SBAC

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

Brazilian Journal of Clinical Analyses

Volume 54 - N 03 | Ano 2022

ISSN 2448-3877

48º CBAC
Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
Costão do Santinho - Florianópolis
18 a 21 de junho de 2023

Costão do Santinho: benefícios da estadia

Network e Eventos

Os hóspedes do resort aproveitam centenas de atividades exclusivas e ainda possuem a oportunidade de socializar e estreitar laços com os participantes do evento.

Refeições Inclusas

O café da manhã tem uma variedade de pães que saem quentinhos do forno direto para a mesa do restaurante

Restaurante principal:
Nossa Senhora das Ondas

Para os amantes de carne:
Parador Sambaqui

Tarifas especiais

A partir de
10X de
R$ **176,40**
(taxas, bebidas e jantar cobrados à parte)

Quer mais vantagens?
Tarifa diferenciada e possibilidade de pagamento em até 10x no cartão sem juros!

Acesse nosso site e fale conosco
cbac.org.br/hospedagem

Inscreva-se em:
cbac.org.br

SBAC
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

/sbacorg /sbacoficial

Saiba mais e inscreva-se em:
cbac.org.br

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 54 - Número 3 - 2022
Edição online - ISSN 2448-3877

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

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

Editores Associados/*Associate Editors*

Bacteriologia Clínica/*Clinical Bacteriological*
Joseli Maria da Rocha Nogueira

Bioquímica Clínica/*Clinical Biochemistry*
Mauren Isfer Anghebem

Gestão e Controle da Qualidade/*Quality Management and Control*
Flávia Martinello

Hematologia Clínica/*Clinical Hematology*
Júlio Cézar Merlim

Micologia Clínica/*Clinical Micology*
Sarah Gonçalves

Parasitologia Clínica/*Clinical Parasitology*
Lenilza Mattos Lima

Patologia Clínica Veterinária/*Veterinary Clinical Pathology*
Breno Fernando Martins de Almeida
Daniele Silvano Gonçalves

Uroanálise e Líquidos Biológicos/*Uroanalysis and Biological Liquids*
José Antonio Poloni

Corpo Editorial/*Editorial Board*

Adriana Dalpicolli Rodrigues - Brasil
Alessandro Conrado de Oliveira Silveira - Brasil
Ana Cristina Rivas da Silva - Brasil
Andréa Regina de Souza Baptista - Brasil
Andrea Silva - Chile
Carlos Álvarez - Chile
Claudia Regina Bonini - Brasil
Diogo André Pilger - Brasil
Eduardo Álvarez Duarte - Chile
Eleine Kuroki Anzai - Brasil
Jaime Antonio Abrantes - Brasil
Juliane Araujo Greinert Goulart - Brasil
Luis Zaror Cornejo - Chile
Marcos Kneip Fleury - Brasil
Maria Elizabeth Menezes – Brasil
Maria Regina Reis Amendoeira - Brasil
Marilise Brittes Rott - Brasil
Patrício Godoy Martinez – Chile
Patrick Menezes Lourenço - Brasil
Ricardo David Couto - Brasil
Ricardo Luiz Dantas Machado - Brasil
Simone Martins de Castro - Brasil
Tiana Tasca - Brasil
Victor Silva - Chile
Vlademir Cantarelli - Brasil

SBAC
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

DIRETORIA EXECUTIVA/*EXECUTIVE BOARD*

Maria Elizabeth Menezes (SC)
Presidente/*President*

Marcos Kneip Fleury (RJ)
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*

Jorge Luiz Joaquim Terrão (ES)
Tesoureiro Adjunto/*Assistent Treasurer*

Conselho Fiscal/*Fiscal Board*
Titulares/Holders
Juno Damasceno Silva (RJ)
Alverne Passos Barbosa (GO)
Júlio Cézar Merlin (PR)

Suplentes/Alternates
Marcello Ávila Mascarenhas (SP)
Iberê Ferreira da Silva Júnior (MT)
Paulo Roberto Hatschbach (PR)

Endereço para correspondência/*Editorial Office*
Rua Vicente Licínio, 99 - Tijuca - Rio de Janeiro, RJ - Brasil CEP: 20270-902 – Fone: 21 2187-0800 E-mail: rbac@sbac.org.br

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 54/*Volume 54* - Número 3/*Number 3*

Sumário / *Contents*

Editorial / *Editorial*

209 **A história do exame de urina: Idade moderna**
The history of urine examination: Modern age
Neufeld PM

Artigos de revisão / *Review articles*

212 **Os interferentes na fase pré-analítica e analítica na qualidade do exame citológico**
Interferences in the pre-analytical and analytical phase as part of the cytological examination
Ribeiro AM, Lima EA, Balacol CD

220 **Contemporary studies about vaccination against human papillomavirus: descriptive analysis**
Estudos contemporâneos acerca da vacinação contra o papilomavírus humano: uma análise descritiva
Alexandre MM, Jesus RA, Lembi MKS, Teixeira DG, Kawamoto KTVS, Sabec GZ

228 **Biofilme e células persisters: da persistência à resistência microbiana**
Biofilm and persister cells: from persistence to microbial resistance
Abrantes JA, Nogueira JMR

235 **Interferência de medicamentos em exames laboratoriais: uma revisão de literatura**
Drug interference in laboratory tests: a literature review
Souza CL, Mendes LML, Araujo SNO

Artigos originais / *Original articles*

243 **Análise comparativa dos parâmetros de testes rápidos para o diagnóstico de anticorpos Sars-CoV-2**
Comparative analysis of rapid test parameters for the diagnosis of Sars-CoV-2 antibodies
Silveira J, Avila EC, Grando AC

250 **Caracterização da evolução sorológica e clínica de pacientes tratados para COVID-19 em um hospital público: estudo transversal**
Characterization of serological and clinical evolution of patients treated for COVID-19 in a public hospital: a cross-sectional study
Klauck BM, Duarte AF, Viana KF, Menolli RA, Jorge AS

256 **Avaliação multicêntrica de um método livre de purificação para detecção do vírus SARS-CoV-2**
Multicentric evaluation of a free purification method for detecting SARS-CoV-2 virus
Reis RO, Bolzan L, Ambrozio CL, Bragança GC, Garrastazu GD

262 **Sorologia reagente para *Toxoplasma gondii* em bolsas de sangue no período do surto de Toxoplasmose em Santa Maria – RS**
Reagent serology for Toxoplasma gondii *in blood bags in the period of the Toxoplasmose outbreak in Santa Maria – RS*
Pinton DA

267 **Estudo piloto em telecitologia: análise citomorfológica por imagens estáticas**
Pilot study in telecitology: diagnosis by static images
Gonçalves J, Mezzomo LC

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 54/*Volume 54* - Número 2/*Number 2*

Sumário / *Contents*

275 **Associação da qualidade das amostras aos fatores obscurecedores dos exames citopatológicos encaminhados a um laboratório escola de Goiânia, Goiás**
Sample quality association with the obscuring factors of the cytopathological exams sent to a school laboratory in Goiania, Goiás
Rodrigues DD, Santos NF, Bordoni GP, Borges LL, Ribeiro AA

282 **Estudos da correlação de parâmetros clínicos avançados e achados na hematoscopia: granulócitos imaturos (IG%)**
Studies of the correlation of hematimetric parameters and findings in hematoscopy: immature granulocytes (IG%)
Silva AFS, Pimentel RF, Nascimento FRBD

287 **A importância do diagnóstico precoce e os tratamentos apresentados na Anemia Falciforme: Revisão Sistemática**
The importance of early diagnosis and treatment presented in sickle cell anemia disease: Systematic Review
Oliveira DB, Lima JO, Fioco EM, Verri ED, Fabrin SCV

293 **Técnica do "Chop": protocolo inovador de transporte de amostra de plasma fresco congelado para controle de qualidade**
"Chop" technique: innovative protocol for transporting fresh frozen plasma samples for quality control
Estácio AG, Lavareda HRF, Rosário ALF, Brito Junior LC

299 **Resultados histopatológicos frente à presença de ASC-US pela citologia de Papanicolaou no rastreio do câncer cervical**
Histopathological results against the presence of ASC-US by Papanicolaou cytology in the screening of cervical cancer
Machado EP, Fagundes GL, Dec ATS, Ravelli APX

309 **Memory immune response in Dengue: successive exposures modify this profile?**
Resposta imune de memória em Dengue: exposições sucessivas modificam este perfil?
Lacerda JSM, Teodoro JVT, Reis MFA, Silva DAA, Rodrigues Júnior V, Silva MV, Teixeira LAS

Relato de caso / *Case report*

318 **Giant Cell Arteritis – A Case Report**
Arterite de Células Gigantes – Um Relato de Caso
Mesquita-Filho PM, Manzato LB, Varela DL, Rodrigues R, Padua WL, Martini LC, Martio AE, Berres TO

322 **Estudo de caso: *Candida* spp., *Actinomyces* spp. e diagnóstico diferencial**
Case Study: Candida *spp.,* Actinomyces *spp. and differential diagnosis*
Mendonça PC, Rodrigues AS, Ruivo H, Santos AR

Carta ao Editor / *Letter to Editor*

328 **Qual a razão para ainda usarmos máscaras?**
Why do we still wear masks?
Nogueira JMR

330 **Instruções aos autores/*Instructions for authors***

A história do exame de urina: Idade moderna

The history of urine examination: Modern age

Paulo Murillo Neufeld, *PhD* | Editor-Chefe da RBAC

A uroscopia chegou à Idade Moderna completamente desacreditada, em decorrência da atuação de médicos e leigos mal-intencionados que visavam apenas o ganho financeiro e não mediam esforços para enganar e ludibriar pacientes incautos. Já no final da Idade Média, diversos textos foram escritos com o intuito de alertar a comunidade médica acerca dos excessos cometidos por parte dos uroscopistas chalatães. No entanto, na Idade Moderna, sob a influência do Iluminismo e da ciência nascente, o diagnóstico por adivinhação da uroscopia foi dando lugar a uma abordagem mais sistemática com os avanços da química orgânica/ alquimia e a introdução do microscópio óptico.

O exame microscópico da urina, metodologia que se seguiu à uroscopia, só foi possível com a conjuminância de dois eventos técnico-científicos de extrema importância que alteraram completamente não apenas a análise de urina em si, mas também a própria medicina laboratorial: o desenvolvimento de corantes e a invenção do microscópio [1590-91]. Particularmente em relação ao microscópio, os créditos pela invenção têm sido dados aos holandeses Hans Janssen [?-1590] e Zacharias Janssen [1580-1638], pai e filho que trabalhavam na fabricação de óculos e lentes na região de Middleburgh. Hans Janssen, inicialmente, e seu filho Zacharias, posteriormente, fizeram experimentos colocando duas lentes de vidro [objetiva e ocular] nas extremidades de um tubo, e desse modo, conseguiram ampliar imagens [30x] e observar objetos de tamanho muito reduzido. Com o tempo, na medida em que a técnica de fabricação de lentes melhorava, o instrumento por eles inventado [microscópio composto] foi sendo aperfeiçoado e seu poder de ampliação e discriminação foi também sendo melhorado. Inclusive, muito rapidamente, microscópios [e telescópios] tornaram-se disponíveis em toda a Europa.

Ainda sobre a história dos microscópios, Robert Hooke [1635-1703], importante pesquisador inglês, desenvolveu microscópios compostos com potência superior à daqueles inventados pela família Janssen, confeccionados em tubo de metal e formado por partes móveis e constituído de uma lente objetiva, que se localizava perto do objeto a ser visualizado, e uma lente ocular, com a qual se faziam as observações. O foco era ajustado por meio de um parafuso que deslocava o ângulo de observação. Em 1665, Hooke publicou seu livro *Micrographia* que, com grande riqueza de detalhes, descrevia com textos e ilustrações seu microscópio e as diversas estruturas visualizadas por ele. A partir da visualização microscópica da cortiça, Hooke cunhou o nome "célula". Posteriormente, ao entrar em contato com o livro de Hooke, o holandês Antonie van Leeuwenhoek [1632-1723], em 1668, passou a construir microscópios simples de apenas uma única lente pequena e esférica entre duas placas de cobre. Uma ponta afiada de um dispositivo no microscópio segurava o espécime para observação, um parafuso movia a amostra

Recebido em 12/07/2022 | Aprovado em 28/08/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202200092

para a posição em frente à lente e outro parafuso movia para cima ou para baixo para o ajuste do foco. Leeuwenhoek construiu os microscópios com a maior capacidade de ampliação da época, alcançando aumentos acima de 200x. Esse instrumento permitiu a observação de hemácias, espermatozoides, embriões de plantas e microrganismos. A partir de 1673, Leeuwenhoek passou a escrever cartas para a Royal Society, em Londres, detalhando suas descobertas baseadas nos seus microscópios simples.

Com relação à microscopia da urina, observações ocasionais e elementares podem ser rastreadas até a primeira metade do século XVII, ou seja, a apenas algumas décadas depois que os microscópios começaram a circular na Europa. No entanto, foi o astrônomo e naturalista francês Nicolas-Claude Fabri de Peiresc [1580-1637] o primeiro a observar, em 1630, cristais e fragmentos de cálculos renais, empregando um microscópio primitivo. Peiresc, trabalhando com uma "urina de aspecto arenoso", observou uma grande quantidade de estruturas microscópicas que se assemelhavam a "tijolos de arranjo romboidal". Provavelmente, cristais de ácido úrico ou oxalato de cálcio foram, efetivamente, as estruturas visualizadas por ele naquele tempo. Em seu livro *Micrographia*, Hooke também ilustrou com grande rigor descritivo os cristais urinários observados. Em sua "Carta 61" da revista *Arcana Naturae Detecta,* Leeuwenhoek relatou, igualmente, a visualização de cristais em uma gota de urina. Da mesma forma, o médico dinamarquês Georg Hann [1647-1699] publicou suas observações acerca dos cristais urinários na revista alemã *Micellunea Curiosa*.

Interessante notar, contudo, que poucos indivíduos, nesse período, olharam microscopicamente para a urina e quando o fizeram, descreveram apenas cristais, talvez por sua aparência marcante ou pelas limitações técnicas dos microscópios. Achados urinários, todavia, não foram mencionados por importantes microscopistas como Henry Power [1623-1668], Marcello Malpighi [1628-1694], Jan Swammerdam [1637-1680] e nem por Lorenzo Bellini [1643-1704], em seu livro *De Urinis et Pulsibus,* publicado em 1683.

Outros exemplos de ausência de observações microscópicas sobre a urina podem ser encontrados nos trabalhos do pediatra sueco Rosén von Rosenstein [1706-1773], que estudou a nefrite decorrente de escarlatina e que, embora tenha descrito a presença de hematúria, não fez referência à visualização microscópica de hemácias em seus textos. Hemácias também não foram vistas pelo médico italiano Domenico Cotugno [1736-1780], que descreveu e nomeou a "albuminúria", em 1770. Os médicos ingleses John Bostock [1773-1846] e Richard Bright [1789-1858], que desenvolveram estudos sobre a composição da urina, também não relataram a visualização microscópica de hemácias.

Essas omissões acerca da microscopia da urina indicam, de forma bastante clara, que o uso do microscópio com fins diagnósticos não era compreendido ou valorizado, sendo o emprego desse instrumento apenas uma curiosidade ocasional.

Contribuindo para a pouca importância dada à microscopia, as imagens produzidas nesse período apresentavam baixa resolução, com graves desvios e aberrações esféricas e cromáticas. Além disso, essas imagens eram invariavelmente muito difusas, multicoloridas e sobrepostas. Para uma efetiva microscopia diagnóstica da urina, na verdade, haveria a necessidade de instrumentos ópticos de qualidade superior que ainda não existiam naquele momento histórico, o que limitou o uso dos microscópicos na medicina, durante todo o período compreendido entre os séculos XV e XVIII.

Apesar desse quadro adverso, a microscopia de urina para a investigação de mecanismos e manifestações de doença foi proposta por alguns poucos pesquisadores. Nesse sentido, ao

observar, em 1630, aquelas estruturas semelhantes a "tijolos romboidais" mencionadas anteriormente, Peiresc procurou correlacionar a sensação dolorosa informada por alguns pacientes durante o ato de micção com a presença desses elementos na urina. Herman Boerhaave [1668-1738], médico e naturalista holandês, hipocrático e fundador da "medicina da beira do leito", utilizou o microscópio para também avaliar se a urina de indivíduos saudáveis e com histórico negativo de urolitíase continha precursores de cálculos urinários. Para tanto, ele avaliou amostras em diferentes intervalos de tempo, lançando mão de diferentes tipos de microscópios. À microscopia, Boerhaave observou a presença de elementos descritos como corpúsculos semelhantes a flocos de lã, estruturas fibrinosas ou estriadas e fragmentos farináceos. Após 24 horas de repouso, cristais surgiram no fundo do frasco. Essa observação cuidadosa e detalhada levou o médico holandês a concluir que a urina normal continha, de fato, precursores de cálculos renais [*Nascitur enim calculus ex omini urina sana*].

Uma abordagem clínica foi também tentada por Domenico Gusmano Galeazzi [1686-1775], médico anatomista italiano que, tratando uma paciente que apresentava pele, suor e urina enegrecidos, ao proceder a microscopia urinária buscou correlacionar os achados microscópicos, representados por glóbulos extremamente diminutos misturados a cristais aciculares, à sintomatologia observada. No entanto, esses achados microscópicos não permitiram que Galeazzi chegasse a uma conclusão plausível pela falta de conhecimento sobre fisiopatologia e pela ausência de efetiva conexão com a clínica.

Por fim, Henry Baker [1698-1774], naturalista inglês, e Martin Frobenius Ledemüller [1719-1769], naturalista alemão, foram autores de inúmeros livros ilustrados baseados em análises microscópicas de amostras biológicas. Ledemüller, inclusive, ao analisar a urina, observou que os sais pareciam variar de acordo com o que o indivíduo ingeria e que diferentes estruturas microscópicas poderiam ser observadas em períodos de tempos diferentes no mesmo indivíduo. Esses estudos foram publicados entre os anos de 1760 e 1762, em seu livro *Mikroskopischer Gemüts und Augen Ergötzung*, composto por 3 volumes, sob o título *Ein Tropfen Urin*.

Na verdade, a análise microscópica da urina só chamaria mais atenção da comunidade médica internacional e ganharia uma perspectiva mais científica e de apoio diagnóstico cerca de duzentos anos após a invenção do microscópio, quando os primeiros estudos sobre o tecido renal surgiram.

BIBLIOGRAFIA

Antic T, DeMay RM. The fascinating history of urine examination. J Am Soc Cytopathol. 2014; 3(2):103-107.

Armstrong JA. Urinalysis in Western culture: a brief history. Kidney Int. 2007; 71(5):384-7.

Cameron JS. A history of urine microscopy. Clin Chem Lab Med. 2015; 53 (Suppl 2): s1453-64.

Eknoyan G. Looking at the urine: the renaissance of an unbroken tradition. Am J Kidney Dis. 2007; 49(6):865-72.

Fogazzi GB, Cameron JS. Urinary microscopy from the seventeenth century to the present day. Kidney Int. 1996; 50 (3):1058-68.

Fogazzi GB, Cameron JS, Ritz E, Ponticelli C. The history of urinary microscopy to the end of the 19th century. Am J Nephrol.1994;14 (4-6): 452-7.

Kampmann J & Ann-Kathrine Schou Teglgård AKS. Urininspektionens historie fra uroskopi til urinanalyse. Ugeskr Læger 2017;179 (50): V69574.

Magiorkinis E, Diamantis A. The fascinating story of urine examination: From uroscopy to the era of microscopy and beyond. Diagn Cytopathol. 2015; 43 (12): 1020-36.

Voswinckel P. From uroscopy to urinalysis. Clin Chim 2000; 297 (1-2): 5-16.

Os interferentes na fase pré-analítica e analítica na qualidade do exame citológico

Interferences in the pre-analytical and analytical phase as part of the cytological examination

Aliny Morgana Ribeiro[1], *Elaine Araújo Lima*[1], *Carmem Damasceno Balacol*[1]

[1] Citopatologia Clínica com Ênfase no Trato Genital Feminino. Belém, PA, Brasil.

Resumo

O câncer de colo do útero está associado à infecção pelo papilomavírus humano – HPV, dos subtipos oncogênicos (HPV-16 e HPV-18). Para prevenir e rastrear o câncer de colo do útero é realizado o exame de Papanicolaou corretamente e com segurança, seguindo os procedimentos das fases pré-analítica e analítica, como: identificação do material, apresentação dos epitélios na lâmina, fixação, coloração, transporte das amostras, capacitação dos profissionais e obtenção do controle de qualidade. Este trabalho tem como objetivo apontar possíveis falhas na fase pré-analítica do exame. Trata-se de uma revisão bibliográfica, com aquisição de artigos do Instituto Nacional do Câncer (INCA), LILACS, SciELO, PubMed, Google acadêmico, além de livros e revistas cientificas. Para garantir a qualidade do exame é realizado um controle de qualidade para detectar, corrigir, minimizar erros e aperfeiçoar o teste. Este trabalho evidencia a necessidade da capacitação, qualificação e atualização dos profissionais e a relevância da implantação de um programa de controle de qualidade em citopatologia.

Palavras-chave: Neoplasias do colo do útero; exame preventivo; Papanicolaou; coleta de PCCU; citopatologia.

Abstract

Cervical cancer is associated with infection by the Human Papillomavirus – HPV, of the oncogenic subtypes (HPV-16 and HPV-18). To prevent and track cervical cancer, a test called Pap smear is performed and to be correctly and safely performed, there are processes that must be done in the pre-analytical and analytical phase, such as: identification of the material, presentation of the epithelia on the slide, fixation, coloration, transport of samples, training of professionals and obtaining quality control. This work aims to point out possible flaws in the pre-analytical phase of the exam. This is a bibliographic review, with acquisition of articles from the National Cancer Institute (INCA), LILACS, SciELO, PubMed, academic Google, as well as books and scientific journals. To guarantee the quality of the exam, a quality control is carried out to detect, correct, minimize errors and improve the test. This work highlights the need for training, qualification and updating of professionals and the relevance of implementing a quality control program in Cytopathology.

Keywords: Uterine cervical neoplasms; preventive exam; Pap smear collection; PCCU collection; cytopathology.

Correspondência
Aliny Morgana Ribeiro
E-mail: alinymorgana17@gmail.com

Recebido em 12/07/2020 | Aprovado em 08/03/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202202038

INTRODUÇÃO

Câncer é o termo dado a doenças de malignidade que têm em comum o crescimento desordenado de células que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos. As rápidas divisões celulares passam a ser incontroláveis e agressivas, passíveis de alterações celulares que podem evoluir para tumores cancerígenos que têm a possibilidade de se espalhar para outras partes do corpo.[1]

O câncer de colo do útero se desenvolve na parte inferior do útero, denominada colo, e está associado à infecção pelo vírus HPV (papilomavírus humano), em especial por subtipos oncogênicos como HPV-16 e o HPV-18. Seu desenvolvimento propaga-se por um período de 15 a 20 anos, no qual 70% dos casos estão relacionados com a infecção pelo HPV e sua progressão para a lesão precursora, até que se desenvolva o câncer invasor.[2]

O câncer de colo do útero é um problema de saúde pública, sendo o quarto tipo de tumor mais recorrente entre as mulheres, com mais de 500.000 novos casos e 250.000 mortes ao ano. No Brasil, é o terceiro tipo de câncer mais incidente no público feminino e a estimativa para o ano de 2022, segundo o INCA, é de 17.010 novos casos. As infecções prevalecem mais no início da atividade sexual em adolescentes e jovens adultas.[3]

Além de ser relacionado à própria infecção pelo HPV, há cofatores que favorecem a infecção e o desenvolvimento para o câncer de colo, como: infecções persistentes por HPV de alto risco, imunidade, genética, tabagismo, hábitos de higiene, má alimentação, comportamento sexual, início da atividade sexual precoce, número de parceiros ou único promíscuo. Para além disso, influenciam também os fatores socioeconômico.[4]

Para prevenir e rastrear o câncer de colo do útero, é realizado o exame de Papanicolaou. De acordo com as diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero (Ministério da Saúde), o público-alvo do referido exame são mulheres a partir dos 25 anos de idade, que já iniciaram atividades sexuais, as quais devem seguir realizando o exame até os 64 anos. Nas mulheres sem nenhum histórico de doenças pré-neoplásicas, só deve ser interrompida a realização do exame quando dois resultados forem negativos nos últimos cinco anos.[5]

O exame preventivo do câncer de colo do útero (PCCU), também chamado de Papanicolaou, é um exame periódico, seguro, eficaz, de baixo custo e de fácil execução. Este diagnóstico citopatológico pode classificar as lesões precursoras, como as intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL) e adenocarcinoma *in situ* (AIS), que são provocadas pela infecção persistente pelos tipos de HPV de alto risco oncogênico, como também as lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL), que são provocadas pela infecção pelos tipos de HPV de baixo risco oncogênico. Assim, é um exame citológico que, junto com o tratamento adequado, nos estágios iniciais, pode resultar em uma redução das taxas de evolução de câncer de colo do útero.[6]

Ao preparar a lâmina do preventivo, a amostra é considerada adequada e satisfatória quando possui células escamosas, glandulares e/ou metaplásicas, além de bem distribuídas, fixadas e coradas, que permitam uma conclusão diagnóstica. A análise de uma amostra satisfatória é um indicador de qualidade fundamental.

Há algum tempo que o exame Papanicolaou vem sofrendo algumas críticas, em virtude da sua baixa sensibilidade. As taxas dos falsos negativos variam entre 6% a 56%, que podem ocorrer nas fases pré-analítica e analítica. Para além disso, existe a possibilidade dos falsos negativos ocorrerem em razão de problemas da hora da coleta, falta do uso de fixador, erros no procedimento de coloração, no escrutínio, interpretação e análises.[6]

REFERENCIAL TEÓRICO

O câncer de colo do útero, quando diagnosticado no início da doença, pode chegar a 100% de chance de cura, se houver um diagnóstico realizado com qualidade. Para que o exame citopatológico seja feito corretamente e com segurança há vários processos que devem ser realizados na fase pré-analítica, como: a correta identificação do material, apresentação dos epitélios na lâmina, fixação, coloração, transporte das amostras, capacitação dos profissionais e controle de qualidade, para que a qualidade do exame não seja comprometida.[7]

Capacitação da enfermagem

Quando, por algum motivo, há um problema na realização do exame na fase pré-analítica, perde-se a sensibilidade e especificidade do PCCU. A partir disso, é muito importante ter atenção na qualidade da obtenção do material cervical para que a coleta das amostras citopatológicas seja realizada por profissionais qualificados. De acordo com a Resolução do Conselho Federal de Enfermagem (COFEN) n° 385/2011, a coleta de material para o exame de PCCU deve ser realizada, unicamente, por enfermeiros, visto ser um procedimento que

requer a capacitação inerente a estes profissionais, devido ao conhecimento técnico, científico e socioeconômico do câncer de colo do útero.[3]

Assim, o enfermeiro é capacitado para atuar nas diferentes atividades de controle do câncer de colo do útero, principalmente no ato de acolher e sensibilizar a paciente desde o primeiro contato até o diagnóstico, além da atenção básica e da realização da coleta do exame.[3]

A atenção básica à saúde é a entrada da paciente no sistema de saúde, no qual o enfermeiro é uma parte fundamental do grupo multiprofissional da Estratégia Saúde da Família (ESF). Este profissional tem responsabilidade na aplicação de métodos educativos e de ações por meio da relação com as pacientes, no objetivo de tirar dúvidas, medos e repassar conhecimentos sobre a relevância da prevenção ao fazer o exame. Cria-se, portanto, uma relação entre paciente e enfermeiro para promover esclarecimento, confiança, proteção e tranquilidade durante o atendimento.[8]

Coleta do material citopatológico

Antecedendo a coleta do material (Figura 1), há o preenchimento do formulário com os dados de identificação, que deve ser feito corretamente, com o nome completo, data de nascimento, endereço, período menstrual e alguns dados e exames clínicos da paciente. Quando não há obtenção dos dados corretos, pode haver interferência na interpretação do exame, dificultando a localização futura da paciente que venha a apresentar alguma alteração em seu exame.[9]

Fundamental que o rastreio das lesões no colo do útero, na fase pré-analítica, seja desenvolvido de forma adequada, impedindo eventuais falsos negativos, com a necessidade de uma apresentação de células devidamente distribuídas, fixadas e coradas.[10] Ademais, é durante o procedimento da coleta que podem ocorrer erros que mais prejudicam a análise do exame, visto que é uma fase essencial e que necessita de execução com eficácia, pois as falhas podem ser responsáveis por até 62% dos resultados falsos negativos, em razão da falta de representatividade celular, escassez de células malignas e processos inflamatórios, que acabam prejudicando o exame. Um esfregaço é considerado satisfatório quando há representação das células da ectocérvice, do canal endocervical e/ou da zona de transformação analisados corretamente.[11]

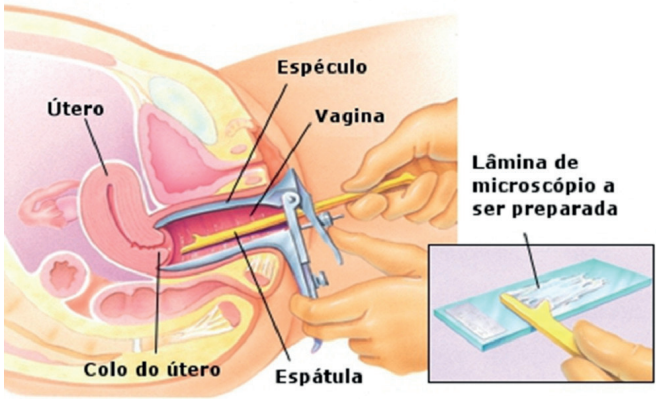


Figura 1

Representação esquemática da coleta na citologia, método convencional.[12]

Fixação das lâminas

O profissional responsável pela coleta do material cervicovaginal é encarregado, também, por realizar uma adequada fixação da amostra, que deve ser feita após a coleta de forma correta e rápida, com o objetivo de preservação da morfologia das células e conservação dos detalhes, prevenindo a deformação celular, a perda da afinidade das células pelos corantes e aparecimento de artefatos.[13] Silva e Assis[9] relatam que os métodos de fixação citopatológicos podem dar-se de três maneiras: fixação úmida, fixação úmida por secagem ao ar e fixação por nebulização.

A fixação úmida ocorre de maneira que as lâminas ficam imersas em álcool a 96%. A principal vantagem é a velocidade de difusão e preservação das estruturas e a desvantagem é que pode ocorrer a retração citoplasmática, com a perda de atividade. Na fixação úmida, com secagem ao ar, os esfregaços são imersos em álcool por, no mínimo, 30 minutos, sendo transportada somente a lâmina para facilitar. A desvantagem é o fato de a lâmina secar na temperatura do ambiente, o que poderá acarretar a perda das características cromáticas, por formação de edema nuclear, ocorrendo, também, coloração limitada.[9]

A fixação por nebulização, entretanto, é realizada por fixadores em *spray*, contendo polietilenoglicol, que forma uma película de proteção das células. Ademais, utiliza-se, também, o álcool 96%, a uma distância de 15cm a 25cm sobre os esfregaços. A desvantagem deste método é o risco de o *spray* ser utilizado muito próximo da lâmina, podendo eliminar ou lesar as células ou provocar a formação de artefatos.[9]

Observa-se um maior percentual de dessecamento nas células, resultante da falta de capacitação dos profissionais coletadores, com uma diminuição significativa após a capacitação dos mesmos. Assim, mostra-se essencial que haja a orientação acerca da fixação imediata do material na lâmina, evitando o dessecamento.[10]

Transporte e recebimento das lâminas

As unidades que enviam suas amostras para serem examinadas devem garantir o meio de transporte adequado, ou seja, cada tipo de fixador utilizará um meio de transporte para que possa garantir a adequabilidade das amostras. Para lâminas fixadas com fixador de cobertura, utilizam-se caixas de papelão, madeira ou plástico; para os fixadores com álcool utilizam-se tubetes com tampa de rosca e as lâminas devem ser enviadas em recipientes individualizados. Desaconselha-se, ainda, o compartilhamento de recipientes, mesmo que as amostras sejam separadas por clipes.[13]

Precedendo o início da fase pré-analítica, ressalta-se o recebimento dos esfregaços citopatológicos na recepção do laboratório responsável pela análise a ser procedida. Nesse momento, é confirmado se a amostra está corretamente identificada dentro dos critérios de aceitação. Esta confirmação é fundamental para que não haja o comprometimento da qualidade do exame.[13]

Coloração das lâminas

Em alguns casos em que não há uma coloração com qualidade, há a liberação de resultados falsos negativos, resultante da não identificação de células atípicas durante a análise do material. De acordo com o controle de qualidade do INCA, as lâminas com material cervicovaginal fixadas em álcool são, diretamente, coradas. Aquelas com fixadores em *spray*, antes de serem coradas, devem ser lavadas em álcool 96%, pelo menos em duas cubas, no mínimo, durante 15 minutos cada, podendo ficar por mais tempo, sem prejudicar a coloração, processo importante para que a película de cobertura seja eliminada, pois inibe a infiltração dos corantes nucleares e citoplasmáticos.

O corante universalmente utilizado é o de Papanicolaou. Uma técnica de coloração multicromática criada por Geórgios Papanicolaou. Ela utiliza três corantes: a hematoxilina de Gill (substituída também pela hematoxilina de Harris), OG-6 e EA-36 ou EA-65. Ainda não há certeza de como acontece o processo pelo qual as células são coradas, mas acredita-se que há duas suposições: a adsorção e as características de compatibilidade química na coloração.

Nas duas hipóteses, a concentração do corante nas soluções e a forma iônica são importantes. Acredita-se que as estruturas celulares de pH ácidos visam atrair corantes de radical catiônico, tanto pelo fenômeno absorção como por fatores químicos. Já as básicas tendem com os corantes de radical aniônico.[14]

O citoplasma celular é constituído por componentes ácidos e básicos e nos núcleos das células prevalecem os ácidos nucleicos. O primeiro corante a ser utilizado é a hematoxilina, responsável pela coloração azulada dos núcleos, reagindo com os ácidos nucleicos. Posteriormente, as lâminas são coradas pelo Orange G (OG-6), um corante ácido que possui afinidade com o componente básico do citoplasma.

Por último, é a solução EA-36 ou EA-65, que são colorações semelhantes, possuindo como diferença a concentração do corante *Light Green*. A solução EA-36 possui 50% a mais do corante. Estes, por sua vez, são corantes ácidos, que se fixam nos componentes básicos do citoplasma.

Além do *Light Green*, há um segundo corante que faz parte das soluções EA-36 e EA-65, que é a eosina amarelada, tendo como função a coloração de grânulos do citoplasma, com afinidade por corantes ácidos.[14] Deve-se manter uma rotina de monitoramento diário dos corantes, que devem ser filtrados e trocados regularmente, para evitar contaminações cruzadas. Para além disso, deve-se observar os rótulos com informações sobre armazenamento e datas de vencimento, pois o álcool também entra na rotina de monitoramento, sendo analisada a sua concentração através de um alcoômetro.[13]

Método citopatológico cervicovaginal convencional

A citologia cervicovaginal foi introduzida por Geórgios Papanicolaou e Aureli Babes no ano de 1928. Porém, a partir de 1943, com a ajuda de Herbert Traut, o método passou a ser amplamente utilizado, por ser rápido, indolor e fácil de executar. Ele permite que haja um acompanhamento da inflamação, o diagnóstico de algumas infecções cervicovaginais e, ainda, o rastreamento do câncer de colo do útero e de lesões precursoras.[15]

No exame convencional há algumas restrições, como a distribuição não homogênea das células na lâmina, o baixo número de células e a presença de fundo hemorrágico, leucócitos e restos celulares que prejudicam a análise. Em razão destas restrições foi elaborado o método de coleta em meio líquido, com objetivo de reduzir as falhas do método convencional.[16]

A citologia de base líquida foi aprovada, em 1996, pelo food and drug administration (FDA) dos Estados Unidos, para o uso em ginecologia e outras especialidades. Ela foi desenvolvida para obtenção de uma lâmina com fundo mais limpo, sem sobreposição de células e obscurecimento de outros elementos, o que se deve ao sistema de filtros, no qual apenas células epiteliais ficam retidas, resultando em uma citologia em monocamada ou em camada fina.[15]

Com o mesmo material é possível refazer lâminas e realizar testes moleculares e identificação de HPV, além de permitir a escolha das células que vão ser transferidas para a lâmina, possibilitando que todo o material seja analisado e evitando perdas celulares.[16]

Quanto aos métodos existem vantagens e desvantagens. A citologia convencional tem como vantagem a confortável execução, menor custo e a possibilidade de corar o material assim que é recebido no laboratório. Sua desvantagem é a perda de, aproximadamente, 80% do material coletado, por continuar na escova cervical, além da má distribuição celular, a possibilidade de falso negativo e o esfregaço com material insuficiente.[15] (Figuras 2 e 3)

A citologia em meio líquido tem como vantagem a preservação e disposição celular, a facilidade de fechar um diagnóstico com redução de tempo de leitura, eliminação de muco, hemácias e leucócitos, redução de amostras insatisfatórias e de casos falsos negativos, além da possibilidade de fazer exames adicionais. Como desvantagem, indica-se a necessidade de treinamento para o profissional sobre a técnica, além da necessidade de aparelhos específicos, elevado custo para a execução e a sobrecarga de trabalho da equipe.[15] (Figuras 2 e 3)

Controle de qualidade

A Organização Mundial da Saúde (OMS) orienta que o PCCU seja realizado de forma efetiva. Contudo, diante da baixa sensibilidade, vem sofrendo críticas, principalmente em razão de sua taxa de falso negativo, na fase pré-analítica e analítica, variar entre 6% a 56%. De acordo com RDC nº 302, de 13 de outubro de 2005, laboratórios de análises clínicas devem implantar programas de controle de qualidade interno e externo, para impedir erros e reduzir falsos negativos.[6] Além disso, tem como finalidade a identificação, diminuição e correção dos erros no desenvolvimento do exame dentro do laboratório, possuindo mais garantia de qualidade e credibilidade, reduzindo os erros de diagnóstico e ajudando a melhorar a fase pré-analítica e analítica.[7]

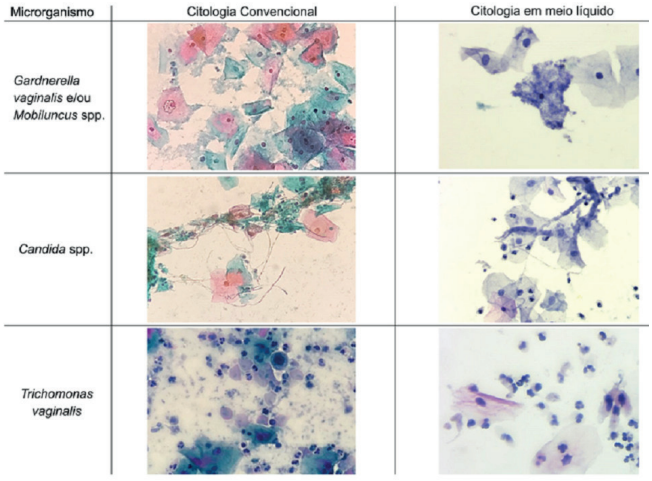


Figura 2

Imagem representativa de comparação entre os métodos.[16]

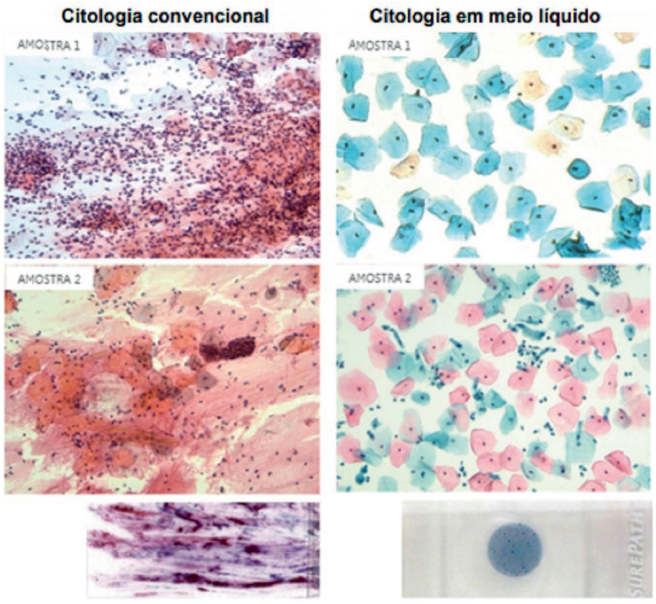


Figura 3

Imagem de Comparação entre os dois métodos.[17]

A Qualificação Nacional em Citologia (QualiCito) é a ferramenta de avaliação recomendada pela Portaria nº 3.388, de 30 de dezembro de 2013, que se baseia em determinar padrões e avaliar a qualidade do PCCU, acompanhando o trabalho dos profissionais dos laboratórios públicos e privados.[6] O Monitoramento Interno de Qualidade (MIQ) ocorre por intermédio de processos feitos com regularidade, para monitorar a qualidade da amostra, verificar o tempo da análise da lâmina, da carga horária do profissional que faz a análise e as técnicas de revisão de lâmina.[18]

A revisão aleatória de 10% dos esfregaços negativos é a mais utilizada, porém não é eficaz para identificar lesões não diagnosticadas da rotina. Indicada como técnica padrão, a revisão de 100% dos esfregaços, por ser mais cuidadosa, reduz erros da rotina. Além disso, há a revisão rápida de 100% dos esfregaços negativos ou insatisfatórios e esfregaços duvidosos, que depois passaram por outra revisão detalhada por profissional experiente para fechar o diagnóstico.

A técnica de pré-escrutínio rápido de todos os esfregaços tem o objetivo de elevar a sensibilidade do exame, por realizar de forma ágil a leitura de todos os esfregaços em até 120 segundos antes da rotina, provocando uma maior quantidade de falsos positivos, por ser enviado para a revisão detalhada um maior número de esfregaços duvidosos. Entretanto, esta técnica ainda demonstra eficácia para redução de resultados falsos negativos.[18]

O Monitoramento Externo de Qualidade (MED) corresponde à revisão dos esfregaços por outro laboratório, diferente do que realizou a primeira leitura. Tem como objetivo avaliar laboratórios tipo I, por outro laboratório do tipo II e mensurar a qualidade dos exames de PCCU realizados por eles, identificar a desigualdade de interpretação de morfologia das células, elevar a eficácia dos exames citopatológicos do colo do útero e diminuir a quantidade de exames falso negativos, falsos positivos e insatisfatórios.[13]

As lâminas enviadas para o MEQ serão escolhidas pela Secretaria de Estado da Saúde (SISCAN) ou por algum outro sistema de informação repassado pelo Ministério da Saúde. Os critérios de lâminaa a serem enviadas são: todas as lâminas com resultados positivos; todas as lâminas insatisfatórias e, de forma aleatória, 10% dos exames com diagnósticos dados como negativos, selecionados pelo número final do exame. Caso haja uma discordância do laboratório tipo II no diagnóstico do esfregaço enviado, deve-se chegar a um consenso entre este laboratório e o laboratório tipo I, antes da liberação do laudo no sistema de informação, e quando não houver consenso entre os laboratórios (tipos I e II), há a possibilidade de solicitar a análise de outro laboratório tipo II.[13]

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Apontar possíveis falhas na fase pré-analítica do exame de Papanicolaou.

Objetivos Específicos

- Diminuir casos de rejeição da amostra;
- Evitar resultados falsos positivos e/ou falsos negativos;
- Chamar atenção para o controle de qualidade na coleta da amostra de PCCU.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado com base em revisão bibliográfica, resultando em uma pesquisa de caráter descritivo, com análise qualitativa. Para obter conhecimento foram incluídos na revisão: artigos, manuais e sites que abordam sobre a qualidade do exame citopatológico, desde a confecção da amostra até a fase de coloração e de montagem das lâminas.

Para a realização desta pesquisa foram utilizados artigos científicos das seguintes plataformas: Instituto Nacional do Câncer (INCA), LILACS, SciELO, PubMed, Google acadêmico, além de livros e revistas cientificas. A bibliografia levantada foi um total de 20 artigos, dos quais 14 foram utilizados para a produção deste trabalho, em que todos foram publicados no período de 2018 a 2020.

DISCUSSÃO

O câncer de colo do útero é o terceiro mais frequente nas mulheres brasileiras, sendo um dos principais problemas de saúde pública. Em razão disso foram elaboradas estratégias para reduzir a sua incidência, através de um programa de rastreamento. Contudo, para obter eficácia é fundamental que seja realizado corretamente desde a fase pré-analítica.

Jakobczynski et al.[10], em seus estudos, comprovam que após os profissionais passarem por devida capacitação houve um aumento nas amostras satisfatórias e da representatividade da JEC, evidenciando que coletas não adequadas podem resultar em laudos falsos negativos. Aoyama et al.[8] relatam a importância do papel da enfermagem na prevenção do câncer de colo do útero, tendo como primeiro contato a atenção básica primária seguida do ingresso da paciente no sistema de saúde, e posterior acompanhamento da mesma.

Oliveira et al.[3] abordam que, de acordo com a Resolução do Conselho Federal de Enfermagem (COFEN) n° 385/2011, somente enfermeiros podem realizar a coleta do exame, visto a necessidade de uma conduta técnica científica. Porém os estudos relatam as contradições da resolução, visto que não leva em consideração particularidades de cada região e nem as estruturas do sistema de saúde de todo o território nacional.

Assim, o INCA é levado a alertar sobre as possíveis consequências e considerar que a coleta poderia ser realizada por técnicos e auxiliares de enfermagem, desde que passem por uma capacitação. Entretanto, permanece em vigor a resolução aos profissionais da enfermagem.

De acordo com o manual produzido pelo Ministério da Saúde[13], o método mais utilizado para o rastreamento das lesões precursoras de câncer de colo do útero é o teste de Papanicolaou. Além disso, para garantir a qualidade do

exame, é realizado um controle de qualidade para detectar, corrigir, minimizar erros e aperfeiçoar o teste, como também para melhorar a coleta e o preparo do escrutínio.

Segundo Santos e Ribeiro[6], o preventivo possui falhas nos diagnósticos, como resultados falsos, devido a sua baixa sensibilidade. Por isso, é necessário que sejam implementados programas de controle de qualidade. Magalhães et al.[7] afirmam que, com o controle, o teste de Papanicolaou passa a ter mais garantia, credibilidade e melhoria nas fases pré-analitica e analítica.

