquer espaço entre eles. Quando as páginas do artigo consultado exibirem números coincidentes, deverão ser eliminados os números iguais (445-449, utilizar: 445-9).

**EDIÇÃO E LOCAL DE PUBLICAÇÃO:** As edições de documentos consultados deverão ser referenciadas após o título, em algarismos arábicos, seguidas de ponto e da palavra “edição” no idioma que figura na publicação original e de forma abreviada. Quando for a primeira edição, essa não deverá ser indicada. Quando houver a definição do local de publicação, este deverá ser indicado em seguida à edição.

**PARÁGRAFOS:** Quando a referência ocupar mais de uma linha, esta deverá ser reiniciada na primeira posição na linha inferior, sem recuos.

#### Alguns exemplos de referências:

##### Periódicos:

- **Um Autor:** Marques SA. Paracoccidiodomycosis. *Clin Dermatol.* 2012 Nov;30(6):610-5.
- **Mais de um autor:** Lee MY, Telisinghe PU, Ramasamy R. Cervical cancer in Brunei Darussalam. *Singapore Med J.* 2012 Sep;53(9):604-7.
- **Até seis autores:** Okita Y, Narita Y, Miyakita Y, Ohno M, Nagai S, Shibui S. Management of cytomegalovirus infection in a patient with malignant glioma treated with temozolomide and steroids. *Intern Med.* 2012;51(20):2967-71.
- **Mais de seis autores:** Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Córdoba S, et al. *Cryptococcus neoformans-*

*Cryptococcus gattii* Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Nov;56(11):5898-906.

• **Autores pessoais e corporativos:** Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al; Members of LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis*. 2012;16(3):205-42.

• **Volume com suplemento:** Maljaars J, Peters HP, Masclee AM. The gastrointestinal tract: neuroendocrine regulation of satiety and food intake. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Dec;26 Suppl 2:241-50.

• **Número com suplemento:** Komrokji RS, Verstovsek S, Padron E, List AF. Advances in the management of myelofibrosis. *Cancer Control*. 2012; 19(4 Suppl):4-15.

• **Editorial com indicação de autoria:** Tamaoki J, Saito H. Diagnosis, evaluation and monitoring of asthma [editorial]. *Allergol Int*. 2012;61(3):351-2.

• **Editorial sem indicação de título:** Bartels PD. Editorial. *Ugeskr Laeger*. 2012;174(42):2518.

• **Artigo/ Editorial sem indicação de autoria:** Improved and Emerging Gel-free Separation and Detection Methods for Proteomics [editorial]. *Proteomics*. 2012;12(19-20):2902-3.

• **Carta ao editor:** Dettenkofer M, Conrad A. Hand hygiene prevents MRSA transmission [letter]. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(8):139.

• **Artigo com DOI:** Newman TB, Pletcher MJ, Hulley SB. Overly aggressive new guidelines for lipid screening in children: evidence of a broken process. *Pediatrics*. 2012 Aug;130(2):349-52. doi: 10.1542/peds.2012-0481.

• **Autor corporativo:** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of fungal infection associated with injection of methylprednisolone acetate solution from a single compounding pharmacy - United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2012 Oct 19;61:839-42.

#### Livros:

• **Um autor/ mais de um autor:** Stockham SL, Scott MA. Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2011.

• **Autor de obra e de capítulo:** Rey L. Bases da parasitologia médica. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

• **Capítulo:** Rodrigues RMMS, Nogueira MD. Fiscalização de alimentos por análise microscópica. In: Almeida-Muradian LB, Camargo Pentead MV. Vigilância Sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2007. p. 72-80.

• **Responsabilidade intelectual destacada:** Diniz D, Sugai A, Guilhem D, Squinca F, organizadores. Ética em pesquisa: temas globais. Brasília: Editora UNB; 2008.

#### Teses, Dissertações e Monografias:

• **Autor e indicação de grau:** Maranhão FCA. Análise da expressão gênica no dermatófito *Trichophyton rubrum* mimetizando a infecção in vitro: pH e diferentes fontes de carbono regulando genes. São Paulo. Tese [Doutorado em Genética] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; 2008.

#### Eventos Científicos:

• **Anais com indicação de título:** Anais do 5º Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007.

• **Anais com indicação de autoria, trabalho e título:** Neufeld PM, Melhem M, Szescs MW, Santos LH, Dornelas-Ribeiro M, Maia S, et al. Espécies de *Candida* isoladas de pacientes leucêmicos. In: Anais do 5. Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007. p. 314.

#### Órgãos/ Instituições:

• **Um autor corporativo:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.

• **Mais de um autor corporativo:** Fundação Oswaldo Cruz; Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. Relatório de atividades: 2006. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2007.

#### Referências Legislativas:

• **Leis:** Brasil. Lei no. 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 20 set 1990; seção 1.

• **Decretos:** Brasil. Decreto no. 7.580, de 28 de junho de 2011. Regulamenta a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, para dispor sobre a organização do Sistema Único de Saúde - SUS, o planejamento da saúde, a assistência à saúde e a articulação interfederativa, e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 29 jun 2011; seção 1.

• **Portarias:** Ministério da Saúde (Brasil). Portaria no. 2.616, de 12 de maio de 1998. Expede diretrizes e normas para a prevenção e o controle da infecção hospitalar. *Diário Oficial da União* 13 mai 1998; seção 1.

• **Resoluções:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos. *Diário Oficial da União* 14 out 2005; seção 1.