Machado et al.[18] mencionam que, em razão da recorrência elevada de resultados falsos negativos, é necessária a implantação do controle interno de qualidade, no qual o mais eficiente é a revisão de 100% dos esfregaços negativos, sendo possível alcançar maior quantidade de lâmina.

Conforme Flora e Colturato,[15] a citologia por meio líquido foi criada, em razão de a técnica da citologia convencional (Papanicolaou) ter limitações. Com isso, mostrou-se necessária a procura de um método com mais sensibilidade, baixo número de resultados falsos negativos, melhor método de coleta e preparo da amostra. Em estudos comparativos, a citologia por meio líquido possui maior sensibilidade e menor especificidade que a citologia convencional, entretanto Silva et al.[16] mencionam a qualidade da citologia em meio líquido e as falhas do método convencional, evidenciando que tem um melhor desempenho para a identificação de *Trichomonas vaginalis*.

CONCLUSÃO

Este estudo evidencia a necessidade de capacitação e qualificação dos profissionais responsáveis pela coleta de material, com a finalidade de aprimorar e garantir a qualidade das amostras, sendo o enfermeiro o profissional capacitado para desenvolver o procedimento da coleta. Além de tornar os profissionais capacitados, é essencial que eles passem por uma atualização, que pode acontecer a cada dois, três anos ou quando o Ministério da Saúde e o INCA atualizarem seus manuais ou a diretriz para a realização do PCCU.

Quanto à relevância da implantação de um programa de controle de qualidade em Citopatologia, os indicadores de controle de qualidade devem ser adotados e avaliados por todos do laboratório, procurando minimizar erros e os resultados falsos.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). O que é câncer?, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer> Acesso em: 10 de agosto 2021.
2. _____. Ministério da saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Câncer do colo do útero – versão para Profissionais de Saúde, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero/profissional-de-saude>. Acesso em: 10 de agosto 2021.
3. Oliveira LL, et al. Exclusividade na coleta de material para exame de colpocitologia oncótica: percepção dos enfermeiros. Revista Enfermagem da UFSM. V.10, p. 1-17, 2020. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/reufsm/article/view/33721/html>. Acesso em: 05 de agosto 2021.
4. Siqueira LC, Oliveira RF dos S. A importância do enfermeiro na concientização e prevenção do HPV. Psicologia e Saúde em debate, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 80–109, 2019. Disponível em: <http://psicodebate.dpgpsifpm.com.br/index.php/periodico/article/view/V5N1A8>. Acesso em: 20 de agosto 2021.
5. Oliveira AK, et al. Infecção pelo HPV – Rastreamento, diagnóstico e conduta nas lesões HPV-induzidas. Revista Feminina, n. 3, v. 49, p.166-172, 2021. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2021/05/1224082/femina-2021-493-p166-172-infeccao-pelo-hpv-rastreamento-diagno_yCxEoCJ.pdf > Acesso em: 16 de agosto 2021.
6. Santos MJS, Ribeiro AA. Estratégias Utilizadas para Melhorar a Qualidade dos Exames Citopatológicos. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 66, n. 1, p. e- 05104, 16 mar. 2020. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/revista/index.php/revista/article/view/104 > Acesso em: 20 de agosto 2021.
7. Magalhães JC, et al. Avaliação dos indicadores de qualidade dos exames citopatológicos do colo do útero realizados em um município do Paraná, Brasil. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. v. 56, p. 1-7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1676- 2444.20200041>. Acesso em: 10 de agosto 2021.
8. Aoyama EA, et al. Assistência de enfermagem na prevenção do câncer de colo do útero. Brazilian Journal of Health Review. v.2, n.1, p.162-170, 2018.
9. Silva IC da, Assis IB de. Os efeitos das incorreções pré-analíticas para o exame de Papanicolau. Revista Saúde em Foco, n. 11, p. 876-890, 2019. Disponível em: <https://portal.unisepe.com.br/unifia/wpcontent/uploads/sites/10001/2019/10/078_Osefeitosdasincorre%C3%A7%C3%B5espr%C3%A9-anal%C3%ADticas-para-o-exame-de-Papanicolau-Isabelle.pdf> Acesso em: 10 de agosto 2021.
10. Jakobczynski J, et al. Capacitação dos profissionais de saúde e seu impacto no rastreamento de lesões precursoras do câncer de colo uterino. Rev. Brasileira de Análises Clínicas, v. 50, n. 1, p. 244-249, 2018. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/artigos/capacitacao-dos-profissionais-de-saude-e-seu-impactonoastreamento-de-lesoes-precursoras-do-cancer-de-colo-uterino/> Acesso em: 02 de agosto 2021.
11. Alves PBC. Método de coleta convencional para o diagnóstico do exame preventivo do câncer de colo do útero. 2019. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Citologia Clínica) – Curso de Especialização em Citologia Clínica, Centro Universitário CESMAC, Maceió – AL, 2019.
12. Miranda E. Exame citopatológico (papanicolau ou preventivo). Estratégia Saúde da Família. Disponível em: <https://estrategiasaudedafamilia.comunidades.net/exame-preventivo> Acesso em: 11de julho 2021.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Manual de Gestão da Qualidade para Laboratório de Citopatologia. 2 ed. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em:<https://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/livro_completo_manual_citopatologia.pdf> Acesso em: 12 de agosto 2021.
14. Laborclin. 2018. Disponível em: <www.laborclin.com.br> Acesso em: 02 de julho 2021.

15. Flora VMS, Colturato PL. Estudo comparativo entre citologia oncótica cérvico vaginal convencional e em meio líquido para rastreamento de câncer do útero e lesões precursoras, Revista Científica Eletrônica de Ciências Aplicadas da FAIT. n. 2, maio, 2020
16. Silva RCG, et al. Desempenho da citologia em meio líquido na identificação de agentes microbiológicos cérvico-vaginais, Revista Brasileira de Análises Clínicas. v.50, n. 2, 2018. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/artigos/desempenho-da-citologia-em-meio-liquido-na- identificacao-de-agentes-microbiologicos-cervico-vaginais/>. Acesso em: 12 de agosto 2021.
17. Diagnósticos do Brasil. Citologia em Meio Líquido. Disponível em: <https://docplayer.com.br/6906239-Citologia-em-meio-liquido.html> Acesso em: 10 de julho 2021.
18. Machado EP, et al. Controle interno da qualidade em citopatologia: o dilema da subjetividade. Rev. Brasileira de Análises Clínicas, v. 50, n. 3, p. 244-249, 2018. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/artigos/controle-interno-de-qualidade-em-citopatologia-o-dilema-da- subjetividade/> Acesso em: 10 de agosto 2021.

Contemporary studies about vaccination against human papillomavirus: descriptive analysis

Estudos contemporâneos acerca da vacinação contra o papilomavírus humano: uma análise descritiva

Mônica Michele Alexandre[1], Renan Almeida de Jesus[2], Michelle Karine dos Santos Lembi[3], Débora Gafuri Teixeira[4], Kathiuska Tokie Vieira dos Santos Kawamoto[5], Giuliana Zardeto Sabec[6]

[1] Aluna do curso de especialização em Farmácia Clínica e Farmácia Hospitalar com Ênfase em Prescrição Farmacêutica e Aluna do curso de Medicina da Universidade Paranaense (UNIPAR). Umuarama, PR, Brasil.

[2] Professor Mestre na Faculdade de Ciências da Saúde de Unaí (FACISA). Unaí, MG, Brasil.

[3] Farmacêutica Bioquímica no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Paranaense (UNIPAR). Umuarama, PR, Brasil.

[4] Aluna do curso de Medicina da Faculdade Ingá de Maringá (UNINGÁ). Maringá, PR, Brasil.

[5] Biomédica no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Paranaense (UNIPAR). Umuarama, PR, Brasil.

[6] Professora Doutora na Universidade Paranaense, Coordenadora do curso de especialização em Farmácia Clínica e Farmácia Hospitalar com Ênfase em Prescrição Farmacêutica, Universidade Paranaense (UNIPAR). Umuarama, PR, Brasil.

Abstract

Fundamentation: With the advancement of medicine, the vaccine against human papillomavirus (HPV) was developed. HPV is a sexually transmitted virus and the vaccine is a skillful means of preventing transmission. However, the vaccine needs to be applied to the at-risk population, young women and men. *Objective:* The objective of the present study is to highlight comprehensive studies on the applicability of the vaccine to the population in an efficient manner. *Methods:* The research will approach a wide review of scientific articles published in recent years, the collection will be carried out in the Google Scholar Database, MEDLINE and SciELO, allowing a discourse analysis of the selected works, and thus, building a critical analysis resulting from the information gathered about the population at risk, effectiveness and stigmas of non-vaccination. *Results:* In a critical analysis, it was corroborated that although vaccination has proven to be effective, the population at risk is not totally immune to the virus, since the stigmas imposed by contemporary society end up preventing vaccination from happening in 100% of the population. *Conclusion:* Thus, the study confirmed the need for permanent prevention policies in health units that aim at health education so that vaccination can reach the entire population at risk.

Keywords: Sexually transmitted disease, prevention, cervical cancer, HPV.

Resumo

Fundamentação: Com o avanço da medicina, surgiu a vacina contra o Papilomavírus humano (HPV). O HPV é um vírus sexualmente transmissível e a vacina é meio hábil que visa prevenir a transmissão. Entretanto, a vacina precisa ser aplicada na população de risco, as mulheres e homens jovens. *Objetivo:* O objetivo do presente estudo é evidenciar estudos abrangentes sobre a aplicabilidade da vacina na população de forma eficiente. *Métodos:* A pesquisa versará em uma revisão ampla de artigos científicos devidamente publicados nos últimos anos, a coleta será realizada na Base de Dados Google Acadêmico, MEDLINE e SciELO, possibilitando uma análise de discurso dos trabalhos selecionados, e assim, construir uma análise crítica decorrente das informações reunidas acerca da população de risco, eficácia e estigmas da não vacinação. *Resultados:* Numa análise crítica, restou corroborado que embora comprovadamente eficaz a vacinação, a população de risco não está totalmente imune ao vírus, visto que, os estigmas impostos pela sociedade contemporânea, acabam por impedir que a vacinação aconteça em 100% da população. *Conclusão:* Deste modo, o estudo confirmou a necessidade de políticas de prevenção permanentes nas unidades de saúde que objetivem a educação em saúde para que a vacinação consiga atingir toda a população de risco.

Palavras-chave: Doença sexualmente transmissível, prevenção, câncer colo uterino, HPV.

Correspondência
Giuliana Zardeto Sabec
E-mail: giu_zardeto@hotmail.com

Recebido em 12/07/2020 | Aprovado em 07/03/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202202039

INTRODUCTION

With the advancement of contemporary medicine, it has enabled the creation of vaccines that aim at the prevention and treatment of some diseases. Hence, through research, effective vaccines have emerged against Human Papillomavirus (HPV), which aims to prevent some diseases, such as cervical cancer.[1]

According to Fiorin et al.[2] vaccines that exist and are currently available against HPV, provide adequate protection against infections and diseases arising from the most important types of HPV 16 and 18, this has been proven in the cervix, vulva, vagina and anus in several tests performed. The same study also stated that, after analyzing the publications on the subject, they corroborated that the quadrivalent HPV vaccine has duly proven efficacy, since it has an impact in relation to cellular changes present in the cytopathological examination.

Also Reis and Ribeiro[3] concluded that HPV occurs worldwide in the entire population, however, the vaccine is an effective and safe means of prevention. After its implantation, it was observed that there was a reduction in the incidence of diseases of the virus streams. Therefore, the objective of this work was to evidence, from the selected materials, to corroborate the relevance of vaccination against HPV, in order to prevent its transmission.

MATERIALS AND METHODS

This research was carried out through a literature review, where some articles on the topic were selected. However, the academic sources used to search for scientific articles were mainly from the Google Scholar® (Google Scholar), MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online) and SciELO (Scientific Electronic Library Online) databases, using the following keywords: sexually transmitted disease, prevention, cervical cancer and HPV, thus bringing together the main ideas about the effectiveness of vaccination, population and current stigmas.

The aforementioned study corroborated the relevance of HPV vaccination, as well as the concern to reach the population at risk in its entirety, thus making it possible to build a critical analysis based on research already published in recent years on the subject.

Thus, this study is justified, because the HPV vaccine is already properly inserted in the Unified Health System (Sistema Único de Saúde – SUS), therefore, it ends up needing current research, in a broad way, not only regarding its importance, but that also demonstrate the updated results as to their effectiveness and scope, allowing from these, that health policies are applied, aiming to protect the population as a whole, regardless of gender.

BIBLIOGRAPHIC REVIEW

Human Papillomavirus (HPV)

Human papillomavirus (HPV) is a DNA virus that is transmitted sexually, and it has an incidence in both sexes[4]. HPV was known to the ancient Greeks and Romans because of the cutaneous and genital warts that were associated with sexual promiscuity and were seen as contagious. It was in the 20th century in Italy that the first evidence of viral etiology was cited.[5]

It is from contact with the infected region that HPV transmission occurs, because through direct contact with the genitals during sexual intercourse, which sometimes occur on the skin (hands, feet, etc.) and mucous membranes (vaginal mucosa, cervix, penis, etc.) However, there is evidence of the presence of the virus in the skin, larynx and esophagus.[6] Therefore, it is essential that vaccination be carried out in both sexes, as immunization will result in a decrease in HPV infection.[7]

Many patients who come into contact with HPV have the ability to abolish the virus spontaneously, however, some of these infected people will undergo some appropriate treatment.[8] It is important to mention about HPV infection, and that there is also, people's ignorance about this virus, its signs, symptoms, transmission, and even, its relationship with cervical cancer.[6]

When vaccination was introduced in SUS, the intention was to reduce the impact of the HPV virus on the development of cancer of the cervix, penis, throat and anus. Thinking about immunization against the virus and consequently reducing the emergence of new cases. Despite this, even though immunization vaccination is performed, the use of condoms during sexual intercourse is not excluded. In addition, it is essential to perform a Pap smear in women and peniscopy in men. Thus, aiming at a greater adherence on the part of young people, there is a need for greater disclosure about the importance of the HPV vaccine. It is suggested that health professionals unite to deliver lectures in educational institutions, in order to inform young people and their guardians about HPV.[9]

HPV types

There are more than 150 HPV serotypes, which are identified numerically, according to their order of discovery.[10] Serotypes are grouped according to their association with cervical carcinoma or precancerous lesions. The HPV that is less likely to have cancer are often serotypes 6 and 11, characterized mainly by the presence of genital warts, unlike HPV that have a high chance of developing cancer, are types 16, 18, 31, 33, 35, and 45.[10] Regarding the types of high-risk oncogenic HPV, the Ministry of Health[11] recommended: "The types of high-risk oncogenic HPV are detected in 99% of cervical cancers, the most common being HPV16 and 18, which together are responsible for about 70% of these cases, however HPV 16 alone it is the cause of approximately 50% worldwide. HPVs 6 and 11 are associated with up to 90% of anogenital warts. "In Brazil, the HPV prevalence profile is similar to the global one, with 53.2% for HPV 16 and 15.8% for HPV 18."

The HPV virus has 120 types, of which 12 are related to the development of cancer. A total of 243 studies were carried out, and these were published worldwide between the years 1990 and 2010, in which 30,848 cases were analyzed, and it remained evident that 92.9% of the cervical carcinomas considered were related to a specific type of HPV. The study also corroborated that cancers related to HPV virus types 16 and 18 were between 70% and 76%.[12]

Nakagawa et al.[13] showed that there is a vast bibliography that talks about the HPV virus and the incidence of cervical carcinoma, demonstrating the controversial aspects on the subject. Although studies are advancing, the rates of morbidity and mortality due to cervical cancer remain high in developing countries, since it is a slow developmental pathology, asymptomatic in its initial stage, and mainly due to infection sexually transmitted.

In Brazil, the way to fight is by cytological examination, so that it can be detected early, since thousands of women are already exposed to the HPV virus, and who need adequate monitoring and treatment, so that the infection does not continue and becomes a cancer.[13]

Regarding the incidence of diseases related to HPV, the Ministry of Health[11] also states: "Without considering non-melanoma skin tumors, cervical cancer is the first most incident in the North Region (25.62 / 100 thousand)". In the Northeast (20.47 / 100 thousand) and Midwest (18.32 / 100 thousand) regions, it occupies the second most frequent position; while South (14.07 / 100 thousand) and Southeast (9.97 / 100 thousand) regions occupy the fourth position.

In addition to cervical cancer, it is estimated that the HPV virus associated with other factors is responsible for 90% of cases of anal cancer, 71% of cases of vulva, vagina and penis cancer, and 72% of oropharyngeal cancers. Studies carried out with men between 18 and 70 years of age show that Brazilian men (72%) have more HPV infection than Mexicans (62%) and North Americans (61%). The incidence of penile cancer is three times higher in Brazilian men than in American men. Regarding oral HPV infection as the main risk factor for oropharyngeal cancer, this has been established in case-control studies. In addition, the majority (≥90%) of oral infections are acquired sexually." Pinto et al.[14] concluded that the initiation of early sexual life is one of the fundamental factors associated with HPV contamination in young people. They stated that due to this precocity, therefore, there is a need for health policies that provide young people and their families with correct information on the subject and the appropriate guidance on sex education. Sanches[15] corroborated that the National Health Surveillance Agency (ANVISA)[16] released the commercialization of the HPV vaccine in Brazil, only from 2006.

HPV transmission

The Ministry of Health[17] defined that HPV is a sexually transmitted infection, it is a type of virus that contaminates mucosa and / or skin regardless of sex, whether male or female. This type of infection causes warts on the genital area and anus, or even cancer depending on the specific type of virus.

Studies state that only complete sexual abstinence can prevent HPV infection, because condoms are not guarantees of sufficient protection, since the virus can be transmitted by intercourse without penetration.[18,19] According to Franco and Harper[20] apud Nadal and Manzione[4] it is possible to propose two forms of prevention, namely, with the tracking of precursor lesions or with immunization against HPV, to avoid them.

According to the Ministry of Health,[11] HPV is transmitted through contact with an infected person. However, its most common form of transmission occurs during sexual intercourse, regardless of being oral-genital, genital-genital or manual-genital.

Thus, the Ministry of Health[11] still highlights: "Studies carried out on individuals with newly acquired HPV infections show that these occurred shortly after the beginning of sexual life, with 10.4% of infections being caused by HPV type 16, one of the most oncogenic. In addition, 45.5% of female adolescents contract HPV before the beginning of the first

sexual intercourse with vaginal penetration. Genital HPV infection can also be transmitted, during childbirth or even through non-sterile gynecological instruments."

For prevention with immunization to happen, it is necessary that people become aware of the importance of vaccination, that is, that the population understands that the vaccine is a skillful means to combat the development of diseases resulting from HPV. Borsatto et al.[21] described that HPV vaccines enabled primary level prevention, in other words, to prevent contamination by the virus.

TREATMENT

Regarding treatment, the Ministry of Health[22] recommends in the case of anogenital warts that these lesions are destroyed, because, even if the person does not undergo the treatment, it may happen that these lesions disappear, remain unchanged, or even increase in size and quantity.

Regarding treatment, the Ministry of Health[22] postulates: "It must be individualized, considering the characteristics (extent, quantity and location) of the injuries, availability of resources and adverse effects. They are chemical, surgical and immunity boosters. They can be home (self-applied: imiquimod, podophyllotoxin) or ambulatory (applied in the health service: trichloroacetic acid – TCA, podophyllin, electrocauterization, surgical excision and cryotherapy), according to the professional indication for each case. Podophyllin and imiquimod should not be used during pregnancy. People with immunodeficiency - HPV treatment recommendations are the same for people with immunodeficiency, as people living with HIV and transplanted. However, in this case, the patient requires closer monitoring, as people with immunodeficiency tend to have a worse response to treatment. Treatments for anogenital warts do not eliminate the virus, so lesions can reappear. Infected persons and their partners must return to the service if they identify new injuries. "

Also the Ministry of Health[22] claims that it is not possible to say that genital warts will disappear or grow, since it will depend on the size and region that they appear, however there are numerous forms of treatment. Nonetheless, the health professional who will observe and define the best treatment for each specific case. Thus, the treatment options employed may be through the use of cream directly on the warts, freezing removal, cauterization, laser or even removal surgery. Importantly, it is possible that in some cases they reappear even after treatment.

PREVENTION

Nunes et al.[23] reported that the prevention of diseases such as cervical cancer is more effective if performed at the beginning. Even though there are public policies aimed at prevention through the use of condoms and Pap smears, there are still high rates of cancer and consequently an increase in mortality from cervical cancer. Although HPV vaccination is carried out in order to prevent the development of injuries or even cancer, its application through SUS is a skillful means of preventing infections arising from HPV.

In Brazil, the inclusion of the tetravalent HPV vaccine in their national vaccination calendar occurred in 2014, pre-adolescent girls were initially vaccinated to immunize them from the various types of cancer that result from the virus, mainly uterine cancer. However, there were reports that there were side effects related to vaccination.[24]

Ministry of Health,[22] HPV vaccination is the most effective form of prevention, as this means is currently available in SUS, and is indicated for girls aged 9 to 14 years old, people with HIV and transplanted people aged between 9 and 26 years old. It is important to highlight that vaccination is not a treatment, as it is not effective when infections or injuries from HPV already exist.

Sanches,[15] however, it is important to note that some women end up relying so much on vaccination and its benefits that they can assume high-risk sexual behavior after vaccination, being vulnerable to other sexually transmitted diseases. Therefore, it is essential that health professionals guide women in the health unit on ways to prevent other diseases and the need to participate in HPV screening programs periodically, since the vaccine does not protect them from all types of HPV.

The Ministry of Health[22] emphasizes that condoms are an important form of prevention against HPV, since their use prevents transmission of other sexually transmitted diseases. However, it does not completely prevent HPV infection, since in areas such as the vulva, pubic area, perineal area or scrotum, they are not fully protected by condoms. It is important to say that the female condom covers the vulva, therefore, this is the most effective way to avoid contagion if used correctly.

Nonetheless, the vaccine against the HPV virus is a form of prevention inserted in SUS that aims at collective immunization, thus reducing individual risk. Promptly, the vaccination proposal seeks to intervene in the risk of developing precancerous lesions.[1] Rêgo et al.[25] considered how relevant health education is for the population aged

between 9 and 13 years old about HPV, through educational methodologies that clarify the importance of vaccination and its effectiveness, thus allowing to break the barriers of resistance that exist or that may exist among the parents of adolescents who have been vaccinated.

Quevedo et al.[26] there is resistance on the part of society related to the access of young women to the vaccine, since, due to low understanding, parents understood that such a means of prevention can stimulate early sexual life. In contrast, Chehuen Neto et al.[27] stated that there are a considerable number of people who are properly informed about the HPV vaccine.

Contamination by the HPV virus occurs in both sexes, being transmitted during sexual intercourse without the use of protection.[28] It is in the young population that the virus has the highest prevalence, thus, the majority of young people sexually active are subject to contagion.[28]

Nadal and Nadal[19] apud Alvarenga et al.[29] contamination by the HPV virus is a public health problem, so its prevention due to the high rates of precancerous and cancerous lesions is a necessary measure. In addition, health education about vaccination is essential, as it is the time to raise awareness among the population about the benefits of the HPV vaccine.

In relation to health education, Osis et al.[30] apud Rêgo et al.[25] understood that health education should start in primary care, since this is where the initial promotion to the population begins regarding information about HPV and any diseases. However, the population only seeks health services when they are needed, that is, when they are sick. Therefore, health education is necessary, so that we reeducate the population about the need to prevent HPV and other diseases.

It is necessary that couples who maintain sexual life stimulate and accompany their partners in gynecological tests, because HPV virus infection is a problem of the couple, and it is up to health professionals to guide and treat men in order to prevent even the appearance of penile cancer.[31]

Similarly, Rêgo et al.[32] pointed out that the health professionals play a primary role in the face of HPV control, because they work with health promotion, performing activities with the primary health care community, among others, allowing the carrying out educational activities according to their students, thus clarifying their doubts and desires. Therefore, it is essential to guide parents on all aspects inherent to the vaccine, respecting the autonomy of those involved and allowing dialogue in health promotion.[33]

Therefore, health professionals play an important role in the face of parents and users in order to allow them to apply the HPV vaccine. Thus, the knowledge and technique necessary for such intervention and skills for this task is expected by these professionals.[34] Some dilemmas due to ethical, cultural and religious issues deserve attention from health professionals, since it is within the family that some barriers are imposed in the face of HPV vaccination. Adequate follow-up and guidance should be carried out so that parents can be aware of the importance and effectiveness of vaccination, consequently reducing the number of cases of cancer and other pathologies arising from HPV. It is about preventing the disease from returning due to the virus infection, and not remedying the disease already installed, since it is necessary for people to take all three doses of the vaccine, and not just the first. Therefore, the professionals involved need to be able to carry out health promotion also with educational institutions and teachers, so that the proximity to students allows to break any and all barriers that may exist in the face of vaccination.[35]

Religion allows people to interact in their community and the problems resulting from social segregation that are usually linked to some disease, the belief ends up provoking a perception of security, because it serves as an emotional, social support and support in the face of the difficulties of the everyday life.[36] It is possible to state that health professionals are professionals trained to carry out activities with the community in order to make them aware of the importance of HPV vaccination.

Studies by Costa and Goldenberg[37] clarify the importance of students knowing HPV, regardless of the age group, they were curious about the topic. Therefore, the subject needs clarification, relevant information regarding the transmission of HPV, as well as contraceptive methods and specific treatments in case of infection.

In order for adolescents to adhere to HPV vaccinations, it is necessary to train health and education professionals in order to promote dialogue. This type of activity allows the population, especially the younger ones, to clarify their doubts, discussing their experiences to improve health conditions.[38]

HPV vaccines

Currently, the HPV vaccine is a propitious way to fight cervical cancer and genital warts. Nevertheless, even if they are properly vaccinated, it is essential that women continue to have their medical appointments regularly at their gynecologists. Thus, anti-HPV vaccination is an additional prevention and does not exempt women from taking care of their gynecological health.[39]

Since the HPV vaccine protects against a specific virus that is transmitted sexually, some parents understand that vaccination can be a stimulus to young people's earlier sexuality. Studies show that this is just a mistake.[40] Sexuality is still seen as a taboo, the beginning of sexual life and STDs as well. Awareness-raising work has a beneficial effect, as it draws the attention of young people and informs them that sex can transmit many diseases and that HPV is one of them, being essential the use of condoms even if properly vaccinated.[40]

The HPV vaccine is not enough to make up for the lack of a cervical cancer prevention exam, since all women, even if they have completed the immunization schedule (3 doses), are advised to continue taking the Pap smear routinely. It is important to highlight that vaccination is not intended to treat HPV-related diseases, since its purpose is to prevent contagion by HPV.[41]

Vaccination in sexually active women, up to 25 years of age, is necessary, since they are more likely to have new HPV infections. SUS enables an efficient promotion of vaccination against HPV types 6, 11, 16 and 18 in the population at risk. In such a way, that the accomplishment of prophylactic measures to the HPV provides quality of life of the population.[42]

ANVISA[16] the new approved vaccine extended the protection to 9 subtypes of the HPV virus, known as 9-valent and including against subtypes 31, 33, 45, 52 and 58 of HPV, also subtypes 6, 11, 16, 18 that were already available in the previous version of the product. HPV is associated with cancer of the uterus, vulva, vagina and anus. The name of the medicine is Gardasil, which is indicated both for boys, as well as for girls aged between 9 and 26 years. It is recommended that vaccination be performed even before sexual initiation, since transmission occurs through sexual intercourse.

It is important to highlight that, according to the Ministry of Health[11], the quadrivalent HPV vaccine, that is, specifically subtypes 6, 11, 16 and 18 (recombinant) in 2018, this quadrivalent HPV vaccine started to be made available to women with age between nine to fourteen years (9 to 14 years, 11 months and 29 days), as well as, for males between eleven and fourteen years of age (11 and 14 years, 11 months and 29 days). Thus, including the male gender of this age group in the vaccination program, allows to reduce the incidence of diseases arising from the HPV virus.

This vaccine was duly registered by the Merck Sharp & Dohme Farmacêutica[43] Inc. In the same sense, follow the indication as approved for the leaflet of Gardasil 9: "Cancers of the cervix, vulva, vagina and anus caused by HPV types 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58; Genital warts (condyloma acuminata) caused by HPV types 6 and 11. In addition to persistent infections and the following precancerous or dysplastic lesions caused by HPV types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58: Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) of grades 2 and 3 and adenocarcinoma of the cervix in situ (AIS); Grade 1 cervical intraepithelial neoplasia (CIN); Vulvar intraepithelial neoplasia (NIV) of grades 2 and 3; Grades 2 and 3 vaginal intraepithelial neoplasia (NIVA); Grade 1 NIV and grade 1 NIVA; Anal intraepithelial neoplasia (NIA) of grades 1, 2 and 3". Eluf Neto[44] on the effectiveness of HPV vaccine, it was observed that it must be done in women who have not started their sexual life, since they may have greater benefits from the vaccine. However, if the woman is already infected with some type of HPV, even though it is included in the vaccine, she will only be protected against a disease caused by other type of HPV virus in this vaccine.

CONCLUSION

From articles and publications guided by the achievement of this study, it was proven that the infection resulting from the human papillomavirus is known as a sexually transmitted disease. It was observed that HPV has a high infection rate.

However, it became evident that both women and men are equally infected by the HPV virus, although the vaccination is aimed at both sexes, many are unaware.

In addition, it was corroborated that among women, HPV is responsible for a high number of cervical tumors, so it is necessary and indispensable to prevent this infection caused by HPV. Consequently, the study highlighted the importance of vaccination before sexual contact, since the only completely safe way is complete sexual abstinence, since condoms are not 100% safe and do not fully prevent contact during sexual intercourse with injuries from HPV. The study ended up confirming that the HPV vaccine currently available in SUS is accessible and with favorable results in fighting the virus, although it needs some improvements to be implemented through health awareness and education.

However, for the population to understand the importance of vaccination against infection from the HPV virus, it is essential that health professionals are able to enable this dialogue, since the lack of knowledge on the subject ends up causing barriers regarding access to vaccination. It is necessary to establish a way to enable health education in a participatory way. Although the HPV vaccine is very effective, there are barriers to be broken, whether for reasons of safety, guarantee of results and religious beliefs. Thus, it has been

demonstrated in this study, that the prevention carried out through vaccination against HPV is quite effective, since it decreases the appearance and development of diseases caused by this virus.

FUNDING SOURCES

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

REFERENCES

1. Santos AB. A incorporação da vacina HPV no SUS: práticas de estado, conhecimentos científicos e produção de diferença sexual nos documentos da implantação da política de saúde. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Filosofia e Ciências Humanas, Programa de Pós-Graduação em Antropologia Social, Porto Alegre, BR-RS, 2017; 1-123.
2. Fiorin TM, Santos ALB, Oliveira TB, Andrade VRMA. Vacina quadrivalente contra o papilomavírus humano: qual o impacto nas anormalidades cervicais? Revisão da literatura. Monografia de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia. In: 6º Congresso Internacional em Saúde. 2019.
3. Reis MV, Ribeiro MCP. Conhecimento dos discentes sobre a vacina contra o HPV. Revista Científica da Universidade Vale do Rio Verde, 2018; 8(2).
4. Nadal SR, Manzione CR. Vacinas contra o papiloma vírus humano. Revista Brasileira de Coloproctologia. 2006; 26(3), 1-4.
5. Carvalho FLO, Rodrigues WP, Pereira RSF, Fraga FV, Brandão IM. HPV como principal precursor do câncer de colo de útero em adolescentes. Revista de Saúde ReAGES, 2018; 1(2), 23-36.
6. Panobianco MS, Lima ADF, Oliveira ISB, Gozzo TO. Knowledge concerning HPV among adolescente undergraduate nursing students. Texto & Contexto Enfermagem, 2013; 22(1), 201-7.
7. Giraldo PC, et. al. Prevenção da infecção por HPV e lesões associadas com o uso de vacinas. DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis, 2008; 20(2), 132-40.
8. Barreto RC, Diniz MFFM, Pereira GAS, Celani HRB. Relação Papilomavírus (HPV) e Tumor Maligno da Cavidade Bucal. Revista Brasileira De Ciências Da Saúde, 2014; 18(3), 261-70.
9. Pereira FB, Souza EP. Cobertura Vacinal do HPV para Adolescentes: Desafios e Possibilidades. Revista Multidisciplinar e de Psicologia, 2017; 11(38), 530-40.
10. Limberger A, et. al. Aspectos imunológicos da infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV). Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, 2012; 33(1), 111-22.
11. Ministério da Saúde. Informe técnico da ampliação da oferta das vacinas papilomavírus humano 6, 11, 16 e 18 (recombinante) – vacina HPV quadrivalente e meningocócica C (conjugada), 2018.
12. Jurberg C, Machado GOC, Biancovilli P, Lima FT, Verjovsky M. Conhecimento sobre o HPV entre adolescentes durante a campanha de vacinação. Revista Adolescência e Saúde, 2015; 12(4), 29-36.
13. Nakagawa JTT, Schirmer J, Barbieri M. Vírus HPV e câncer de colo de útero. Revista Brasileira de Enfermagem, 2010; 63(2), 307-11.
14. Pinto VFC, Barbosa VFC, Paiva SG. Aspectos epidemiológicos e citológicos de infecções pelo papilomavírus humano (HPV) em adolescentes: uma revisão. Revista Científica do ITPAC, 2012; 5(4), 1-10.
15. Sanches EB. Prevenção do HPV: a utilização da vacina nos serviços de saúde. Revista Saúde e Pesquisa, 2010; 3(2), 255-61.
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Registrada vacina do HPV contra 9 subtipos do vírus, 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br Acesso em: 05 mar 2020.
17. Ministério da Saúde. Registrada vacina do HPV contra 9 subtipos do vírus. 2017. Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/index.php/promocao-da-saude/53138-registrada-vacina-do-hpv-contra-9-subtipos-do-virus>. Acesso em 10 de fev 2020.
18. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2012. Departamento de DST, Aids e Hepatites virais. Bol Epidemiol Aids DST, 1(1). Disponível em: file:///C:/Users/Unipar/Downloads/metas_hepatites.pdf
19. Nadal LRM, Nadal SR. Indicações da Vacina Contra o Papilomavirus Humano. Revista Brasileira de Coloproctologia, 2008; 28(1), 124-26.
20. Franco EL, Harper DM. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical control. Vaccine 2005; 23(1), 2388-94.
21. Borsatto AZ, Vidal MLB, Rocha RCNP. Vacina contra o HPV e a Prevenção do Câncer do Colo do Útero: Subsídios para a Prática. Revista Brasileira de Cancerologia, 2011; 57(1), 67-74.
22. Ministério da Saúde. HPV: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. 2019. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/hpv>. Acesso em 4 dez 2019.
23. Nunes CBL, Arruda K, Pereira TN. Apresentação da eficácia da vacina HPV distribuída pelo sus a partir de 2014 com base nos estudos Future I, Future II, e Villa et al. Acta Biomedica Brasiliensia, 2015; 6(1), 1-9.
24. Garcia M. Discursos alternativos sobre a vacinação contra o HPV: análise das mensagens em uma comunidade virtual no Facebook. Cadernos do Tempo Presente, 2017; n. 27, 101-11.
25. Rêgo RLS, Alencar RRS, Rodrigues APRA. A educação em saúde para adolescentes e a vacina contra o HPV. Ciências Biológicas e de Saúde Unit., 2017; 4(1), 181-90.
26. Quevedo JP, Inácio M, Wieczorkievicz AM, Invernizzi N. et al. A política de vacinação contra o HPV no Brasil: a comunicação pública oficial e midiática face à emergência de controvérsias. Revista Tecnologia e Sociedade, 2016; 12(24), 1-26.
27. Chehuen Neto JA, et al. Atitudes dos pais diante da vacinação de suas filhas contra o HPV na prevenção do câncer de colo do útero. Cadernos Saúde Coletiva, 2016; 24(2), 248-51.
28. Ballalai I, Monteiro DLM, Migowski E. Vacinação na adolescência. Adolescência & Saúde, 2007; 4(1), 50-6.
29. Alvarenga SP, Magalhães VRM, Ataíde LN, Hirata CP, Rezende SS, Kalil JH. Vacina contra o HPV: avaliando as contradições da indicação e posologia atual. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, 2016; 14(2), 395-402.
30. Osis MJD, Duarte GA, Sousa MH. SUS users' knowledge of and attitude to HPV virus and vaccines available in Brazil. Revista de Saúde Pública, 2014; 48(1), 123-33.
31. Veneu ACS, Santos C, Souza LRF, Jesus MLA, Souza RR, Cortez EA. A enfermagem na assistência à saúde e prevenção do HPV no homem. Revista online de Pesquisa: cuidado é fundamental, 2009; 1(2).
32. Cardoso MME. Aspectos históricos, fisiopatológicos e preventivos da infecção por papillomavirus humano-HPV. Especialização em atenção básica e saúde da família. Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.
33. Conceição CV, Moraes MAA. Orientações sobre vacinação contra o HPV em escolas públicas no interior do Estado de São Paulo. Revista de Extensão do IFSC- Caminho Aberto, 2016; 3(5), 57-60.
34. Aligieri P. Pais e médicos precisam conhecer e recomendar as vacinas contra HPV. Revista da Associação Médica Brasileira, 2007. 53(4): 283-92.
35. Oliveira DA, Silva MFFS, Souza JOQ, Souza JPS, Campos ERT, Rodrigues HG. Vacina contra papilomas vírus humano: dilemas enfrentados no seio familiar. Revista Intercâmbio, 2017; 9, 131-48.
36. Guillen FO, Zardeto G, Pupulin ART, Amadei JL. Pessoas vivendo com HIV/AIDS: influência das crenças na qualidade de vida e adesão ao tratamento. Revista Uningá, 2014; 42, 10-15.

37. Costa LA, Goldenberg P. Papilomavírus Humano (HPV) entre Jovens: um sinal de alerta. Saúde e Sociedade, 2013; 22(1), 249-61.
38. Rizzo ER, Silva JAL, Basílio MD, Santos MS, Souza RA, Messias CM. Vacina do HPV - o conhecimento das adolescentes a respeito do Papiloma vírus Humano, um relato de experiência. Revista Pró-UniverSUS, 2016; 7(2), 10-12.
39. Sampaio Neto LF. Vacina anti-HPV: excelente para sua filha, discutível para a saúde pública. Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba, 2012; 14(1), 1.
40. Roitman B. HPV: uma nova vacina na rede pública. Boletim Científico de Pediatria. 2015, 4(1), 3-4.
41. Almeida FL, Beiral JS, Ribeiro KR, Shimoda E, Souza CHM. A vacina contra o vírus HPV para meninas: um incentivo à vida sexual precoce? Revista Científica Interdisciplinar, 2014; 1(1), 49-71.
42. Silva MJPMA. A eficácia da vacina profilática contra o HPV nas lesões HPV induzidas. Femina, 2009; 37(10), 519-26.
43. Gardasil. [bula] Bula do medicamento Gardasil 9. Laboratório Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda, 2017.
44. Eluf Neto, J. A vacina contra o papilomavírus humano. Revista brasileira de epidemiologia, 2008.

Biofilme e células *persisters*: da persistência à resistência microbiana

Biofilm and persister cells: from persistence to microbial resistance

Jaime Antonio Abrantes[1], *Joseli Maria da Rocha Nogueira*[1]

[1] Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Microbiologia (DCB - ENSP). Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Resumo

Os microrganismos vivem em constante adaptação para sua sobrevivência, tanto no ambiente como no interior de outros organismos. O objetivo deste artigo é reunir o conhecimento existente associado ao papel dos biofilmes microbianos na manutenção de bactérias, sua persistência e a associação com sua resistência aos antimicrobianos em infecções de diversos sítios anatômicos. Trata-se de uma revisão da literatura, visando buscar estudos sobre persistência e resistência bacteriana. Foram utilizadas as bases de dados: MEDLINE, LILACS e BVS. O biofilme é um mecanismo de sucesso evolutivo, no qual bactérias e outros organismos se organizam e se inter-relacionam, inclusive através do *Quorum sensing*. As infecções bacterianas associadas a biofilmes são de difícil tratamento, podendo ser responsável pela cronicidade das mesmas e pela ineficácia da terapia antimicrobiana. Outra responsável por esta ineficácia são as células *persisters*, variantes fenotípicas que sobrevivem à terapia antimicrobiana em estado de latência e depois se reproduzem, perpetuando sua existência. O estudo destas células e mecanismos são de suma importância para o acompanhamento de processos infecciosos diversos, principalmente os crônicos.

Palavras-chave: Farmacorresistência bacteriana; biofilmes; infecções bacterianas.

Abstract

Microorganisms live in constant adaptation for their survival, both in the environment and inside other organisms. The objective of this article is to gather the existing knowledge associated with the role of microbial biofilms in the maintenance of bacteria, their persistence and the association with their resistance to antimicrobials in infections of different anatomical sites. This is a literature review, aiming to search for studies on bacterial persistence and resistance. The following databases were used: MEDLINE, LILACS and VHL. The biofilm is an evolutionary success mechanism, where bacteria and other organisms organize and interrelate, including through Quorum-sensing. Bacterial infections associated with biofilms are difficult to treat and may be responsible for their chronicity and the ineffectiveness of antimicrobial therapy. Another responsible for this ineffectiveness are the persister cells, which are phenotypic variants that survive antimicrobial therapy in a latent state and then reproduce, perpetuating their existence. The study of these cells and mechanisms are of paramount importance for the monitoring of different infectious processes, especially the chronic ones.

Keywords: Biofilms; bacterial infections; drug resistance bacterial.

Correspondência
Jaime Antonio Abrantes
E-mail: jaimeabrantes@gmail.com

Recebido em 27/09/2022 | Aprovado em 28/09/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202200074

INTRODUÇÃO

As bactérias estão presentes em nosso planeta há bilhões de anos e permanecem sobrevivendo mesmo diante de todos os eventos e ambientes inóspitos.[1] Em resposta a alterações ambientais e fisiológicas, ou às vezes espontaneamente, tais microrganismos produzem vários grupos diferentes de subpopulações específicas para atingir uma maior possibilidade de sobrevivência.[2,3]

Consideramos como biofilme uma comunidade de microrganismos que vivem aderidos a uma superfície, envolvidos numa complexa combinação de compostos, como polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular, que dificulta a sua erradicação, já que estas estruturas podem ser consideradas estratégias dos microrganismos para se manterem em uma determinada superfície. Com base nessa possibilidade de adaptação microbiana, é extremamente relevante considerar a dificuldade de se conter infeções causadas por microrganismos organizados nestes biofilmes.[4-6] Esta situação pode ocorrer em diferentes contextos, como no ambiente e até mesmo no hospital, fazendo com que estas bactérias possam necessitar de enfoques diferentes para a sua eliminação.[7,8]

Um tipo de subpopulação importante, encontrada nos biofilmes, são as chamadas células *persisters*, detectadas inicialmente por Bigger em bactérias do gênero *Staphylococcus* sp., e mais tarde também pela equipe de pesquisa de Amato e Brynildsen em *Escherichia coli* e outras espécies.[9,10] Essas cepas exibiram fenótipos temporários de resistência a antimicrobianos (geralmente a múltiplos fármacos), distinguindo-se daquelas que desenvolvem resistência permanente por mutações genéticas ou transferência horizontal de genes.[11] A descoberta de persistentes em biofilmes reacendeu o interesse por essas células incomuns. De fato, a presença de células persistentes pode ser importante na etiologia de muitas doenças infecciosas recalcitrantes.[12]

Recentemente, a alta incidência de recidivas de infecção causada por *persisters* em pacientes imunocomprometidos enfatizou a importância desta pesquisa.[13,14] Acrescente-se, ainda, a descoberta de que muitas infecções crônicas são causadas por microrganismos persistentes, levando também ao uso excessivo de antimicrobianos e, sucessivamente, ao surgimento de outras bactérias resistentes a estas classes de fármacos.[15] Portanto, é importante entender o mecanismo preciso da formação destes biofilmes e quais seriam as estratégias para seu controle. Este artigo de revisão tem como objetivo reunir o conhecimento existente associado ao papel dos biofilmes microbianos na manutenção de bactérias, sua persistência e a associação com sua resistência aos antimicrobianos em infecções de diversos sítios anatômicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão da literatura, visando buscar estudos sobre persistência e resistência bacteriana. Foram utilizadas as bases de dados: MEDLINE, LILACS e BVS, com as seguintes palavras-chave: Farmacorresistência bacteriana, Biofilmes, Infecções bacterianas e *persisters*. Os critérios de inclusão utilizados para a seleção da amostra foram: artigos publicados na íntegra em português, inglês e espanhol; todo artigo, independentemente do método de pesquisa utilizado, e abranger um período de 5 anos (2017 até 2022) visando à atualidade dos dados consultados. Como critérios de exclusão: artigos com duplicidade, acesso restrito ao resumo, publicações sem adesão ao objetivo da pesquisa e aqueles que não atenderam aos critérios de inclusão. Após busca bibliográfica com aplicação dos filtros, critérios de inclusão e exclusão, realizou-se a leitura criteriosa dos títulos e resumos, no intuito de verificar a consonância com o objeto de estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biofilme

Biofilme é uma espessa camada de microrganismos que se agregam para formar uma comunidade microbiana. A mesma se liga a uma superfície com uma camada de polissacarídeo chamada de substância polimérica extracelular (SPE).[16] O SPE consiste em polissacarídeos, DNA extracelular, proteínas, lipídios, surfactantes, flagelos e pili. Esta matriz polimérica protege os microrganismos, pois forma-se ao redor e sobre o crescimento microbiano, promovendo o desenvolvimento desta comunidade e protegendo de ameaças à sua sobrevivência. O biofilme é poroso, a fim de possibilitar a entrada eficaz de nutrientes e eliminação de produtos residuais.[6,8]

De forma geral, existem dois tipos de células provenientes de crescimento microbiano, as células individuais de vida livre e as sésseis, que quando formam agregados podem derivar em biofilmes,[17] os quais podem ser compostos de bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas, uma combinação de ambas, bactérias junto a fungos, protozoários, algas e até vírus. Porém, na maioria dos biofilmes os microrganismos representam menos de 10% da massa seca, sendo os outros 90% compostos pela matriz polimérica.[6]

As células que fazem parte de um biofilme realizam uma complexa rede de interações, em que o principal objetivo

é manter a sobrevivência desta comunidade e um nível de organização. Este sistema é denominado *Quorum sensing*.[8]

Comunicação (Quorum sensing)

O sistema *Quorum sensing* (QS) é um assunto extremamente atual, e com base em seu estudo estamos gradualmente expandindo nossa compreensão sobre como as bactérias se comunicam umas com as outras e regulam suas atividades e interações.

Neste sistema, as bactérias controlam o comportamento de toda a população bacteriana sintetizando e secretando moléculas sinalizadoras, também conhecidas como moléculas autoindutoras (AIs). Esse sistema é usado pelas bactérias para se comunicar e orquestrar a estrutura e função dos biofilmes bacterianos.[18]

Para que isso ocorra, as bactérias que produzem essas moléculas sinalizam para outras próximas. Quando as bactérias detectam que as AIs atingiram uma concentração limite, elas respondem alterando a expressão e o comportamento de seus genes. Além disso, os microrganismos compartilham material genético, que também aumenta a sobrevivência desta estrutura.[6] Além de modificar coletivamente o comportamento bacteriano, as AIs relacionadas ao QS também podem ser incorporadas na diafonia entre o hospedeiro e os microrganismos.[18]

Os estímulos químicos de comunicação (QS) entre as células podem promover diversas mudanças no comportamento da comunidade microbiana como um todo.[8] Entre elas podemos citar: a resposta ao estresse promovida pela limitação de nutrientes com consequente crescimento lento; aumento da expressão de bombas de resistência a múltiplos fármacos; ativação de sistemas de detecção de *quorum* e mudanças no perfil das proteínas da membrana externa.

Em razão das especificidades do biofilme, como variabilidade microbiana, o SPE, a organização populacional, a presença de células *persisters* e até mesmo a eficácia do QS, torna-se uma tarefa árdua a detecção do biofilme em amostras clínicas.[19]

Detecção do biofilme

O diagnóstico de infecção por biofilme é feito principalmente por achados clínicos, pois devido à sua própria natureza, detectá-los é um desafio. Vários métodos têm sido sugeridos para detectar biofilmes em ambiente laboratorial, mas esse avanço não é tão grande no ambiente clínico. Ou seja, os métodos *in vitro*, em condições ideais e controladas, são muito mais eficazes do que o diagnóstico *in vivo*, diretamente no sítio de formação do biofilme.[7,19]

As infecções por biofilme geralmente estão associadas a infecções crônicas e permanecem nos locais de infecção, muitas vezes na presença de dispositivos implantados. Biofilmes podem produzir infecções ocultas ou subclínicas, que provocam uma resposta inflamatória diminuída do hospedeiro e, portanto, são mais difíceis de detectar e tratar. Quando um biofilme é formado em um dispositivo implantado, ele não pode ser detectado sem remoção do dispositivo.[7]

Apesar da evolução tecnológica em detecção laboratorial do biofilme, as técnicas microbiológicas ainda podem ter uma sensibilidade não tão satisfatória, como a cultura, por exemplo. Isto porque, ainda que as células possam ser detectadas, existem fatores limitantes, como as variantes de crescimento lento e as *persisters*, que como já foi mencionado podem não formar colônias no ambiente laboratorial. Entre outros fatores, as técnicas de cultura podem ser ineficazes devido à heterogeneidade dos biofilmes, a presença de espécies mistas e ao envolvimento de cepas bacterianas exigentes.[7]

Não existe uma técnica padronizada em ambiente clínico para detecção de biofilmes, embora haja extrema necessidade e carência deste segmento. No entanto, as técnicas moleculares são promissoras pelos avanços recentes na detecção de biofilme, assim como o uso de biomarcadores associados ao biofilme e a técnicas de imagem. Os métodos moleculares incluem o sequenciamento metagenômico de tecnologias baseadas em DNA. Desta forma é possível revelar mais informações em relação ao método com RNA ribossômico para detecção. Dentre essas informações, podemos citar alguns mecanismos de resistência a antibióticos e fatores de virulência.[7]

Outro método promissor é a utilização de biomarcadores, pois quando associados ao biofilme podem detectar moléculas únicas ou estimular uma resposta específica do hospedeiro ao mesmo. Os anticorpos podem não ser detectados durante uma infecção aguda, no entanto podem ser utilizados para detectar uma infecção associada ao biofilme.[8]

As proteínas são as principais substâncias utilizadas como biomarcadores para as bactérias formadoras de biofilme. Já as imagens de biofilme fornecem informações espaciais e podem auxiliar a análise dos outros métodos convencionais, otimizando-os.[6]

Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), tem sido possível observar que agregados microbianos maiores são normalmente encontrados nas feridas mais difíceis de curar, enquanto agregados menores foram encontrados nas feridas agudas.[8]

Entre os métodos não convencionais de detecção de biofilmes, podemos citar a investigação baseada em

bioimpedância, em que são utilizadas correntes elétricas e ondas acústicas de superfície usando vibração.[6]

Biofilme e infecções

A infecção bacteriana em uma ferida segue uma "progressão exponencial", iniciando com replicação bacteriana, produção de uma matriz polimérica e, por consequência formação do biofilme.[8] Diversos fatores colaboram para a mudança de colonização para infecção, abrangendo a virulência dos microrganismos, a suscetibilidade do hospedeiro, a carga biológica dos microrganismos e o compartilhamento do material genético entre os mesmos.[6,19]

As bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* causam diversas infecções crônicas e se localizam no centro dos problemas em infecções adquiridas na comunidade e em instituições de saúde. Com sua capacidade de formar biofilme, sua participação e dificuldade de resolução em feridas crônicas continua a crescer.[5]

As feridas crônicas que não cicatrizam incluem úlceras venosas nas pernas, úlceras nos pés diabéticos, úlceras por pressão e queimaduras. Uma das causas da cronicidade de feridas se deve ao metabolismo das bactérias na superfície da ferida, principalmente quando começa a replicação. Os subprodutos ali formados, como endotoxinas e metaloproteinases, afetam negativamente as fases da cicatrização.[8]

Além dos casos citados, os biofilmes são encontrados na síndrome do intestino irritável, membranas timpânicas, feridas crônicas, osteomielite, placa dentária, infecções pulmonares causadas por *Pseudomonas* sp., na fibrose cística, amigdalite, implantes, válvulas cardíacas artificiais, lentes de contato e todos os tipos de cateteres internos.[6]

Uma bactéria muito presente em pesquisas é a *Pseudomonas aeruginosa*, um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo e não fermentador de glicose. A capacidade desta bactéria formar um biofilme é uma de suas principais estratégias de sobrevivência, principalmente formando canais de água, e tem como função distribuir nutrientes e oxigênio. A disponibilidade de nutrientes é um dos fatores limitantes para a colonização, como também o gradiente de oxigênio presente em sua superfície.[20]

As espécies mais comuns recuperadas de biofilme são *S. aureus*, *Streptococcus* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. e *Citrobacter* spp,[8] Dependendo do sítio de infecção, podemos encontrar determinados tipos de bactérias, até mesmo uma espécie mais específica, como podemos observar no Quadro 1.

Quadro 1

Infecções humanas associadas à formação de biofilme.

Infecções	Espécies bacterianas envolvidas
Cárie dentária	Cocos Gram-positivos (*Streptococcus* spp.)
Periodontite	Bactérias bucais anaeróbias Gram-negativas
Otite média	*Haemophilus influenzae*
Amigdalite crônica	Várias espécies
Fibrose cística	*Pseudomonas aeruginosa*
Endocardite	*Streptococcus* do grupo viridans e *Staphylococcus* spp.
Fasciíte necrosante	*Streptococcus* do grupo A
Infecções musculoesqueléticas	Cocos Gram-positivos
Osteomielite	Várias espécies
Infecção do trato biliar	Bactérias entéricas
Infecções renais	Bacilos Gram-negativos
Prostatite bacteriana	*Escherichia coli*
Desvio de líquido cefalorraquidiano	*Staphylococcus* spp.
Lentes de contato	*Pseudomonas aeruginosa* e cocos Gram-positivos
Suturas	*Staphylococcus* spp.
Pneumonia associada a sistema de ventilação	Bacilos Gram-negativos
Válvulas mecânicas cardíacas	Cocos Gram-positivos
Infecções em cateter endovascular	*Staphylococcus* spp.

Fonte: Adaptado de Vermelho e colaboradores (2008).[21]

Biofilme x Resistência

Quando o biofilme é produzido em organismo, a infecção por diversas vezes se torna crônica e não cede ao uso de antimicrobianos nem ao sistema imunológico do hospedeiro, interferindo na atividade fagocítica do macrófago ou contribuindo para a inativação de anticorpos.[8]

A tolerância ao antimicrobiano pelo biofilme é diferente da resistência bacteriana aos antimicrobianos. Bactérias incorporadas em um biofilme são capazes de sobreviver ao tratamento com antimicrobianos por conta da tolerância e até resistência. Entretanto, no primeiro caso, quando o biofilme é rompido, as bactérias se tornam suscetíveis ao tratamento com antibióticos.[6]

A resistência do biofilme é derivada de inúmeros fatores e pode variar muito de uma infecção para outra. As bactérias dentro de um biofilme, por exemplo, podem resistir a uma concentração de antimicrobiano de até mil vezes mais que a Concentração Inibitória Mínima (CIM), quando em estado planctônico. [8]

Persisters

Persisters são variantes fenotípicas das cepas bacterianas habitualmente presentes no biofilme, cuja função é a sobrevivência. Estas células ficam num estado de aparente dormência, não se dividem, exibindo tolerância a múltiplos fármacos e podem sobreviver ao tratamento com diversos antimicrobianos conhecidos. Além disso, algumas não são cultiváveis e o mecanismo de tolerância persistente é distinto dos mecanismos bem compreendidos de resistência a antibióticos.[12]

É possível observar esse fenômeno também no ambiente, uma vez que *Persisters* já foram detectadas em esgoto, trazendo riscos à saúde por conta de ineficácia no seu tratamento.[22] As pressões gerais enfrentadas por bactérias no ambiente incluem uma variedade de condições, como a necessidade de nutrientes frente sua escassez, estresse oxidativo, *Quorum sensing*, resposta a danos e à presença de antibióticos, induzindo a formação de células *persisters*.[23]

Há evidências consideráveis em modelos *in vivo*, destacando a importância das *persisters* em prolongar o tempo de infecções. O papel potencial dessas células na recaída de processos infecciosos também é uma razão significativa para investigá-las.[24] As análises acerca das *persisters* são um grande desafio, mediante a transitoriedade e reversibilidade de tal estado fisiológico, assim como a pequena quantidade de material biológico que pode ser gerado a partir das raras células em relação ao restante das colônias.[25]

Durante muitos anos e por falta de investimentos na área, o foco dos estudos se concentrou em manipular populações bacterianas, geneticamente ou ambientalmente, aferindo as mudanças que essas manobras tinham em relação à comunidade bacteriana e na formação de *persisters*.[25]

Com o passar do tempo e da evolução tecnológica, tornou-se prioridade a pesquisa unicelular, uma vez que as *persisters* são uma parcela mínima da população microbiana. O uso de dispositivos microfluídicos associados à microscopia e citometria de fluxo tornou-se alternativa promissora. Com a utilização destes dispositivos, o isolamento unitário de bactérias foi possível, assim como acompanhar o comportamento individual usando microscopia de lapso de tempo e resultando em um mapeamento histórico das *persisters*.[24]

Persistência x Resistência

Existe ainda muita desinformação sobre o entendimento de *persisters*, principalmente no tocante à diferença entre este tipo de célula e a resistência. O fenômeno de persistência difere em alguns aspectos, tanto no nível populacional quanto no nível individual.[24] Podemos observar algumas destas diferenças na Figura 1.

No nível populacional, enquanto as colônias suscetíveis e as resistentes apresentam homogeneidade, as colônias que apresentam persistência são heterogêneas. Este fato ocorre por conta das células *persisters* serem minoria e estarem em latência, por consequência não se reproduzindo. Frente à exposição aos antimicrobianos, em disco-difusão, existe halo de inibição semelhante entre colônias suscetíveis e as que apresentam persistência. Em contrapartida, as resistentes exibem redução significativa do halo ou até a ausência do mesmo. Outra grande diferença é a cinética bacteriana após a exposição aos antimicrobianos.[24]

A curva de crescimento das colônias suscetíveis entra normalmente em declínio, terminando em morte de todas as colônias. Na curva de crescimento das resistentes, há crescimento contínuo e na curva das colônias contendo *persisters*, há um grande declínio causado pelas mortes das não-*persisters*, chegando depois a uma estabilização atribuída às células portadoras do fenômeno de persistência.[23-25]

No nível de célula única, as células *persisters* não apresentam estabilidade, pois não há transmissão de persistência para as próximas gerações. Assim como as células suscetíveis, as *persisters* não apresentam crescimento frente à exposição a antimicrobianos. Já as bactérias resistentes apresentam crescimento frente à exposição a antimicrobianos específicos.[23-25]

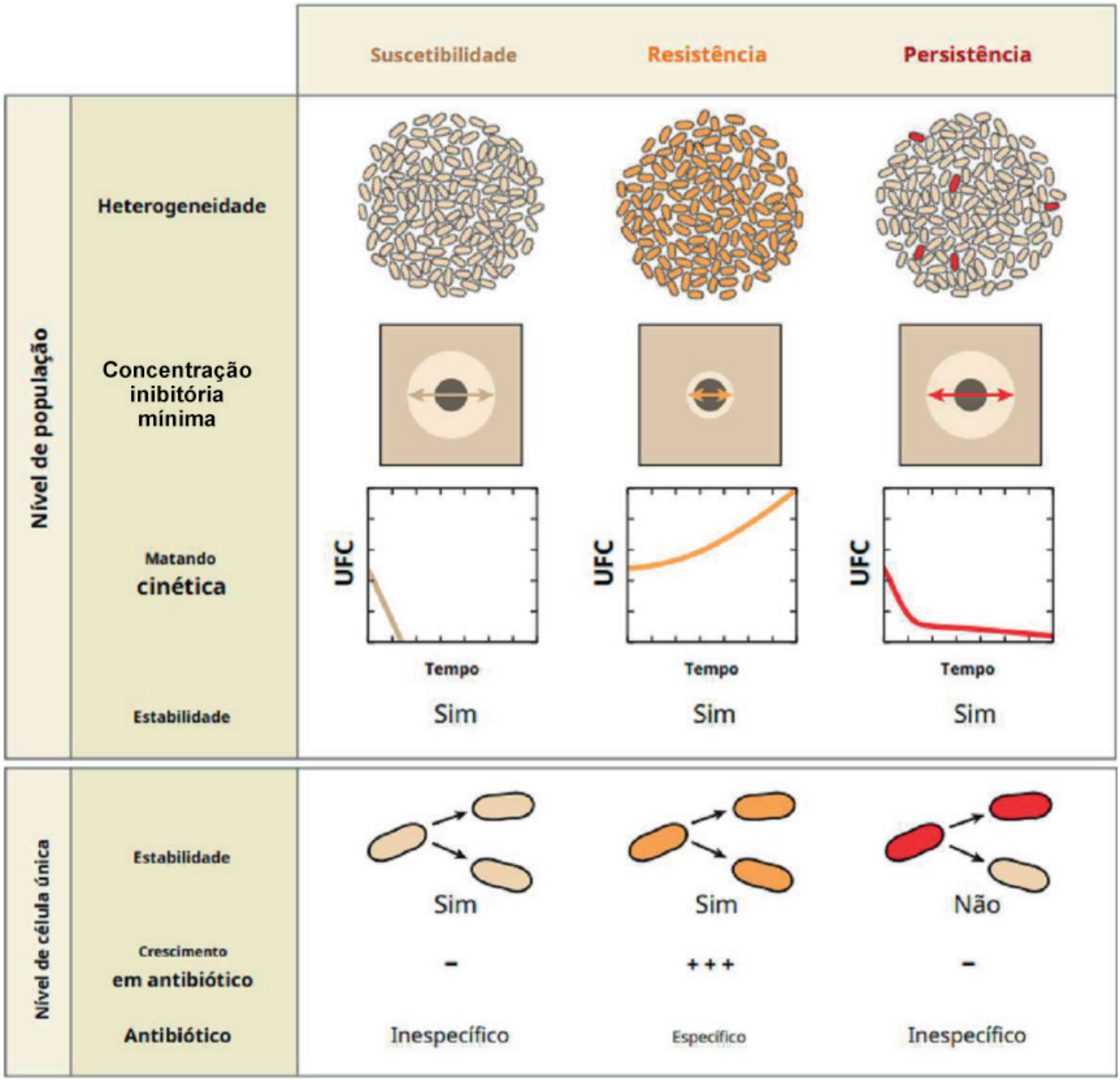


Figura 1

Diferenças populacionais e individuais entre suscetibilidade, resistência e persistência

Fonte: Adaptado de Gollan et al. (2019).[24]

CONCLUSÃO

Biofilme e *persisters* estão presentes no ambiente e também na clínica, sendo um desafio tanto detectá-los quanto tratar infecções associadas. Os estudos acerca dos tópicos abordados dão base para melhorar o entendimento associado à fisiopatologia e aos novos métodos diagnósticos adequados para a detecção *in vitro* e *in vivo* desta comunidade microbiana tão organizada, assim como o fenômeno de persistência e a diferença deste para a resistência aos antimicrobianos. Tais estudos são cruciais na compreensão de processos infecciosos crônicos e de difícil tratamento.

REFERÊNCIAS

1. Das Sarma P, Antunes A, Simões MF, Das Sarma S. Earth's Stratosphere and Microbial Life. Curr Issues Mol Biol. 2020; 38: 197-244.
2. Gollan B, Grabe G, Michaux C, Helaine S. Bacterial Persisters and Infection: Past, Present, and Progressing. Annu Rev Microbiol. 2019; 73: 359-385.
3. Castillo Pedraza MC, Novais TF, Faustoferri RC, Quivey RG, Terekhov A, Hamaker BR. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of Streptococcus mutans biofilms. Biofouling. 2017; 33(9): 722-40.
4. Lima JLC, Alves LR, Paz JNP, Rabelo MA, Maciel MAV, Morais MMC. Análise da produção de biofilme por isolados clínicos de Pseudomonas aeruginosa de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica. Rev Bras Ter Intens. 2017; 29(3): 310-316.
5. Rodrigues RL, Lima JLC, Sena KXFR, Maciel MAV. Phenotypic and genotypic analysis of biofilm production by Pseudomonas aeruginosa isolates from infection and colonization samples. Rev. Soc. Bras. Med Trop. 2020; 53, e20200399.
6. Evelhoch SR. Biofilm and Chronic Nonhealing Wound Infections. Surg Clin North Am. 2020; 100(4): 727-732.
7. Katongole P, Nalubega F, Florence NC, Asiimwe B, Andia I. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic Escherichia coli isolated from clinical isolates in Uganda. BMC Infect Dis. 2020; 20(1): 453.
8. Azevedo MM, Lisboa C, Cobrado L, Pina-Vaz C, Rodrigues A. Hard-to-heal wounds, biofilm and wound healing: an intricate interrelationship. Br J Nurs. 2020; 29(5): S6-S13.
9. Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. Lancet. 1944; 244: 497-500.
10. Amato SM, Brynildsen MP. Nutrient transitions are a source of persisters in Escherichia coli biofilms. PLoS One. 2014; 9(3):e93110.
11. Tilahun M, Shimelis E, Wogayehu T, Assefa G, Wondimagegn G, Mekonnen A, Hailu T, et al. Molecular detection of multidrug resistance pattern and associated gene mutations in M. tuberculosis isolates from newly diagnosed pulmonary tuberculosis patients in Addis Ababa, Ethiopia. PLoS One. 2020; 15(8): e0236054.
12. Lewis, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. Nature Rev Microbiol. 2007; 5 (1): 48-56.
13. Campoccia D, Mirzaei R, Montanaro L, Arciola CR. Hijacking of immune defences by biofilms: a multifront strategy. Biofouling. 2019; 35(10): 1055-1074.
14. Stapels DAC, Hill PWS, Westermann AJ, Fisher RA; Thurston TL, Saliba AE, Blommestein I, et al. Salmonella persisters undermine host immune defenses during antibiotic treatment. Science. 2018; 362(6419): 1156-1160.
15. Band VI, Crispell EK, Napier BA, Herrera CM, Tharp GK, Vavikolanu K, Pohl J, et al. Antibiotic failure mediated by a resistant subpopulation in Enterobacter cloacae. Nat Microbiol. 2016; 1(6): 16053.
16. Alonso VPP, Palissari R, Cotta MA, Cesar CL, Kabuki, DY. Avaliação microscópica de superfícies de aço inoxidável usados em ensaios de biofilmes. Hig Alim. 2019; 2390-2395.
17. Rowson C, Townsend R. Biofilms: prevention and treatment. Br J Hosp Med. 2016; 77(12): 699-703.
18. Wu L, Luo Y. Bacterial quorum-sensing systems and their role in intestinal bacteria-host crosstalk. Front Microbiol. 2021; 12: 611413.
19. Caixeta MA, Braga A, Almeida D, Pinto O, Santana E, Naves P. Estudo da formação de biofilmes por Pseudomonas aeruginosa. Encicl Biosf. 2019; 16(29).
20. Da Silva SAO, Martins FS, Da Silva AS, Ghelen MH, Diaz CMG, Martins ESR. O enfermeiro no diagnóstico e tratamento de biofilme em feridas. Disc Scien | Saúde. 2018; 19(2), 281-290.
21. Vermelho AB, Bastos MCF, Sá MHB. Bacteriologia geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
22. Liu X, Tang R, Li H, Wang L, Wan C. The physiological and ecological properties of bacterial persisters discovered from municipal sewage sludge and the potential risk. Environ Res. 2022; 205: 112481.
23. Kim JS, Chowdhury N, Yamasaki R, Wood TK. Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state. Environ Microbiol. 2018; 20(6): 2038-2048.
24. Gollan B, Grabe G, Michaux C, Helaine S. Bacterial persisters and infection: past, present, and progressing. Annu Rev Microbiol. 2019; 73: 359-385.
25. Van den Bergh B, Fauvart M, Michiels J. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. FEMS Microbiol. Rev. 2017. 41(3):219-51.

Interferência de medicamentos em exames laboratoriais: uma revisão de literatura

Drug interference in laboratory tests: a literature review

Claudio Lacerda de Souza[1], *Laila Micaela de Lima Mendes*[1], *Sara Nunes de Oliveira Araujo*[2]

[1] Graduando(a) em Biomedicina no Centro Universitário Jorge Amado – UNIJORGE. Salvador, BA, Brasil.

[2] Biomédica, Doutora em Patologia Humana – Pesquisadora externa do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz Bahia. Salvador, BA, Brasil.

Resumo

Introdução: No laboratório de análises clínicas existem habitualmente relações concomitantes de diversos medicamentos com exames laboratoriais. Sabendo que alguns medicamentos utilizados pelos pacientes podem interferir nos exames laboratoriais, a seleção desses fármacos e sua associação com diferentes exames pode minimizar resultados equivocados. *Objetivo:* Demonstrar os medicamentos que mais podem gerar interferência nos exames laboratoriais. *Material e métodos:* Foram selecionados 91 artigos de pesquisa, publicados em periódicos nacionais na língua portuguesa, inglesa e espanhola entre 2015-2020. Apenas 29 estudos foram incluídos no trabalho, considerando as características gerais dos estudos e a interferência medicamentosa nos testes laboratoriais. As bases de dados utilizadas para a pesquisa do tema foram: LILACS, PubMed e SciELO, a partir dos seguintes descritores: Interação medicamentosa, exame laboratorial, diagnóstico. *Resultados e discussão:* De acordo com os dados encontrados na literatura, existe interferência de medicamentos em testes bioquímicos, microbiológicos, hematológicos, imunológicos, imuno-hematológicos e urina tipo 1. Dentre os medicamentos encontrados como interferentes estão inclusas as classes de anti-hipertensivos, diuréticos, antidiabéticos, antibióticos, anticoagulantes, anticoncepcionais, anti-histamínicos, corticosteroides, imunossupressores sistêmicos, antipsicótico, anticorpos monoclonais, antiparkinsonianos e opioides analgésicos. *Conclusão:* As classes medicamentosas que mais geram interferências são os anti-hipertensivos e os diuréticos, e os testes bioquímicos são mais afetados na rotina laboratorial pelos medicamentos.

Palavras-chave: Avaliação de processos (cuidados de saúde); boas práticas de manipulação; capacitação profissional; controle analítico de qualidade.

Abstract

Introduction: In clinical analysis laboratory, there are usually concurrent relationships between different drugs with laboratory tests. Knowing that some medications can interfere with laboratory tests, the selection of these drugs and their association with each test performed highlighting their possible interference, can minimize erroneous results. *Objective:* To demonstrate the drugs that can most interfere with laboratory tests. *Material and methods:* 91 research articles, published in national journals in Portuguese, English and Spanish between 2015-2020, were selected, only 29 studies were included in the synthesis of the study, considering the general characteristics of the studies, the drug interference in the tests laboratory tests. The databases used to research the theme were: LILACS, PubMed and SciELO, based on the following descriptors: Drug interaction, laboratory examination, diagnosis. *Results and discussion:* According to the literature, there is interference by drugs in biochemical, microbiological, hematological, immunological, immunohematological and type 1 urine tests. The drugs found to be interfering are included in the classes of; antihypertensives, diuretics, antidiabetics, antibiotics, anticoagulants, anticonseptives, antihistamines, corticosteroids, systemic immunosuppressants, antipsychotic, monoclonal antibodies, antiparkinsonians and opioids analgesics. *Conclusion:* The drug that generate the most interference are antihypertensive drugs and diuretics, and biochemical tests are affected in the laboratory routine by drugs.

Keywords: Process assessment (health care); good manipulation practices; professional training; analytical quality control.

Correspondência
Sara Nunes de Oliveira Araújo
E-mail: sara_nunes2@hotmail.com

Recebido em 18/04/2021 | Aprovado em 17/03/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202202136

INTRODUÇÃO

Os laboratórios de análises clínicas são baseados em procedimentos que se iniciam na coleta de dados e espécime do paciente, passam pelo processamento das amostras e finalizam na geração do laudo laboratorial. Esse processo é dividido em três fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase pré-analítica inclui a requisição do exame, a orientação sobre a coleta do material, o transporte até o laboratório clínico (caso seja um espaço diferente do local de coleta) e o cadastramento das amostras. Desse modo, a fase pré-analítica é a etapa que mais impacta custos e qualidade dos resultados laboratoriais.[1] A fase analítica é a segunda fase a ser executada, onde são realizadas as análises do material coletado, o seu monitoramento, a supervisão dos equipamentos e dos reagentes, além da avaliação da estabilidade das amostras. Por fim, a fase pós-analítica tem como papel representar as análises realizadas na fase analítica em forma de um laudo laboratorial autoexplicativo e claro a fim de contribuir com a tomada de decisão médica.[1]

O preparo para a realização da fase pré-analítica pode se tornar fácil caso haja uma orientação adequada aos pacientes antes do exame, como orientações *on-line*, uso de aplicativos do laboratório ou aplicação de questionários que instruam os pacientes sobre a associação de exercícios físicos, hábitos de ingestão de bebida alcoólica ou período menstrual, além da utilização de medicamentos em uso contínuo ou não contínuo antes da coleta do material biológico.[2]

No laboratório de análises clínicas, é comum a relação concomitante de diversos medicamentos com exames laboratoriais, porém essa associação pode iniciar o que é denominado interação medicamentosa (IM), interação entre os medicamentos e os exames laboratoriais, sendo que os seus efeitos em até determinado ponto são de forma esperada, no entanto, em alguns casos, essas interações podem levar a resultados equivocados e ineficientes no tratamento do paciente.[3]

As IMs se subdividem em farmacocinéticas ou farmacodinâmicas, que podem ser afetadas por fatores específicos do paciente, incluindo processo de doença, polifarmácia, dose e frequência de medicamentos.[4] Na farmacocinética, medicamentos sofrem absorção, distribuição, biotransformação e excreção. Já na farmacodinâmica o medicamento age no tecido-alvo onde tem efeito.[4]

Em um estudo, Souza e colaboradores mostraram que muitos fármacos têm o efeito de proporcionar reações *in vivo*, *in vitro* ou em ambos, dependendo do teste laboratorial. Nesses casos, quando um medicamento induz alteração de um princípio biológico por meio de um mecanismo fisiológico ou farmacológico, a interferência ou reação adversa é facilmente detectada.[5]

As principais razões do potencial da gravidade clínica são classificadas em leves, moderadas e graves, classificações que permitem prevenir os agravos de interferências medicamentosas para monitorar de forma eficaz o uso racional de fármacos.[6] Com isso, as interferências medicamentosas de gravidade leve representam uma resolução clínica limitada, não impondo alterações no tratamento médico; as interferências medicamentosas de gravidade moderada podem piorar o quadro clínico do paciente e requerem uma alteração da terapia farmacológica para não comprometer o tratamento; as interferências medicamentosas com gravidade grave precisa de ação médica imediata, pois o paciente corre risco de morte.[7]

A rotina de um laboratório é complexa, com múltiplos processos diferentes que estão relacionados pela grande variedade de análises em níveis plasmáticos, séricos e urinários em cada indivíduo.[8] Essa rotina possibilita determinar circunstâncias patológicas diante dos resultados obtidos. Os profissionais que interpretam os resultados devem seguir normas que planejam diminuir desacertos ou até mesmo evitá-los.[9] Sabendo em que grau o medicamento pode interferir, existe uma variação com o procedimento utilizado, podendo ser detectado no sangue e na urina. Com isso, para diminuir essa interferência às amostras de sangue em uma detecção de patologia clínica, o ideal é efetuar os exames quando o uso do medicamento for suspenso, ou em um período de utilização de mínimas doses ou, no caso de medicamentos que não podem ser interrompidos, deixar registrado na ficha do paciente.[3,10]

Os medicamentos utilizados de forma contínua possibilita um rastreio em situações de risco, em que possíveis alterações no organismo podem interferir no seguimento das análises e alterar o diagnóstico.[11] A literatura indica que o uso de vários medicamentos também compromete os resultados dos exames, contribuindo para um diagnóstico falso positivo ou falso negativo. É de conhecimento científico que muitos fármacos interferem nos exames, e que no organismo, ao interagirem com substâncias que contêm os reagentes químicos utilizados, podem estar associados a essa alteração no diagnóstico.[11]

Pessoa e colaboradores enfatizaram que os riscos de interferência medicamentosa podem aumentar quando o paciente usa mais de um fármaco. De fato, isso deve ser

averiguado pelos profissionais de saúde com antecedência à execução dos exames.[10] Além dos formulários que são aplicáveis antes do exame, os gestores dos laboratórios de análises clínicas precisam desenvolver e implantar um sistema de gestão que seja eficaz e que possa avaliar melhor o perfil do paciente e liberar exames com qualidade.[10]

Sabendo que a interferência medicamentosa é uma situação comum que pode alterar os resultados de análises clínicas, o objetivo dessa revisão é alertar os profissionais analistas, no sentido de que estejam mais atentos na liberação dos laudos, diminuindo a quantidade de erros e determinado um diagnóstico mais fidedigno para os pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta revisão bibliográfica foi feito um levantamento de publicações científicas relacionadas com a temática sobre interferência de medicamentos em exames laboratoriais. Os critérios de inclusão dos artigos foram estabelecidos da seguinte maneira: ser artigo de pesquisa publicado em periódicos nacionais na língua portuguesa e inglesa entre 2015 a 2020. As bases de dados utilizadas para a pesquisa do tema foram: LILACS (Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências Sociais e da Saúde), PubMed e SciELO (*Scientific Eletronic Library Online*) para coleta de dados, a partir dos seguintes descritores: Interação medicamentosa, exame laboratorial, diagnóstico.

Durante a coleta e análise do material foram coletados 91 artigos de pesquisa, e dentre estes foram excluídos 62 artigos que na leitura do resumo não apresentavam relação com a problemática do estudo que foi identificar interferência nos exames laboratoriais em decorrência do uso de medicamentos. Para análise dos 29 artigos selecionados e síntese do trabalho, foram realizados os seguintes procedimentos: leitura informativa ou exploratória, que constitui na leitura do material para saber do que se tratavam os artigos; leitura seletiva, que se preocupou com a descrição e seleção do material quanto a sua relevância para o estudo; leitura crítica e reflexiva que buscou por meio dos dados a construção dos resultados encontrados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Interferência dos anti-hipertensivos em testes bioquímicos

Os exames bioquímicos são importantes parâmetros que possibilitam averiguar as alterações metabólicas responsáveis pelo desenvolvimento de doenças de cada indivíduo. A avaliação de exames laboratoriais na prática clínica possibilita a detecção de individualidade bioquímica de cada indivíduo, em conjunto com os sinais clínicos e avaliação dietética.[12]

No caso dos anti-hipertensivos, sua relação com os exames é homogênea, pois as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte da população adulta no Brasil, tendo um alto índice de casos de interferências.[8,13] Nesse contexto, a literatura menciona o aumento na análise de creatinina, de transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e de lipoproteínas de alta densidade (HDL) no soro de indivíduo que utiliza o captopril, um inibidor da enzima conversora da angiotensina I.[5,13,14] No exemplo de efeito fisiológico, o enalapril[15] e a hidroclorotiazida,[16] que são utilizados para hipertensão, causam aumento nas dosagens de ácido úrico no soro.[8] Outra interferência é observada no uso do propranolol, também um anti-hipertensivo, o qual demonstra aumento no exame de tiroxina (T4) no soro.[2]

Em seu estudo, Silva descreveu que os fármacos para hipertensão utilizados antes do processo de coleta para o exame podem interferir de forma considerável, sendo que a interferência fisiológica se dá por mecanismo de ação relacionada à nefrotoxicidade. O propranolol, por sua vez, é associado a um aumento sérico de triglicerídeos e redução dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL), podendo elevar as bilirrubinas.[8]

O captopril apresenta falso aumento de frutosamina no soro e, dependendo dos pacientes, pode indicar a elevação de potássio (hipercalemia), como a aparente neutropenia naqueles com mais de três meses de tratamento, como também o aumento de cetonas, tanto em concentrações supraterapêutica como terapêutica.[8,13]

Vaca Sarasti e colaboradores mostraram que o uso da levotiroxina sódica, assim como o propranolol, demonstra alterações nos exames com altos números de T4, cuja indicação é para o tratamento do hipotireoidismo como reposição hormonal. O hipotireoidismo é uma alteração tireoidiana muito frequente e usualmente o diagnóstico e o tratamento são simples, mesmo quando essas alterações são detectáveis.[17]

Interferência dos diuréticos em testes bioquímicos

No caso dos diuréticos, os tiazídicos, como a clortalidona, são específicos para o balanço do cálcio, diminuindo a excreção urinária, aumentando os níveis séricos. Mesmo assim, eleva os níveis de colesterol total (CT), da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de muito baixa

densidade (VLDL-C).[13] No entanto, o diurético de alça, como a furosemida, diminui os níveis de sódio, cloreto, potássio, cálcio e magnésio no soro. O fármaco também está associado ao aumento sérico dos níveis de creatinina, ureia, colesterol, triglicérides e de ácido úrico.[13,14]

Interferência dos antidiabéticos em testes bioquímicos

O cloridrato de metformina é um antidiabético, também citado por causar resultados falsos positivos em testes bioquímicos de cetona urinária, diminuindo as concentrações do colesterol total, de lipoproteína de baixa densidade (LDL), de glicose, de insulina e de triglicerídeos. O uso desse fármaco em um tempo prolongado pode alterar a forma de absorção celular da cobalamina (B12), diminuindo a captação de ferro.[8]

A sitagliptina é um medicamento usado como segunda escolha para o tratamento do diabetes tipo 2 em pacientes que não responderam à metformina. O uso deste fármaco está associado à elevação na concentração de incretinas, que são peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1) e peptídeo inibidor gástrico (GIP), resultando em aumento de secreção de insulina e diminuição na secreção de glucagon.[18]

Interferência dos anticoncepcionais em testes bioquímicos

Os medicamentos anticoncepcionais orais são utilizados para contracepção, e agem através de hormônios, impedindo a ovulação e assim evitando a gravidez sem planejamento. Alguns desses medicamentos, como por exemplo, Diane 35, Selene e Nordette, estão associados à elevação na formação de trombina, gerando o risco de tromboembolismo venoso associado à alta dosagem de etinilestradiol, hormônio sintético que faz parte da composição do medicamento, gerando aumento dos níveis plasmáticos de tempo de protrombina (TP), de tempo da tromboplastina parcial ativada (TTPA), de tempo de trombina (TT) e na dosagem de fibrinogênio.[19]

Interferência dos antibióticos em testes microbiológicos

A urocultura é um exame de urina que serve para identificar bactérias causadoras da infecção urinária. De modo mais simples, é capaz apenas de identificar o microrganismo que está causando a infecção. O uso de antibióticos gera interferência caso o paciente esteja fazendo uso, e pode inibir o crescimento das bactérias.[20]

Dependendo do medicamento, a terapia deve ser suspensa por alguns dias antes da realização dos exames laboratoriais. Aos pacientes em uso de antibióticos, torna-se imprescindível a retirada, no mínimo, 7 dias antes da realização de exames de cultura. Sendo assim, uma forma regulamentada para auxiliar na redução dessas alterações é o monitoramento dos medicamentos, que consiste na prática de farmacovigilância.[21]

Interferência dos antibióticos em teste de urina tipo 1

O uso de antibacterianos como benzilpenicilina e de cefuroxima pode induzir a resultados falsos positivos na medição de glicose urinária, pelo método de redução do cobre. Outro antibacteriano, a doxiciclina, gera interferência com o teste de fluorescência, resultando em níveis de catecolaminas falsamente aumentados na urina.[22]

Interferência dos anticoagulantes em testes hematológicos

O hemograma completo é um exame que serve para a avaliação da saúde geral do paciente, fornecendo diagnóstico de doenças, acusando distúrbios sanguíneos e para acompanhamento nos diversos tratamentos.[23] Alguns medicamentos podem causar alterações hematológicas graves, como a agranulocitose, aplasia de medula óssea e trombocitopenias.[9]

A literatura relata sobre a trombocitopenia induzida por heparina (TIH), pela administração de heparina, que resulta na agregação plaquetária. A TIH tipo II ocorre quando tem formação de anticorpos tipo IgG contra o complexo heparina e o fator IV plaquetário, com diminuição da proteína C, da antitrombina, do cofator de heparina II, levando ao quadro grave de formação de trombos arteriais ou venosos.[24]

Os anticoagulantes como tripotássico (K_3 EDTA), que tem função quelante de íons metálicos, atuam no sangue sequestrando o cálcio plasmático disponível, inibindo a cascata de coagulação, preservando a morfologia eritrocitária após a coleta da amostra de sangue. A literatura afirma que o excesso de tripotássico (K_3 EDTA) pode diminuir o valor do hematócrito e do volume corpuscular médio (VCM) devido à hipertonicidade do plasma com concentração iônica aumentada, causando aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), sem alterar a concentração de hemoglobina.[25]

Interferência dos anti-histamínicosos em testes imunológicos

Os testes imunológicos detectam a presença de anticorpos contra parasitas, fungos, bactérias ou vírus. Podem também detectar a presença dos antígenos desses agentes,

indicando diretamente a sua presença no hospedeiro. Os testes imunológicos podem ainda ser utilizados para a detecção de hormônios ou outras substâncias químicas.[26]

Sabe-se que anti-histamínicos devem ser suspensos por mais de 96 horas antes dos testes de leitura imediata, pois podem interferir no resultado, minimizando ou inibindo reações de leitura. Para os de leitura tardia, anti-histamínicos estão liberados.[27]

Interferência dos corticosteroides em testes imunológicos

Para os testes de leitura tardia, os pacientes devem, preferencialmente, estar sem o uso de corticosteroides, pois podem interferir no resultado, minimizando ou inibindo reações de leitura.[27]

Interferência dos imunossupressores sistêmicos em testes imunológicos

Os imunossupressores sistêmicos agem na divisão celular e são usados na prevenção de rejeição de transplantes e no tratamento das doenças autoimunes. Os pacientes devem, preferencialmente, estar sem o uso de imunossupressores sistêmicos, pois podem interferir no resultado, minimizando ou inibindo reações do teste de leitura tardia.[27]

Interferência de antipsicótico em testes imunológicos

A literatura cita que a clorpromazina é um antipsicótico que gera interferência baseada em reações imunológicas entre gonadotrofina coriônica humana (HCG) e anti-HCG, resultando em falsos positivos ou falsos negativos de gravidez.[22]

Interferência dos anticoncepcionais em testes imunológicos

Os anticoncepcionais orais conhecidos como Diane 35, Selene e Nordette também demonstraram interferência nos testes que avaliam os sistemas reguladores da coagulação na avaliação de quantificação da proteína total e livre, gerando níveis diminuídos de antitrombina pelo princípio do teste de imunonefelometria, e de proteína S no ELISA.[19]

Interferência de anticorpo monoclonal em testes imuno-hematológicos

Os testes imuno-hematológicos são fundamentais para subsidiar as pesquisas pré e pós-transfusionais realizadas entre o sangue do doador e do receptor, com o objetivo de evitar reações indesejadas no momento da transfusão de hemocomponentes.[28]

Observou-se em pacientes que fizeram uso do Daratumumabe (DARA), a presença de anticorpo monoclonal IgG1κ que reconhece uma proteína transmembranar (CD38) altamente expressa nas células malignas características do mieloma múltiplo, onde o uso do DARA interfere nos testes de compatibilidade sanguínea, complicando a liberação segura de hemoderivados, causando pan-reatividade em testes sorológicos de rotina, gerando reações de aglutinação positiva em testes indiretos de antiglobulina (IATs), como testes de detecção (triagem) de anticorpos, painéis de identificação de anticorpos e testes cruzados de globulina anti-humana (AHG).[29]

Interferência de opioide analgésico em testes toxicológicos de urina

A literatura relata que a oxicodona, medicamento da classe opioide analgésico, tem demonstrado interferência nos resultados dos testes toxicológicos para cocaína e maconha.[22]

A fim de traçar as alterações que medicamentos podem exercer em resultados de exames laboratoriais, consolidamos alguns dados obtidos na literatura, que são apresentados na Tabela 1.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As interferências medicamentosas são responsáveis por gerar diversos erros analíticos que envolvem os testes laboratoriais bioquímicos, hematológicos, imunológicos, imuno-hematológicos, microbiológicos e na uranálises. Os testes de bioquímica são os que mais sofrem alterações nos resultados por conta dessas interferências. Dentro desses interferentes, os diuréticos e anti-hipertensivos predominam quando comparados aos demais estudados. Sendo assim, as interferências por medicamentos já são encontradas em publicações científicas na literatura comprovando a necessidade da investigação desse eixo de estudo, o que não descarta a importância de novas pesquisas científicas, pois existem novos medicamentos que podem demonstrar a necessidade de especificações para auxiliar os profissionais de saúde, no momento de realizar os testes para evitar qualquer equívoco nos resultados dos testes.

Tabela 1

Medicamentos que exercem interferência em resultados de exames laboratoriais

MEDICAMENTOS	EXAMES	MATERIAL	REFERÊNCIA
ANTI-HIPERTENSIVOS			
Propranolol	↑ Triglicerídeos ↑ Bilirrubinas ↑ Tiroxina (T4) ↓ Lipoproteínas de alta densidade (HDL)	Soro	(3)(8)(17)
Hidroclorotiazida	↑ Ácido úrico ↑ Cálcio ↑ Glicose	Soro	(16)
Enalapril	↑ Ácido úrico	Soro	(15)
Captopril	↑ Creatinina ↑ K – Potássio ↑ Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) ↑ Lipoproteína de alta densidade (HDL)	Soro	(14)(16)(8)
Levotiroxina sódica	↑ Tiroxina (T4)	Soro	(17)
DIURÉTICOS			
Clortalidona	↑ Colesterol total (CT) ↑ Lipoproteína de baixa densidade (LDL) ↑ Lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C)	Soro	(13)
Furosemida	↑ Creatinina ↑ Ureia ↑ Colesterol ↑ Triglicérides ↑ Acido úrico ↓ Sódio ↓ Cloreto ↓ Potássio ↓ Cálcio ↓ Magnésio	Soro	(13)
ANTIDIABÉTICOS			
Cloridrato de Metformina	↑ Cetonas urinárias ↓ Colesterol total (CT) ↓ Lipoproteína de baixa densidade (LDL) ↓ Ferro ↓ Triglicerídeos ↓ Insulina ↓ Glicose	Soro	(8)
Sitagliptina	↑ Insulina ↓ Glucagon	Soro	(18)
ANTICONCEPCIONAIS			
Diane 35, Selene e Nordette	↑ Tempo de protrombina (TP) ↑ Tempo da tromboplastina parcial ativada (TTPA) ↑ Tempo de trombina (TT) ↑ Fibrinogênio ↓ Antitrombina ↓ Proteína S	Plasma	(19)

Tabela 1 (continuação)

MEDICAMENTOS	EXAMES	MATERIAL	REFERÊNCIA
ANTIBIÓTICOS			
Antibióticos	↓ Presença de bactérias no exame de urocultura	Urina	(20)
Benzilpenicilina e Cefuroxima	Falso positivo de glicose.	Urina	(22)
Doxiciclina	Falso aumento de catecolaminas.	Urina	(22)
ANTICOAGULANTES			
Heparina	↓ Proteína C ↓ Antitrombina ↓ Cofator de heparina II	Sangue	(24)
Tripotássico (K3 EDTA)	↓ Hematócrito ↓ Volume corpuscular médio (VCM) ↑ Hemoglobina corpuscular média (CHCM)	Sangue	(25)
ANTI-HISTAMÍNICOS			
ANTI-HISTAMÍNICOS	↓ Reação dos testes imunológicos de leitura imediata.	Soro	(27)
CORTICOSTEROIDES			
Corticosteroides	↓ Reação dos testes imunológicos de leitura tardia.	Soro	(27)
IMUNOSSUPRESSORES SISTÊMICOS			
Imunossupressores sistêmicos	↓ Reação dos testes imunológicos de leitura tardia.	Soro	(27)
ANTIPSICÓTICO			
Clorpromazina	Falso positivo ou Falso negativo nos testes de gravidez.	Soro	(22)
ANTICORPOS MONOCLONAIS			
Daratumumabe – DARA	Aglutinação positiva em testes indiretos de antiglobulina. Aglutinação positiva em testes de detecção de anticorpos. Aglutinação positiva em testes de globulina anti-humana (AHG).	Plasma	(29)
OPIOIDES ANALGÉSICOS			
Oxicodona	Falso negativo em testes para cocaína e maconha (THC)	Urina	(22)

REFERÊNCIAS

1. Wolf LM. Fases pré-analítica, analítica e pós-analítica no monitoramento laboratorial da anticoagulação com antagonistas da vitamina k. Clin Biomed Res [Internet]. 2017;37(2):125-31. Disponível em: http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/2357-9730.70775
2. Teixeira JCC, Chicote SRM, Daneze ER. Non-Conformities Identified During the Phases Pre-Analytics, Analytical and Post-Analytical of a Clinical Analysis Public Laboratory. Nucleus. 2016;13(1):251-60.
3. Maia MRA, Pieroni MR, Barros GBS. Análise dos Exames Laboratoriais Relacionados ao Tempo de Coagulação Sanguínea de Pacientes Usuários de Anticoagulantes. Revista Científica da Unifenas. 2019;1:3-11.
4. Rodrigues MCS, Oliveira C de. Drug-drug interactions and adverse drug reactions in polypharmacy among older adults: an integrative review. Rev Lat Am Enfermagem [Internet]. 2016;24. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-11692016000100613&lng=en&tlng=en
5. Souza RKL, Coan EW, Anghebem MI. Nonconformities in the pre-analytical phase identified in a public health laboratory. J Bras Patol e Med Lab. 2020;56:1-8.
6. Smith MP, Bluth MH. Common Interferences in Drug Testing. Clin Lab Med [Internet]. 2016 Dec;36(4):663-71. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272271216300622
7. Zhong ZD, Clements-Egan A, Gorovits B, Maia M, Sumner G, Theobald V, et al. Drug Target Interference in Immunogenicity Assays: Recommendations and Mitigation Strategies. AAPS J [Internet]. 2017 Nov 23;19(6):1564-75. Disponível em: http://link.springer.com/10.1208/s12248-017-0148-7
8. Silva LM da. Interferência de antidiabéticos e anti-hipertensivos em exames laboratórias bioquímicos: uma revisão integrativa. BMC Public Health [Internet]. 2017;5(1):1-8. Disponível em: http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/7165
9. Bezerra LA. Interferências medicamentosas em exames laboratoriais. Ciências Biológicas e da Saúde. 2016;2:41-8.
10. Pessoa T de L, Clemente WS, Costa TX da, Bezerra PK do V, Martins RR. Drug interactions in maternal intensive care: prevalence, risk factors, and potential risk medications. Einstein (São Paulo) [Internet]. 2019 May 22;17(3). Disponível em: https://journal.einstein.br/article/drug-interactions-in-maternal-intensive-care-prevalence-risk-factors-and-potential-risk-medications/
11. Marini DC, Ferreira FR, Zuim NRB. Interferência das Estatinas em Exames Laboratoriais. Infarma - Ciências Farm. 2017;29(1):43.