#### Meios Eletrônicos:

• **Periódicos:** Mondelli AL, Niéro-Melo L, Bagagli E, Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Sugizaki MF, Carneiro MV, Villas Boas PJF. *Candida* spp.: manual identification (reference method) and automated identification (Vitek system platform). *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* [periódicos na internet]. 2012 set [acesso em 29 de out 2012]; 18(3). Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v18n3/a11v18n3.pdf>.

• **Referências legislativas:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 306, de 13 de dezembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de saúde [resolução RDC na internet]. *Diário Oficial da União* 10 dez 2004 [acesso em 28 out 2012]. Disponível em: <http://www.unesp.br/pgr/pdf/rdc30604anvisa.pdf>.

• **Eventos Científicos:** Albuquerque P, Kyaw CM, Saldanha RR, Brígido MM, Felipe MSS, Silva-Pereira I. Identification and Characterization of Phase-Specific cDNAs Encoding for Two Hydrophobins in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. In: 4o. Congresso Virtual de Micologia de Hongos Patógenos em América Latina [evento na internet]. 2003 27jun-14jul; Caracas, Venezuela [acesso em 10 jul 2003]. Disponível em: <http://congresomicologia.ucv.ve>.

A tramitação de manuscritos será feita exclusivamente online pelo **GNPapers**, no endereço: [www.gnpapers.com.br/rbac/](http://www.gnpapers.com.br/rbac/). Outras formas de submissão, não serão aceitas.

#### Observações Gerais:

• A comunicação entre os diferentes participantes do processo editorial de avaliação e publicação (autores, revisores e editor) será feita apenas de forma eletrônica pelo GNPapers, sendo o autor responsável pelo manuscrito informado automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status;

• Apenas o autor responsável pelo manuscrito deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema e posterior acesso por meio de login e senha;

• A RBAC comunicará individualmente, por e-mail, a cada autor a sua participação no manuscrito. Caso um dos autores não concorde com sua participação, o manuscrito será recusado;

• O GNPapers atribuirá a cada manuscrito um número de registro e o autor principal será notificado de que o manuscrito está completo e apropriado para iniciar o processo de revisão;

• Pedidos de *fast-track* poderão ser considerados desde que justificados e solicitados por orientadores e/ou coordenadores de programas de pós-graduação ou responsáveis por departamentos, laboratórios, setores ou serviços de instituições públicas ou privadas ou ainda se rigorosamente fundamentados por seus autores. Os pedidos de *fast-track* deverão vir endereçados ao editor da RBAC em documento em papel timbrado da instituição e carimbado por seus superiores hierárquicos.

### MODELO DE DECLARAÇÃO

Declaração de Responsabilidade, Conflitos de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais

Os autores abaixo assinados vimos submeter o artigo intitulado "Título do Artigo" à apreciação do Corpo Editorial da *Revista Brasileira de Análises Clínicas* - RBAC para sua publicação. Nesta oportunidade, declaramos estar de acordo com que os direitos autorais referentes ao artigo em tela tornem-se propriedade exclusiva da RBAC desde sua submissão, sendo vedada a reprodução total ou parcial, em qualquer meio de divulgação, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e concedida pela editoria da RBAC. Declaramos também que o artigo não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros e que seu conteúdo é de inteira responsabilidade dos autores. Declaramos ainda que este é um trabalho original e que não foi publicado anteriormente e nem está sendo considerado para publicação em outro periódico, tanto no formato impresso quanto no eletrônico. Os autores confirmam estar cientes e concordantes com a publicação do artigo na RBAC e afirmam não haver qualquer tipo de conflito de interesse do tema abordado no artigo com pessoas, entidades ou instituições.

Nomes dos autores e assinaturas:

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_
4. \_\_\_\_\_
5. \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

# Catálogo de produtos atualizado!

↓ Confira!  
[pncq.org.br](http://pncq.org.br)

O PNCQ oferece uma ampla linha de amostras para Controle de Qualidade Externo e Interno para Laboratórios Clínicos, Biologia Molecular, Citopatologia, Serviços de Hemoterapia, Toxicologia e Medicina do Trabalho.  
**Acesse o site e faça o download do Catálogo de Produtos PNCQ 2022!**

Confira alguns dos últimos lançamentos em amostras:

- Vitamina D
- COVID-19
- PRO-BNP

Aproveite para conhecer também as ferramentas GRATUITAS disponíveis para nossos Associados.



O PNCQ é acreditado pelo Cgcre do INMETRO como Provedor de Ensaio de Proficiência em conformidade com a ABNT NBR ISO/IEC 17043:2011 sob o número 0013



O PNCQ é acreditado pelo Cgcre do INMETRO como Provedor de Ensaio de Proficiência em conformidade com a ABNT NBR ISO 17034:2017 sob o número 0012



Habilitação ANVISA REBLAS 009 Provedor de Ensaio de Proficiência

Empresa certificada pela ABNT em conformidade com a ABNT NBR ISO 9001:2015 sob o número 23.008/04



 **PNCQ**<sup>®</sup>  
Programa Nacional de Controle de Qualidade

Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

(21) 3172-7100 | 2569-6867

[pncq@pncq.org.br](mailto:pncq@pncq.org.br)

Rua Vicente Licínio, 193 - Tijuca - Rio de Janeiro/RJ  
CEP: 20270-340

 @PNCQoficial

 @pncqoficial



[www.pncq.org.br](http://www.pncq.org.br)