12. Mourão BCL, Bassan FAP, Oliveira LA de, Rodrigues G, Beira J. Revista Saúde em Foco – Edição no 11 – Ano: 2019. 2019;1441-7.
13. Souza A, Santiago E, Almeida L. Interferências nos Exames Laboratoriais Causados pelos Anti-Hipertensivos Usados no Brasil. Rev Eletrôn Atualiza Saúde [Internet].2016;3(3):101-13. Disponível em: http://atualizarevista.com.br/wp-content/uploads/2016/01/Interferências-nos-exames-laboratoriais-causados-pelos-anti-hipertensivos-usados-no-Brasil-v-3-n-3.pdf
14. Amaral JF do, Ialá TJ, Felício JF, Ferreira GDO, Batista JMM, da Silva FM, et al. Interações Medicamentosas Potenciais em pacientes internados em um hospital filantrópico. Rev Enferm Atual Derme [Internet]. 2020 Jun 30;92(30):235-42. Disponível em: https://revistaenfermagematual.com.br/index.php/revista/article/view/687
15. Tenorio EAE. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Medicina (B Aires) [Internet]. 2018;141. Disponível em: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/4082%0Ahttp://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4147/Diaz_rc.pdf;jsessionid=CD5A7FF3022F1A5526948369A600356D?sequence=1
16. Alves NR, Denise P, Menezes L de, Diniz JÁ, Souza FAF, Carvalho PMM, Tavares SMQMC Artigo. Avaliação das interações medicamentosas entre anti-hipertensivos e hipoglicemiantes orais. Rev Psicol [Internet]. 2019;13(1981–1179):374-92. Disponível em: https://idonline.emnuvens.com.br/id/article/view/1625/2394
17. Vaca Sarasti GE, et al. Prevalencia de hipotiroidismo determinado mediante niveles de FT4 y TSH en pacientes que acuden al Laboratorio Metrored Valle de los Chillos. 2016;49. Disponível em: http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/10040
18. Vieira GD-V, Xavier JO de L, Freitas JC de O, Sousa OV de. Agonistas do receptor de GLP-1 e inibidores da serino-protease dipeptidil-peptidase-4 no tratamento de diabetes tipo 2 - Uma revisão. Brazilian J Heal Rev [Internet]. 2020;3(4):7654-75. Disponível em: https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/12804/10752
19. Duarte AJVG. Os anticoncepcionais orais como fatores de risco para a trombose venosa profunda. BMD - Grad [Internet]. 2017;6:5-9. Disponível em: https://repositorio.uniceub.br/jspui/handle/235/11698
20. Masson LC, Martins LV, Gomes CM, Cardoso AM. Diagnóstico laboratorial das infecções urinárias: relação entre a urocultura e o EAS. Rev Bras Análises Clínicas. 2020;52(1):77-81.
21. Carolina A, Modesto F, Xavier T, Matteucci A, Amaral RG. Conhecimentos e Condutas de Profissionais de Saúde de um Hospital da Rede Sentinela Pharmacovigilance: Professional Knowledge and Conduct at a Teaching Hospital. 2016;40(3):401-10.
22. Rapkiewicz JC, Zaros KJB, Grobe R. Interação de fármacos com exames de laboratório. Cim formando. 2019;4(2):1-10.
23. Seniv L, Simionatto M, Cruz BR, Borato DCK. Analysis of temperature, time and blood/anticoagulant ratio in the complete blood count. Rev Bras Análises Clínicas [Internet]. 2017;49(2). Disponível em: http://www.gnresearch.org/doi/10.21877/2448-3877.201600545
24. Pimenta REF, Yoshida WB, Rollo HA, Sobreira ML, Bertanha M, Mariúba JV de O, et al. Trombocitopenia induzida por heparina em paciente com oclusão arterial aguda. J Vasc Bras [Internet]. 2016 Jun;15(2):138-41. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/1677-5449.004215
25. Riba VCJ, Pessini PGS, Chagas CS, Neves DS, Gascón TM, Fonseca FLA, et al. Interference of blood storage containing K 2 EDTA and K 3 EDTA anticoagulants in the automated analysis of the hemogram. J Bras Patol e Med Lab [Internet]. 2020;56:1-6. Disponível em: http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1676-2444.20200037
26. Silva MC, Brígido PC, Penha HMCA. Manual Ilustrado de Práticas Laboratoriais em Imunologia. Manual Ilustrado de Práticas Laboratoriais em Imunologia. 2016.
27. Aun MV, Malaman MF, Felix MMR, Menezes UP, Queiroz GR e S de, Rodrigues AT, et al. Testes in vivo nas reações de hipersensibilidade a medicamentos - Parte I: testes cutâneos. Brazilian J Allergy Immunol. 2018;2(4):7-12.
28. Cunha MC. Importância dos Testes Imuno-Hematológicos em Receptores de Sangue e a Ocorrência das Reações Transfusionais. Rev Eletrônica Farmácia. 2016;13(1.1):56-9.
29. Chapuy CI, Aguad MD, Nicholson RT, AuBuchon JP, Cohn CS, Delaney M, et al. International validation of a dithiothreitol (DTT) – based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing. Transfusion [Internet]. 2016 Dec;56(12):2964-72. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/trf.13789

Análise comparativa dos parâmetros de testes rápidos para o diagnóstico de anticorpos Sars-CoV-2

Comparative analysis of rapid test parameters for the diagnosis of Sars-CoV-2 antibodies

Juliete da Silveira[1], *Emiliana Claro Avila*[2], *Allyne Cristina Grando*[1]

[1] Universidade Luterana do Brasil, Curso de Biomedicina. Canoas, RS, Brasil.

[2] Faculdade Anhanguera, Curso de Biomedicina. Pelotas, RS, Brasil.

Resumo

Introdução: O vírus SARS-CoV-2 é o responsável pela atual pandemia da Covid-19, que causa a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG, em inglês SARS) com alta taxa de mortalidade. A transmissão ocorre a partir de uma pessoa infectada através de secreções ou gotículas de saliva, tosse, espirro, aperto de mãos contaminadas ou até mesmo por objetos ou superfícies previamente contaminados. *Objetivo*: Comparar os parâmetros informados nas bulas dos testes rápidos aprovados pela Anvisa para diagnóstico de SARS-CoV-2. *Método*: Foram utilizadas 7 bulas de testes rápidos para o diagnóstico da Covid-19. A consulta das bulas ocorreu com base nas aprovações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) através da internet. *Resultados:* Os resultados encontrados para especificidade e sensibilidade apresentaram uma menor detecção para os anticorpos IgM, evidenciando que alguns fornecedores apresentaram 85% quando se trata de IgM e acima de 95% para detecção e IgG. *Conclusão:* Os resultados para pesquisa de anticorpos IgG são superiores aos de IgM e a validação de testes rápidos para Covid-19 não possuem uma padronização.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; imunoglobulinas; cromatografia de afinidade.

Abstract

Introduction: The SARS-CoV-2 virus is responsible for the current Covid-19 pandemic that causes Severe Acute Respiratory Syndrome with a high mortality rate. Transmission occurs from an infected person through secretions or droplets of saliva, coughing, sneezing, shaking contaminated hands or even through objects or surfaces that are previously contaminated. *Objective:* Comparison of the parameters reported in the inserts of rapid tests confirmed by Anvisa for the diagnosis of Covid-19. *Method:* Seven rapid test inserts were used for the diagnosis of SARS-CoV-2. The consultation of the leaflets was based on the approvals of the National Health Surveillance Agency (Anvisa) through the internet. *Results:* The results found for source specificity and sensitivity a lower for IgM, evidenced that some suppliers source 85% when it comes to IgM and above 95% for detection and IgG. *Conclusion:* The results for IgG research are superior to those for IgM and a validation of rapid tests for Covid-19 does not have a standardization.

Keywords: SARS-CoV-2; antibodies; chromatography affinity.

Correspondência
Allyne Cristina Grando
E-mail: allynegrando@gmail.com

Recebido em 07/02/2022 | Aprovado em 24/10/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202200018

INTRODUÇÃO

O vírus SARS-CoV-2, responsável por causar a Síndrome Respiratória Aguda Grave, é caracterizado por ser uma nova mutação a partir do vírus da família *Coronaviridae*. Em dezembro de 2019, foi conhecido esse novo vírus SARS-CoV-2, em um país da Ásia Oriental, na cidade Wuhan, localizada na China. No entanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a pandemia pelo novo coronavírus em março de 2020. Ressalta-se que é uma doença altamente contagiosa, com taxa elevada de mortalidade quando envolve idosos, pacientes com diabetes, cardiopatas, hipertensos e imunodeprimidos. Para o diagnóstico imunológico correto, a coleta do material biológico deve ser realizada no período indicado, ou seja, após o décimo-quinto dia de início dos sintomas ou da exposição ao vírus. Caso a coleta ocorra durante o período de janela imunológica, o resultado pode ser um falso negativo, pois o paciente ainda não produziu anticorpos suficientes para a sua detecção.[1-3]

Os vírus são esféricos e possuem o genoma de RNA de fita simples e são envolvidos por um envelope de gordura (fosfolipídico). Na superfície há várias proteínas, conhecidas como proteína S (proteína Skipe), que é uma espícula glicoproteica responsável por se ligar fortemente à enzima ECA2, localizadas nas células humanas. A partir dos trímeros da proteína S é distribuído ao redor do envelope gerando um aspecto de coroa, assim ocasionando o nome de coronavírus.[4]

Habitualmente a transmissão se dá através de uma pessoa infectada pelo vírus, por meio de secreções ou gotículas de saliva, tosse, espirro, aperto de mãos contaminadas ou até mesmo por objetos ou superfícies, previamente contaminados. Desta forma, entre os principais métodos profiláticos estão: usar corretamente máscaras adequadas para proteção do nariz e da boca, higienizar as mãos com frequência, utilizar álcool gel nas mãos e nos objetos previamente contaminados, evitar contato próximo de outras pessoas como também locais com aglomerações. Sabe-se que o período de incubação da doença é em torno de 14 dias, sendo este o período entre o contato com o vírus até o surgimento dos possíveis sintomas. Algumas pessoas podem se enquadrar como pacientes assintomáticos, mas os principais sintomas apresentados pelos pacientes infectados pelo vírus são falta de ar, dificuldade ao respirar, febre, tosse seca, dor no peito, cansaço (astenia), dor de garganta, perda de olfato (anosmia), alteração do paladar (ageusia) e distúrbios gastrointestinais (náuseas, vômitos ou diarreia).[1,2]

A partir dos diversos casos da Covid-19, observou-se que a doença pode apresentar vários estágios. Na fase inicial, o organismo tem o primeiro contato com o vírus, e a proteína S do coronavírus pode ligar-se diretamente ao receptor ECA2 na superfície das células humanas. Foi evidenciado que a ECA2 é altamente vinculada ao sistema cardiovascular, rins, cérebro e pulmões. Desta forma, alguns pacientes com a Covid-19 vão a óbito por falência múltipla dos órgãos. A enzima se expressa nas células epiteliais do trato respiratório, como alvéolos, traqueia ou brônquios, ao qual se liga e ocorre a replicação. Os vírions maduros são então liberados das células primárias e infectam novas células-alvo.[5-7]

O diagnóstico é realizado pela avaliação médica dos sinais e sintomas que o paciente está apresentando, juntamente com o diagnóstico laboratorial. O exame laboratorial, indispensável para a confirmação do diagnóstico da doença, pode ser realizado através do método de imunocromatrografia, a pesquisa de antígeno para SARS-CoV-2 ou a pesquisa de anticorpos. O teste imunológico é a pesquisa de anticorpos gerados contra o vírus e normalmente inclui a pesquisa das imunoglobulinas IgG (anticorpos de memória) e IgM (anticorpos de fase aguda) e em algumas metodologias é realizada a pesquisa de IgA (anticorpos de fase aguda). O material biológico utilizado para este exame pode ser soro, plasma ou sangue total, conforme orientação do fornecedor de cada teste.[3,8]

Para o diagnóstico é possível utilizar testes rápidos para pesquisa de antígeno, sorologia para a quantificação dos anticorpos e através da transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).[7] Atualmente, o teste padrão ouro é o RT-PCR por ser o mais sensível para a detecção do vírus. Através do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) foram evidenciados os testes mais realizados, estando em primeiro lugar o RT-PCR seguido dos testes rápidos para anticorpos e em terceiro os testes sorológicos.[8]

Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar a comparação dos parâmetros informados nas bulas dos testes rápidos aprovados pela Anvisa para diagnóstico de Covid-19 até o presente momento.

Testes Rápidos

A metodologia de imunoensaio utilizada nos testes rápidos é conhecida como imunocromatografia e os resultados podem ser obtidos em torno de 15 a 30 minutos. Para o teste ser considerado como válido deve apresentar a tira Controle reagente. Portanto, no caso de não ser identificada a tira Controle, o teste deve ser considerado como inválido. Através desse método é possível realizar a pesquisa de anticorpos. Os testes imunocromatográficos são compostos pelo filtro de amostra, suporte do conjugado, membrana de nitrocelulose e filtro de adsorção.[9]

O filtro da amostra promove a distribuição uniforme e controlada do material a ser analisado para o suporte do conjugado, impedindo o alagamento do dispositivo. O suporte conjugado é o resultado da conjugação de anticorpos ou antígenos com nanopartículas que têm como função transferir uniformemente a amostra sobre a membrana do teste. A membrana de nitrocelulose é posicionada na área conhecida como região analítica, devendo conter reagentes de captura na linha teste e linha controle. O filtro absorvente é posicionado na extremidade da membrana de nitrocelulose e tem como finalidade migrar todo o fluido adicionado no teste, assegurando que não ocorra a volta deste material, evitando assim falsos positivos.[9]

É indicativo que a produção de IgM e IgA contra a proteína antigênica S, que é a proteína presente na espícula viral, e a N, que é a proteína estrutural do nucleocapsídeo helicoidal, ocorre em média 7 dias após o início dos sintomas e, logo após, a IgG pode ser detectada quase simultaneamente à IgM mas, não necessariamente, ao produzir as imunoglobulinas IgG ocorre a diminuição da carga viral. Os pacientes que se enquadram com a detecção de IgG ainda podem estar infectados com o vírus.[10]

METODOLOGIA

Foram utilizadas 7 bulas de testes rápidos para o diagnóstico da Covid-19. A consulta das bulas ocorreu com base nas aprovações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) através da Internet ente julho de 2020 e junho de 2021. Para a revisão da literatura foram utilizados artigos a partir do ano de 2015. Os artigos foram pesquisados de forma eletrônica através do SciELO e do PubMed, nos idiomas português e inglês. Para complementar as pesquisas dos artigos, foram utilizadas informações fornecidas pelo Ministério da Saúde (MS) e nota técnica divulgada pela Anvisa para a investigação do SARS-CoV-2.

As bulas de testes rápidos consultadas foram Anti Covid-19 IgG/IgM Rapid Test, Coronavírus IgG/IgM (Covid-19), Coronavirus Rapid Test, Família Teste Rápido em Cassete 2019-nCoV IgG/IgM, Lumiratek Covid-19 (IgG/IgM), Medtest Coronavírus e One Step Covid-2019 Test. Todos os fabricantes possuem autorização para a comercialização dos kits pela Anvisa.

RESULTADOS

A partir destas bulas foram avaliados o total de amostras testadas, a quantidade obtida de verdadeiro positivo (VP), quando o indivíduo está infectado pelo vírus e possui resultado positivo; de verdadeiro negativo (VN), quando o paciente não está infectado pelo vírus e possui um resultado negativo; de falso positivo (FP), quando o indivíduo não está infectado pelo vírus e apresenta um resultado positivo; e de falso negativo (FN), quando a pessoa está infectada pelo vírus e apresenta um resultado negativo. Em conjunto, foram avaliados os parâmetros de sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN); através dos resultados encontrados todos os testes apresentaram uma melhor detecção quando se trata de IgG. Os resultados estão determinados na Tabela 1.

Foram avaliados os possíveis interferentes das amostras biológicas e os possíveis interferentes dos kits. Os resultados estão descritos respectivamente na Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 1

Comparação geral dos testes

Nome comercial do teste	Fabricante	Total de amostras testadas	VP	VN	FP	FN	S (%)	E (%)	Acurácia (%)	VPP (%)	VPN (%)
Anti Covid-19 IgG/IgM Rapid Test	LABTEST DIAGNÓSTICA S/A	Placa de reação: 70	IgG: 20 IgM: 17	IgG: 49 IgM: 48	IgG: 0 IgM: 3	IgG: 1 IgM: 2	IgG: 95,24 IgM: 89,47	IgG: 100 IgM: 94,12	IgG: 98,5 IgM: 92,86	IgG: 100 IgM: 85	IgG: 98 IgM: 96
Anti Covid-19 IgG/IgM Rapid Test	LABTEST DIAGNÓSTICA S/A	Tira de reação: 122	IgG: 22 IgM: 20	IgG: 98 IgM: 97	IgG: 0 IgM: 2	IgG: 2 IgM: 3	IgG: 91,66 IgM: 89,96	IgG: 100 IgM: 97,98	IgG: 98,36 IgM: 95,90	IgG: 100 IgM: 91,91	IgG: 98 IgM: 97
Coronavírus IgG/IgM (Covid-19)	Ebram produtos laboratoriais Ltda	70	IgG: 20 IgM: 17	IgG: 49 IgM: 48	IgG: 1 IgM: 2	IgG: 0 IgM: 3	IgG: 100 IgM: 85	IgG: 98 IgM: 96	IgG: 98,57 IgM: 92,85	IgG: 95,24 IgM: 89,47	IgG: 100 IgM: 94,12
Coronavírus Rapid Test	Diagnóstica indústria e comércio Ltda-Me	586	312	234	1	49	86,43	99,57	91,61	99,68	82,68
Família Teste Rápido em Cassete 2019-nCoV IgG/IgM	Acro Biotech Inc	70	IgG: 20 IgM: 17	IgG: 49 IgM: 48	IgG: 1 IgM: 2	IgG: 0 IgM: 3	IgG: 100 IgM: 85	IgG: 98 IgM: 96	IgG: 98,57 IgM: 92,85	IgG: 95,24 IgM: 89,47	IgG: 100 IgM: 94,12

Tabela 1 (continuação)

Nome comercial do teste	Fabricante	Total de amostras testadas	VP	VN	FP	FN	S (%)	E (%)	Acurácia (%)	VPP (%)	VPN (%)
Lumiratek Covid-19: (IgG/IgM)	Lumiradx Healthcare Ltda	IgG: 446 IgM: 456	IgG: 75 IgM: 78	IgG: 369 IgM: 368	IgG: 2 IgM: 3	IgG: 0 IgM: 7	IgG: 100 IgM: 91,76	IgG: 99,47 IgM: 99,19	IgG: 99,55 IgM: 97,81	IgG: 97,4 IgM: 96,3	IgG: 100 IgM: 98,13
Medteste Coronavírus	Medlevensohn comércio e representações de produtos hospitalares Ltda	181	IgG: 37 IgM: 33	IgG: 142 IgM: 141	IgG: 1 IgM: 2	IgG: 1 IgM: 5	IgG: 97,37 IgM: 86,84	IgG: 99,3 IgM: 98,6	IgG: 98,89 IgM: 96,13	IgG: 97,36 IgM: 94,28	IgG: 99,3 IgM: 96,57
One Step Covid-2019 Test	Celer Biotecnologia S/A	596	312	234	1	49	86,43	99,57	91,61	99,68	82,68

Fonte: Elaborada pelo autor.

(VP: verdadeiro positivo; VN: verdadeiro negativo; FP: falso positivo; FN: falso negativo; S: sensibilidade; E: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.)

Tabela 2

Comparação dos interferentes da amostra

Nome comercial	Interferentes da amostra
Anti Covid-19 IgG/IgM Rapid Test	Nenhuma interferência foi observada para amostras contendo triglicérides até 500mg/dL, ácido ascórbico até 20mg/dL, hemoglobina até 1000mg/dL, bilirrubina até 60mg/dL e colesterol total até 232mg/dL. As amostras não devem ser inativadas pelo calor, pois podem produzir resultados incorretos. Nos testes realizados, não foram observados resultados falsamente positivos em amostras positivas para as seguintes condições médicas: vírus influenza A, vírus influenza B, vírus respiratório Sincicial (RSV), adenovírus, HBsAg, Sífilis, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e vírus da hepatite C (HCV).
Coronavírus IgG/IgM (Covid-19)	As seguintes substâncias potencialmente interferentes foram adicionadas a amostras negativas e positivas para o SARS-CoV-2*. Ácido ascórbico: 20mg/dL, Bilirrubina: 60mg/dL, colesterol: 6 mmol/L, hemoglobina: 1000mg/dL e triglicerídeos: 50mg/dL. Nenhuma das substâncias na concentração testada interferiu no ensaio. O nível de hematócrito do sangue total pode afetar os resultados do teste. O nível de hematócrito precisa estar entre 25% e 65% para obter resultados precisos. Foram testadas amostras positivas para anti-influenza A, anti-influenza B, anti-RSV, antiadenovírus, anti-HBsAg, antissífilis, anti-H. pilory, anti-HIV e anti-HCV. Não foi observada reatividade cruzada para nenhum desses patógenos.
Coronavirus Rapid Test	Amostra hemolisada deve ser evitada para a realização do teste. Os seguintes anticorpos não causaram interferências na análise: Parainfluenza vírus, Influenza A, Influenza B, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, Adenovírus, Respiratory syncytial, Hepatite B, Hepatite C, *Treponema pallidium*, HIV, EB vírus, CMV, Enterovírus tipo 71.
Família Teste Rápido em Cassete 2019-nCoV IgG/IgM	Não utilizar amostras hemolisadas, não deixar as amostras à temperatura ambiente por períodos prolongados. O nível hematócrito do sangue total pode afetar os resultados do teste. O nível hematócrito precisa estar entre 25% e 65% para resultados precisos. Os seguintes compostos foram testados usando o teste rápido em cassete 2019-nCoV IgG/IgM e não foi observada nenhuma interferência. Triglicerídeo: 100mg/dL, Ácido ascórbico: 20mg/dL, bilirrubina: 60mg/dL, colesterol total: 15 mmol/L. O teste rápido foi testado com amostras positivas para vírus anti-influenza A, vírus anti-influenza B, anti-RSV, antiadenovírus, Antissarampo, HAMA, RF, IgG não específico, IgM não específico, anti-EV71, antivírus Parainfluenza, HBsAg, antissífilis, anti-H. pylori, anti-HIV e anti-HCV. Os resultados não mostraram reatividade cruzada.
Lumiratek Covid-19 (IgG/IgM)	Foram testadas amostras positivas de vírus anti-influenza A, anti-influenza B, anti-RSV, antiadenovírus, HBsAg, antissífilis, anti-H. pylori, anti-HIV, anti-HCV e HAMA. Os resultados não mostraram reatividade cruzada. Foi observada alguma reatividade cruzada com amostras positivas para o anticorpo SARS-CoV e o Fator Reumatoide. É possível a reação cruzada com amostras positivas para o anticorpo MERS-CoV. As seguintes substâncias potencialmente interferentes foram adicionadas às amostras negativas de Covid-19: Acetaminofena:20mg/dL, cafeína: 20mg/dL, albumina: 2g/dL, Ácido acetilsalicílico: 20mg/dL, Ácido gentísico: 20mg/dL, etanol: 1%, Ácido ascórbico: 2g/dL, creatina: 200mg/dL, bilirrubina: 1g/dL, hemoglobina: 1000mg/dL, Ácido oxálico: 60mg/dL, Ácido úrico: 20mg/ml. Nenhuma das substâncias na concentração testada interferiu no ensaio.
Medteste Coronavírus	A análise deve ocorrer com a amostra em temperatura ambiente, porém não deixe as amostras à temperatura ambiente por mais de 12 horas. As seguintes substâncias potencialmente interferentes foram adicionadas às amostras negativas e positivas para Covid-19. Acetaminofeno: 20mg/dL; cafeína: 20mg/dL; albumina: 2g/dL; Ácido acetilsalicílico: 20 mg/dL; Ácido gentísico: 20mg/dL; etanol: 1% Ácido Ascórbico: 2g/dL; creatina: 200mg/dl; bilirrubina: 1g/dL; hemoglobina: 1000mg/dL; Ácido oxálico: 60mg/dL; Ácido úrico: 20mg/mL; Nenhuma das substâncias na concentração testada interferiu no ensaio. O MedTeste Coronavírus foi testado com amostras positivas para vírus influenza A, vírus influenza B, RSV, adenovírus, HBsAg, sífilis, H. pylori, HIV e HCV. Os resultados não mostraram reatividade cruzada.
One Step Covid-2019 Test	Amostras hemolisadas devem ser evitadas. As amostras congeladas devem ser mantidas em temperatura ambiente para que sejam completamente descongeladas e bem homogeneizadas antes da execução do teste. As amostras não devem ser congeladas e descongeladas repetidamente. Amostras testadas a seguir não tiveram impacto no resultado nas seguintes concentrações: substância concentração bilirrubina 250 µmol/L, hemoglobina 9g/L, triglicérides 15 mmol/L, fator reumatoide 80 IU/mL, Título Anticorpo Antinuclear (ANA) 1:240, Anticorpo antimitocondrial (AMA) 80 U/mL, IgG Rato 1000 µg/mL. Amostras positivas testadas pelo One Step COVID-2019 Test foram testadas para vários agentes. Os resultados não apresentaram reação cruzada. Anticorpo vírus Parainfluenza, anticorpo Influenza A, anticorpo Influenza B, anticorpo pneumonia Chlamydia, anticorpo pneumonia Mycoplasma, anticorpo adenovírus, anticorpo Vírus Sinacial Respiratório, anticorpo de superfície Hepatite B, anticorpo vírus Hepatite C, anticorpo Treponema pallidum, anticorpo HIV, anticorpo vírus EB, anticorpo vírus Measles, anticorpo Cytomegalovirus, anticorpo Enterovirus tipo 71, anticorpo Mumps e amostra positiva vírus Varicela-zoster.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 3

Comparação dos interferentes do kit

Nome comercial do teste	Interferentes do kit
Anti Covid-19 IgG/IgM Rapid Test	O produto nunca deve ser congelado ou exposto à temperatura superior a 30ºC. Evitar exposição das placas ou tiras de reação à umidade ambiente.
Coronavírus IgG/IgM (Covid-19)	A umidade e temperatura podem afetar negativamente os resultados; o kit pode ser armazenado em temperatura ambiente ou refrigerado (2ºC a 30°C) e em nenhum momento o kit poderá ser congelado. O teste é estável até a data de validade impressa no envelope lacrado ou na etiqueta da embalagem fechada. O teste deve permanecer no envelope lacrado ou na embalagem fechada até seu uso. Após aberto, o diluente possui estabilidade de pelo menos 40 dias.
Coronavirus Rapid Test	Manter longe de luz solar direta, umidade e calor. Não congelar o kit, que deve ser armazenado de 4ºC a 30°C.
Família Teste Rápido em Cassete 2019-nCoV IgG/IgM	Armazene como embalado na bolsa selada à temperatura ambiente ou refrigerado (2ºC a 30°C). Não congelar.
Lumiratek Covid-19 (IgG/IgM)	Armazenar como embalado na embalagem vedada à temperatura ambiente ou refrigerado (2ºC a 30°C); nunca congelar. O tampão não coberto pode ser armazenado à temperatura ambiente ou refrigerado (2ºC a 30°C) por pelo menos 1,5 meses. O teste deve permanecer na embalagem vedada até a sua utilização.
Medteste Coronavírus	Umidade acima de 60% e temperaturas acima de 30ºC podem afetar negativamente os resultados. O teste deve ser armazenado à temperatura ambiente ou refrigerado (2ºC a 30°C); nunca deve ser congelado. É estável até a data de validade indicada no rótulo. O dispositivo de teste deve permanecer na embalagem fechada até o momento da utilização. Após aberto, utilizar em até 1 hora e não deve utilizado após a data de validade.
One Step Covid-2019 Test	O produto deve ser armazenado em temperatura entre 2°C e 30°C. Não armazenar em temperaturas elevadas. Se o produto for refrigerado, o cassete deve ser estabilizado pelo menos 30 minutos em temperatura ambiente antes de ser utilizado. Os cassetes de teste, quando armazenados de acordo com a temperatura indicada e em sua embalagem original fechada são estáveis por 06 (seis) meses. Tampar a solução tampão imediatamente após o uso. Os componentes do kit são estáveis até a data de expiração indicada no rótulo da embalagem. O cassete de teste deve ser utilizado no prazo máximo de uma hora após ser retirado da embalagem.

Fonte: Elaborada pelo autor

DISCUSSÃO

Diante da emergência mundial relacionada ao novo coronavírus SARS-CoV-2 foi autorizada a utilização dos testes rápidos, método de ensaio imunocromatográfico para a pesquisa de anticorpos, sem fins de diagnóstico confirmatório. Os resultados falsos positivos para IgM e IgG isolados ou combinados, também são possíveis visto os imunoensaios estarem sujeitos a reações cruzadas induzidas por anticorpos inespecíficos ou decorrentes de outras doenças inflamatórias e infecciosas. O perfil de reatividade cruzada nos testes para anticorpos anti SARS-CoV-2 ainda não foi completamente estabelecido porque os testes possuem limites de detecção muito relativos.[11,12]

A sensibilidade refere-se à probabilidade de um resultado verdadeiro positivo na presença de uma doença. Sendo assim, consiste em indivíduos afetados pela doença a que o teste se aplica. Nos valores obtidos foi visto que os testes que diferem IgG e IgM apresentam um percentual menor para a sensibilidade da imunoglobulina IgM. Os testes Coronavírus IgG/IgM (Covid-19) e Família Teste rápido em Cassete 2019-nCoV IgG/IgM apresentaram os mesmos valores para a sensibilidade; foram os fabricantes com menor percentual de IgM 85% e ao mesmo tempo o maior percentual para IgG de 100%.[13-15]

Foi evidenciado que dois testes, o Coronavirus Rapid Test e o One Step Covid-2019 Test, não diferenciaram as imunoglobulinas entre IgG e IgM, as bulas trouxeram informações como anticorpos totais e possivelmente por este motivo apresentaram uma sensibilidade de 86,43%, que foi reduzida em relação aos demais fabricantes. As demais bulas mostraram variações entre os dois anticorpos produzidos ao longo da doença; houve uma prevalência em que todos os fabricantes obtiveram uma sensibilidade maior quando foi testado o anticorpo IgG possivelmente porque quando se encontra na fase aguda os níveis de IgM estão reduzidos, o que diminui a faixa de detecção.[13,16,17]

A especificidade é a probabilidade de obter um resultado negativo quando não haja a doença, ou seja, é o percentual de resultados verdadeiros negativos. O fabricante Anti Covid-19 IgG/IgM Rapid Test apresentou um percentual de IgM equivalente a 94,12%; todos os demais testes avaliados obtiveram uma especificidade mais elevada.[13,18]

Os testes Coronavirus Rapid Test e One Step Covid-2019 Test foram os dois que realizaram os testes com maior número de amostras, ambos testaram mais de 500 amostras. O Lumiratek Covid-19 (IgG/IgM) foi o terceiro teste que analisou em média 450 amostras, enquanto alguns fabricantes realizaram em apenas 70 pacientes. Desta forma, foi evidenciado que

não existe uma padronização para aceitação ou rejeição do kit, referente ao número mínimo estipulado de amostras que devem ser analisadas antes de iniciar a comercialização.[16,17,19]

Observou-se que todos os fabricantes consideram a temperatura como interferente dos kits, visto que, caso a temperatura esteja fora do estabelecido, pode afetar negativamente as análises. Outro quesito é a questão da umidade como interferência nos testes Anti COVID-19 IgG/IgM Rapid Test, Coronavírus IgG/IgM (COVID-19), Coronavírus Rapid Test e Medteste Coronavírus. Durante a fase analítica um dos principais pontos que envolvem a qualidade da análise é a umidade, temperatura das amostras ou reagentes utilizados. Vale ressaltar que os testes podem apresentar um resultado incorreto em decorrência das interferências.[13]

Na bula do Anti Covid-19 IgG/IgM está descrito que a análise se deu através da placa de reação e da fita de reação. Com base nas informações pertinentes da bula o procedimento é realizado da mesma forma nas duas situações, porém no molde de placa de reação são adicionadas 2 gotas do tampão do kit e na tira de reação é usada apenas 1 gota. No modelo de tira foi realizado um número maior de amostras; não foi seguido um padrão entre as duas modalidades.[18]

O teste do Coronavirus Rapid Test foi o único que apresentou sensibilidade à luz, devendo ser mantido longe da luz solar direta.[16] Apenas os testes do Medteste Coronavírus e One Step COVI-19 Test trouxeram a informação de que, após aberto o cassete, a análise deve ocorrer no período máximo de uma hora.[17,20]

Os testes Coronavirus Rapid Test e One Step Covid-19 Test foram os que apresentaram os maiores números de resultados falsos negativos (FN), sendo 49 amostras no total. O terceiro teste com maior número de FN é o Lumiratek Covid-19 (IgG/IgM), que apresentou 7 pacientes em fase aguda como falso negativo.[13,17,19] Com base nesse grande número de pacientes que foram testados como negativos, mas que estavam infectados com o vírus e possivelmente transmitindo a novas pessoas, é evidente que os testes rápidos possuem uma grande margem de erro. Um teste que apresenta um número tão elevado de resultados FN certamente não é confiável.

Através da comparação entre as bulas foi visto que nenhuma acurácia atingiu 100%, com isso percebemos que todos os testes trabalham com uma possível margem de erro. Os testes de Coronavirus Rapid Test e One Step Covid-2019 Test, os dois com o menor percentual encontrado, obtiveram acurácia de 91,61%. Portanto, a acurácia avalia a proporção das análises corretas como os verdadeiros positivos e verdadeiros negativos. Desta forma, os testes Coronavirus Rapid Test e One Step apresentaram a menor acurácia e está diretamente ligado ao fato de terem o maior número de FN.[13,14,17]

O valor preditivo positivo (VPP) indica qual a probabilidade de um indivíduo com teste positivo apresentar a infecção e o valor preditivo negativo (VPN) indica qual a probabilidade de um indivíduo com teste negativo não apresentar a infecção. O teste com o menor VPP foi Anti Covid-19 IgG/IgM Rapid Test, com 85% para IgM. Enquanto o menor VPN foi o teste One Step Covid-2019 Test, com 82,68%.[17,18] A partir dos dados encontrados através da comparação entre alguns fornecedores, os testes Coronavirus Rapid Test e One Step Covid-2019 Test foram os que apresentaram o pior desempenho. Para a população não é recomendada a utilização desses testes porque ao realizar o teste, e se o resultado der negativo, os leigos entendem que realmente não estão infectados pelo vírus. No entanto, podem estar transmitindo para outras pessoas e aumentando o número de casos na sociedade.

Os testes foram analisados na presença de outros anticorpos, para verificar se causaria algum tipo de interferência. O Lumiratek Covid-19 (IgG/IgM) foi o único que apresentou um tipo de reatividade cruzada com amostras positivas para o anticorpo SARS-CoV e o Fator Reumatoide. É possível que a reação cruzada também ocorra com amostras positivas para o anticorpo MERS-CoV.[19] Os demais testes foram analisados, porém não ocorreu nenhuma reação cruzada.

A Anvisa não tem preconizado quais as substâncias mínimas que devem ser comparadas entre os fabricantes, porque todos tiveram pelo menos uma substância diferente. Portanto, pode ser que uma substância específica possa interferir em um teste, sem ao menos ser testada em outros fabricantes.[14-20]

Alguns fabricantes apresentam possível interferência na amostra por hemólise, lipemia e/ou icterícia. No entanto, é permitida a utilização de amostras com sangue total, e nessas situações provavelmente não ocorre a dosagem dos analitos para a confirmação dos valores para averiguar se o teste será realizado com uma amostra apta para a análise.[14-20]

CONCLUSÃO

Conclui-se que os testes imunocromatográficos comparados ao longo deste trabalho apresentaram uma melhor detecção na imunoglobulina IgG, nos parâmetros de especificidade, sensibilidade, acurácia, VPP e VPN. Desta forma, existe uma maior probabilidade de resultados falsos negativos na fase aguda da doença.

As bulas avaliadas de testes rápidos para SARS-CoV-2 não possuem uma padronização no número de amostras

testadas, afetando diretamente a confiabilidade dos testes. Com base nesta pesquisa, foi evidenciado que a Anvisa não possui critérios de aceitação e de rejeição para a aprovação e liberação dos testes que estão sendo comercializados.

A Anvisa também não preconiza quais as substâncias mínimas que devem ser comparadas entre os fabricantes e como será a conferência para verificar se os estabelecimentos que realizam os testes rápidos estão dosando os analitos antes da análise. Portanto, deveria existir uma notificação ou vigilância para monitorar se os laboratórios, hospitais e/ou farmácias, antes de realizarem a análise, dosam os analitos para avaliar se a amostra – mesmo sendo sangue total – está conforme o estabelecido: sem hemólise, lipemia e/ou icterícia.

Sendo assim, é imprescindível que a Anvisa estipule protocolos mínimos para a aprovação antes dos testes serem comercializados. Desta forma, o diagnóstico ocorrerá de uma forma mais segura e eficaz.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Coronavírus: Covid-19. Ministério da Saúde. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/> Acesso em: 01 set 2022.
2. Coronavírus, Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul. Disponível em: https://ti.saude.rs.gov.br/covid19/ Acesso em: 30 ago 2022.
3. Secretaria de Saúde de Minas Gerais. Disponível em: <https://www.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2020/06/Recomenda%C3%A7%C3%B5es-t%C3%A9cnicas-COE-sobre-a-utiliza%C3%A7%C3%A3o-dos-testes-diagn%C3%B3sticos-para-COVID-19-e-para-retestagem-laboratorial-diante-de-resultados-divergentes-de-COVID-19-4.pdf> Acesso em: 01 set 2022.
4. Lima M et al. A química dos saneantes em tempos de covid-19: você sabe como isso funciona? Química Nova 43(5), 2020.
5. Uzuniam A. Coronavírus SARS-CoV-2 e Covid-19. Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial, v.56, 2020.
6. Scholz JR et al. COVID-19, Sistema Renina-Angiotensina, Enzima Conversora da Angiotensina 2 e Nicotina: Qual a Inter-Relação? Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 115(4), 2020.
7. Tavares C de AM et al. Alterações da ECA2 e Fatores de Risco para Gravidade da COVID-19 em Pacientes com Idade Avançada. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 115(4), 2020.
8. Nogueira JM da R, Silva LOP. Diagnóstico Laboratorial da COVID-19 no Brasil. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 52(2), 2020.
9. Japolla G et al. Teste imunocromatográfico de fluxo lateral: uma ferramenta rápida de diagnóstico. Enciclopédia Biosfera Centro Científico Conhecer, v.11, n.22, 2015.
10. Xavier A et al. COVID-19: Manifestações clínicas e laboratoriais na infecção pelo novo coronavírus. Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial, v.56, 2020.
11. Nota Ténica GVIMS/GGTES/ANVISA nº 07/2020 - Orientações para prevenção e vigilância epidemiológica das infecções por SARS-CoV-2 (covid-19) dentro dos serviços de saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/notas-tecnicas/nt-07-2020_covid-em-servicos-saude_atualizada-em_09-03-2022.pdf/view#:~:text=09%2F03%2F2022,Nota%20T%C3%A9cnica%20GVIMS%2FGGTES%2FANVISA%20n%C2%BA%2007%2F2020%20_atualizada,em%2009%2F03%2F2022>Acesso em: 02 set 2022.
12. Dias VMCH et al. Orientações sobre diagnóstico, tratamento e isolamento de pacientes com COVID-19. J Infect Control, v. 9, n. 2, p. 56-75, 2020. Acesso em: 01 set 2022.
13. Diretriz para a Gestão e Garantia da Qualidade de testes laboratoriais remotos (TRL) da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial (SBPC/ML). Disponível em: http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/LivroTLR_2015.pdf Acesso em: 10 abr 2021.
14. Bula Coronavírus IgG/IgM (COVID-19). Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/25351153719202045/?numeroRegistro=10159820239> Acesso em: 12 mar 2021.
15. Bula Família Teste Rápido em Cassete 2019- nCoV IgG/IgM. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/25351189190202006/?numeroRegistro=81325990117> Acesso em: 12 mar 2021.
16. Bula Coronavírus Rapid Test. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/25351167156202072/?numeroRegistro=80638720148> Acesso em 12 mar 2021.
17. Bula One Step COVID-2019 Test. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/25351174464202054/?numeroRegistro=80537410048> Acesso em: 12 mar 2021.
18. Bula Anti COVID-19 IgG/IgM Rapid Test. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/25351191493202081/?numeroRegistro=10009010356> Acesso em: 12 mar 2021.
19. Bula Lumiratek. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/25351197132202048/?numeroRegistro=81327670112> Acesso em: 12 mar 2021.
20. Bula MedTeste Coronavírus (COVID-19) IgG/IgM. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/25351189196202075/?numeroRegistro=80560310056> Acesso em 12 mar 2021.

Caracterização da evolução sorológica e clínica de pacientes tratados para COVID-19 em um hospital público: estudo transversal

Characterization of serological and clinical evolution of patients treated for COVID-19 in a public hospital: a cross-sectional study

Bianca Maliska Klauck[1], Ana Frida Duarte[2], Kelvinson Fernandes Viana[3], Rafael Andrade Menolli[4], Alex Sandro Jorge[4]

[1] Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Residência Farmacêutica em Análises Clínicas. Cascavel, PR, Brasil.

[2] Farmacêutica graduada pela Universidade Paranaense (2020), unidade universitária de Francisco Beltrão - PR. Francisco Beltrão, PR, Brasil.

[3] Centro Interdisciplinar para Ciências da Vida e da Natureza, Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA). Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

[4] Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas. Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE. Cascavel, PR, Brasil.

Resumo

O SARS-CoV-2, causador da doença Covid-19, é um vírus de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, sentido positivo, pertencente à família *Coronaviridae*. Seu diagnóstico se dá a partir da identificação do material genético do SARS-CoV-2 ou através da avaliação de respostas humorais geradas pelo organismo. O presente estudo visa analisar a conversão e o perfil sorológico dos pacientes em diferentes tempos de internação no Hospital Universitário do Oeste do Paraná, assim como os dados fornecidos pelo sistema de prontuário eletrônico TASY® (Philips Tasy, Blumenau-SC, BR), como sintomatologia, dados epidemiológicos e clínicos, além de acompanhar a evolução clínica do paciente durante seu tempo de internação na unidade hospitalar. Consiste em um estudo transversal e retrospectivo, no qual foram usadas dosagens de anticorpos IgA, IgM, IgG; foram utilizadas 31 amostras de soro de pacientes positivos pertencentes à soroteca do Laboratório do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP). Estas amostras foram previamente coletadas de pacientes da primeira onda de Covid-19 internados na Ala Covid e UTI-Covid do referido hospital, no período de abril a junho de 2020. Das 31 amostras analisadas, a população e faixa etária prevalentes foi de adultos masculinos de 41 a 60 anos, habitantes de Cascavel (83,9%) e com desfecho de cura (83,87%). Somente a média de anticorpos IgG ficou abaixo do valor de *cut-off*, sendo que os demais anticorpos positivaram. Os maiores títulos de anticorpos foram encontrados em pacientes com idade mais elevada, os anticorpos da classe IgA e IgM mantiveram-se mais elevados entre as mulheres, porém para anticorpos da classe IgG os homens obtiveram maiores títulos.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; anticorpos; coronavírus.

Abstract

SARS-CoV-2, which causes COVID-19, is a positive-sense, single-stranded ribonucleic acid (RNA) virus belonging to the *Coronaviridae* family. Its diagnosis is made from the identification of the genetic material of SARS-CoV-2 or through the evaluation of humoral responses generated by the organism. The present study aims to analyze the conversion and serological profile of patients at different lengths of stay at the University Hospital of Western Parana, in addition to analyzing data provided by the TASY® electronic medical record system (Philips Tasy, Blumenau-SC, BR), such as, symptomatology, epidemiological and clinical data, in addition to the patients outcome during his stay in the hospital unit. It consists of a cross-sectional and retrospective study, in which IgA, IgM, IgG antibodies were measured, using 31 serum samples from positive patients belonging to the serum library of the HUOP Laboratory. These samples were previously collected from patients with the first wave of COVID-19 admitted to the COVID Wing and COVID-ICU of the aforementioned hospital, from April to June 2020. Of the 31 samples analyzed, the prevalent population and age group were male adults between 41-60 years old, inhabitants of Cascavel (83.9%) and with cure outcome (83.87%). Only the average of IgG antibodies was below the cut-off value, and the other antibodies were positive. The highest antibody titers were found in older patients, the IgA and IgM class antibodies remained higher among women, however, for IgG class antibodies, men had higher titers.

Keywords: SARS-CoV-2; antibodies; serology.

Correspondência
Bianca Maliska Klauck
E-mail: biaklauck@gmail.com

Recebido em 21/02/2022 | Aprovado em 24/10/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202200023

INTRODUÇÃO

A Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) foi descoberta em Wuhan, província de Hubei, China, em dezembro de 2019, e desde então vem infectando milhares de pessoas e causando inúmeras mortes em todo o território mundial. O SARS-CoV-2, bem como o SARS-CoV e o coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) causam pneumonia grave com alta taxa de mortalidade.[1]

O SARS-CoV-2, causador da doença Covid-19, é um vírus de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, sentido positivo, pertencente à família *Coronaviridae*. Seu tamanho varia de 60nm a 140nm de diâmetro, com projeções semelhantes a pontas em sua superfície, dando-lhe uma aparência de coroa sob o microscópio eletrônico. A transmissão ocorre por inalação ou contato com gotículas geradas durante a tosse e espirro de indivíduos infectados sintomáticos e assintomáticos. Seu período de incubação varia de 2 a 14 dias e os principais sintomas relatados até o momento são: febre, tosse, dor de garganta, dificuldade em respirar, fadiga, mal-estar, entre outros.[2,3]

O diagnóstico se dá a partir da identificação do material genético do SARS-CoV-2 ou através da avaliação de respostas humorais geradas pelo organismo. O teste considerado padrão ouro para o diagnóstico é a identificação de alvos do genoma viral por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR – do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction*) em amostras coletadas por *swab* nasal ou da orofaringe durante a primeira semana de sintomas. Já através dos testes sorológicos, buscamos identificar a presença de resposta humoral ao SARS-CoV-2, por meio de anticorpos de isotipos IgA, IgM e IgG específicos para diferentes proteínas do vírus. Estes anticorpos são detectados por ensaio imunoenzimático (ELISA) ou imunoensaios de quimioluminescência (CLIA), e devem ser indicados a partir da segunda semana dos sintomas.[4]

O Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP) é referência no atendimento de pacientes com o novo coronavírus (SARS-CoV-2) na macrorregião Oeste, contando com uma população de cerca de dois milhões de habitantes. Uma vez que o paciente é admitido no hospital com sintomatologia de Covid-19, é realizada a coleta de material para detecção do vírus pelo método RT-PCR. Entretanto, não se faz o acompanhamento da conversão sorológica do paciente, visto que isto demanda elevado custo ao hospital.

Atualmente existe uma lacuna científica sobre como o sistema imune responde à infecção por SARS-CoV-2, visto que o conhecimento sobre esta doença vai se desenvolvendo à medida que a pandemia evolui. Neste sentido, se faz necessária uma testagem sorológica seriada destes pacientes a fim de acompanhar a evolução da doença e a necessidade de tratamento.

O presente estudo visa analisar a conversão e perfil sorológico dos pacientes em diferentes tempos de internação no Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP), assim como os dados fornecidos pelo sistema de prontuário eletrônico TASY® (Philips Tasy, Blumenau-SC, BR), como sintomatologia, dados epidemiológicos e clínicos, além de acompanhar a evolução clínica do paciente durante seu tempo de internação na unidade hospitalar.

METODOLOGIA

Consiste em um estudo transversal e retrospectivo, no qual foram usadas dosagens de anticorpos IgA, IgM, Ig; foram utilizadas 31 amostras de soro de pacientes positivos pertencentes à soroteca do Laboratório do HUOP. Estas amostras foram previamente coletadas de pacientes da primeira onda de Covid-19 internados na Ala Covid e UTI-Covid do referido hospital, no período de abril a junho de 2020. Participaram da pesquisa somente os pacientes internados por cinco dias ou mais, sendo utilizadas amostras alternadas dos dias de internamento (dia 0, 5º, 10º, 15º e 20º).

A análise das amostras foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas, Ensino, Pesquisa e Extensão (LACEPE) do HUOP pelo método de ELISA indireto (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Este método baseia-se na ligação antígeno-anticorpo, sendo que o antígeno pode se ligar a um anticorpo específico, que é subsequentemente detectado por um anticorpo secundário acoplado à enzima. Um substrato cromogênico para a enzima produz uma mudança de cor visível ou fluorescência, indicando a presença de antígeno.

Após isso, as amostras foram classificadas em reagentes ou não reagentes a partir do cálculo do *cut-off*, que seria a média do resultado das absorbâncias dos controles negativos multiplicados por dois. Os resultados foram tabulados na plataforma Excel 365® para análise estatística do tipo descritiva e organizada em tabelas e gráficos.

ÉTICA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos sob o Parecer de nº 4.517.274.

RESULTADOS

Os dados epidemiológicos referentes aos 31 pacientes do estudo foram obtidos através do sistema TASY® e caracterizados em faixas etárias, sexo, cidade de residência e evolução clínica, conforme apresentado na Tabela 1.

Os pacientes mais acometidos pelo SARS-CoV-2 na macrorregião Oeste do Paraná foram pessoas do sexo masculino (61,29%), residentes na cidade de Cascavel (83,87%), com idade de 41 a 60 anos (58,06%) e que obtiveram cura (83,87%) como desfecho clínico.

Tabela 1

Perfil epidemiológico dos pacientes acometidos pelo SARS-CoV-2 no período de abril a junho de 2020, em um hospital universitário.

CARACTERÍSTICAS	CATEGORIA	N	%
Faixa etária	20-40 anos	4	12,90
	41-60 anos	18	58,06
	61-80 anos	7	22,58
	>80 anos	2	6,45
Sexo	Feminino	12	38,70
	Masculino	19	61,29
Residência	Cascavel	26	83,87
	Santa Tereza do Oeste	2	6,45
	Maringá	1	3,23
	Lindoeste	1	3,23
	Cafelândia	1	3,23
Óbito	Sim	5	16,13
	Não	26	83,87

A Figura 1 demonstra a dosagem dos anticorpos IgG durante os dias 0, 5º, 10º, 15º e 20º de internamento, sendo as médias dos títulos 0,319, 0,379, 0,356, 0,390 e 0,371, respectivamente, concluindo em uma média geral de 0,363, ficando abaixo do valor de *cut-off*: 0,462.

A Figura 2 demonstra a dosagem dos anticorpos IgM durante os dias 0, 5º, 10º, 15º e 20º de internamento, sendo as médias dos títulos 0,076, 0,108, 0,145, 0,166 e 0,067, respectivamente, concluindo em uma média geral de 0,112 ficando acima do valor de *cut-off* - 0,104.

A Figura 3 demonstra a dosagem dos anticorpos IgA durante os dias 0, 5º, 10º, 15º e 20º de internamento, sendo as médias dos títulos 0,247, 0,274, 0,325, 0,279 e 0,336, respectivamente, concluindo em uma média geral de 0,292, ficando acima do valor *de cut-off*: 0,269.

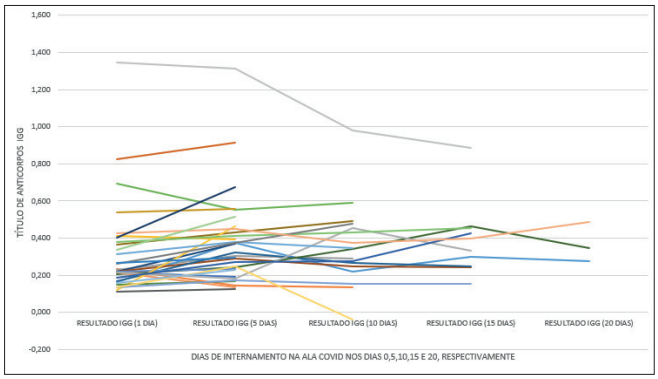


Figura 1

Dosagem de anticorpos IgG em pacientes internados na Ala Covid/UTI-Covid no período de abril a junho de 2020 em um hospital universitário.

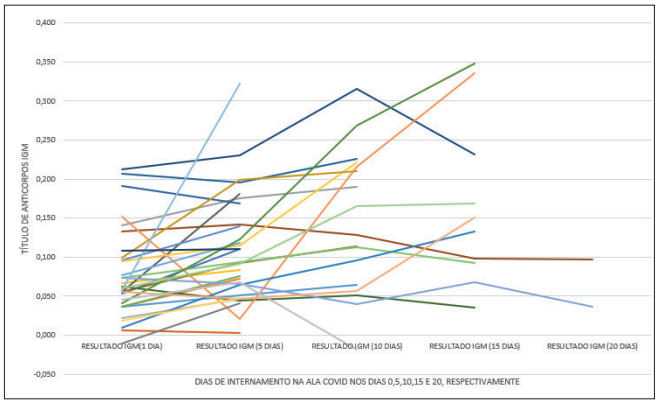


Figura 2

Dosagem de anticorpos IgM em pacientes internados na Ala Covid/ UTI-Covid no período de abril a junho de 2020 em um hospital universitário.

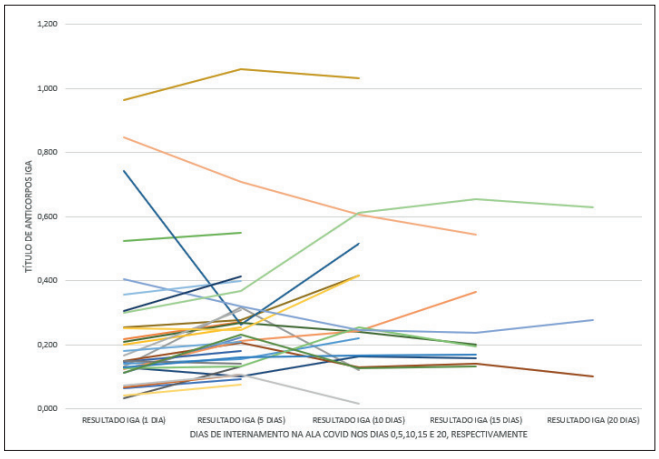


Figura 3

Dosagem de anticorpos IgA em pacientes internados na Ala Covid/UTI-Covid no período de abril a junho de 2020 em um hospital universitário.

As médias obtidas dos títulos de anticorpos IgG foram classificadas por faixas etárias, demonstrando que pacientes de 20 a 40 anos apresentaram títulos de IgG inferiores às demais faixas etárias no dia 0 (0,222) e reduziram nas dosagens seguintes. Os indivíduos de 41 a 60 tiveram maior média no 10º dia (0,384) e mantiveram títulos elevados durante a internação, enquanto pacientes de 61 a 80 anos a maior média foi no 20º dia (0,489) e pacientes acima de 80 anos no 15º dia (0,464), como aponta a Figura 4.

Nas dosagens de anticorpos IgM, a média de títulos da faixa etária acima de 80 anos foi superior às demais idades, com maior média (0,202) no 5º dia. A partir do 5º dia, as idades de 41 a 60 anos e de 61 a 80 anos obtiveram títulos de IgM mais elevados e maiores médias no 15º dia (respectivamente 0,159 e 0,175). Pacientes de 20 a 40 anos apresentaram títulos de IgM inferiores às demais faixas etárias e a maior média foi no 10º dia (0,190), como exibido na Figura 5.

Na Figura 6 podemos identificar que as médias dos títulos de anticorpos IgA dosados em indivíduos acima de 80 anos foi superior às demais idades em todas as dosagens e maior média (0,781) no 5º dia. As faixas etárias classificadas de 61 a 80 anos e de 20 a 40 anos também obtiveram médias de títulos de IgA mais elevados no 5º dia (0,286 e 0,233, respectivamente). Entretanto, pacientes com 41 a 60 anos manifestaram títulos superiores apenas no 10º dia (0,363).

Em relação ao sexo e à dosagem de anticorpos IgG dos 31 pacientes incluídos no estudo, 12 pacientes eram do sexo feminino e 19 pacientes do sexo masculino. A maior média de títulos dosados de anticorpos IgG foi para o sexo masculino no 20º dia (0,489); no sexo feminino, a maior média foi no 10º dia (0,385), como demonstrado na Figura 7.

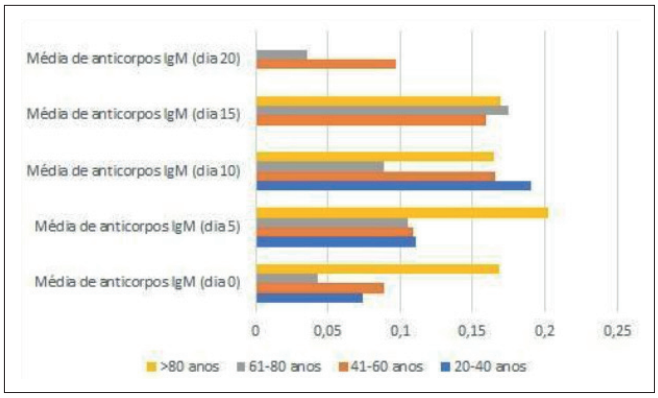


Figura 5

Dosagem de anticorpos IgM em pacientes internados na Ala Covid/UTI-Covid no período de abril a junho de 2020 em um hospital universitário por faixas etárias.

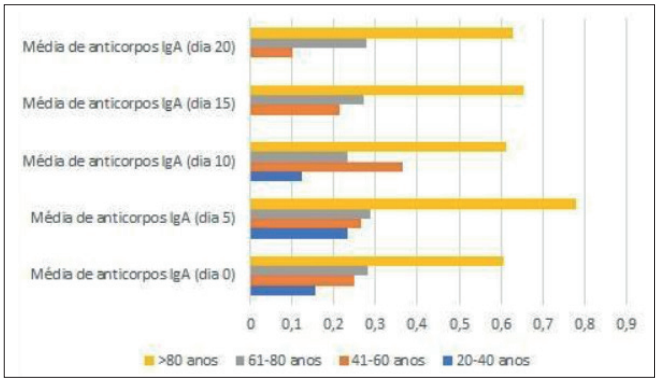


Figura 6

Dosagem de anticorpos IgA em pacientes internados na Ala Covid/UTI-Covid no período de abril a junho de 2020 em um hospital universitário por faixas etárias.

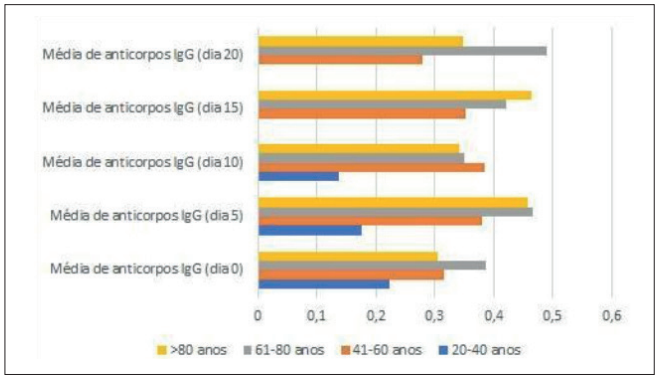


Figura 4

Dosagem de anticorpos IgG em pacientes internados na Ala Covid/UTI-Covid no período de abril a junho de 2020 em um hospital universitário por faixas etárias.

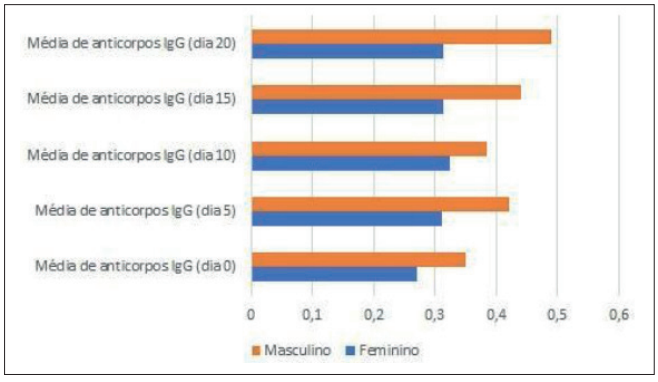


Figura 7

Dosagem de anticorpos IgG em pacientes internados na Ala Covid/UTI-Covid no período de abril a junho de 2020 em um hospital universitário por sexo.

Já para anticorpos IgM, a média de títulos dosados foi superior no sexo feminino em todas as datas de internação, conforme constatado na Figura 8. No 15º dia encontramos uma média de 0,177 para o sexo feminino, enquanto para o sexo masculino, uma média de 0,159.

O sexo feminino apresentou médias de títulos de anticorpos IgA superiores às do sexo masculino em todos os dias de dosagens. No 10º dia, o sexo feminino obteve uma média de 0,376. Entre os pacientes do sexo masculino, a maior média (0,280) de títulos de IgA foi no 10º dia. Estes dados estão presentes na Figura 9.

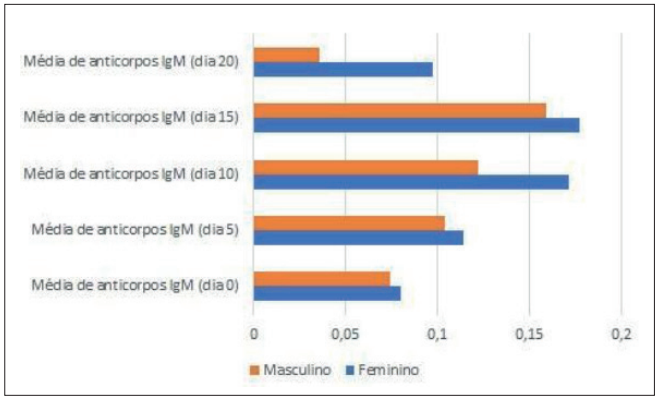


Figura 8

Dosagem de anticorpos IgM em pacientes internados na Ala Covid/UTI-Covid no período de abril a junho de 2020 em um hospital universitário por sexo.

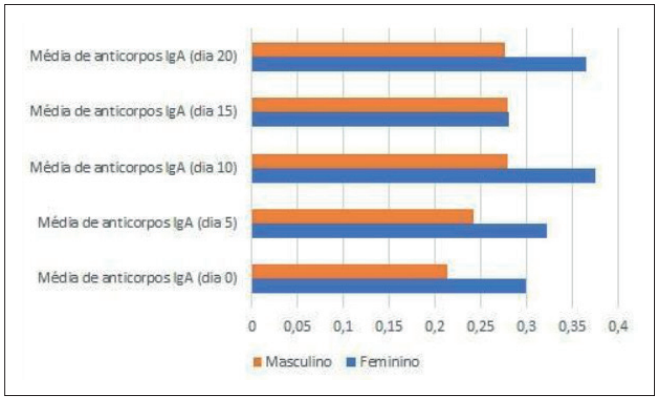


Figura 9

Dosagem de anticorpos IgA em pacientes internados na Ala Covid/UTI-Covid no período de abril a junho de 2020 em um hospital universitário por sexo.

DISCUSSÃO

Considerando como variável o sexo e os anticorpos do tipo IgG, verificamos uma maior prevalência em indivíduos do sexo masculino, podendo ser correlacionado ao estudo de Graham (2020), em que foram coletadas amostras de soro de 32 pacientes com teste de COVID-19 positivo por RT-PCR com *swab* nasofaríngeo e que demonstrou este mesmo perfil sorológico.[5]

A diferença na produção de anticorpos entre indivíduos masculinos e femininos pode ser explicada por meio da variação nas concentrações de esteroides sexuais que ocorre ao longo do curso de vida, a qual contribui para diferenças nos perfis imunológicos, além do papel dos alelos sexuais (X e Y) e as doenças ligadas a eles, que podem estar relacionadas a doenças autoimunes de caráter genético.[6]

Em relação à faixa etária, nosso estudo encontrou um aumento de títulos de anticorpos em geral em pacientes mais velhos, se contrapondo ao estudo de Ciarambino (2021), uma revisão bibliográfica que relaciona a diminuição dos títulos de anticorpos e menor afinidade de células de memória a partir da idade do paciente.[7]

Yang e colaboradores (2021) compararam níveis de anticorpos IgG SARS-CoV-2 de 85 amostras pediátricas positivas e 3.648 pacientes adultos positivos, obtendo resultados similares ao presente estudo, onde pacientes com idade entre 19 e 24 anos mostraram níveis de IgG significativamente mais baixos do que os 612 adultos com idade entre 51 e 60 anos.[8]

Esperava-se que a inflexão da resposta do anticorpo SARS-CoV-2 ocorresse em uma idade mais avançada, quando o sistema imunológico em envelhecimento não está apto para reagir a novos antígenos. Podemos dizer que um aumento do nível basal de citocinas pró-inflamatórias associadas a algumas comorbidades comuns da velhice, como obesidade, hipertensão ou diabetes, podem ter um efeito estimulador na resposta humoral da SARS-CoV-2.[9]

Há escassez de estudos sistemáticos sobre a produção de IgA em pacientes com COVID-19. Os testes sorológicos relatados se concentram em IgM, IgG e imunoglobulinas totais, embora IgA desempenhe um papel importante na imunidade da mucosa. Na verdade, a IgA é a imunoglobulina mais importante para combater o patógeno infeccioso no sistema respiratório e digestivo no ponto de entrada do patógeno. Como uma barreira imunológica, a IgA secretora pode neutralizar o SARS-CoV-2 antes de atingir e ligar as células epiteliais.[10]

CONCLUSÃO

Das 31 amostras analisadas, a população e a faixa etária prevalente corresponderam a adultos masculinos de 41 a 60 anos, habitantes de Cascavel (83,9%) e com desfecho de cura (83,87%). Somente a média de anticorpos IgG ficou abaixo do valor de *cut-off*, sendo que os demais anticorpos positivaram. Os maiores títulos de anticorpos foram encontrados em pacientes com idade mais elevada, e a dosagem de anticorpos da classe IgA e IgM manteve-se mais elevada entre as mulheres, porém, para anticorpos da classe IgG, os homens obtiveram maiores títulos.

SUPORTE FINANCEIRO

Esta pesquisa possui financiamento próprio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná pelo incentivo à realização de pesquisa em toda a sua extensão; ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário do Oeste do Paraná por ceder espaço para execução da pesquisa, bem como sua vasta fonte de dados. E aos meus colegas de profissão, que sempre estiveram ao meu lado.

REFERÊNCIAS

1. Ciotti M, Ciccozzi M, Terrinoni A, Jiang W-C, Wang C-B, Bernardini S. The COVID-19 Pandemic. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences [Internet]. 2020 Jul 9;57(6):365-88. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408363.2020.1783198>
2. Singhal T. A review of coronavirus disease-2019 (COVID-19). The Indian Journal of Pediatrics. 2020 Mar 13;87(4):281-6.
3. Kumar KSR, Mufti SS, Sarathy V, Hazarika D, Naik R. An Update on Advances in COVID-19 Laboratory Diagnosis and Testing Guidelines in India. Frontiers in Public Health. 2021 Mar 4;9.
4. Goudouris ES. Laboratory diagnosis of COVID-19. Jornal de Pediatria. 2020 Aug.
5. Graham NR, Whitaker AN, Strother CA, Miles AK, Grier D, McElvany BD, et al. Kinetics and Isotype Assessment of Antibodies Targeting the Spike Protein Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2 In COVID-19 Patients as a function of Age and Biological Sex. medRxiv [Internet]. 2020 Jul 16 [cited 2022 Feb 13];2020.07.15.20154443. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7386516/>
6. Scully EP, Haverfield J, Ursin RL, Tannenbaum C, Klein SL. Considering how biological sex impacts immune responses and COVID-19 outcomes. Nature Reviews Immunology [Internet]. 2020 Jul 1;20(7):442–7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41577-020-0348-8>
7. Ciarambino T, Para O, Giordano M. Immune system and COVID-19 by sex differences and age. Women's Health. 2021 Jan;17:174550652110222.
8. Yang HS, Costa V, Racine-Brzostek SE, Acker KP, Yee J, Chen Z, et al. Association of Age With SARS-CoV-2 Antibody Response. JAMA Network Open [Internet]. 2021 Mar 22 [cited 2021 Mar 27];4(3):e214302. Disponível em: https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2777743?resultClick=1
9. Chen Y, Klein SL, Garibaldi BT, Li H, Wu C, Osevala NM, et al. Aging in COVID-19: Vulnerability, immunity and intervention. Ageing Research Reviews. 2021 Jan;65:101205.
10. Chao YX, Rötzschke O, Tan E-K. The role of IgA in COVID-19. Brain, Behavior, and Immunity. 2020 Jul;87:182-3.

Avaliação multicêntrica de um método livre de purificação para detecção do vírus SARS-CoV-2

Multicentric evaluation of a free purification method for detecting SARS-CoV-2 virus

Rafael Oliveira Reis[1], *Leandro Bolzan*[2], *Cintia Lima Ambrozio*[1], *Guilherme Cassao Bragança*[3], *Gustavo Dupont Garrastazu*[3]

[1] Centro Universitário URCAMP, Laboratório de Biologia Molecular. Bagé, RS. Brasil.

[2] UNIFRA – Centro Universitário Franciscano. Santa Maria, RS, Brasil.

[3] Centro Universitário URCAMP, Curso de Farmácia. Bagé, RS, Brasil.

Resumo

A retomada das atividades e aumento da circulação de pessoas, passados dois anos do primeiro diagnóstico de Covid-19, obrigou a necessidade de métodos eficazes e rápidos para o diagnóstico da doença. Métodos de RT-PCR livre de extração com menor tempo de realização têm sido testados. Submetemos o novo teste Qiaprep&Amp Viral Um Kit (QIAGEN – Hilden, Alemanha), método rápido de RT-PCR sem as fases de extração e purificação de ácidos nucleicos, a um método laboratorial já padronizado nos laboratórios do estudo. Um total de 85 amostras foram analisadas (60 detectáveis e 25 não detectáveis para SARS-CoV-2) e encontramos sensibilidade total de 98,3% (IC 95% 91,06 - 99,96%) e especificidade de 96% (IC 79,65% - 99,9 %) com uma acurácia total de 97,5%). O método apresentou boa performance, podendo ser uma importante estratégia no controle da pandemia da Covid-19.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; reação em cadeia da polimerase em tempo real; Covid-19

Abstract

The return of social activities and the increased people traveling, two years after the first diagnosis of Covid-19, has necessitated the need for effective and rapid methods for diagnosing the disease. Extraction-free RT-PCR methods with shorter lead times have been tested. We performed the evaluation of the new Qiaprep&Amp Viral One Kit (QIAGEN – Hilden, Germany), a rapid RT-PCR method without the steps of nucleic acid extraction and purification in comparison a laboratory method already standardized in the laboratories of the study. A total of 85 samples were analyzed (60 detectable and 25 non-detectable for SARS-CoV-2) and we found a total sensitivity of 98.3% (95% CI 91.06 - 99.96%) and a specificity of 96%, (CI 79.65% - 99.9 %) with a total accuracy of 97.5%.) The method showed good performance and can be an important strategy in the control of the Covid-19 pandemic.

Keywords: SARS-CoV-2; real-time polymerase chain reaction; Covid-19

Correspondência
Rafael Oliveira Reis
E-mail: rafaelurcamp@gmail.com

Recebido em 10/03/2022 | Aprovado em 24/10/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202200030

INTRODUÇÃO

No final de 2019, um surto de pneumonia de etiologia desconhecida ocorrido na cidade de Wuhan, província de Hubei na China, foi relatado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Um novo tipo de Coronavírus, denominado como SARS-CoV-2, levou à morte de milhares de indivíduos no mundo todo.[1,2] A volta à rotina com segurança tem sido estudada e vem avançando no mundo todo, entretanto novas variantes preocupantes do vírus SARS-CoV-2 têm comumente emergido.[3,4] A massiva testagem mundial para identificar indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 produziu grande impacto nos laboratórios de diagnóstico, levando a momentos críticos diante da grande escassez de insumos plásticos e de reagentes.[5]

No atual momento, com a retomada das atividades em vários países, abertura de fronteiras, grandes eventos presenciais, a testagem massiva com testes de alta sensibilidade se mostrou ainda mais fundamental. Para isso são necessários testes com tempos de resposta rápida com o intuito de diminuir ou evitar novas ondas e surtos de Covid-19, e assim bloquear o avanço de novas variantes preocupantes.[4,6,7]

Novas formas diagnósticas para identificação do vírus são sugeridas na literatura, com inovações que visam aumentar a escala de testagem e no menor tempo possível.[8] Entretanto, a precisão dos métodos moleculares é fundamental para a eficiência na detecção do vírus SARS-CoV-2. A técnica de RT-PCR livre de purificação ou direta tem sido descrita e testada como alternativa rápida através da técnica RT-qPCR. O método QiaPrep&Amp Viral Um Kit® (QP&A – Hilden, Alemanha), tem por objetivo disponibilizar resultados rápidos utilizando protocolo de reação direta sem a necessidade de purificação de ácidos nucleicos, através de somente uma etapa de lise de amostra. Sendo assim, o trabalho focou em analisar o desempenho do método QP&A em dois laboratórios que realizam a testagem para SARS-COV-2 frente ao método XPert XPress SARS-CoV-2® (XP SARS-CoV-2, CEPHEID – Califórnia, EUA).

METODOLOGIA

Obtenção das Amostras

Uma análise multicêntrica foi realizada em dois laboratórios da Região Sul do Brasil. Foram selecionadas aleatoriamente 85 amostras com resultados detectáveis e não detectáveis para SARS-CoV-2 previamente processadas no equipamento Gene Xpert (Califórnia – EUA) utilizando o teste IVD (*diagnostic in vitro*) XP SARS-CoV-2. No LAB "A" foram avaliadas 45 amostras, sendo 35 detectáveis para SARS-CoV-2 e 10 não detectáveis; no LAB "B" foram realizadas as análises de 40 amostras (25 detectáveis e 15 não detectáveis).

Análises das Amostras QP&A

As amostras com resultados detectáveis foram armazenadas a -30°C em meio de transporte viral (VTM) (CEPHEID -EUA), para o estudo. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente em cabine de segurança biológica até completo descongelamento. Em seguida, foram submetidas ao método QP&A. Para a reação foram utilizados 8µL de amostra em VTM e adicionados 2µL do tampão de lise do kit, e incubando em TA (temperatura ambiente) por 2 minutos. Após, foram adicionados o MIX previamente preparada com 5µL de Mastermix, 2µL de primers e sondas do controle interno de amplificação, 1,0ul do de pirmers e sondas do controle interno de amostras, 1,0 de primers e sondas para o gene *N1/N2* e 1,0µL de água livre de DNAse e RNAse por reação, somando total de 10µL de PCR por reação, que posteriormente foi acrescentado à amostra com tampão de lise com volume total de reação de 10µL.

Todas as amostras selecionadas foram testadas em equipamento QiaQuant 96/5 plex, utilizando o kit comercial QP&A e sondas e primers (QIAGEN N1+N2 Assay, Hilden – ALE) descritas no protocolo CDC. As condições RT-PCR foram de 10 minutos a 50°C para formação de DNA, seguidos por extração inicial de 2 minutos para DNA genômico. A formação de amplicons foi a realizada através de 40 ciclos de extração a 95°C por 5 segundos, seguidos por anelamento, com extensão e leitura a 58°C por 30 segundos.

A relação entre os valores de *cycle threshold* (Ct) obtidos das amostras detectáveis para o gene *N1/N2* do kit QP&A foi comparada à dos valores do gene *N2* do kit XP SARS-CoV-2. As condições de amplificação e protocolos seguiram as regras do fabricante.

Avaliação de Desempenho

Para a avaliação da metodologia em diferentes cenários epidemiológico, o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN), assim como a Taxa de probabilidade (*Likelihood ratio* - LR) foram avaliados frente a três cenários hipotéticos de prevalência de 1%, 10% e 25%.

RESULTADOS

Do total de 85 amostras analisadas (60 detectáveis e 25 não detectáveis), 59 foram detectáveis para QP&A e 24 não detectáveis, sendo que as duas amostras restantes apresentaram resultados divergentes entre os dois métodos testados. Do total de amostras obtivemos um resultado falso positivo e um resultado falso negativo; em comparação com o método utilizado como referência XP, ambas as discrepâncias ocorreram no LAB "B". Os Cts das amostras positivas para o gene viral variaram de 12,8 ciclos a 36,60 ciclos para o XP SARS-CoV-2 e 14,60 ciclos a 38,60 ciclos para o QP&A (Figura 1). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de quando analisamos a diferença entre as médias de Ct entre os dois grupos, no qual não houve diferença significativa entre os dois testes, p>0,005.

Não houve diferença significativa entre os Cts encontrados pelo método XP SARS-CoV-2 e o método QP&A. A Figura 2 demonstra as amostras que apresentaram maior diferença entre os Cts (15, 30, 34 e 35). Através da análise de correlação bivariada foi possível verificar a boa correlação entre os dois métodos R=0.932, (IC-95%) (Figura 3).

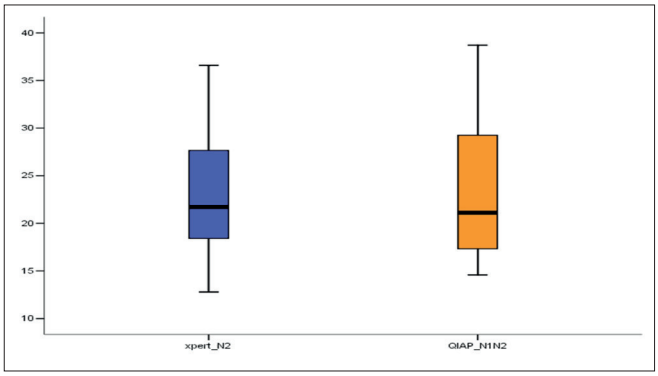


Figura 1
Média dos Cts observados entre os dois métodos

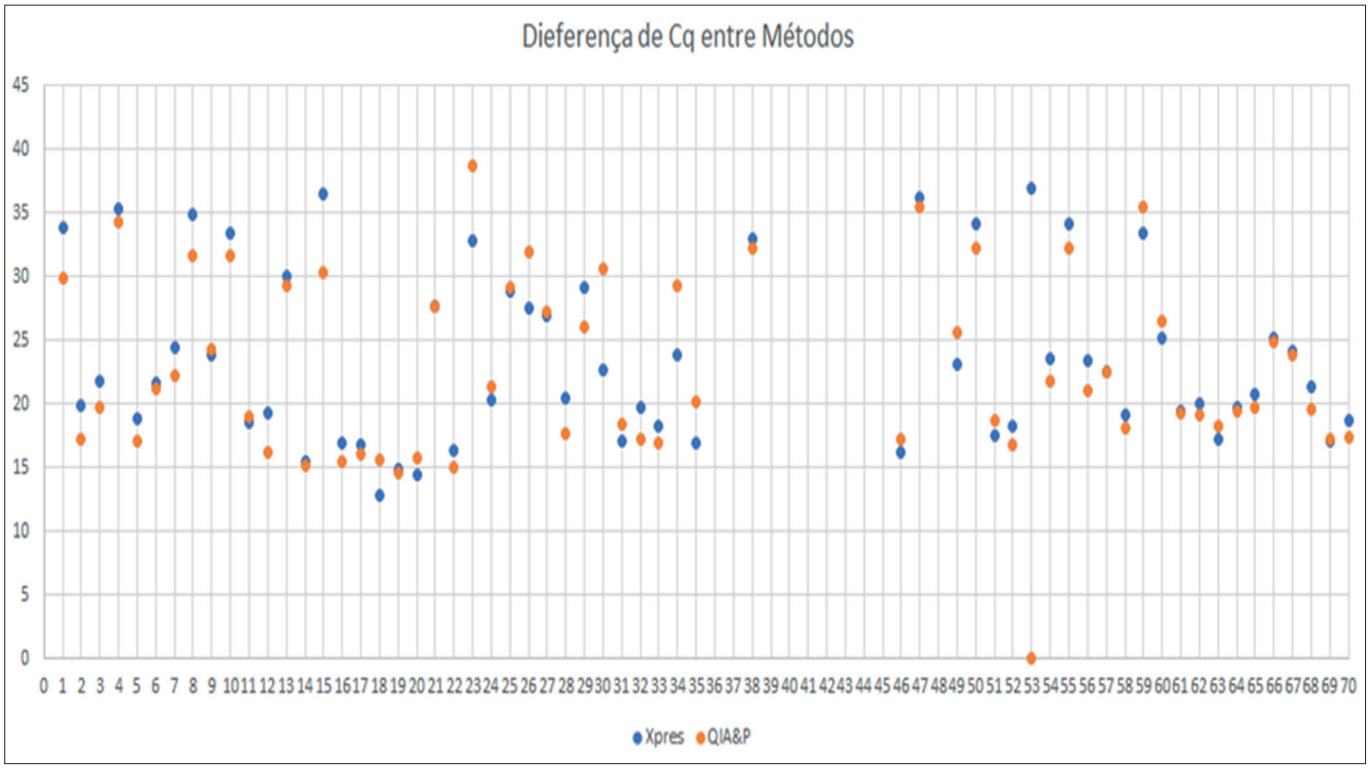


Figura 2
Diferença de Ct entre as amostras testadas no XP SARS-CoV-2 (azul) e no QP&A (laranja).

Legenda: Cq – ciclo de qualificação (corresponde a Ct)

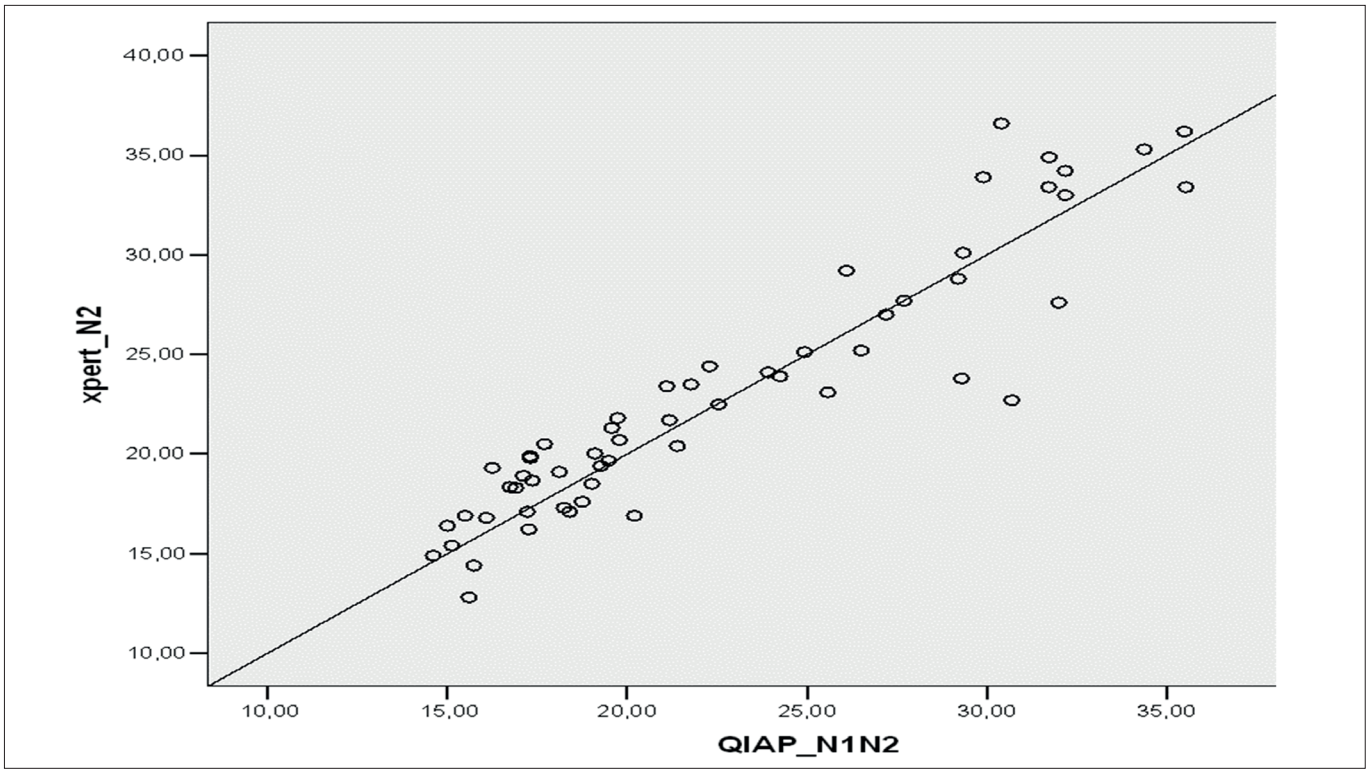


Figura 3

Análise de regressão linear bivariada para avaliar relação entre os dois métodos.

Ficou evidente que o método apresenta melhor sensibilidade quando em amostras com cargas virais mais elevadas Ct <30 ciclos, entretanto apenas uma amostra com Ct acima de 30 apresentou resultado falso negativo (amostra com Ct de 36,9 no XP SARS-CoV-2), conforme Tabela 1.

Encontramos uma sensibilidade total de 98,3% (IC 95% 91,06 - 99,96%) e uma especificidade de 96% (IC 79,65% - 99,9 %), com acurácia total de 97,5%. Porém quando avaliamos amostras com Ct até 35 ciclos obtidos pelo método referência, a concordância entre as amostras positivas foi de 100%.

Tabela 1

Avaliação da concordância em diferentes grupos de Cts.

Xpert Xpress SARS-CoV-2	QIA&P	Concordância	Erros
	N Pos	N	%	Falso Neg Ct
Pos <30 Ct	47	47	100	*
Pos >30 Ct	13	12	92,30	36,9
				Falso Pos Ct
Negativo	25	24	96	38,3

As duas amostras com resultados discordantes foram repetidas em RT-qPCR (dados não apresentados) através do kit (Xgen Master Covid-19 - Mobius Life Science), onde foi demonstrado que o resultado falso positivo observado se tratava de um resultado verdadeiramente positivo, e com isso pudemos observar uma especificidade de 100%.

Para avaliar o impacto da nova metodologia frente aos cenários pandêmicos, inferimos a análise em três tipos de prevalência, sendo a primeira 1% de positividade, seguida por 10% e 25% de positividade.

Inicialmente a uma baixa taxa de infecção na população 1%, a taxa de probabilidade (*Likelihood ratio- LR)* que indica quantas vezes um resultado diagnóstico é capaz de mudar a probabilidade de ser uma doença, sendo calculado para resultados positivos e negativos, LR + foi de 24,58 (IC 3,60 - 167,80) enquanto a razão de probabilidade negativa LR- foi de 0,02 IC (0- 0,02). Já o valor preditivo positivo (VPP) foi 19,89% (IC 3,51% -62,89%), enquanto o valor preditivo negativo (VPN) do teste neste cenário foi de 99,98% (99,88% - 100%).

Quando modificamos a prevalência da doença para 10%, LR+ é de 24,58, (3,60 - 167,80), ao mesmo tempo em que o LR é

de 0,02 (IC 0 - 0,02). O VPP foi de 73,2% (IC 28,58% - 94,1%), de forma que o VPN encontrado foi 99,81% (IC 98,67% - 99,97%).

Em um cenário de forte prevalência da doença supondo uma taxa de prevalência de 25%, observamos um LR+ de 24,58 (3,60 - 167,80), enquanto a taxa de probabilidade negativa foi igual à dos outros dois cenários LR- 0,02 IC (0 - 0,02). Já o valor preditivo positivo do teste em um cenário de alta prevalência foi de 89,12% (IC 54,56% - 98,24%), enquanto o valor preditivo negativo se manteve por volta do 99% (IC 96,1% - 99,92).

DISCUSSÃO

O teste RT-PCR tem sido amplamente empregado no diagnóstico da Covid-19, devido ao elevado gasto de insumos plásticos aliado ao elevado tempo de execução do teste RT-qPCR convencional. Com isso, a inovação para melhorar estes aspectos tem sido fomentada.[5]

A técnica de PCR quantitativa (qPCR) para a detecção de um RNA de interesse é precedida do isolamento e purificação do RNA total da amostra, da eluição e possível concentração do material.[8] Só então é utilizado o RNA purificado para reação de RT-qPCR, e sendo assim a obtenção do ácido nucleico é trabalhosa e demorada.[9] Vale considerar que etapas adicionais que requerem manipulação manual podem resultar em erros experimentais.[10]

Além disso, o uso de materiais plásticos em grandes quantidades para extração de ácidos nucleicos pode resultar em falta nos estoques, podendo levar à interrupção do serviço devido à falta de insumos. Assim, os métodos de extração direta e livre de purificação tornaram-se uma alternativa, pois envolvem menos etapas no processo e possuem baixo consumo de insumos plásticos (escassos em momentos pandêmicos).[11-14]

Vários autores têm explorado esta necessidade do sistema diagnóstico,[15,16] no entanto nem todas as metodologias apresentam ótima sensibilidade.

Pessoa et al. (2021) obtiveram uma concordância de 78% entre amostras positivas com uma diferença significativa no valor de Ct quando comparadas ao método padrão no total de amostras do estudo. O método QP&A apresentou melhor acurácia, quando comparado ao método realizado por Pessoa et al. (2021).

Claas et al. (2021), utilizando o mesmo método e protocolo, obtiveram alta concordância (100%) entre seus resultados quando avaliados em amostras com detecção para o gene *N1/N2* demonstrando a reprodutibilidade do método. Quando o método livre de purificação foi comparado a quatro plataformas diferentes de RT-PCR, avaliando resultados com todos os Cts, a concordância do autor foi de 86,3%. Q&AP demonstrou boa sensibilidade clínica em nosso estudo, quando comparado ao kit já validado Xpress-SARS-CoV-2, avaliando amostras detectáveis com Ct até 40 ciclos, realizados no equipamento Gene Xpert. O método Q&AP também apresentou desempenho superior ao do encontrado por Pessoa et al. (2021), com a utilização do método *in house* rápido de obtenção de ácidos nucleicos.

O método Q&AP apresentou seu melhor desempenho em amostras detectáveis com Ct até 35 ciclos. Outras alternativas, conforme Smyrlaki et al. (2020), através de detecção e aquecimento para otimizar a detecção molecular da Covid-19, obtiveram sensibilidade de 96% e 91% em dois diferentes protocolos utilizando amostras para o gene *ORF1ab* até Ct de 40 ciclos, avaliando 597 amostras. Visseaux et al. (2021), avaliando métodos rápidos e diretos, obtiveram sensibilidade de 91,9%, 89,2% e 94,6% em amostras com Ct até 30 ciclos, utilizando kits com alvos para o gene E dos SARS-CoV-2.[17,18]

QP&A apresentou ótimo desempenho quando foram avaliadas amostras com Ct até 35 ciclos, sendo superior a outros estudos.[11,16] O método QP&A apresentou sensibilidade de 100% com a avaliação até 30 Cts, demonstrando desempenho semelhante ao dos métodos disponíveis no mercado laboratorial.[11,13,14]

Dois resultados discrepantes foram encontrados no QP&A em nosso estudo, também observados em outros estudos utilizando o mesmo equipamento como referência.[5] Porém quando avaliamos a sensibilidade e especificidade associadas a valores preditivos, verificamos um excelente valor preditivo negativo nos diversificados cenários de prevalência pela infecção da Covid-19. Ondas de disseminação do vírus intercaladas por períodos de baixa disseminação têm sido constantes no mundo todo.[19] A simulação dos variados cenários contribui para o entendimento do real desempenho clínico do método em períodos de alta disseminação e períodos de baixa transmissão do vírus. Como esperado, o valor preditivo do teste foi melhor quando em elevadas taxas de prevalência da doença, demonstrando tanto em cenários de baixa prevalência que o teste ainda apresenta desempenho aceitável. Além disso, o aumento da capacidade de testagem nos diferentes tipos de laboratórios pode contribuir para um diagnóstico rápido e mais preciso do que testes que utilizam de fluxo lateral, principalmente em contatos e indivíduos assintomáticos.[20,21]

CONCLUSÃO

O método *RUO* QP&A apresentou boa acurácia quando comparado ao método utilizado como referência, a elevada especificidade associada a uma boa sensibilidade. A implementação deste teste pode contribuir fortemente para auxiliar no combate à pandemia da Covid-19, principalmente no momento de retomada das atividades. O menor tempo para realização do teste associado à menor utilização de insumos plásticos pode auxiliar na velocidade de isolamento de pacientes positivos, contribuindo para a diminuição de variantes de preocupação, e é importante ferramenta no controle e disseminação do vírus SARS-CoV-2, principalmente no momento de reabertura das fronteiras no mundo todo. Avaliações com maior número amostral pode contribuir para determinar ainda melhor este desempenho e o impacto no controle pandêmico.

REFERÊNCIAS

1. Matta S, Chopra KK, Arora VK. Morbidity and mortality trends of Covid 19 in top 10 countries. Indian J Tuberc. 2020;67(4):S167. doi:10.1016/J.IJTB.2020.09.031
2. Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. N Engl J Med. 2020;382(18):1708–1720. doi:10.1056/nejmoa2002032
3. Hierro LA, Cantarero D, Patiño D, de Arenaza DRP. Who can go back to work when the COVID-19 pandemic remits? PLoS One. 2020;15(8). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0238299
4. Gao S, Guo H, Luo G. Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2, a global urgent public health alert! J Med Virol. novembro 2021. doi:10.1002/JMV.27491
5. Becker M, Taylor T, Kiazyk S, Cabiles D, Meyers A, Sandstrom P. Recommendations for sample pooling on the Cepheid GeneXpert ® system using the Cepheid Xpert ® Xpress SARS-CoV-2 assay. 2020:1-13. doi:10.1101/2020.05.14.097287
6. Das S, Shibib DR, Vernon MO. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 .The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information. 2020;(January).
7. Tegally H, Wilkinson E, Lessells RJ, et al. Sixteen novel lineages of SARS-CoV-2 in South Africa. Nat Med. fevereiro 2021. doi:10.1038/s41591-021-01255-3
8. Alcoba-Florez J, González-Montelongo R, Íñigo-Campos A, et al. Fast SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR in preheated nasopharyngeal swab samples. Int J Infect Dis. 2020;97:66–68. doi:10.1016/J.IJID.2020.05.099
9. Menezes ME, Lima LM, Martinello F. Diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Rev Bras Análises Clínicas. 2020;52(2). doi:10.21877/2448-3877.20200006
10. Arevalo-Rodriguez I, Buitrago-Garcia D, Simancas-Racines D, et al. False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: A systematic review. PLoS One. 2020;15(12). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0242958
11. Bruce EA, Huang ML, Perchetti GA, et al. Direct RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 RNA from patient nasopharyngeal swabs without an RNA extraction step. PLoS Biol. 2020;18(10):e3000896. Published 2020 Oct 2. doi:10.1371/journal.pbio.3000896
12. Hasan MR, Mirza F, Al-Hail H, et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA by direct RT-qPCR on nasopharyngeal specimens without extraction of viral RNA. PLoS One. 2020;15(7 July). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0236564
13. Merindol N, Pépin G, Marchand C, et al. SARS-CoV-2 detection by direct rRT-PCR without RNA extraction. J Clin Virol. 2020;128. doi:10.1016/J.JCV.2020.104423
14. Barza R, Patel P, Sabatini L, Singh K. Use of a simplified sample processing step without RNA extraction for direct SARS-CoV-2 RT-PCR detection. J Clin Virol. 2020;132. doi:10.1016/J.JCV.2020.104587
15. Claas ECJ, Smit PW, van Bussel MJAWM, et al. A two minute liquid based sample preparation for rapid SARS-CoV2 real-time PCR screening: A multicentre evaluation. J Clin Virol. 2021;135:104720. doi:10.1016/J.JCV.2020.104720
16. Pessoa WFB, Galvão BHA, Barroso H, et al. Alternative workflow for COVID-19 diagnosis using direct RT-PCR screening. Rev Bras Análises Clínicas. 2021;53(2):175–179. doi:10.21877/2448-3877.202102128
17. Smyrlaki I, Ekman M, Lentini A, et al. Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. Nat Commun. 2020;11(1):1–12. doi:10.1038/s41467-020-18611-5
18. Visseaux B, Collin G, Houhou-Fidouh N, et al. Evaluation of three extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR assays: A feasible alternative approach with low technical requirements. J Virol Methods. 2021;291:114086. doi:10.1016/j.jviromet.2021.114086
19. Seong H, Hyun HJ, Yun JG, et al. Comparison of the second and third waves of the COVID-19 pandemic in South Korea: Importance of early public health intervention. Int J Infect Dis. 2021;104:742. doi:10.1016/J.IJID.2021.02.004
20. Rodrigues Teixeira Silva Daameche H, Zampieri Ipolito M, Chieregato Matheus JP. Indicadores de Lesão e Inflamação Muscular em Atletas - Revisão Integrativa da Literatura. Rev Educ em Saúde. 2018;6(1):90-98. doi:10.29237/2358-9868.2018v6i1.p90-98
21. Torres I, Poujois S, Albert E, Colomina J, Navarro D. Evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag rapid test device) for SARS-CoV-2 detection in asymptomatic close contacts of COVID-19 patients. Clin Microbiol Infect. 2021;27(4):636.e1-636.e4. doi:10.1016/J.CMI.2020.12.022

Sorologia reagente para *Toxoplasma gondii* em bolsas de sangue no período do surto de Toxoplasmose em Santa Maria – RS

Reagent serology for Toxoplasma gondii *in blood bags in the period of the Toxoplasmose outbreak in Santa Maria – RS*

Dandara Avozani Pinton[1]

[1] Biomédica – Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil.

Resumo

Verificar a prevalência de sorologia IgM reagente para *Toxoplasma gondii* em bolsas de sangue no período do surto de toxoplasmose em Santa Maria – RS. Foi realizado levantamento de dados a partir dos resultados de sorologia anti-*T. gondii* IgM reagente de bolsas sanguíneas coletadas entre as datas de 07/05/2018 a 22/05/2018, durante o surto na cidade. Além disso, foram coletados dados como sexo do doador, idade, local onde residem, profissão e tipo sanguíneo. No período citado acima, foram testadas 364 bolsas sanguíneas. Dentre estas, foram encontrados resultados IgM positivo para *T. gondii* em 8 (2,1%) bolsas, sendo que 3 (0,8%) apresentaram resultado inconclusivo. A maior soroprevalência IgM para *T. gondii* se encontra em homens (2,62%), com idade de 18 a 29 anos (5,97%), raça parda (8,33%), com tipo sanguíneo O^+ (4,02%) e que residem na região oeste da cidade de Santa Maria – RS (4,76%). Em épocas de surtos como no caso de Santa Maria no ano de 2018, é de suma relevância ressaltar a importância da triagem sorológica para *T. gondii* em bolsas de sangue, tendo em vista que a transmissão para gestantes e imunodeprimidos pode acarretar problemas irreversíveis.

Palavras-chave: Toxoplasmose; Doadores de sangue; Bancos de sangue; Sangue; Sorologia; Diagnóstico

Abstract

To verify the prevalence of serological IgM reagent for Toxoplasma gondii in blood bags during the outbreak of toxoplasmosis in Santa Maria – RS. Data were collected from the results of anti-*T. gondii* IgM serology reagent from blood bags collected between the dates 05/05/2018 to 05/22/2018, during the outbreak in the city. In addition, data were collected such as donor sex, age, place of residence, profession and blood type. In the period described above, 364 blood bags were tested. Among these, positive IgM results for *T. gondii* were found in 8 (2.1%) pockets, of which 3 (0.8%) presented inconclusive results. The highest IgM seroprevalence for *T. gondii* was found in males (2.62%), aged 18 to 29 years old (5.97%), brown breed (8.33%), with blood type O^+ (4, 02%) and residing in the western region of the city of Santa Maria – RS (4.76%). In times of outbreaks as in the case of Santa Maria in the year 2018, it is of great importance for the surveillance of the serological screening for the use of blood bags and irrigation.

Keywords: Diagnosis; Blood; Toxoplamosis; Blood donors; Blood banks; Serology.

Correspondência
Dandara Avozani Pinton
E-mail: dandaravzn@gmail.com

Recebido em 20/01/2020 | Aprovado em 14/03/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202200947

INTRODUÇÃO

A transfusão de hemocomponentes tem sido muito importante na terapêutica moderna, quando usada de forma adequada. É empregada na saúde para corrigir algumas complicações, como por exemplo a anemia hemolítica, anemia ferropriva, anemia megaloblástica, entre outros.[1,2] Durante a transfusão sanguínea inúmeras doenças podem ser transmitidas ao receptor, sendo uma delas a toxoplasmose.[3]

O *Toxoplasma gondii* em humanos é relatado em todo o mundo, mas vários fatores irão interferir na prevalência da infecção, como o comportamento alimentar, idade e localização geográfica.[4] Além destes fatores citados, este parasita também pode ser transmitido de pessoas IgM positivas para receptores negativos, através de sangue total e leucócitos.[5]

Os receptores de sangue e/ou hemoderivados geralmente são considerados pacientes imunossuprimidos, e o recebimento de sangue infectado poderia causar complicações irreversíveis, sendo essencial rastrear o sangue doado.[6]

Uma das maiores preocupações são voltadas às gestantes, tendo em vista que existe possibilidade de infecção congênita, podendo até mesmo ser letal.[7] Diante desta realidade, é de suma importância que o pré-natal seja realizado no primeiro trimestre de gestação, e assim os casos agudos de toxoplasmose gestacional podem ser diagnosticados precocemente e tratados, reduzindo as sequelas para o recém-nascido.[8] Os testes laboratoriais vêm sendo aperfeiçoados ao longo do tempo e se tornando cada vez mais sensíveis e específicos para detecção dos antígenos.[9]

No Brasil ainda não existe um programa que obrigue a notificação dos casos de toxoplasmose, impedindo desta forma que se estabeleça a incidência e prevalência de forma correta, impossibilitando que sejam tomadas medidas contra a disseminação da doença.[10] Cabe ressaltar que em nosso país não é obrigatoriedade realizar testes sorológicos para *T. gondii* nas bolsas de sangue. Esta não obrigatoriedade pode ter origem na falta de verbas para realizar a pesquisa e/ou também pelo receio das autoridades de saúde quanto ao número elevado de exclusões de doadores e descarte de bolsas de sangue, causando assim uma diminuição no estoque sanguíneo.

No ano de 2018, ocorreu um surto de toxoplasmose na cidade de Santa Maria – RS, e observando este atual cenário é de suma importância a análise dos dados sobre a prevalência de sorologia reagente para *Toxoplasma gondii* em bolsas de sangue no hemocentro regional de Santa Maria no período do surto, partindo do princípio de que a transmissão do *T. gondii* ocorre não apenas pela ingestão de alimentos mal cozidos e/ou mal lavados, mas também através da transfusão sanguínea.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A triagem sorológica é a mais indicada para o diagnóstico de infecções agudas, tendo em vista que na fase inicial o parasita não pode ser identificado nos tecidos e secreções.[11] O anticorpo antitoxoplasma da classe IgM é o marcador sorológico mais utilizado, mas para confirmação deve-se realizar o teste de avidez de IgG, visto a frequência de resultado falso positivo de IgM.[12]

Para gestantes é de extrema importância a solicitação do perfil sorológico da doença aguda, avaliando anticorpos IgM e IgG. Um título positivo para IgG e negativo para IgM indica infecção pregressa, não oferecendo risco para o feto, exceto se a gestante for imunossuprimida. A presença destes anticorpos não caracteriza uma infecção aguda, apenas contato recente, que pode ser diagnosticado por até 18 meses após a primo-infecção.[13]

O diagnóstico de toxoplasmose pode se dar mediante diversas formas, porém o mais comum é o teste Enzime Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Outros testes também podem ser aplicados como a imunofluorescência indireta (IFI) e hemaglutinação indireta (HAI).[14]

Para auxiliar no diagnóstico, pode-se recorrer a outros métodos, como a pesquisa molecular (PCR) e o teste de avidez de anticorpos IgG. Resultados de anticorpos IgG com baixa avidez é indicativo de resposta imunológica com menos de quatro meses, já os de alta avidez são produzidos por uma infecção mais antiga, ou seja, há mais de quatro meses.[15]

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada uma coleta de dados através dos resultados de sorologia reagente IgM para *T. gondii* em bolsas de sangue do Hemocentro Regional de Santa Maria, coletadas entre as datas de 11/05/2018 a 22/05/2018, correspondente à época do surto de toxoplasmose na cidade. Através de planilhas previamente estabelecidas, compararam-se os doadores testados, com base nos dados como idade do doador, sexo, raça, local onde residem, profissão e tipo sanguíneo.

Na coleta de dados anteriormente citada, foram seguidas todas as normas éticas de sigilo quanto à identidade dos pacientes, bem como o uso das informações apenas para fins científicos.

ÉTICA

O suposto trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e aprovado em 23 de fevereiro de 2019, com o número de registro 3.171.867. O protocolo de pesquisa apresenta todos os Termos e documentos preconizados pela Resolução CNS nº 466/12.

RESULTADOS

O levantamento de dados baseou-se nos resultados de sorologia anti-*T. gondii* reagente. Foram testadas todas as bolsas de sangue coletadas entre as datas de 11/05/2018 a 22/05/2018, totalizando 364 bolsas. Dentre estas, foram encontrados resultados IgM positivo para *T. gondii* em 8 (2,1%) bolsas, sendo que 3 (0,8%) apresentaram resultado inconclusivo, totalizando 3% de bolsas IgM positivas para *T. gondii*.

A pesquisa foi processada mediante quimioluminescência, utilizando o kit ARCHITECT®anti-*T. gondii*. Os valores de referência adotados para resultado inconclusivo foram > de 0,50 UI/mL a 0,60 UI/mL; acima deste valor, o resultado já é considerado positivo, e abaixo de 0,50 UI/mL é considerado negativo. Cabe ressaltar que as bolsas que apresentaram resultado positivo foram descartadas, bem como as que apresentaram resultado inconclusivo, para prevenir possíveis complicações na transfusão.

Na tabela 1 podemos observar que a maior soroprevalência IgM para *T. gondii* se encontra em homens (2,62%), com idade de 18 a 29 anos (5,97%), raça parda (8,33%), com tipo sanguíneo O^+ (4,02%) e que residem na região oeste da cidade de Santa Maria – RS (4,76%).

Tabela 1

Comparação da soroprevalência de infecção IgM por *T. gondii* de acordo com idade, sexo, raça, tipo sanguíneo e região onde reside.

Características	Testados	Casos IgM positivos para *T. Gondii*	
	N	n	%
Anos de idade			
18 a 29	67	4	5,97
30 a 39	86	1	1,16
40 a 49	142	1	0,70
50 ou +	69	2	2,89
Sexo			
Masculino	229	6	2,62
Feminino	135	2	1,48
Raça			
Branco	246	4	1,62
Negro	59	2	3,38
Pardo	24	2	8,33
Outros	35	-	-
ABO			
O+	149	6	4,02
A+	87	1	1,14
A–	53	1	1,88
Outros	75	-	-
Região			
Zona oeste	84	4	4,76
Zona norte	119	1	0,84
Zona sul	82	1	1,21
Zona leste	44	1	2,27
Outras cidades	35	1	2,85

DISCUSSÃO

A soroepidemiologia de infecção por *T. gondii* em doadores de sangue no Brasil tem sido pouco estudada. Em pacientes imunodeprimidos, a toxoplasmose pode causar complicações severas, como por exemplo distúrbios cerebrais e encefalite. Em doadores de sangue essa infecção pode não trazer maiores consequências, mas quando transmitida para pacientes imunodeprimidos e gestantes, através da transfusão sanguínea, poderá vir a causar maiores problemas.[16,17] Atualmente os exames de triagem sorológica para *T. gondii* em bancos de sangue não são obrigatórios, mas estudos mostram uma considerável prevalência em bolsas de sangue, o que pode ser um fator de risco para complicações em pacientes transfundidos.

Um estudo realizado no nordeste do Irã com 491 doadores de sangue apresentou resultado de 1,6% positivos para IgM; em relação ao sexo, mulheres apresentaram taxa de IgM maior do que a dos homens, bem como a idade que foi mais prevalente em doadores na faixa etária dos 50 a 60 anos.[18] Em outro estudo também realizado no Irã, obtiveram resultado de 3,2% positivo para IgM em bolsas de sangue, com a soroprevalência maior em doadores do sexo feminino.[19]

Em ambos estudos os resultados diferem dos encontrados em nosso levantamento de dados, onde a maior soroprevalência foi em homens com idade entre 18 e 29 anos. Em contrapartida, em um estudo realizado em Taiwan com 1.783 doadores, foram encontrados 161 (9,0%) doadores positivos

para *T. gondii*, mas nenhum caso relatado de IgM positivo isolado, em relação à soropositividade, foi maior entre os homens em relação às mulheres, e não houve diferença significativa na prevalência entre os diferente grupos etários.[20]

O presente estudo apresentou uma taxa menor de soropositividade IgM para *T. gondii* em relação a um estudo realizado no Hemocentro de São José do Rio Preto em 2015, no qual foi pesquisado o parasita em 750 bolsas. O resultado foi de 27[3,6] bolsas reagentes IgM para *T. gondii*, relatada principalmente em homens (68%) com idade em torno de 34 anos.[21] Em estudo realizado no nordeste da Tailândia, na província de Loei, em um total de 345 doadores, 13 (39,4%) foram positivos para anti-*T.gondii* IgM, os homens apresentaram maiores resultados positivos do que as mulheres, a idade prevaleceu entre as faixas etárias de 21 a 30 anos e de 31 a 40 anos, apresentando resultados mais elevados do que no presente estudo.[22]

No norte da Índia também foi realizado um estudo com doadores de sangue, com um total de 493 doadores; 24 (5%) foram positivo IgM para *T. gondii* e a prevalência maior foi no sexo feminino (89,2%), o que difere do nosso estudo.[23]

No ano de 2016, um estudo sistemático em várias regiões do mundo avaliou de forma abrangente a taxa de soroprevalência do *T. gondii* em doadores de sangue. Ao todo foram testados 20.964 doadores, dos quais 377 (1,8%) foram positivos para anti-*T. gondii* IgM. As maiores soroprevalências de toxoplasmose IgM positivas foram encontradas na África (46%), Brasil (75%) e Etiópia (73%), e a menor foi na Ásia (29%). Esses índices podem ser devido à localização e ao clima destes países, tendo em vista que os oocistos esporulam mais rápido em regiões quentes.[24]

Segundo o boletim epidemiológico apresentado pela Secretaria de Saúde, os três bairros que mais apresentaram moradores com soropositividade para toxoplasmose durante o surto estão localizados na região oeste da cidade, bem como os resultados encontrados no levantamento de dados do suposto trabalho. Neste boletim epidemiológico também foi apresentado que as mulheres apresentaram soropositividade maior do que os homens, com total de 64,5%.[25] A respeito da faixa etária, a Secretaria de Saúde constatou que o surto acometeu pessoas de 20 a 39 anos, totalizando 56,5%, o que confere com o levantamento de dados realizado nos doadores de sangue.[26]

No ano de 2018, após a confirmação do surto de toxoplasmose na cidade de Santa Maria, a Hemorrede juntamente com o Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS) enviou uma nota técnica conjunta ao hemocentro com o tema "Orientações para triagem clínica de candidatos à doação de sangue frente ao surto de toxoplasmose em Santa Maria – RS". Nesta nota é reforçada a atenção que a triagem clínica deve ter com doadores oriundos do município de Santa Maria – RS, atentar-se para a história de sintomas correlacionados com a doença, reforçar aos doadores a importância de informar o serviço sobre qualquer sintoma relacionado à toxoplasmose que possa ocorrer após a doação, como forma de reduzir o risco de transmissão por via transfusional e também para ações de hemovigilância.[27]

CONCLUSÕES

Após análise realizada podemos observar que a taxa de soroprevalência de toxoplasmose em doadores de sangue se manteve na média, conforme os estudos que foram comparados. Em épocas de surto como ocorreu na cidade de Santa Maria, seria importante a inserção de testes sorológicos para *T. gondii* em bolsas de sangue, a fim de prevenir possíveis complicações para o transfundido, principalmente para gestantes, diante da possibilidade de infecção congênita, que pode ser muitas vezes grave e até mesmo letal.

SUPORTE FINANCEIRO

Não houve suporte financeiro para a realização desta pesquisa. Todas as despesas foram de responsabilidade da pesquisadora. Os participantes não tiveram nenhum gasto durante a realização da mesma.

REFERÊNCIAS

1. Razouk FG, Reiche EM. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes. Rev. Bras. Hematol. Hemoter**,** 2004; 26 (2): 126-134.
2. Silva PS, Nogueira VO. Hemoterapia: as dificuldades encontradas pelos enfermeiros. ConScientiae Saúde, 2007; 6(2): 329-334.
3. Saadatnia G, Golkar M. A revive on human toxoplasmosis. Scand.Infect. Dis, 2012; 44(11): 805-14.
4. Nakashima F. Investigação sorológica e molecular de *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue. São Paulo. Tese [Pós Graduação em Ciências da Saúde] – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 2015.
5. Sing G, Sehgal R. Transfusion-transmitted parasitic infections. Asian. Transfus.Sci, 2010; 4(2): 73-77.
6. Nissapatorn V. Toxoplasmosis in HIV/AIDS: a living legacy. Asian. Trop. Med. Public. Heal., 2009; 40(6): 1158-78.
7. Coelho RAL, Kobayashi M, Carvalho Junior LB. Prevalence of IgG antibodies specific to Toxoplasma gondii among blood donors in Recife, Northeast Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2003; 45: 229-31.

8. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004; 363:1965-76.
9. Velati C, Romanó L, Fomiatti L, Baruffi L, Zanetti AR. Impact of nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus on the safety of blood supply in Italy: a 6-year survey. Transf, 2008; 48(10): 2205-13.
10. Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Brasília, 2010; 22(11): 85-334.
11. Gagne SS. Toxoplasmosis. Prim Care Update Ob.Gyns, 2001; 8:122-4.
12. Montoya JG, Liesenfeld O, Kinney S, Press C, RemingtonJS. VIDAS test for avidity of toxoplasma – specific immunoglobulin G for confirmatory testing of pregnantwomen. Jour. Clin. Microbiol. 2002; 40:2504-8.
13. Beck S, Konopka CK, Silva AK, Diehl FP. Importância do rastreamento sorológico da toxoplasmose em gestantes atendidas em ambulatório de pré-natal de alto risco. Revista Saúde. Santa Maria, 2010; 36(1):29-36.
14. Amendoeira MR, Coura LF. A brief review on toxoplasmosis in pregnancy. Scientia Medica. Porto Alegre. 2010; 20(1):113- 9.
15. Prado AA, Almeida GF, Gontijo LS, Torres MM. Toxoplasmose: o que o profissional da saúde deve saber. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia, 2011; 7(12).
16. Derouin F, Pelloux H. Prevenção da toxoplasmose em pacientes transplantados. Clin Microbio Infect. 2008; 14(12): 1089-101.
17. Mahmoudvand H, Sheibani V, Keshavarz H, Shojaee S, Esmaeelpour K, Ziaali N. Inibidor da acetilcolinesterase melhora o comprometimento da aprendizagem e memória induzida pela infecção por *Toxoplasma gondii* . Ira.Jour.Parasit. 2016; 11(2): 177-185.
18. Sadooghian S, Mahmoudvand H, Mohammadi MA, Sarcheshmeh NN, Kareshk AT, Kamiabi H, Zia-ali N. Prevalence of Toxoplasma gondii infection among healthy blood donors in Northeast of Iran, Iran. Jour. Parasitol**.,** 2017; 12(4): 554-562.
19. Ormazdi H, Sanikhani N, Hadighi R, Akhlaghi L, Memar AR, Razmju E. Investigation of antibodies (IgG and IgM) against *Toxoplasma gondii* in blood donors referred to Tehran blood transfusion organization by ELISA. Jour.Urm.Med. 2010; 21: 212- 216.
20. Chiang TY, Hsieh HH, Kuo MC, Chiu KT, Lin WC, Fan CK, Fang CT, Ji DD. Soroepidemiology of Toxoplasma gondii infection among healthy blood donors in Taiwan, Jour.Plos. One, 2012; 7(10) 10-1371.
21. Nakashima F. Investigação sorológica e molecular de *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue. São Paulo. Tese [Pós-Graduação em Ciências da Saúde] – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 2015.
22. Pinlaor S, Ieamviteevanich K, Pinlaor P, Maleewong W, Pipitgool V. Seroprevalence of specific total immunoglobulin (Ig), IgG and IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* in blood donors from Loei Proovince, Northeast Thailand, Jour. Trop. Med. Pub. Heal., 2009; 31(1): 123-7.
23. Elhence P, Agarwal P, Prasad KN, Chaudhary RK. Seroprevalence of Toxoplasma gondii antibodies in North Indian blood donors: implications for transfusion transmissible toxoplasmosis. Transfus.Apher. Sci, 2010; 43(1): 37-40.
24. Foroutan-Rad M, Majidiani H, Dalvand S, Daryani A, Kooti W, Saki J, Headayati-Rad F, Ahmadpour E. Toxoplasmosis in Blood Donors: A systematic review and meta-analysis. Transfus. Med. Rev, 2016; 30(3): 116-22.
25. Secretaria de Saúde - Boletim Epidemiológico. Relatório de atualização de investigação de surto, 2018. Disponível em: file:///C:/Windows/system32/config/systemprofile/Downloads/11132505-boletim-bairros.pdf
26. Secretaria de Saúde - Boletim Epidemiológico. Relatório de atualização de investigação de surto, 2018. Disponível em: file:///C:/Windows/system32/config/systemprofile/Downloads/11132419-variaveis.pdf.
27. Secretaria de Saúde. Nota técnica conjunta – Orientações para triagem clínica de candidatos à doação de sangue frente ao surto de toxoplasmose em Santa Maria/RS. Disponível em: https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/carga20180430/27153041-nota-tecnica-conjunta-0012018hemorrede-dvs.pdf.

Estudo piloto em telecitologia: análise citomorfológica por imagens estáticas

Pilot study in telecitology: diagnosis by static images

Jusimar Gonçalves[1], *Lisiane Cervieri Mezzomo*[2]

[1] Universidade Feevale - Curso de Especialização em Citopatologia Diagnóstica. Novo Hamburgo, RS, Brasil.

[2] Universidade Feevale - Curso de Especialização em Citopatologia Diagnóstica. Doutorado em Patologia - UFCSPA (Porto Alegre, RS). Novo Hamburgo, RS, Brasil.

Resumo

Objetivo: Avaliar o uso da telecitologia estática para o diagnóstico de lesões escamosas de alto grau e investigar a concordância intraobservador entre os diagnósticos citopatológicos obtidos com o uso do microscópio e a citologia estática. *Métodos:* Inicialmente realizada uma avaliação retrospectiva de 20 amostras por um médico patologista e um analista clínico citopatologista. Posteriormente foram capturadas cinco imagens de cada caso e transmitidas virtualmente usando uma conexão WhatsApp® de um smartphone. Os diagnósticos preliminares foram registrados por seis observadores. *Resultados:* O percentual de casos cujo diagnóstico da imagem microscópica e do smartphone foram concordantes foi 72%. A análise estatística pelo teste Kappa mostrou uma concordância moderada entre os diagnósticos microscópicos e das imagens digitais, com um coeficiente geral K= 0,43. Quando analisado individualmente, o maior nível de concordância alcançado foi de 85% com um coeficiente K= 0,60 considerado como concordância moderada. *Conclusão:* Este estudo mostrou que é possível capturar e transferir imagens de alta qualidade de forma fácil, rápida e econômica a partir de lâminas de citologia usando smartphones. A transmissão remota das imagens utilizando a tecnologia de câmeras de smartphones estão se tornando ferramentas eficientes, desde que operados por pessoal treinado e capacitado tanto para a análise citomorfológica quanto para citologia digital.

Palavras-chave: Patologia; Telemedicina; Telepatologia; /citologia; Smartphone

Abstract

Objective: To evaluate the use of static telecithology for the diagnosis of high-grade squamous lesions and to investigate the intraobserver agreement between the cytopathological diagnoses obtained using the microscope and the static cytology. *Methods:* A retrospective evaluation of 20 samples was performed by a pathologist and a cytopathologist. Subsequently, five static cytology images were captured from each case and transmitted virtually using a WhatsApp® connection from a smartphone. Preliminary diagnoses were recorded by six observers. *Results:* The percentage of cases whose diagnosis of the microscopic image and the smartphone were in agreement was 72%. Statistical analysis by the Kappa test showed a moderate agreement between microscopic and digital imaging diagnoses, with a general coefficient K = 0.43. When individually analyzed, the highest level of agreement reached was 85% with a coefficient K = 0.60 considered as moderate agreement. *Conclusion:* This study showed that it is possible to easily and quickly capture and transfer high quality images from cytology slides using smartphones. Remote transmission of images using smartphone camera technology is becoming an efficient tool, provided it is operated by trained personnel capable of both cytomorphological analysis and digital cytology.

Keywords: Smartphone; Telemedicine; Pathology; Telepathology; /cytology

Correspondência
Lisiane Cervieri Mezzomo
E-mail: lisimezzomo@gmail.com

Recebido em 12/07/2020 | Aprovado em 08/03/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202202038

INTRODUÇÃO

O primeiro dispositivo microscópico de captura de imagens foi desenvolvido por Ludwig Edinger em 1910 e utilizado até 1940. Posteriormente, surgiram as câmeras baseadas em filmes, empregadas até os anos 2000, quando as câmeras digitais passaram a ser utilizadas.[1]

Os avanços nas áreas de tecnologia e redes revolucionaram o mundo, incluindo a área da Medicina. A telemedicina e seus vários campos, incluindo a telepatologia, fornecem uma ampla plataforma para consultas e investigações e também podem servir como uma valiosa ajuda educacional. Nesse contexto, a telecitologia, ou citologia digital, é uma área que vem crescendo e se destacando nos últimos anos.[2] Ela compreende o uso de telecomunicações para transmitir imagens de citologia para diagnóstico, consulta ou educação.

A citologia estática envolve o uso de imagens pré-capturadas por uma câmera acoplada ao microscópio óptico e posterior transmissão.[3] É relativamente de baixo custo e de fácil utilização, e atualmente vem sendo utilizada com bastante frequência para esclarecimento de dúvidas com o objetivo de acelerar o processo de consulta e liberação dos resultados citológicos. Nesse método de citologia digital, ou telecitologia, o citopatologista pré-seleciona as áreas, captura as imagens com uma câmera, em seguida digitaliza-as e, então, transmite por e-mail ou outras ferramentas de internet.[4] A metodologia pode ser aplicada à todos os tipos de materiais citológicos, incluindo amostras ginecológicas e não ginecológicas, como raspados, aspirados e amostras de líquidos obtidos por punção ou de forma espontânea. Também pode ser útil no arquivamento e apresentação de casos raros e incomuns, exemplos clássicos de entidades que seriam de alto valor diagnóstico (cujas lâminas poderiam se perder com o tempo), testes de proficiência e propósitos de pesquisa.[2]

No futuro, a telecitologia estática pode ter um lugar que atenda às necessidades clínicas em diferentes situações de prática. Nesse contexto, esse estudo objetiva avaliar o uso da telecitologia estática para o diagnóstico de lesões escamosas de alto grau e investigar a concordância intraobservador entre os diagnósticos citopatológicos obtidos de forma clássica, com o uso do microscópio, e a citologia estática.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos casos e captura das imagens

Este estudo transversal foi realizado por meio de seleção de 20 casos positivos de citologia convencional, a partir de um banco de dados (arquivo de lâminas) de um laboratório de Patologia do Meio-Oeste Catarinense. Para a conclusão diagnóstica as lâminas foram triadas por dois observadores com experiência na área, um médico patologista e um analista clínico especialista em citopatologia. Foram incluídos casos de citologia oncótica cervicovaginal, que o autor considerou necessitar de uma segunda opinião ou uma consulta especializada, corados pela técnica de Papanicolaou, com resultado positivo para lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e carcinoma de células escamosas (CA), confirmadas pelo exame anatomopatológico. Foram excluídos casos de citologia oncótica cervicovaginal com resultado positivo para as classificações supracitadas que não tiveram correspondente biópsia de colo do útero, lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL), atipias escamosas (ASC), incluindo atipias escamosas de significado indeterminado (ASC-US) e atipias escamosas não se pode excluir HSIL (ASCH) e também lâminas insatisfatórias para avaliação, quebradas ou danificadas.

Após a seleção dos casos, os campos microscópicos de valor diagnóstico foram selecionados e capturados digitalmente, sendo a ampliação de 400× utilizada preferencialmente para captura de imagens, em virtude de ser a objetiva usada na rotina de triagem.

Com a área de interesse em foco, a lente da câmera foi aplicada contra uma das oculares do microscópio e a imagem foi capturada. As imagens foram obtidas a partir da objetiva do microscópio óptico Nikon Eclipse E200 LED binocular (Nikon Corporation, Tokyo, Japan), com objetiva de 400x e Smartphone Iphone 5S (Designed by Apple in California), sem adaptador ocular.

De forma a uniformizar a análise, padronizou-se a seleção e captura das imagens estáticas de cada lâmina citopatológica. A seleção das imagens da citologia foi baseada nos critérios de Bethesda, e escolhidas por um observador (responsável pelo estudo), de modo a serem suficientes para a conclusão diagnóstica, baseadas no diagnóstico inicial. A qualidade das imagens digitais foi determinada empiricamente. Apenas imagens consideradas de qualidade ou relevância suficientes foram incluídas no estudo. As imagens obtidas foram em alta resolução, permitindo ao observador a aproximação da imagem e verificação dos detalhes celulares, quando necessário.

Transmissão das imagens e diagnóstico citológico

Após a captura das imagens, essas foram transmitidas aos observadores individualmente por meio do aplicativo WhatsApp® (WhatsApp, Inc., Mountain View, Califórnia, EUA). As imagens foram transferidas sem modificação de cor, brilho

e tamanho. Para a padronização dos resultados, foi fornecido um formulário estruturado, com opções de respostas, baseado nos critérios de Bethesda. As respostas incluíram desde atipias escamosas, lesões escamosas de baixo e alto grau, e lesões glandulares (Tabela 1). Não foi fornecido aos observadores nenhum tipo de informação clínica ou a respeito do diagnóstico que pudesse influenciar nos resultados. A interpretação telecitológica foi comparada ao diagnóstico final obtido em consenso pelos dois profissionais, um patologista e um citopatologista.

O grupo de observadores incluídos no trabalho foram seis alunos do curso de especialização em Citopatologia Diagnóstica da Universidade Feevale, localizada em Novo Hamburgo-RS que aceitaram participar do estudo. Após a análise dos resultados dos observadores, as lâminas e as imagens de citologia estática foram reavaliadas e as razões de discordância foram determinadas.

Aspectos éticos

Todos os participantes incluídos aceitaram participar do estudo e assinaram o TCLE (Termo de consentimento livre e esclarecido). O presente projeto foi cadastrado na Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Feevale.

Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando o software SPSS (IBM SPSS Statistics 24.0), e o coeficiente de Kappa foi calculado para medir a concordância entre os observadores. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Considerou-se uma média de captura de cinco imagens por caso suficientes para a conclusão diagnóstica. Os campos mais significativos foram selecionados, fotografados através da objetiva do microscópio óptico com o uso de um smartphone e encaminhados aos participantes para posterior avaliação. Os casos foram transmitidos separadamente, ao longo de 6 meses e os participantes tiveram em torno de 7 dias para concluir o diagnóstico.

A Figura 1 exemplifica um caso disponível para avaliação pelos citopatologistas. Nesse caso a paciente tinha 22 anos, assintomática, exame de repetição com histórico de células atípicas de significado indeterminado possivelmente não neoplásicas (ASC-US) há seis meses. O diagnóstico citológico liberado foi de lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e o resultado da biópsia histológica foi de neoplasia intraepitelial cervical de grau 3 (NIC 3). As cinco imagens foram disponibilizadas em conjunto para análise pelo participante do estudo. O caso foi transmitido a cada participante individualmente.

As Figuras 2 e 3 são exemplos de imagens digitais avaliadas pelos participantes do estudo com maior porcentagem de acerto, com 100% de concordância.

Já as Figuras 4 e 5 foram casos que obtiveram as menores taxas de concordância (17% e 33%, respectivamente). Atribui-se a essas baixas taxas de concordância algumas características contidas nos esfregaços, como intensa sobreposição celular, grande quantidade de sangue e infiltrado inflamatório abundante, o que muitas vezes dificulta a análise. Também relaciona-se com a pouca experiência dos observadores, pois todos eles estão em fase de formação na área. Entre as respostas para o caso 4, dois observadores consideraram como LSIL e outros dois como CA, e para o caso 11 cinco observadores consideraram como CA e somente um considerou como HSIL.

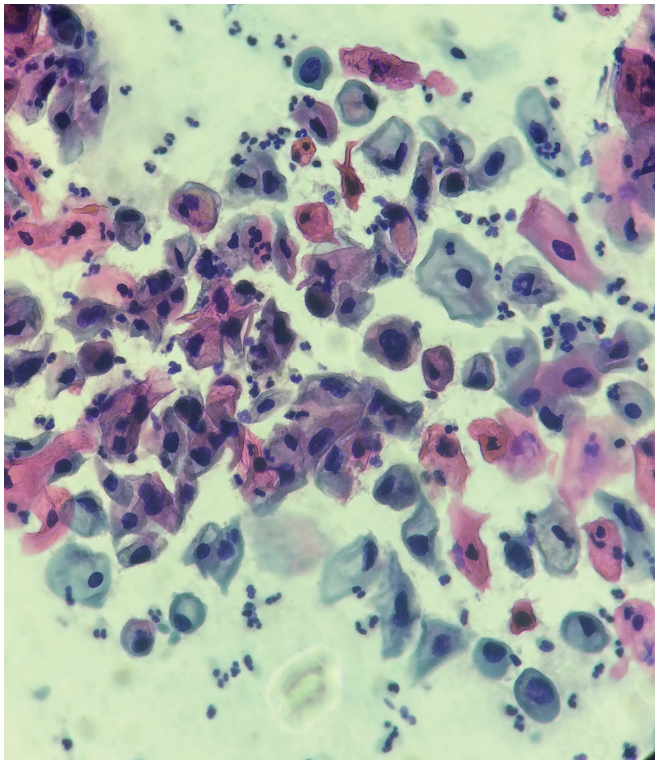


Figura 1

Caso 8 no qual as principais características citológicas encontradas foram células imaturas com macronucleose, contorno de membrana nuclear irregular, cromatina grosseira, mal distribuída e hipercromática. O diagnóstico liberado pelo laboratório foi HSIL. As respostas das análises foram todas idênticas às do diagnóstico do laboratório. O nível de concordância foi de 100%.

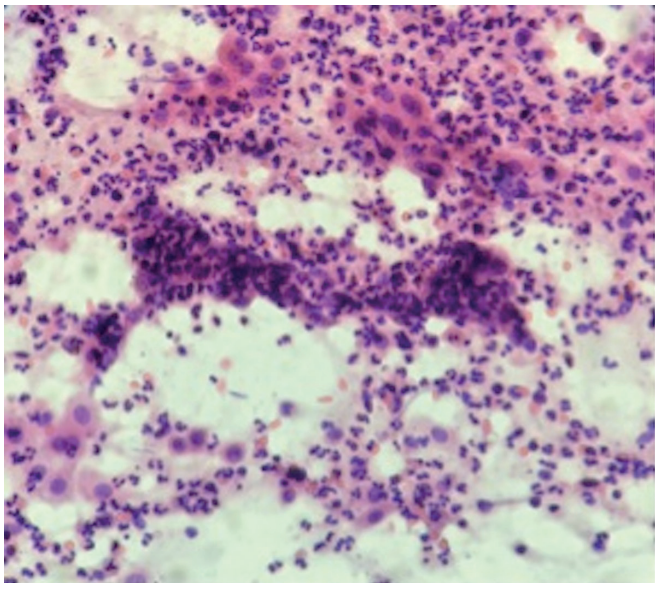


Figura 2

Caso 1 no qual as principais características citológicas encontradas foram células imaturas com macronucleose, contorno de membrana nuclear irregular, cromatina grosseira, mal distribuída e hipercromática. O diagnóstico liberado pelo laboratório foi HSIL. As respostas das análises foram todas idênticas às do diagnóstico do laboratório. O nível de concordância foi de 100%.

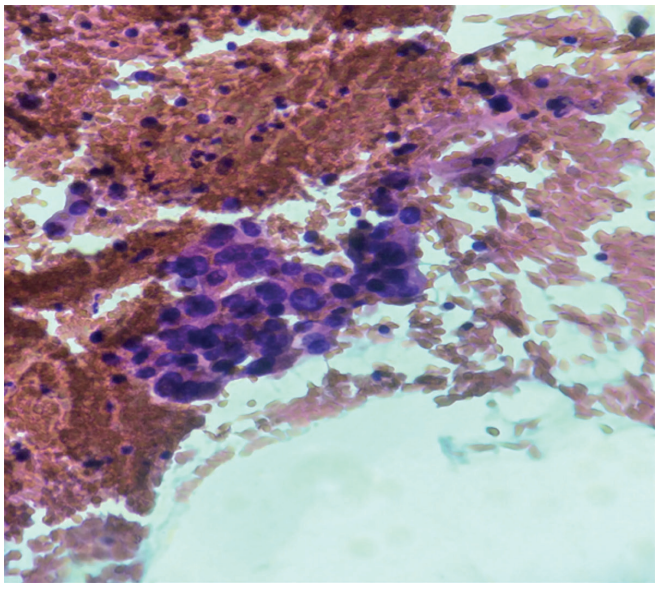


Figura 3

Caso 2 no qual as principais características citológicas encontradas foram células imaturas com macronucleose, contorno de membrana nuclear irregular, cromatina grosseira, mal distribuída e hipercromática com presença de grande quantidade de sangue. O diagnóstico liberado pelo laboratório foi HSIL. As respostas das análises foram todas idênticas às do diagnóstico do laboratório. O nível de concordância foi de 100%.

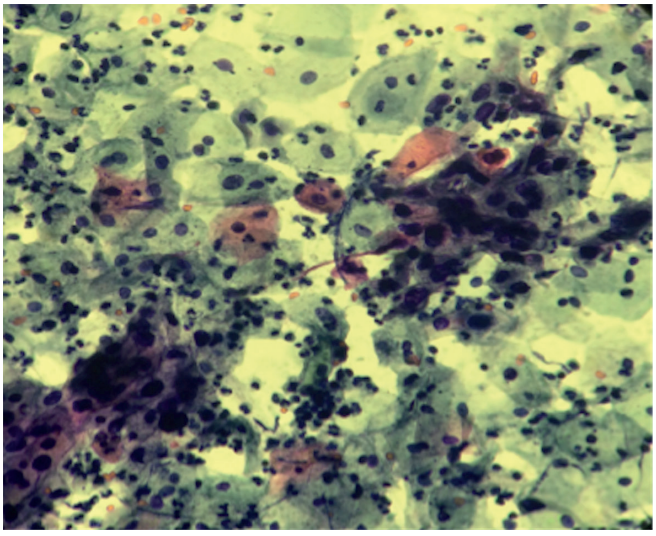


Figura 4

Caso 11 – 17% de concordância

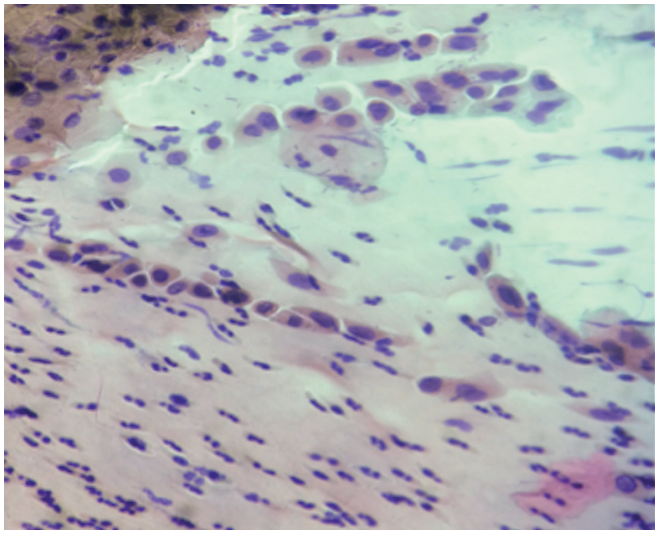


Figura 5

Caso 4 – 33% de concordância

Casos 11 e 4 – Diagnóstico laboratorial HSIL. Presença de células imaturas com macronucleose, contorno de membrana nuclear irregular, cromatina grosseira, mal distribuída e hipercromática. Muitas vezes os critérios entre HSIL e CA não são muito claros, o que pode levar a confusão no diagnóstico.

Considerou-se que todas as imagens capturadas pela objetiva do microscópio obtidas por meio de câmera do smartphone apresentaram resolução adequada e possibilitaram aos participantes a visualização dos detalhes citológicos de forma satisfatória.

Além disso, considerou-se que o aplicativo WhatsApp® foi uma ferramenta rápida e bem-sucedida na transferência de imagens na técnica de telecitologia. Todos os participantes relataram ter visualizado as imagens de forma satisfatória e rapidamente após a transmissão.

A avaliação dos 20 casos de citologia incluídos resultou em concordância considerável entre os observadores, tendo como média geral 72,5%.

Os resultados obtidos das análises das imagens enviadas via WhatsApp® são mostrados Tabela 1.

A análise estatística mostrou que o presente estudo teve uma taxa moderada de concordância dos casos entre os diagnósticos microscópicos e das imagens digitais, com um coeficiente Kappa K= 0,43. Quando analisamos os dados individualmente para cada observador, o maior nível de concordância alcançado foi de 85% com um coeficiente kappa de K= 0,60, uma concordância moderada. Entretanto três observadores obtiveram 65% de concordância e valores de Kappa classificados como de fraca a razoável concordância.

O maior valor de Kappa e o melhor índice de acertos foram vistos em 3/20 casos com 100% de acerto pelos observadores. Atribui-se o alto índice de acerto nesses casos ao grau de alterações presentes nas lâminas, em que os critérios de hipercromasia, cromatina granular com formação de grumos e irregularidades na borda nuclear estavam bem evidentes.

Tabela 1

Resultados das análises dos 20 casos de citologia incluídos no estudo e a concordância intraobservadores

Casos	Cito	Histo	Obs. 1	Obs. 2	Obs. 3	Obs. 4	Obs. 5	Obs. 6	Concordância Citologia
1	HSIL	NIC3	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	100%
2	HSIL	NIC2	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	100%
3	HSIL	NIC2	HSIL	HSIL	CA	LSIL	HSIL	HSIL	67%
4	HSIL	NIC3	CA	LSIL	LSIL	HSIL	HSIL	CA	33%
5	HSIL	NIC2	HSIL	HSIL	HSIL	LSIL	HSIL	HSIL	83%
6	HSIL	NIC1	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	ADENO	83%
7	HSIL	NIC3	CA	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	83%
8	HSIL	NIC3	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	100%
9	HSIL	NIC3	HSIL	CA	CA	HSIL	LSIL	HSIL	50%
10	HSIL	NIC3	HSIL	HSIL	LSIL	HSIL	HSIL	HSIL	83%
11	HSIL	NIC3	CA	CA	HSIL	CA	CA	CA	17%
12	HSIL	NIC3	HSIL	CA	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	83%
13	HSIL	NIC3	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	CA	83%
14	HSIL	NIC3	HSIL	HSIL	HSIL	LSIL	HSIL	HSIL	83%
15	HSIL	NIC3	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	CA	83%
16	HSIL	NIC3	CA	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	83%
17	HSIL	NIC2	HSIL	LSIL	HSIL	HSIL	HSIL	HSIL	83%
18	CA	CA	CA	CA	CA	HSIL	CA	CA	83%
19	CA	CA	CA	ADENO	CA	HSIL	CA	HSIL	50%
20	CA	CA	HSIL	ADENO	CA	LSIL	HSIL	HSIL	17%
Concordância entre os observadores			75%	65%	80%	65%	85%	65%	72% 72,5%

LSIL - Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; HSIL – Lesão intraepitelial escamosa de alto grau; CA – Carcinoma de células escamosas; ADENO – Adenocarcinoma; HISTO – Histológica; CITO – Citologia; OBS – Observador.

Entretanto, a maioria dos casos (casos 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18) apresentou 83% de concordância. O caso 3 apresentou 67% de concordância, seguido de concordância nos casos 9 e 19, com 50% de concordância; o caso 4 apresentou 33% de concordância.

Apenas dois dos 20 casos (11 e 20) tiveram 17% de concordância e foram considerados os casos com maior índice de discordância. Esses dois casos eram de HSIL e CA respectivamente, fato esse que pode ter como explicação a intensa sobreposição celular capturada nas imagens, dificultando a identificação da origem celular (glandular ou escamosa), o que também pode explicar a interpretação de adenocarcinoma em uma HSIL e também a aplicação dos critérios para diagnóstico.

Posteriormente à obtenção dos resultados, as lâminas dos casos discordantes foram reavaliadas e as imagens microscópicas foram comparadas com as imagens capturadas. As características citológicas e estruturais dos casos que apresentavam desconformidade diagnóstica (n= 27,5%) são atribuídas à pouca experiência em leitura de lâminas dos observadores. Por se tratar de imagens estáticas, o observador não tem controle sobre a ampliação e foco, o que dificulta muitas vezes a análise, especialmente em casos que exigem maior atenção aos critérios citomorfológicos. Além disso, o número de imagens enviadas é um fato que limita a observação em apenas alguns campos selecionados da lâmina e isso, para as pessoas com pouca experiência, pode ser considerado um fator de insegurança no momento da liberação do laudo. Vale considerar também o fato de que este trabalho utilizou como avaliadores os alunos em formação do curso de especialização na área, e portanto observadores com variabilidade de conhecimentos e de treinamentos. Atribui-se esse aspecto às baixas concordâncias encontradas nesse trabalho.

DISCUSSÃO

A medicina digital tornou-se um dos tópicos mais estudados nas últimas décadas, pois sua aplicabilidade reside não apenas no uso de dispositivos digitais para fins médicos, mas também altera o cenário geral de previsão de doenças, prevenção, diagnóstico, tratamento e manejo pós-tratamento. Dentro desse cenário, introduz-se a citologia digital, ou telecitologia, um componente do que já é conhecido como Telepatologia. Nos últimos anos testemunhou-se o amplo uso da telepatologia na educação, consultas, arquivamento de lâminas e testes de proficiência, e nesse contexto a telecitologia vem se tornando uma prática na avaliação à distância usando imagens digitais.[3]

A citologia digital é uma área recente e ainda em expansão, com alguns trabalhos publicados.[5-10] Entretanto, a maioria dos estudos que foram realizados com essa metodologia incluiu uso de profissionais experientes para a avaliação das imagens, muitas vezes com tempo de rotina superior a 10 anos. Este trabalho difere em parte, uma vez que os avaliadores foram estudantes em fase final de conclusão do curso de especialização em citopatologia, com média de 1,5 anos de treinamento, porém com pouca experiência na área. A importância dessa análise reside no fato de expor as principais dificuldades encontradas pelos profissionais da área especialmente quando considerados critérios citológicos limítrofes. Os resultados refletem a variabilidade de critérios citológicos presentes nas lesões e que muitas vezes acabam se sobrepondo, dificultando o diagnóstico.

É importante destacar que a citologia é dependente do olhar do observador e apresenta variabilidade de interpretações, mesmo entre profissionais com ampla experiência. Além disso, o diagnóstico de lesões de alto grau é muitas vezes difícil mesmo para consultores experientes, e algumas vezes apresenta considerável variabilidade intraobservador e interobservador. Esse estudo demonstra esses critérios, uma vez que alguns casos tiveram maior variabilidade de interpretações.

Considera-se que a limitação do número de imagens por caso, aliada à pouca experiência dos avaliadores, pode ter dificultado a análise do diagnóstico e diminuído os valores de concordância geral. Além disso, as imagens enviadas de forma estática para análise, ao contrário da análise microscópica, não possibilitam o uso de recursos como intensidade de luz, modificações na resolução e especialmente o exame de células em vários planos focais. Considera-se esses recursos essenciais na análise citológica, especialmente em casos de lesões com grupamentos tridimensionais, grupos sinciciais e células sobrepostas, frequentes em lesões de alto grau.

Essa limitação pode ser observada no estudo de ZIOL et al.,[6] que analisaram 100 casos de citologia cervicovaginal e observaram que apesar do processo de digitalização de imagens dos esfregaços citológicos cervicais com diagnóstico difícil ser geralmente preciso, ele sofreu com as questões pertinentes às imagens estáticas, como a incapacidade de foco e a falta de resolução, particularmente para as células de tamanhos pequenos. Os autores relatam uma concordância que variou de 68% a 85%. Nosso estudo encontrou concordância semelhante e corrobora esses dados já publicados.

No estudo de GALVEZ et al.[5] foram analisadas as características citológicas específicas identificadas em 21 casos de aspirações por agulha fina da mama. Os autores observaram que todas as características avaliadas poderiam ser identificadas tanto nas imagens estáticas quanto na análise microscópica, com 81% de concordância. Em nosso estudo, a análise das imagens digitais teve concordância de 72,5%, próximo aos valores encontrados nesse trabalho.

Outro trabalho, publicado por DELLA MEA et al.,[7] utilizou 48 casos de citologia de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de lesões mamárias. Os autores relataram que o uso de imagens estáticas enviadas por e-mail alcançou um resultado de concordância em 84% dos casos, o que é semelhante ao encontrado em nosso trabalho. Esses valores de concordância semelhantes podem ser explicados devido ao fato de se tratarem de dois estudos com análise somente de imagens estáticas, diferenciando-se apenas pelo método de envio das mesmas. Posteriormente, o mesmo percentual foi encontrado por AYATOLLAHI et al.,[8] com 85% de concordância para a interpretação de imagens estáticas de amostras de 50 esfregaços de derrame pleural com diferentes diagnósticos.

Além desses, nossa análise encontrou resultados semelhantes de concordância com estudo publicado por JIALDASANI et al.[11] Os autores analisaram 46 casos enviados de dois hospitais rurais a cerca de 500km de um centro terciário de câncer. Os casos foram submetidos a uma segunda opinião durante um período de dois anos e avaliados por meio de uma abordagem de armazenamento estático e de telecitologia direta. A concordância diagnóstica foi de 74%.

MARCHEVSKY et al.[9] analisaram 27 amostras coletadas por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de pacientes com pancreatite crônica com alterações epiteliais de reparo atípico e adenocarcinomas pancreáticos de baixo grau que foram revisadas por quatro citopatologistas experientes que utilizaram a telecitologia e microscopia de rotina. A comparação entre os diagnósticos corretos e as consultas realizadas pelos dois métodos e entre os diagnósticos realizados nos mesmos casos pelas duas modalidades produziu coeficientes kappa variando de K=0,44 a K=1. Esses valores de concordância são esperados nesse tipo de estudo, visto que os observadores são citopatologistas experientes e com segurança na liberação dos laudos. Além disso, a grande variabilidade de concordância foi semelhante ao que encontramos nessa análise.

Podemos inferir que nossos resultados corroboram esses estudos anteriormente publicados, e que são semelhantes aos casos já publicados na literatura.

Um fator que pode ter sido preponderante para a discrepância dos resultados das análises entre os observadores incluídos nesse estudo é a impossibilidade de análise da lâmina toda, ou seja, a disponibilidade de apenas alguns campos (5) pode ter dificultado a interpretação dos diagnósticos citológicos. Esse fato reflete outra característica inerente ao método de citologia estática, que é o viés do olhar do observador que está capturando as imagens. É importante destacar que o diagnóstico citológico final é baseado na análise do conjunto de características citológicas microscópicas da lâmina como um todo, e que a captura das imagens deve refletir a totalidade das características observadas para que o diagnóstico seja fidedigno.

CONCLUSÕES

Consistente com trabalhos anteriormente publicados, este estudo mostrou que capturar e transferir imagens microscópicas é um método prático, fácil e econômico. É previsível que as imagens digitais transferidas pela técnica de telecitologia por meio do uso de dispositivos como o WhatsApp® sejam usadas cada vez mais, porque essa ferramenta permite que as imagens sejam facilmente compartilhadas. Dados desse estudo indicam que a telecitologia pode ser usada para realizar avaliações de adequação remota com eficácia moderada a alta quando comparada à microscopia convencional. Acredita-se, portanto que a citologia estática pode ser uma ferramenta consultiva potencialmente útil para a interpretação de espécimes citológicos com dificuldades diagnósticas, especialmente quando se deseja uma segunda opinião. São necessários, no entanto, estudos mais robustos e que comparem de forma mais controlada a análise do material recebido/enviado pela tecnologia de transmissão de imagens com a análise da lâmina microscópica para que seja avaliada a aplicabilidade do método para o diagnóstico. Acredita-se que com o avanço contínuo da tecnologia, o futuro da telecitologia testemunhará melhorias no método e aceitação pela comunidade.

REFERÊNCIAS

1. Sahin D, Hacisalihoglu UP, Kirimlioglu SH. Telecytology: Is it possible with smartphone images?. Diagnostic Cytopathology. 2018;46:40-46.
2. Nishat R, Ramachandra S, Behura SS, Kumar R. Digital cytopathology. J Oral Maxillofac Pathol, 2017. 21(1):p.99-106.
3. Agarwal S, Zhao L, Zhang R, Hassell L. FaceTime validation study: low-cost streaming video for cytology adequacy assessment. Cancer Cytopathol. 2016;124:213-220.
4. Sowter C, Wells CA. Telepathology: Assessment of the implications and applications of telepathology for practical diagnostic pathology. J Clin Pathol 1998;51:714-5.

5. Galvez J, Howell L, Costa MJ, Davis R. Diagnostic concordance of telecytology and conventional cytology for evaluating breast aspirates. Acta Cytol 1998;42:663-7.
6. Ziol M, Vacher-Lavenu MC, Heudes D, et al. Expert consultation for cervical carcinoma smears. Reliability of selected-field videomicroscopy. Anal Quant Cytol Histol 1999;21:35-41.
7. Della Mea V, Puglisi F, Bonzanini M, et al. Fineneedle aspiration cytology of the breast: a preliminary report on telepathology through Internet multimedia electronic mail. Mod Pathol 1997;10:636-41.
8. Ayatollahi H, Khoei A, Mohammadian N, et al. Telemedicine in diagnostic pleural cytology: a feasibility study between universities in Iran and the USA. J Telemed Telecare 2007;13:363-8.
9. Marchevsky AM, Nelson V, Martin SE, et al. Telecytology of fine-needle aspiration biopsies of the pancreas: a study of well differentiated adenocarcinoma and chronic pancreatitis with atypical epithelial repair changes. Diagn Cytopathol 2003;28:147-52.
10. Tonet C, Calil LN, Mezzomo, LC. A telecitologia na rotina do rastreamento do câncer do colo uterino . RBAC. 51(3): 178-184
11. Jialdasani R, Desai S, Gupta M, et al. An analysis of 46 static telecytology cases over a period of two years. J Telemed Telecare 2006;12:311-4.

Associação da qualidade das amostras aos fatores obscurecedores dos exames citopatológicos encaminhados a um laboratório escola de Goiânia, Goiás

Sample quality association with the obscuring factors of the cytopathological exams sent to a school laboratory in Goiania, Goiás

Diego Deodato Rodrigues[1], Nathália Fernandes Santos[1], Graziela Picciola Bordoni[1], Leonardo Luiz Borges[2], Andrea Alves Ribeiro[3]

[1] Acadêmico(a) no curso de Ciências Biológicas Modalidade Médica (Biomedicina) na Pontifícia Universidade Católica Goiás – PUC Goiás. Goiânia, GO, Brasil.

[2] Doutorado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de Brasília, Brasil; Professor Doutor da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas – PUC Goiás. Goiânia, GO, Brasil.

[3] Dra. UFG (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública), Professora Doutora da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas – PUC Goiás. Goiânia, GO, Brasil.

Resumo

Objetivo: Avaliar a associação dos fatores obscurecedores e diagnósticos citopatológicos do Laboratório Clínico da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (LAC-PUC Goiás). *Métodos:* Foram utilizados exames citopatológicos do LAC-PUC Goiás entre janeiro e dezembro de 2018, assim como o software Microsoft® Excel 2013 para cálculo das prevalências por faixa etária: >15 anos, 15< 24 anos, 25< 34 anos, 35< 64 anos e >65 anos. Para a análise de adequabilidade da amostras foi utilizado o software BioEstatv® versão 5.3, aplicado o teste do qui-quadrado com nível de significância de 5% *(p<0,05); e para a análise da associação da presença de zona de transformação e anormalidades citopatológicas, foi utilizado o cálculo do Odds ratio* com intervalo de confiança de 95% e de significância e nível de significância de 5% *(p<0,05) Resultados:* Nos 6.298 diagnósticos, 98,08% foram satisfatórios e 1,92% insatisfatórios, sendo 3,76% de anormalidades. As células escamosas atípicas, não podendo afastar lesão de alto grau (ASC-H), 1,15%; lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), 0,94%; células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), 0,91%; lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), 0,66%; atipias glandulares de significado indeterminado (AGC-NEO) e Carcinoma Invasor, 0,05%. As faixas etárias prevalentes foram 15 a 24 anos para LSIL, 35 a 64 anos para ASC-US, ASC-H e AGC-NEO, e carcinoma > 65 anos. Fatores obscurecedores: dessecamento, material espesso e piócitos mostraram significância com amostras parcialmente obscurecidas (p<0,05). A ZT foi significante com anormalidades citológicas (OR: 3,86 IC: 3,87 2,62 - 5,70 p=0,000). *Conclusão:* Dessecamento e demais fatores obscurecedores foram significantes com a adequabilidade das amostras citológicas, o que reforça a importância da educação continuada.

Palavras-chave: citologia; diagnóstico; saúde da mulher

Abstract

Objective: To evaluate the association between obscuring factors and cytopathological diagnoses at the Clinical Laboratory of the Pontifical Catholic University of Goiás (LAC-PUC Goiás). *Methods:* Cytological examinations were used at LAC-PUC Goiás between January and December 2018. Microsoft® software was used Excel 2013 for calculating prevalence by age group: > 15 years, 15 <24 years, 25 <34 years, 35 <64 years and > 65 years. To analyze the suitability of the samples, the BioEstatv® version 5.3 software was used, applied the chi-square test with a significance level of 5% (p<0.05) and to analyze the association between the presence of a transformation zone and cytopathological abnormalities calculation of the *Odds ratio* with a 95% confidence interval and a 5% significance level (p<0.05) *Results:* In the 6.298 diagnoses, 98.08% were satisfactory and 1.92% unsatisfactory, with 3.76% of abnormalities. Atypical squamous cells, which cannot rule out a high-grade lesion (ASC-H), 1.15%; high-grade intraepithelial lesion (HSIL), 0.94%; atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), 0.91%; low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), 0.66%; glandular atypias of undetermined significance (AGC-NEO) and Invasive Carcinoma 0.05%. The prevalent age groups were 15 to 24 years for LSIL, 35 to 64 years ASC-US, ASC-H and AGC-NEO, and carcinoma> 65 years. Obscuring factors: desiccation, thick material and pyocytes showed significance with partially obscured samples (p <0.05). ZT was significant with cytological abnormalities (OR: 3.86 CI: 3.87 2.62 - 5.70 p = 0.000). *Conclusion:* Desiccation and other obscuring factors were significant with the adequacy of the cytological samples, which reinforces the importance of continuing education.

Keywords: cytology; analysis; health services

Correspondência
Andrea Alves Ribeiro
E-mail: andrea.ribeiro13@gmail.com

Recebido em 06/10/2020 | Aprovado em 10/03/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202202069

INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero é o terceiro tumor maligno mais frequente na população feminina, exceto o câncer de pele não melanoma, atrás do câncer de mama e do colorretal. É considerado a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil, e a estimativa de novos casos é de 16.710 para ano de 2022.[1]

O exame citopatológico tem por finalidade diagnosticar as lesões pré-cancerosas. Desta forma, a detecção precoce e o tratamento adequado, de acordo com as condutas preconizadas pelo Ministério da Saúde, previnem o câncer de colo do útero. Em países desenvolvidos foi possível reduzir a incidência do câncer de colo do útero em 80% em decorrência do rastreamento citológico implantado com qualidade, cobertura, tratamento e seguimento das mulheres.[1]

O exame citopatológico é de fácil acesso, indolor, simples, rápido e tem relação custo-efetividade favorável.[1] Segundo o Ministério da Saúde,[2] é recomendado às mulheres na faixa etária de 25 a 64 anos e que já tiveram atividade sexual. A periodicidade recomendada para o rastreamento é a repetição do exame citopatológico a cada três anos, após dois exames com qualidade adequada normais consecutivos realizados com um intervalo de um ano.[2]

A zona de transformação (ZT), também chamada de junção escamocolunar (JEC), está localizada na ectocérvix, região do colo do útero possui que epitélio colunar que foi ou está sendo substituído pelo novo epitélio escamoso metaplásico. A ZT contém as células glandulares e/ou metaplásicas e é o local onde a maioria das anormalidades e maior parte das lesões que progridem para o câncer do útero podem ocorrer, pois na ZT acontece alta taxa de multiplicação celular. Um indicador importante da qualidade do esfregaço é a presença de células escamosas, glandulares e/ou metaplásicas em quantidades representativas que tenham boa distribuição, estejam bem fixadas e coradas, permitindo uma melhor conclusão diagnóstica. Exames citopatológicos sem a representação da zona de transformação têm maior probabilidade de levar a achados falsos negativos, mascarando as anormalidades citopatológicas.[3-5]

Quando uma amostra é considerada insatisfatória significa que a leitura esteja prejudicada por razões de natureza técnica e/ou de amostragem celular. É na fase pré-analítica em que ocorrem a maior parte dos erros que podem levar às amostras insatisfatórias, podendo-se destacar problemas na coleta, ausência de identificação de lâminas e lâminas quebradas ou mesmo ausentes.[6]

As amostras são classificadas como insatisfatórias quando apresentam material acelular ou hipocelular (<10% do esfregaço) ou leitura prejudicada (>75% do esfregaço) por presença de sangue, piócitos, artefatos de dessecamento, contaminantes externos, ou intensa superposição celular. Uma amostra que possui de 50% a 75% das células obscurecidas é caracterizada como uma amostra parcialmente obscurecida.[5,7-9]

Dentre os fatores que mais comprometem a adequabilidade da amostra e que podem aumentar as taxas de resultados falsos negativos, reduzindo a precisão do exame citopatológico, destacam-se a presença de sangue, processos inflamatórios, áreas espessas, má fixação que gera dessecamento, contaminantes, artefatos de estiramento e lubrificante.[7]

A validade do exame citopatológico ainda é questionada em programas de rastreamento do câncer de colo do útero, visto que este possui uma taxa de resultados falsos negativos elevada, variando de 2% a 13%, incluindo erros de coleta, escrutínio e interpretação. A implementação de medidas na rotina dos laboratórios, como monitoramento interno de qualidade (MIQ) e externo (MEQ), pode garantir a melhoria da qualidade do exame citopatológico. Um programa de qualidade em citopatologia busca o aperfeiçoamento desse exame em detectar anormalidades escamosas e glandulares, por meio do acompanhamento e avaliação dos procedimentos dos exames citopatológicos de colo do útero, fazendo o registro escrito de rotinas e procedimentos, revisando todos os esfregaços positivos, todos os insatisfatórios e a revisão rápida de 100% dos esfregaços negativos. Esses são alguns exemplos de monitoramento da qualidade para se evitar resultados falsos negativos.[10,11]

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi verificar a associação da qualidade das amostras e dos fatores obscurecedores dos exames citopatológicos encaminhados a um laboratório escola de Goiânia, Goiás.

MÉTODOS

Para o desenvolvimento desta pesquisa, fez-se um estudo de corte transversal, em que foram coletados dados de 6.298 fichas de requisição dos exames citopatológicos[12] realizados no Laboratório Clínico da Pontifícia Universidade Católica

de Goiás (LAC-PUC Goiás), situado na cidade de Goiânia – Goiás, no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2018, de mulheres provenientes do Sistema Único de Saúde (SUS). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Goiás segundo o protocolo 235.376.

Os resultados citopatológicos foram classificados de acordo com a Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais,[12] baseada nos critérios citomorfológicos do Sistema de Bethesda: células escamosas atípicas de significado indeterminado (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance* – ASC-US); lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (*Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* – LSIL); células escamosas atípicas em que não se pode descartar lesão de alto grau (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance Cannot Exclude High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* – ASC-H); lesão intraepitelial escamosa de alto grau (*High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* – HSIL); células glandulares atípicas favorecendo neoplasia (*Atypical Glandular Cells Favor Neoplasic* – AGC-NEO) e adenocarcinoma *in situ*.[7]

Nas análises estatísticas foi criado um banco de dados no *software* Microsoft® Excel 2013, onde foi realizado o cálculo das prevalências estratificadas por faixa etária: menores de 15 anos, de 15 a 24 anos, de 25 a 34 anos, de 35 a 64 anos e maiores de 65 anos.[13] As variáveis foram categorizadas usando as informações contidas nos laudos citopatológicos sobre os fatores que comprometem a qualidade da amostra, como: dessecamento, dessecamento e espesso, sangue, sangue e outros, espesso, espesso e piócitos e material hipocelular. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste do qui-quadrado, utilizando o *software* BioEstat (R) versão 3.6.3 para o cálculo dos fatores obscurecedores e adequabilidade da amostra, com nível de significância do $p<0,05$. Em relação à análise da associação entre ZT e anormalidades citológicas foi utilizado o *software* EpiInfo™ 7.2 e realizado o cálculo do *Odds ratio* (OR), com nível de significância de 95% e $p<0,05$.

RESULTADOS

De acordo com as fichas de requisição analisadas, do total de 6.298 laudos citopatológicos, foi observado 98,08% (6.177/6.298) das amostras como satisfatórias para análise e 1,92% (121/6.298) foram classificadas como insatisfatórias (Tabela 1).

Na Tabela 2 está apresentada a prevalência de amostras com anormalidades citológicas, em que foram encontradas em 3,76% (232/6.177) dos diagnósticos citopatológicos. Observou-se 96,24% (5.945/6.177) de resultados citopatológicos negativos para lesão intraepitelial ou malignidade. A maior prevalência de resultados negativos foi de 61,37% (3.791/6.177) na faixa etária de 35 a 64 anos. Em relação às anormalidades, observou-se a maior prevalência de células escamosas atípicas, não podendo afastar lesão de alto grau (ASC-H), 1,15% (71/6.177). A lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) mostrou-se prevalente em 0,94% (58/6.177) dos casos. Estas lesões foram mais prevalentes na faixa etária de 35 a 64 anos, sendo responsáveis por 0,66% e 0,52% dos diagnósticos nessa faixa etária.

As células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) compreenderam 0,91% (56/6.177) dos diagnósticos, sendo também prevalente na faixa etária de 35 a 64 anos. As lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) foram diagnosticadas em 0,66% (41/6.177), sendo que na faixa etária de 15 a 24 anos observou-se uma maior prevalência com 0,26% (16/41). A atipia glandular de significado indeterminado, AGC-NEO apresentou-se em 0,05% (3/6.177) das amostras analisadas e o carcinoma invasor foi observado em 0,05% (3/6.177) dos casos, sendo que a maior prevalência foi na faixa etária de 35 a 64 anos nos diagnósticos de AGC-NEO e carcinoma invasor em maiores que 65 anos.

As amostras analisadas que tiveram a zona de transformação (ZT) representada apresentaram uma associação significativa entre as anormalidades citológicas (OR: 3,86 IC: 3,87 2,62 – 5,70 *p=0,000*) (Tabela 3).

Em relação aos fatores obscurecedores, os laudos citopatológicos analisados demonstraram uma maior frequência de dessecamento nas amostras consideradas insatisfatórias, sendo responsável por 95,9% (116/121) de rejeição quando comparadas com as amostras parcialmente obscurecidas por dessecamento (p<0,000). O dessecamento também foi o achado mais relevante nas amostras parcialmente obscurecidas, responsável por 44,03% (70/159) dos casos. A presença de sangue nos exames citopatológicos analisados foi responsável por 20,75% (33/159) de amostras parcialmente obscurecidas e 1,65% (2/121) de amostras consideradas insatisfatórias para análise citopatológica, com uma associação estatisticamente significante para as amostras parcialmente obscurecidas por sangue (*p<0,000*). Quando analisado com

outros fatores obscurecedores concomitantes, sangue e outros fatores obscurecedores, obteve-se 13,84% (22/159) de amostras parcialmente obscurecidas (*p<0,000*).

Houve uma associação estatisticamente significante entre amostras classificadas em espessas com presença de piócitos, e apresentaram-se em 10,7% (17/159) (*p<0,000*) das amostras parcialmente obscurecidas. Amostras dessecadas e espessas foram observadas em 6,29% (10/159) (*p*=0,005) das amostras parcialmente obscurecidas, já as amostras espessas foram responsáveis por 4,4% (7/159) (*p=0,019*). Nas amostras com material hipocelular e presença de piócitos não houve associação significativa entre as amostras consideradas insatisfatórias (*p=0,104*), (*p=0,251*), respectivamente (Tabela 4).

Tabela 1

Prevalência dos resultados satisfatórios e insatisfatórios dos exames encaminhados ao laboratório clínico da PUC Goiás em 2018.

Diagnóstico citopatológico		
	n	**%**
Satisfatórios	6.177	98,08
Insatisfatórios	121	1,92
TOTAL	6.298	100

Tabela 2

Prevalência dos diagnósticos citopatológicos estratificados por faixa etária encaminhados ao laboratório clínico da PUC Goiás em 2018.

FAIXA ETÁRIA	**NEGATIVOS**		**ASC-US**		**LSIL**		**ASC-H**		**HSIL**		**AGC-NEO**		**CARCINOMA INVASOR**		**TOTAL**	
	N	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
< 15 anos	15	0,24	1	0,02	1	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0,28
15 a 24 anos	688	11,14	7	0,11	16	0,26	7	0,11	7	0,11	0	0	0	0	725	11,74
25 a 34 anos	1.096	17,74	17	0,28	11	0,18	20	0,32	16	0,26	0	0	0	0	1.160	18,78
35 a 64 anos	3.791	61,37	28	0,45	13	0,21	41	0,66	32	0,52	3	0,05	1	0,02	3.909	63,28
> 65 anos	355	5,75	3	0,05	0	0	3	0,05	3	0,05	0	0	2	0,03	366	5,93
TOTAL	5.945	96,24	56	0,91	41	0,66	71	1,15	58	0,94	3	0,05	3	0,05	6.177	100

Tabela 3

Associação entre componentes da zona de transformação (ZT) e das anormalidades citológicas nos exames citopatológicos analisados no laboratório clínico da PUC Goiás em 2018.

Zona de Transformação	**Presença de Anormalidades**		**Ausência de Anormalidades**		**Total**		**OR (IC) 95%**	**P**
	n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**		
Presença	199	3,22	3.625	58,69	3.824	61,91	3,86 (2,62 - 5,70)	0,000
Ausência	33	0,53	2.320	37,56	2.353	38,09		
TOTAL	232		5.945		6.177	100		

Tabela 4

Fatores que comprometeram a qualidade da amostra nos exames encaminhados ao laboratório clínico da PUC Goiás em 2018 (n = 280)

Fatores obscurecedores	Presente		Ausente		p Qui-quadrado
	n	f%	n	f%	
Dessecamento					
Parcialmente obscurecida	70	44,03	89	55,97	< 0,000
Insatisfatória	116	95,90	5	4,10	
Dessecamento e espesso					
Parcialmente obscurecida	10	6,29	149	93,71	0,005
Insatisfatória	0	0,00	121	100,00	
Sangue					
Parcialmente obscurecida	33	20,75	126	79,25	< 0,000
Insatisfatória	2	1,65	119	98,35	
Sangue e outros					
Parcialmente obscurecida	22	13,84	137	86,16	< 0,000
Insatisfatória	0	0,00	121	100,00	
Espesso					
Parcialmente obscurecida	7	4,40	152	95,60	0,019
Insatisfatória	0	0,00	121	100,00	
Espesso e piócitos					
Parcialmente obscurecida	17	10,70	142	89,30	< 0,000
Insatisfatória	0	0,00	121	100,00	
Material hipocelular					
Parcialmente obscurecida	0	0,00	159	100,00	0,104
Insatisfatória	2	1,65	119	98,35	
Piócitos					
Parcialmente obscurecida	0	0,00	159	100,00	0,251
Insatisfatória	1	0,83	120	99,17	

DISCUSSÃO

Nesse estudo houve uma associação estatisticamente significante entre a adequabilidade das amostras nos exames citopatológicos e seus fatores obscurecedores.

Dentre os fatores obscurecedores que podem comprometer a análise do exame citopatológico, dessecamento foi estatisticamente significante entre as amostras consideradas insatisfatórias (*p<0,000*). Esse fator ocorre por má fixação, uma vez que dificulta a entrada dos corantes nas células, prejudicando a conservação das amostras. A fixação possui a função de preservar a integridade das características citomorfológicas e tintoriais das células. Também pode ocorrer quando o tempo entre a coleta e a realização do esfregaço é grande, e assim a lâmina pode perder a umidade pelo ar ou alguma fonte de calor, prejudicando a visualização da mesma por dessecamento.[14-16]

A presença de sangue neste estudo apresentou associação estatisticamente significante (*p<0,000*), semelhante ao estudo de Amaral et al.,[17] que demonstrou elevada frequência de esfregaços com dessecamento, purulentos e com sangue. Amaral et al.[17] identificaram uma maior frequência de resultados citopatológicos alterados quando a amostra foi classificada como satisfatória para análise e com representação de células endocervicais (*p=0,001)*.

Zhao et al.[18] encontraram associação estatisticamente significante quando considerados todos os fatores obscurecedores, demonstrando maior malignidade em lesões de

células escamosas, do que aquelas em células glandulares (*p=0,001)*, sendo 8 em cada 10 lâminas insatisfatórias, com presença de células escamosas.

O profissional, ao realizar a coleta no colo do útero, deve estar atento e observar a quantidade significante de muco, secreção ou sangue, e fazer a retirada do excesso para evitar uma sobreposição celular, impossibilitando o escrutínio da lâmina e a identificação da lesão citopatológica.[17,19-21]

No presente estudo foi demonstrado que amostras que continham a zona de transformação e apresentaram anormalidades representavam 3,22% dos resultados citopatológicos; já quando não houve a zona de transformação, a presença de anormalidades citológicas identificadas foi de 0,53%. As amostras analisadas apresentaram uma associação estatisticamente significante das anormalidades citológicas à presença de ZT (OR: 3,86 IC: 3,87% 2,62 – 5,70 *p*= 0,000), resultado semelhante ao encontrado nos estudos de Mendonça et al., e Stolnicu et al.[3,22] É importante destacar que em 90% dos casos, o câncer de colo do útero ocorre em células da zona de transformação.[23,24]

Para que a amostra seja considerada adequada, é necessário que o material coletado contenha células da junção escamocolunar, visto que nessa região ocorre maior incidência de câncer cervical devido à alta taxa de multiplicação celular. A não representatividade da zona de transformação não descarta a ausência de lesões e pode levar a resultado falso negativo. A ausência da zona de transformação pode estar mascarando a presença de anormalidades citopatológicas.[23,24]

Do total de 6.177 laudos citopatológicos satisfatórios, observou-se 96,24% de resultados negativos e 1,92% foram insatisfatórios. Filipe et al.[20] mostraram, através da análise dos exames citopatológicos, que houve baixa frequência de casos insatisfatórios (<5%) em diferentes níveis de índice de desenvolvimento humano (IDH).

Dos casos satisfatórios, a maior prevalência de resultados negativos foi na faixa etária dos 35 a 64 anos, achado semelhante aos estudos de Mendonça et al.,[3] que apresentaram negatividade em 62,7% dos diagnósticos nessa faixa etária. Neste estudo, as anormalidades citopatológicas foram encontradas em 3,76% dos diagnósticos citopatológicos. Os diagnósticos menos graves foram ASC-US (0,91%) e LSIL (0,66%), com maior prevalência na faixa etária de 35 a 64 anos e de 15 a 24 anos, respectivamente. A prevalência de lesões mais graves ocorreu nos diagnósticos citopatológicos de ASC-H com 1,15%, HSIL representou 0,94% das lesões, AGC-NEO foi encontrado em 0,05% dos casos, sendo que em todos estes a faixa etária mais prevalente foi de 35 a 64 anos. O carcinoma invasor representou um total de 0,05% dos laudos citológicos, acometendo mulheres com mais de 65 anos de idade.

Estes resultados são similares aos estudos de Stolnicu et al.[22] e Lima et al.[25] que observaram as anormalidades citopatológicas com maior frequência em mulheres de 30-39 anos em 38,7% e 1,86% das amostras analisadas, respectivamente. No estudo de Ribeiro et al.,[13] a maior incidência de lesões ocorreu na faixa etária de 25 a 34 anos com 0,98% dos laudos, seguida pela faixa de 45 a 54 anos de idade com 0,84%, e 35 a 44 anos com 0,74%.

A incidência do câncer de colo do útero aumenta nas mulheres entre 30 e 39 anos de idade e atinge seu pico na quinta ou sexta décadas de vida.[1] Passos et al.[4] observaram uma prevalência de 57,20% de lesões graves em mulheres de 45 a 64 anos, sendo a idade média de diagnóstico de lesões pré-cancerosas dependente da idade da primeira relação sexual e a intensidade de testes de rastreamento.[26]

A falta de orientação, de acesso ao longo da vida e o exame tardio atrasam o diagnóstico e podem variar de acordo com as características socioeconômicas e a disponibilidade de acesso a serviços de saúde. Os problemas no rastreamento associados aos erros da fase pré-analítica, a falta de treinamento apropriado, coletas mal realizadas e fatores obscurecedores contribuem para liberação de laudos falsos negativos. De fato, grandes centros urbanos têm melhores condições econômicas, maior capacidade de investimento e maior qualificação de equipes de saúde, diminuindo esses riscos.[27]

A associação de educação continuada às mulheres e aos profissionais envolvidos gera qualificação da técnica quando todas as etapas do procedimento são seguidas e realizadas adequadamente. Isso inclui adequada orientação às pacientes, condições e técnicas de coleta do material até a interpretação das lâminas.[25,29]

Para que se evite os resultados falsos negativos, o sistema de monitoramento da qualidade deve incluir combinações apropriadas de atividades como, por exemplo, o limite de lâminas por profissional deve ser de, no máximo, 70 em uma jornada diária de 8 horas e devem ser considerados a habilidade do profissional e o grau de dificuldade que os casos podem apresentar.[10,30]

Estruturas de trabalho adequadas e processos para melhorar o desempenho dos serviços são bastante relevantes em todo o procedimento das fases, desde a coleta das amostras até a emissão dos laudos, e podem melhorar significativamente os diagnósticos citopatológicos, diminuindo os resultados falsos negativos e aperfeiçoando a conclusão diagnóstica.[10,11,27]

CONCLUSÃO

Através deste estudo foi possível observar que dessecamento e demais fatores obscurecedores foram significantes no que se refere à adequabilidade das amostras citológicas, o que reforça a importância de treinamentos e atualizações dos profissionais envolvidos, através de cursos de qualificação, como educação continuada, no intuito de reduzir os erros pré-analíticos e analíticos, buscando garantir a qualidade da amostra. Contudo, é importante evitar os fatores obscurecedores, para melhor confiança e adesão das mulheres aos exames citopatológicos, assim como a conscientização das mulheres sobre a importância do exame citopatológico, através de informações claras e ações que incentivam a busca pela saúde.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer [https://www.inca.gov.br] Detecção precoce [acesso em 02 fev 2020]. Disponível em: https://www.inca.gov.br/en/node/1194.
2. Ministério da Saúde do Brasil. Diretrizes Brasileiras para Rastreamento do Câncer do Colo do Útero. Impresso no Brasil. 2016.
3. Mendonça FC, Costa GO, Ribeiro AA. Prevalência do diagnóstico citopatológico: uma abordagem sobre as condutas preconizadas pelo Ministério da Saúde. Rev EVS – Rev Ciências Ambient e Saúde. 2019;46(1):17.
4. Passos EN, Ribeiro AA, Tavares SB do N, Souza NLA de, Batista M de LS, Cardoso Filho LI, et al. Bacterial vaginosis, representation of endocervical and/or metaplastic cells, and cytological abnormalities in different age groups: Association study. Diagn Cytopathol. 2020;2-7.
5. Santos MJS, Ribeiro AA. Estratégias Utilizadas para Melhorar a Qualidade dos Exames Citopatológicos. Rev Bras Cancerol. 2020;66(1).
6. Machado EP, Wosniack C, Reche PM, Costa BR, Perek KV, Ravelli APX. Abordagem interdisciplinar: Qualidade da coleta cervicovaginal na prevenção do câncer de colo uterino. Revista Extensão em Foco, n° 16. 2018;12-25.
7. Nayar, Ritu, and David C. Wilbur, eds. The Bethesda system for reporting cervical cytology: definitions, criteria, and explanatory notes. Springer, 2015.
8. Galvão EFB, Silva MJM, Esteves FAM, Peres AL. Frequency of unsatisfactory samples of preventive exams of cervical cancer in Pernambuco, Brazil. 2015;29(2):51–6.
9. Vieira AJH, Santos JI dos. Brazilian Journal of Clinical Analyses. Rev Bras Análises Clínicas [Internet]. 2017;49(3):235-9. Disponível em: www.trasso.com.br
10. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Manual de gestão da qualidade para laboratório de citopatologia. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA; 2016. 160p.
11. Cardoso Filho LI, Tavares SBN, Siqueira MLB, dos Passos EN, Araújo NLAS, Martins JMA, et al. Internal quality control indicators in cervical cytopathology of a university laboratory. Cytopathology. 2018;29(4):355-60.
12. Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas recomendações para profissionais de saúde. Vol. 28, Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. 2006. 486-504.
13. Ribeiro AA, Furtado LCP & de Castro Arantes N. Associação dos Agentes Microbiológicos Patogênicos e Anormalidades Citológicas nos Exames Citopatológicos Encaminhados a um Laboratório Escola de Goiânia – Goiás. Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde. 2018;45(1), 115-122.
14. Nai GA, Souza KKG, Rodrigues ER, Barbosa RL. Presença de células da junção escamo-colunar em esfregaços cérvico-vaginais de mulheres acima de 40 anos. Rev Bras Ginecol e Obs. 2011; 33:2-6.
15. Fischmann S, Ughini O. Importância da qualidade da coleta do exame preventivo para o diagnóstico das neoplasias glandulares endocervicais e endometriais Importance of the sample collections quality in pap smear for diagnosis of glandular endocervical and endometrial cancers. 2016;(3).
16. Quintana SBS, Carvalho Fabiano L, Silva GRF, Campos MBT, Maia MCS, Araújo Júnior MLC, et al. Avaliação comparativa da qualidade da coloração de Papanicolaou em diferentes tempos de fixação em álcool etílico a 96%. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2019;55(1): 44-56.
17. Amaral RG, Manrique EJC, Guimarães JV, Sousa PJ de, Mignoli JRQ, Xavier A de F, et al. Influência da adequabilidade da amostra sobre a detecção das lesões precursoras do câncer cervical. Rev Bras Ginecol e Obs. 2008;30(11).
18. Zhao L, Wentzensen N, Zhang RR, Dunn ST. Factors Associated with Reduced Accuracy in Papanicolaou Tests for Patients with Invasive Cervical Cancer, 2014; Sep;122(9):694-701.
19. Mori MA, Nunes C, Ribeiro DM. Falhas no diagnóstico do câncer de colo uterino. 2015;37-50.
20. Filipe R, Costa A, Longatto-filho A, Vazquez FDL, Tavares H, Fregnani G. The Quality of Pap Smears from the Brazilian Cervical Cancer Screening Program According to the Human Development Index. 2020;299-308.
21. Kumar N, Gupta R, Gupta S. Glandular cell abnormalities in cervical cytology: What has changed in this decade and what has not? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2019; 240:68-73.
22. Stolnicu S, Musca S, Micu D, Micu L, Moldovan C, Puscasiu L. Prevalence of abnormal Pap smears in a consecutive and previously unscreened population in Romania. Int J Gynecol Obstet. 2014;124(2):156-9.
23. Andrade VRM, Santos AV, Staudt KJ, Mallmann CW. Interdisciplinarity as educational tool in health: a study of cervical cancer. Rev Bras Análises Clínicas. 2017;49(2):189-94.
24. Silva IC, Assis IB. Revista Saúde em Foco – Edição no 11 – Ano: 2019. 2019;876-90.
25. Lima TM, Renata P, Lessa A, Freitas LV, Teles MR, Aquino PDS, et al. Artigo Original Análise da capacidade diagnóstica dos exames preventivos do câncer de colo uterino. 2012;25(5):673-8.
26. Sharma AK, Nagao T. Design of a silicon-based plasmonic optical sensor for magnetic field monitoring in the infrared. Appl Phys B Lasers Opt. 2014;117(1):363-8.
27. Rejane M, Barcelos B, Cássia R De, Lima D, Iii ET, Pereira B, et al. Quality of cervical cancer screening in Brazil: external assessment of the PMAQ. 2017;1-13.
28. Camargo AS, Lima UC, Ribeiro AA. Alterações provocadas pelo papilomavirus humano nos exames citopatológicos em um laboratório escola da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. 2018;1-8.
29. Franco R, Amaral RG, Montemor EBL, Montis DM, Morais SS, Zeferino LC. Fatores associados a resultados falso-negativos de exames citopatológicos do colo uterino. 2006;28(19):479-85.
30. Miller AB, et al. Report on consensus conference on cervical cancer screening and management. International Journal of Cancer, New York, v. 86, n. 3, p. 440-447, 2000.

Estudos da correlação de parâmetros clínicos avançados e achados na hematoscopia: granulócitos imaturos (IG%)

Studies of the correlation of hematimetric parameters and findings in hematoscopy: immature granulocytes (IG%)

Artur Fernando Soares da Silva[1], *Raphael Ferreira Pimentel*[2], *Fábio Rodrigo Barbosa Dutra Nascimento*[3]

[1] Estudante. Centro Universitário dos Guararapes. Recife, PE, Brasil.

[2] Especialista. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, Brasil.

[3] Mestre. Docente. Centro Universitário dos Guararapes. Recife, PE, Brasil.

Resumo

Objetivo: O hemograma é um exame que avalia de forma quantitativa e qualitativa os componentes do sangue. Sua automação ao longo dos anos foi essencial para executá-lo de maneira mais rápida e precisa. Devido ao aumento da demanda nos laboratórios de análises clínicas, com a automação, surgiram também parâmetros clínicos avançados que aumentam a capacidade de interpretação do hemograma pelo corpo clínico. Dentre esses parâmetros clínicos, está o IG% (percentual de granulócitos imaturos) que avalia a presença de leucócitos mais imaturos da linhagem granulocítica no sangue, sendo este parâmetro o objeto de estudo deste trabalho. *Métodos:* Trata-se de um estudo prospectivo realizado na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) em 100 amostras de sangue periférico de pacientes do hospital que foram processadas no equipamento XT-4000iTM da SYSMEX e que atenderam critérios prévios de inclusão e exclusão. O objetivo foi correlacionar a contagem de granulócitos imaturos pelo método manual (hematoscopia) e automatizado (padrão ouro da SYSMEX), justificando, assim, a importância do uso do IG% na rotina laboratorial que em geral é subutilizado por falta de conhecimento sobre sua importância e aplicação. *Resultados:* Foi possível estabelecer um valor de correlação pelo método *Spearman* que se apresentou dentro do intervalo de referência de 95%, além de se ter observado sensibilidade e especificidade satisfatórias, conforme estudos anteriores com o maquinário da SYSMEX. *Conclusão:* O trabalho corroborou com estudos prévios que tiveram como objetivo a avaliação do parâmetro IG% e poderá servir de subsídio para pesquisas posteriores.

Palavras-chave: Automação Laboratorial; Células Sanguíneas; Contagem de Leucócitos; Diagnóstico Clínico

Abstract

Objective: The hemogram is an exam that evaluates in a quantitative and qualitative way the components of the blood. Its automation over the years has been essential to perform it more quickly and accurately. Due to the increased demand in clinical analysis laboratories, with automation, advanced clinical parameters that increase the capacity of interpretation of the hemogram by the clinical body have also emerged. Among these clinical parameters is the IG% (percentage of immature granulocytes) which evaluates the presence of immature leukocytes from the granulocytic line in the blood, therefore this parameter is the object of study of this work. *Methods:* It was a prospective study carried out at the Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (HEMOPE) on 100 samples of peripheral blood from patients in the hospital who were processed in the SYSMEX XT-4000iTM equipment and who met previous inclusion and exclusion criteria. The objective was to correlate the immature granulocyte count through manual (hematoscopy) and automated methods (gold standard of SYSMEX), thus justifying the importance of the use of IG% in the laboratory routine, which in general is underused due to the lack of knowledge about its importance and applicability. *Results:* It was possible to establish a correlation value by the *Spearman* method, which presented itself within the reference range of 95%, in addition to a satisfactory sensitivity and specificity, according to the SYSMEX machinery. *Conclusion:* The work corroborated with previous studies that had as objective the evaluation of the IG% parameter and could serve as subsidies for further research.

Keywords: Automation Laboratory; Blood Cells; Leukocyte Count; Clinical Diagnosis

Correspondência
Artur Fernando Soares da Silva
E-mail: artur.fss@hotmail.com

Recebido em 14/12/2020 | Aprovado em 10/03/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202202087

INTRODUÇÃO

Os exames laboratoriais são essenciais na manutenção da saúde, na prevenção de doenças e no diagnóstico de inúmeras patologias. Sua importância na tomada de decisão no campo clínico é vital. A análise das amostras biológicas de forma quantitativa e qualitativa auxilia, em grande parte dos casos, os profissionais da área da saúde na conclusão mais correta do diagnóstico e no encaminhamento do paciente para o tratamento mais adequado.[1] Dentre os exames laboratoriais existentes, o hemograma é um dos principais aliados na conclusão dos diagnósticos, sejam ou não relacionados às patologias hematológicas. O hemograma avalia de forma quantitativa e qualitativa os elementos do sangue; é um dos exames mais requeridos nas consultas e faz parte de todas as revisões de saúde. Sua indicação consiste, principalmente, na contagem de eritrócitos, plaquetas e leucócitos.[2]

A automação do hemograma permite maior agilidade e sensibilidade na liberação de resultados num laboratório de análises clínicas. Especialmente naqueles que têm que administrar uma rotina intensa, é necessário o interfaceamento automático – ausência de revisão hematoscópica pelo analista – para liberação direta de exames cujos índices hematimétricos automatizados estejam dentro dos valores predeterminados como normais e padrões.[3] De acordo com o manual do maquinário XE-2100™ da SYSMEX e literaturas publicadas na área,[4;5] dentre os índices hematimétricos são alguns exemplos: WBC (*White Blood Cell*); RBC (*Red Blood Cell*); HGB (hemoglobina) e o HCT (hematócrito). Quando tais índices exibem qualquer alteração que não esteja dentro do considerado normal, é sinalizado ao analista em forma de alarmes (*flags)*. Ao receber esse sinal, é necessário realizar a hematoscopia do material analisado para identificar qual mudança foi responsável por aquela sinalização.

Além dos índices hematimétricos automatizados usuais, existem parâmetros clínicos avançados que permitem aos equipamentos de hemograma realizar análises específicas sobre determinada série hematológica baseando-se no conteúdo do interior das células em análise, conforme a tecnologia de cada analisador. Essas análises têm importante significado clínico quando bem interpretadas. Enquadram-se nesta categoria os parâmetros: NRBC (eritroblastos); IPF (plaquetas imaturas); IRF (fração imatura de reticulócitos); RETHe (conteúdo de hemoglobina dos reticulócitos) e IG% (granulócitos imaturos),[6] sendo este último o objeto de estudo deste trabalho.

O parâmetro clínico avançado IG% (*immature granulocyte*) consiste na avaliação por meio da automação da série maturativa de granulócitos que aparecem nos casos de aumento da atividade medular. Segundo o documento técnico, "O novo modelo de negócios para parâmetros avançados em hematologia – granulócitos imaturos (IG)" da SYSMEX,[7] foi criado, assim como os outros parâmetros clínicos avançados, por se observar a necessidade de melhoria nos cuidados com os pacientes, sendo, portanto, muito importante no diagnóstico, mesmo que seu uso ainda seja reduzido e sua aplicação pouco explorada devido à insciência de alguns profissionais e laboratórios.

Em geral, os equipamentos que realizam os exames hematológicos, apesar de identificarem nas amostras, não são capazes de distinguir na sua avaliação os diferentes tipos de granulócitos imaturos devido a sua sensibilidade limitada. Quando isso acontece, além da porcentagem de IG%, exibem os *flags* "presença IG", "neutrófilos bandas?" e "granulócitos imaturos?", indicando ao analista quando se faz necessária uma avaliação microscópica daquele exame que está sendo realizado. Entretanto, dependendo de cada laboratório, o parâmetro clínico avançado IG% pode simplesmente ser solicitado para demonstrar o percentual desses granulócitos imaturos no espécime analisado, evitando revisões desnecessárias de microscopia.[5]

O debate sobre a presença de granulócitos imaturos nos exames é pouco amplo e, em muitos casos, por falta de conhecimento sobre a aplicabilidade que o maquinário nos laboratórios apresenta, o analista clínico acaba por subutilizar o percentual IG% que poderia auxiliar diretamente na agilidade da liberação do laudo de determinado paciente, evitando gasto de energia e de labor desnecessários na microscopia. Portanto, o intuito desse artigo foi correlacionar a contagem manual por hematoscopia com a contagem de granulócitos imaturos automatizada. O estudo também teve potencial de ressaltar a utilização mais refinada do IG% na rotina, oferecendo subsídios para estudos posteriores de implantação do IG% em rotinas de laboratório, na prática clínica e nas tomadas de decisão.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Este estudo, de caráter prospectivo, foi realizado em 100 amostras oriundas dos pacientes da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), processadas

no equipamento XT-4000i™ da SYSMEX, cujos critérios de inclusão e exclusão foram: a) presença do número de identificação da amostra (deveria ser uma amostra real de um paciente); b) ausência de número começando com QC (não poderia ser uma amostra-controle); c) WBC (*White Blood Cells*) acima de $1x10^3$ (1000 leuc/µL); d) apresentar os *flags*: "granulócitos imaturos?","neutrófilos banda?" (bastonetes) e "presença IG"; e) demonstrar o percentual de IG%.

Análise em contador automatizado

As amostras foram processadas em um contador modelo XT-4000i™ da SYSMEX cuja metodologia envolve a contagem diferencial em seis partes para a obtenção do parâmetro clínico avançado IG%, aplicando a técnica de citometria de fluxo fluorescente e foco hidrodinâmico.[5] Foram utilizados os reagentes: CELLPACK-EPK, STROMATOLYSER-FB, STROMATOLYSER-4DL, STROMATOLYSER-4DS e SULFOLYSER, todos obtidos em uma distribuidora da SYSMEX em Recife – PE, Brasil.

Análise hematoscópica

As amostras foram coletadas em tubo a vácuo da marca VACUETTE® contendo o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante. Distensões sanguíneas das amostras selecionadas foram realizadas sem anticoagulantes utilizando uma lâmina distensora no ângulo de 45º em relação a uma lâmina de vidro previamente desengordurada. As lâminas foram coradas utilizando a técnica de May Grunwald-Giemsa[8] e analisadas à microscopia de luz por dois citomorfologistas. A contagem diferencial foi feita em 200 leucócitos (100 por pesquisador) em zigue-zague, percorrendo o centro do esfregaço sanguíneo de maneira que as células fossem avaliadas sem sobreposição.

Análise de dados

Estabeleceu-se um limiar de positividade para o IG% automatizado a partir de 0,5% definido de acordo com estudos que tiveram como objetivo determinar valores de referência para a presença significante de IG%.[9] Esse valor se manteve o mesmo para a contagem manual de granulócitos imaturos devido ao número de células contadas, que foi de 200 células, sendo ≥0,5% positivo para a presença de IG em uma das contagens manuais. Os resultados foram inseridos em uma tabela de valores de verdade para a determinação da sensibilidade e especificidade do método manual para contagem de granulócitos imaturos em relação ao parâmetro automatizado. A análise de correlação dos métodos foi feita através do coeficiente de *Spearman* e o processamento dos dados deu-se através do programa *GraphPad Prism* versão 9.0.0.121.

ÉTICA

Este artigo seguiu a resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) 466/12 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do HEMOPE sob o Parecer 4.291.216. Não se fez necessária a aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), tendo em vista que as amostras avaliadas foram identificadas por código de barras e não teve vínculo com a identificação do paciente.

RESULTADOS

A Tabela 1 demonstra a relação de amostras negativas e positivas de acordo com o liminar de positividade estabelecido de 0,5%. Foi possível quantificar o número de Verdadeiros Positivos, Verdadeiros Negativos, Falsos Positivos e Falsos Negativos, e assim determinar a sensibilidade de 0,90% e a especificidade de 1%.

A Figura 1 mostra a correlação das 100 amostras entre os resultados automatizados liberados pelo equipamento XT-4000i™ da SYSMEX e a contagem manual realizada pelos analistas. O resultado de correlação pelo método de *Spearman* (r) mostrou um valor de r=0,8775, em que o intervalo de confiança de 95% foi 0,8209 – 0,9169. O valor de P (*p-value*) foi p<0,0001 e a equação de regressão linear Y = 1,059*X + 1,012.

Tabela 1

Comparação entre os resultados positivos (≥0,5%) e os resultados negativos (<0,5%).

IG manual	IG automatizado	
	POSITIVO	**NEGATIVO**
POSITIVO	78 (VP)	0 (FP)
NEGATIVO	9 (FN)	13 (VN)

*VP: Verdadeiros Positivos; FP: Falsos Positivos; FN: Falsos Negativos; VN: Verdadeiros Negativos

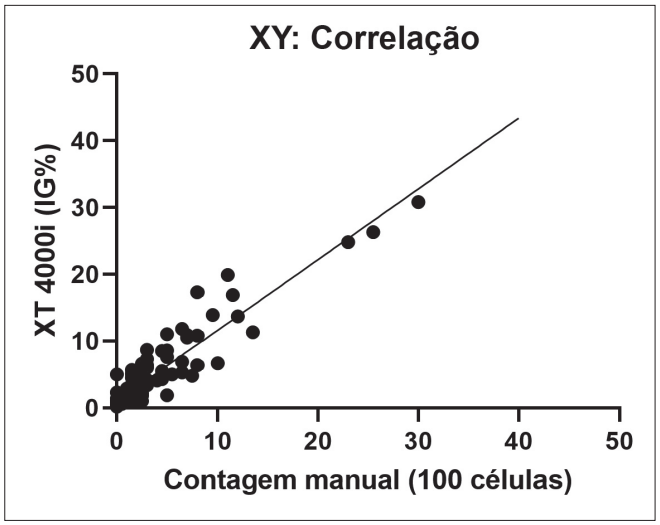


Figura 1

Correlação entre o método automatizado (Y) e o método manual (X). N = 100 amostras. Tamanho: 13 x 17cm.

DISCUSSÃO

Os granulócitos apresentam grande importância no sangue periférico e, consecutivamente no hemograma realizado, representando cerca de 70% dos leucócitos encontrados. Na série branca (leucócitos), a presença de granulócitos imaturos normalmente está associada a algum processo patológico como infecções bacterianas, doenças inflamatórias agudas, traumas cirúrgicos e neoplasias mieloproliferativas. Contudo, essas células podem também ser observadas durante a gestação, no período neonatal ou em casos de tratamentos com agentes estimuladores de granulopoiese.[5;10]

De acordo com o documento técnico da SYSMEX,[6] no momento da contagem, o maquinário hematológico considera como "granulócitos imaturos" os promielócitos, mielócitos e os metamielócitos, visto que os mieloblastos estão associados a problemas de caráter mais agudo. Como mostrado no documento técnico,[7] segundo estudos realizados pelo Dr. Rümke, a precisão dos resultados na contagem de leucócitos está diretamente relacionada à quantidade de células contadas; quando comparado com o método automatizado, o método manual de 100 células é vagaroso e pouco confiável devido ao baixo número de células registradas. O contador hematológico automatizado é capaz de identificar milhares de leucócitos, daí possuir um melhor intervalo de confiança, tendo sua eficácia comprovada por estudos prévios que tiveram como objetivo a enumeração de granulócitos imaturos através de equipamentos hematológicos.[11-14]

Em um estudo realizado por S. Buoro,[13] utilizando o contador XN-9000™ para avaliar granulócitos imaturos em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) com suspeita de septicemia, foi possível observar que a contagem de IG% automatizada não apresentava um desempenho inferior em relação ao método manual, e que estava em vantagem por ser mais ágil e processar maior número de amostras. Anos antes, em 2007, Fernandes e Hamaguchi[14] também observaram um bom desempenho do contador XE-2100™ para a contagem de IG%, através da comparação do método automatizado não só com a contagem manual, mas também com a técnica de citometria de fluxo usando os marcadores CD16 e CD11b, específicos para granulócitos imaturos. A SYSMEX, padrão ouro em seus equipamentos cientificamente comprovado, tem alta sensibilidade e especificidade em seus valores.

No presente estudo, é evidente que, para o contador XT-4000i™, a qualidade do parâmetro automatizado se manteve. Na Tabela 1, foi possível observar que o número de resultados Falsos Positivos (FP) não existiu, resultando numa especificidade eficaz no valor de 1%, mostrando que de acordo com o limiar estabelecido (0,5%), amostras negativas não terão resultados relevantes na microscopia. No caso dos resultados Falsos Negativos (FN), acredita-se que essa divergência mínima seja por conta da limitação do método manual que foi previamente relatado. Ainda assim, foi possível observar uma sensibilidade de 0,90% considerada satisfatória no trabalho realizado. A Figura 1 corrobora com estudos que acreditam na substituição do método manual de contagem de granulócitos imaturos pelo método automatizado,[11-14] porque mostra que ambos os resultados estiveram próximos da linha de regressão disposta enquanto referência no gráfico, mostrando ao analista que sua substituição, além de confiável, trará agilidade e precisão para os resultados liberados pelo laboratório. O valor de r (0, 8775) obtido após a correlação de *Spearman* apresentou-se dentro do intervalo de confiança de 95% (0.8209 – 0.9169), como o esperado, e o *p-value* <0,0001 reafirma que a probabilidade de que os resultados encontrados não sejam verdadeiros é mínima ou quase nula.

CONCLUSÃO

O presente estudo constatou aquilo que a SYSMEX e a literatura afirmam sobre o uso do parâmetro IG% na rotina laboratorial: mostrou que resultados que não retratam a

realidade dos pacientes são raros e que é possível utilizar o IG% automatizado de forma segura e confiável. Acredita-se que isso trará mais agilidade na liberação de laudos facilitando o trabalho do analista e melhorando os diagnósticos e tratamentos por parte da equipe médica. Esse trabalho poderá servir de subsídio para estudos posteriores que visem à implantação do IG% na prática clínica, trazendo grande enriquecimento aos resultados liberados. É necessário enfatizar que o uso refinado do parâmetro clínico avançado IG% dependerá das demandas apresentadas pelo público-alvo do local. Acredita-se que se fará necessário em situações que demandem intervenção médica imediata, de acordo com as condições clínicas apresentadas.

SUPORTE FINANCEIRO

O referido orçamento é oriundo dos próprios pesquisadores envolvidos.

AGRADECIMENTOS

Gratos pela aprovação do projeto de pesquisa por parte da Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Hematologia e Hemoterapia (HEMOPE) que culminou neste presente trabalho, e por todo o apoio da equipe técnica que compõe o setor de citologia na Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE) da mesma instituição.

REFERÊNCIAS

1. Williamson MA, Synder LM. Wallach: interpretação de exames laboratoriais. 10ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2016.
2. Failace R, Failace R, Fernandes FB. Hemograma: manual de interpretação. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2015.
3. Failace R, Pranke P. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de hemogramas através de contadores eletrônicos. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2004; 26(3): 159-166. doi: 10.1590/S1516-84842004000300004.
4. SYSMEX. Manual:XE-2100™ Automated Hematology System. Paraná: SYSMEX; c2011.
5. Bain BJ. Células sanguíneas: um guia prático. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2016.
6. SYSMEX. Manual: XT-4000i™ Analisador Hematológico Automatizado. [Internet]: SYSMEX; c2020.
7. SYSMEX. Documento técnico: O novo modelo de negócios para parâmetros avançados em hematologia – granulócitos imaturos (IG). São Paulo: SYSMEX; c2019.
8. Melo M, Silveira CM. Laboratório de hematologia: teorias, técnicas e atlas. 1ª ed. Rio de Janeiro: Rubio; 2015.
9. Roehrl MHA, Lantz D, Sylvester C, Wang JY. Age-Dependent Reference Ranges for Automated Assessment of Immature Granulocytes and Clinical Significance in an Outpatient Setting. Arch. Pathol. Lab. Med. 2011; 135(4): 471-7. DOI: 10.1043/2010-0258-OA.1.
10. Hoffbrand AV, Moss PAH. Fundamentos em hematologia. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
11. Fujimoto H, Sakata T, Hamaguchi Y, Shiga S, Tohyama K, Ichiyama S, et al. Flow Cytometric Method Enumeration and Classification of Reactive Immature Granulocyte Population. Wiley Online Library. c2000; 42: 371-8. doi: 10.1002/1097-0320(20001215)42:6<371:AID-CYTO1004>3.0.CO;2-G.
12. Nigro KG, O'Riordan MA, Molloy EJ, Walsh MC, Sandhaus LM. Performance of an Automated Immature Granulocyte Count as a Predictor of Neonatal Sepsis. American jornal of clinical pathology. 2005; 123(4): 618-624. doi: 10.1309/73H7K7UBW816PBJJ.
13. Buoro S, Mecca T, Vavassori M, Azzarà G, Esposito SA, Dominoni P, et al. Immature granulocyte count on the new Sysmex XN-9000: performance and diagnosis of sepsis in the intensive care unit. Signa Vitae. 2015; 10(2): 4-0.
14. Fernandes B, Hamaguchi Y. Automated Enumeration of Immature Granulocytes. American Journal of Clinical Pathology. 2007; 128(3): 454-463. doi: 10.1309/TVGKD5TVB7W9HHC7.

A importância do diagnóstico precoce e os tratamentos apresentados na Anemia Falciforme: Revisão Sistemática

The importance of early diagnosis and treatment presented in sickle cell anemia disease: Systematic Review

Daphne Batista de Oliveira[1], Julia Oliveira de Lima[1], Evandro Marianetti Fioco[2], Edson Donizetti Verri[3], Saulo Cesar Vallin Fabrin[4]

[1] Bacharel em Biomedicina – Claretiano – Centro Universitário. Batatais, SP, Brasil.

[2] Doutor em Biologia Oral/Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FORP-USP). Ribeirão Preto, SP, Brasil.

[3] Doutor em Odontologia/Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FORP-USP). Ribeirão Preto, SP, Brasil.

[4] Doutorando no programa de Biologia Oral/Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FORP-USP). Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Resumo

A alta prevalência da doença falciforme compõe um dos maiores problemas de saúde pública do Brasil. Nesse sentido, é imprescindível a obtenção do diagnóstico precoce para evitar o aparecimento de outras doenças e infecções mais graves que podem debilitar ainda mais a saúde do paciente. Foi realizada uma revisão sistemática da literatura baseada em estudos primários a partir de pesquisas de artigos com base no banco de dados da SciELO, PubMed e Google Acadêmico. A doença falciforme pode apresentar diversas manifestações clínicas nos órgãos. O pulmão é um dos órgãos mais afetados pela anemia, causando principalmente a síndrome torácica aguda (STA). A patologia também está associada a anormalidades renais, à retinopatia e ao priapismo. Considera-se de maior importância realizar exames periódicos, pois a doença pode se apresentar assintomática e suas complicações também podem permanecer até em estágios avançados.

Palavras-chave: Anemia falciforme; complicações; Diagnóstico precoce; Terapêutica.

Abstract

The high prevalence of sickle cell anemia disease makes up a major public health problems in Brazil, aiming this subject is essential to getting early diagnosis to prevent the onset of other diseases and more severe infections that can further weaken the health of the patient. A systematic review of the literature based on primary studies was conducted from research articles based on the SciELO database, PubMed and Google Scholar. Sickle cell anemia disease may have different clinical manifestations in organs. The lung is one of the organs most affected by anemia, causing mainly Acute Chest Syndrome (ACS). This pathology is also associated with renal abnormalities, retinopathy and priapism. It is considered of most importance to do periodic exams because the disease may present asymptomatic and complications attributed these can also remain in advanced stages.

Keywords: Anemia sickle cell; complications; Early diagnosis; Therapeutics.

Correspondência
Daphne Batista de Oliveira
E-mail: daphneoliveira@outlook.com

Recebido em 13/05/2021 | Aprovado em 18/03/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202202143

INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil é a prevalência da anemia falciforme, uma hemoglobinopatia hereditária que está relacionada a uma alteração da globina beta da hemoglobina. Essa alteração se dá pela troca da hemoglobina A (HbA) por uma hemoglobina mutante, a hemoglobina S (HbS), porém só há ocorrência da anemia falciforme se houver a homozigose (SS) com o paciente, ou seja, se ele recebeu o gene da hemoglobina S de ambos os pais. No entanto, se ele receber a hemoglobina S de um dos pais e do outro a hemoglobina A, ele é portador do traço falciforme, não apresentando sintomas, e só possui importância clínica em caso de aconselhamento genético e casos como a gravidez. No estado gestacional é requerida maior atenção, pois nesse período acontecem maiores complicações clínicas associadas à doença.[1]

Um estudo realizado em 2013 com crianças e adolescentes mostrou que a doença falciforme está associada a limitações nos aspectos sociais, emocionais e escolares, apresentando redução em todos eles em comparação a outros da mesma idade.[2,3] Outro estudo também indica que pelo menos 50% dessas crianças e adolescentes demonstram problemas psiquiátricos, como depressão, autoestima baixa e ansiedade, que podem se agravar com o passar da idade,[4] além de apresentarem hipertensão,[5] lesões pulmonares,[6,7] retinopatia,[8] dentre outras complicações. Outro estudo realizado em 1998 aponta, com base em evidências científicas, que a anemia falciforme pode provocar doenças cardíacas.[9] Nos demais, indicam também o surgimento de priapismo.[10] No que concerne ao tratamento, novos métodos têm sido pesquisados,[11] além de outros já utilizados.[12] Com relação aos novos métodos, vêm sendo estudadas moléculas que reduzem a polimerização das hemácias.[13,14]

O diagnóstico da doença falciforme é realizado a partir do método de eletroforese da hemoglobina, da focalização isoelétrica ou cromatografia líquida de alta performance (HPLC).[15] O diagnóstico prematuro da patologia evita complicações futuras e fornece melhores oportunidades de tratamento para o portador.[16] A doença pode apresentar variados graus de gravidade em consequência de combinação entre a hemoglobina S com outras hemoglobinas anormais (ex.: gene da hemoglobina C).[15]

O objetivo deste trabalho foi avaliar a importância do diagnóstico precoce na anemia falciforme para evitar o agravamento da doença e o surgimento de complicações associadas, além de apresentar tratamentos clínicos e alternativos para controle ou cura da doença através da revisão sistemática da literatura. Por esta razão, foram analisados e selecionados artigos que comprovam a eficácia do diagnóstico precoce em portadores da anemia falciforme, também relatando novos métodos terapêuticos.

METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura baseada em estudos primários com base no banco de dados da SciELO (https://scielo.org/en/), da PubMed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) e do Google Acadêmico (https://scholar.google.com.br/) mediante pesquisa direta realizada na linguagem inglesa e portuguesa, por meio do termo "Anemia Falciforme", e por consulta no DeCS (http://decs.bvs.br/) através da utilização das mesmas palavras, resultando dessa busca o termo "Anemia Sickle Cell", posteriormente utilizado como estratégia de pesquisa no banco de dados da PubMed, conforme dados apresentados na Tabela 1. Foram utilizados 38 trabalhos, todos tendo sido incluídos por apresentarem argumentos que são relevantes ao nosso tema, como é mostrado na Figura 1.

Os artigos selecionados foram publicados no período de 1998 a 2019. Os critérios de exclusão utilizados foram artigos que não apresentaram especificamente os tratamentos e os diagnósticos para o controle da patologia. Os critérios de inclusão se basearam nos artigos que demonstraram precisamente soluções e pesquisas para o aumento da qualidade e expectativa de vida dos portadores.

Tabela 1

Trabalhos selecionados para a revisão sistemática.

Banco de dados de busca	N. de relatos identificados
Google Acadêmico	8
PubMed	11
Scielo	18
Outras fontes	1
Total	38

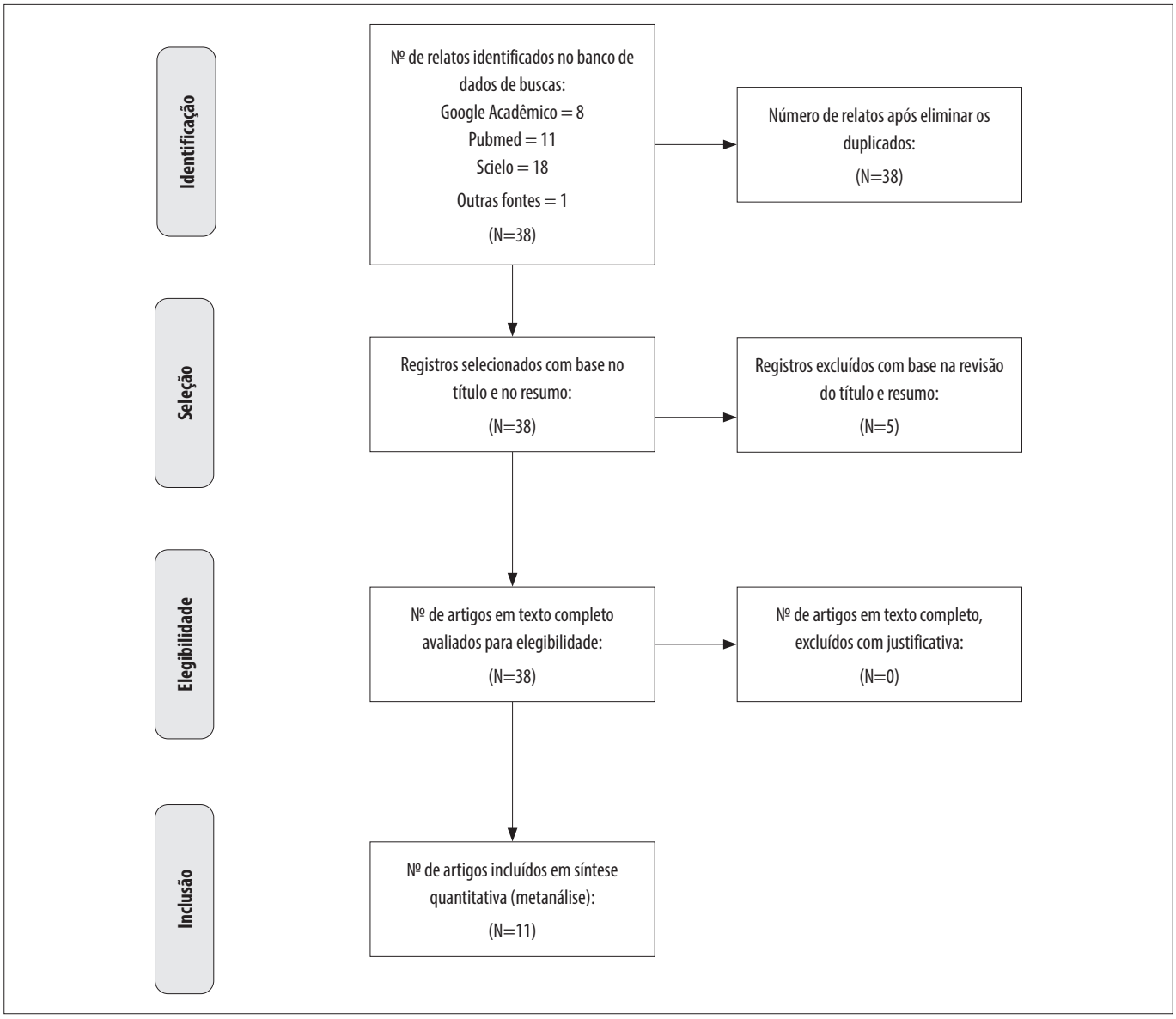


Figura 1
Fluxograma dos trabalhos selecionados.

RESULTADOS/DISCUSSÃO

Segundo Martins et al., 1998,[9] uma das complicações está envolvida com alterações físicas no fluxo sanguíneo que decorre a partir da rigidez das hemácias, processo que pode levar à obstrução, à isquemia e a dano orgânico irreversível ao coração.

O pulmão é um dos órgãos mais afetados pela doença podendo causar morbimortalidade, principalmente devido a sua vulnerabilidade aos eventos vasos-oclusivos provocados pela anemia falciforme.[7] Suas complicações mais comuns abrangem síndrome torácica aguda (STA), hipertensão pulmonar, asma e casos infecciosos, como por exemplo a pneumonia, sobretudo em crianças, apresentando uma alta prevalência de mortalidade.[15] O método da espirometria é adequado para as adversidades pulmonares por possuir baixo custo e ser de fácil acesso.[17]

No caso da STA, essa se torna ainda mais grave durante a gravidez, provocando sintomas clínicos como dor torácica, tosse, febre e hiperventilação. Essa síndrome gera uma lesão

pulmonar provocada sobretudo por infecção, embolia gordurosa e sequestro de células falciformes nos vasos pulmonares, levando ao infarto pulmonar.[1] De acordo com Hsien et al., 2012,[5] a doença falciforme também está relacionada com as anormalidades renais, pois estima-se que 1/3 dos jovens portam a nefropatia. A incapacidade de concentração urinária, defeito na acidificação urinária, excreção de potássio e distúrbios glomerulares, como proteinúria e hiperfiltração glomerular, também estão dentre as anormalidades renais provocadas, levando a um aumento da pressão arterial gradualmente com a idade do indivíduo.

Além destas complicações citadas, a região ocular é também bastante afetada pela anemia falciforme, levando a alterações na retina.[8] No demais, podem ocorrer outros sintomas como atraso no crescimento, frequentes crises dolorosas e maior suscetibilidade a acidentes cerebrais.[4] Uma alteração muito comum que envolve os homens é o priapismo, que é um estado de ereção peniana prolongada e dolorosa que pode persistir por até mais de quatro horas sem estar associada a estímulos sexuais.[10]

Todas as complicações citadas podem ser controladas a partir de um diagnóstico precoce para reduzir significativamente a morbimortalidade da doença.[18] É imprescindível que o diagnóstico seja realizado na triagem neonatal, para, desta forma, identificar terapêutica adequada para precaver implicações e óbito.[19] Para tal triagem, o teste mais adequado é o do pezinho, auxiliando na detecção precoce dessa hemoglobinopatia, e deste modo, viabilizando acompanhamento aos pacientes antes que estes apresentem sintomas severos e, consequentemente, prevenindo implicações futuras.[16] Porém, o estágio tardio da doença, ou seja, na adolescência ou na fase adulta,[20] acarreta um problema maior para a saúde do paciente, e o diagnóstico mais eficiente nestes casos é a técnica de eletroforese de hemoglobina.[15,21] Quando o indivíduo é portador do traço falcêmico ou da anemia, é recomendável que este realize o mapeamento genético para o acompanhamento clínico, principalmente em casos de gravidez.[18]

Na infância as implicações consequentes da doença apresentam-se ainda mais complicadas, pois esta é uma fase que condiz com o mais importante período do desenvolvimento humano.[4] A doença falciforme constitui um grande problema de saúde pública no Brasil e a enfermidade é mais predominante na população negra e parda, porém, atualmente essa anemia pode atingir também indivíduos caucasianos devido à miscigenação.[22]

O tratamento indicado proveniente do diagnóstico neonatal é a indicação de penicilina profilática, utilizada para combater infecções e recomendada para crianças até cinco anos de idade.[21] Muitos estudos têm observado a terapia à base do hidroxiureia[23,24] como a mais adequada, já que ela diminui as crises dolorosas e o sequestro esplênico, aumenta a concentração de hemoglobina por ter afinidade com o oxigênio e leva à redução das transfusões sanguíneas e das hospitalizações decorrentes da doença,[21] porém este medicamento reduz o número de leucócitos na circulação do indivíduo.[24] Há outros modos terapêuticos que também podem ser utilizados para o controle da anemia, inclusive vêm sendo pesquisados os benefícios da suplementação com Vitamina D na doença.[25]

Segundo a literatura, determinadas moléculas estão sendo estudadas e têm apresentado alta potencialidade de modificação química da hemoglobina, o que reduziria o processo de polimerização.[11,13,14] Através das pesquisas também tem sido avaliado que os antioxidantes auxiliam no tratamento da patologia,[26] e o uso de magnésio por meio da via intravenosa auxilia no controle das crises dolorosas agudas, podendo reduzir o período de internação.[14] O zinco[13] e o óxido nítrico também têm mostrado grande potencial para colaborar com o tratamento.[27]

Além destas terapias, uma nova pesquisa tem mostrado a benevolência da transfusão de hemácias rejuvenescidas[28,29], apresentando resultados mais satisfatórios do que a transfusão sanguínea convencional.[30] Porém outro estudo tem apresentado as desvantagens com relação à transfusão, como por exemplo a associação com reação tardia e a sobrecarga de ferro.[31] Outra revisão literária tem mostrado altas propriedades medicinais de *Cajanus cajan* (espécie de feijão) que possui compostos que ajudam a inibir o processo de falcização dos eritrócitos, consequentemente evitando a hemólise destes.[32]

Houve um relato de caso indicando um novo tratamento alternativo de acupuntura a laser para o controle de dores agudas e, neste caso, foi observada uma significativa diminuição dos sintomas iniciais através da utilização dessa terapêutica, concluindo, desta forma, que este processo reduziria o uso de medicamentos analgésicos e, por conseguinte, os efeitos adversos provocados por eles.[33] Foram avaliadas novas terapias que abrangem indução de hemoglobina fetal, inibição do estresse oxidativo, dentre outras que estão relacionadas com a patologia.[34] No demais, é também fundamental o autocuidado do paciente mantendo, por exemplo, alimentação

adequada e cuidando do bem-estar para prevenir agravos da doença com uma equipe de saúde especializada.[35,36]

Estudos também relatam que a presença de infecção urinária é a mais comum em gestantes portadoras de anemia falciforme, sendo seguida pela pneumonia.[37] Desta forma, durante o período gestacional é ainda mais imprescindível que a gestante mantenha seus exames atualizados, tanto pela própria saúde, já que a anemia provoca mais complicações durante esse período, quanto pelo feto, já que ele poderá portar a anemia ou o traço falciforme que é ainda mais comum.[38]

CONCLUSÃO

Em virtude do que foi mencionado, considera-se de maior importância realizar exames periódicos, como por exemplo atualização do hemograma, pois durante a infância a anemia pode se manter assintomática e as complicações imputadas desta também podem permanecer até atingir estágios avançados.[1] Estudos mostram que a taxa de mortalidade em crianças vem reduzindo gradualmente ao longo dos anos, enquanto a taxa dos adultos tem aumentado. Esse aspecto comparava que o diagnóstico ainda neonatal ou durante a infância possibilitava maiores alternativas terapêuticas, enquanto no caso de diagnóstico tardio as opções de tratamento ficam mais delimitadas devido ao estágio avançado da doença.[16,19] O tratamento definitivo para a doença, que é o transplante de medula óssea, ainda é pouco utilizado e possui diversos riscos à saúde do paciente, tornando assim ainda mais necessário o desenvolvimento de novas pesquisas para o controle, diagnóstico e tratamento da patologia,[11] possibilitando desta forma maior sobrevida aos afetados, visto que estes possuem baixa expectativa de vida, que é de aproximadamente 30 a 40 anos.[4]

REFERÊNCIAS

1. Silva CSD, Coelho VAO. Gestação em pacientes portadoras de anemia falciforme. Revista de Patologia do Tocantins 2018; 5(4):64-69.
2. Menezes ASDODP, Len CA, Hilário MOE, Terreri MTRA, Braga JAP. Qualidade de vida em portadores de doença falciforme. Rev Paul Pediatr 2013; 31(1):24-9.
3. Jesus ACDSD, Konstantyner T, Lôbo IKV, Braga JAP. Características socioeconômicas e nutricionais de crianças e adolescentes com anemia falciforme: Uma revisão sistemática. Rev Paul Pediatr 2018; 36(4):491-499.
4. Lorencini GRF, Paula KMPD. Perfil comportamental de crianças com anemia falciforme. Temas psicol 2015; 23(2):269-280.
5. Hsien HC, Carvalhaes JTA, Braga JAP. Pressão arterial em crianças portadoras de doença falciforme. Rev Paul Pediatr 2012; 30(1):87-92.
6. Padua AID, Martinez JAB. Anemia falciforme: uma importante causa potencial de hipertensão pulmonar no Brasil. J Bras Pneumol 2012; 38(1):143-144.
7. Irala LDCP, Rodrigues RL. Avaliação das complicações pulmonares na anemia falciforme em pacientes do Hemocentro – Unicamp. FOCO: Caderno de Estudos e Pesquisas 2017; Capa(13):24-37.
8. Santos AMD, Faro GBDA, Amaral MVMD, Mendonça CDQ, Leal BC, Cipolott R. Alterações retinianas em jovens portadores de anemia falciforme (hemoglobinopatias). Arq Bras Oftalmol 2012; 75(5):313-315.
9. Martins WdA, Mesquita ET, Cunha DMd, Ferrari AH, Pinheiro LAdF, Fº LJMR, Jr. RCP. Alterações Cardiovasculares na Anemia Falciforme. Arq Bras Cardiol 1998; 70(5):365-370.
10. Vicari P, Figueiredo MS. Priapismo na doença falciforme. Rev Bras Hematol Hemoter 2007; 29(3):275-278.
11. Santos JLD, Chin CM. Anemia falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos. Quím Nova 2012; 35(4):783-790.
12. Filho LDAB, Ferrão TDO, França AVC, Rocha RD, Dantas LD, Carvalho LFDP, et al. Sobrecarga de ferro transfusional em portadores de anemia falciforme: comparação entre ressonância magnética e ferritina sérica. Radiol Bras 2011; 44(3):151-155.
13. Datta D, Namazzi R, Conroy AL, Cusick SE, Hume HA, Tagoola A,Ware RE, et al. Zinc for Infection Prevention in Sickle Cell Anemia (ZIPS): study protocol for a randomized placebo-controlled trial in Ugandan children with sickle cell anemia. Trials 2019; 20(460):1-11.
14. Than NN, Soe HHK, Palaniappan SK, Abas AB, Franceschi LD. Magnesium for treating sickle cell disease. Cochrane Database Syst Rev 2017; 2017(4):1-56.
15. Nuzzo DVPD, Fonseca SF. Anemia falciforme e infecções. Jornal de Pediatria 2004; 80(5):347-354.
16. Mendonça AC, Garcia JL, Almeida CM, Megid TBC, Júnior AF. Muito além do "Teste do Pezinho". Rev Bras Hematol Hemoter 2009; 31(2):88-93.
17. Fonseca CSV, Araújo-Melo CA, Carvalho RMD, Barreto-Neto J, Araújo JG, Cipolotti R. Função pulmonar em portadores de anemia falciforme. Rev Paul Pediatr 2011; 29(1):85-90.
18. 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.
19. Sarat CNF, Ferraz MB, Júnior MAF, Filho RACC, Souza ASD, Cardoso AIDQ, Ivo ML. Prevalência da doença falciforme em adultos com diagnóstico tardio. Acta Paul Enferm 2019; 32(2):202-209.
20. Ministério da Saúde. Doença Falciforme – Saúde bucal: Prevenção e cuidado. Brasília, DF: Biblioteca Virtual em Saúde MS; 2014.
21. Coelho JCF. Anemia falciforme e seus métodos de diagnóstico. Anápolis. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Biomedicina] – Anhanguera Educacional; 2018.
22. Cavalcanti JM, Maio MC. Entre negros e miscigenados: a anemia e o traço falciforme no Brasil nas décadas de 1930 e 1940. Hist Cienc Saúde – Manguinhos 2011; 18(2):377-406.
23. Nazon C, Sabo AN, Becker G, Lessinger JM, Kemmel V, Paillard C. Optimizing Hydroxyurea Treatment for Sickle Cell Disease Patients: The Pharmacokinetic Approach. J Clin Med 2019; 8(10):1-10.
24. Guarda CC, Silveira-Mattos PSM, Yahouédéhou SCMA, Santiago RP, Aleluia MM, Figueiredo CVB, Fiuza LM, et al. Hydroxyurea alters circulating monocyte subsets and dampens its inflammatory potential in sickle cell anemia patients. Scientific Reports 2019; 9(14829):1-11.
25. Oliveira JFD, Vicente NG, Santos JPP, Weffort VRS. Vitamina D em crianças e adolescentes com doença falciforme: uma revisão integrativa. Rev Paul Pediatr 2015; 33(3):349-354.
26. Balushi HA, Hannemann A, Rees D, Brewin J, Gibson JS. The Effect of Antioxidants on the Properties of Red Blood Cells From Patients With Sickle Cell Anemia. Front Physiol 2019; 10(976)1-9.

27. Moreira FT, Oliveira CBd, Gomez CM, Bernardo WM. O óxido nítrico inalatório nas crises vaso-oclusivas da anemia falciforme é mais eficaz ou seguro que o tratamento convencional? Rev Assoc Med Bras 2011; 57(3):256-257.
28. Gehrke S, Shah N, Gamboni F, Kamyszek R, Srinivasan AJ, Gray A, Landrigan M, et al. Metabolic impact of red blood cell exchange with rejuvenated red blood cells in sickle cell patients. Transfusion 2019; 59(10):3102-3112.
29. Tanhehco YC, Bhatia M. Hematopoietic stem cell transplantation and cellular therapy in sickle cell disease: where are we now? Curr Opin Hematol 2019; 26(6):448-452.
30. Webb J. The use of rejuvenated red blood cells for transfusion in patients with sickle cell anemia. Transfusion 2019; 59(10):3042-3045.
31. Bernaudin F. Why, Who, When, and How? Rationale for Considering Allogeneic Stem Cell Transplantation in Children with Sickle Cell Disease. J Clin Med 2019; 8(10):1-21.
32. Cordovil K, Cople-Rodrigues CS, Santos IN, Franco ED, Bertolucci SKV. Revisão das Propriedades Medicinais de Cajanus cajanna Doença Falciforme. Rev Bras Plantas Med 2015; 17(4):1199-1207.
33. Marques CVP. Acupuntura a laser no tratamento da dor em criança com anemia falciforme. Relato de caso. Rev Dor 2014; 15(1):70-73.
34. Carden MA, Little J. Emerging disease-modifying therapies for sickle cell disease. Haematologica 2019; 104(9):1710–1719.
35. Cordeiro RC, Ferreira SL, Santos ACDC. Experiências do adoecimento de pessoas com anemia falciforme e estratégias de autocuidado. Acta Paul Enferm 2014; 27(6):499-504.
36. Gomes LMX, Pereira IA, Torres HC, Caldeira AP, Viana MB. Acesso e assistência à pessoa com anemia falciforme na Atenção Primária. Acta Paul Enferm 2014; 27(4):348-355.
37. Nomura RMY, Igai AMK, Tosta K, Fonseca GHHd, Gualandro SFM, Zugaib M. Resultados maternos e perinatais em gestações complicadas por doenças falciformes. Rev Bras Ginecol Obstet 2010; 32(8):405-411.
38. Rosenfeld LG, Bacal NS, Cuder MAM, Silva AGD, Machado ÍE, Pereira CA, Souza MDFMd, Malta DC. Prevalência de hemoglobinopatias na população adulta brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde 2014-2015. Rev Bras Epidemiol 2019; 22(supl.2):1-9.

Técnica do "Chop": protocolo inovador de transporte de amostra de plasma fresco congelado para controle de qualidade

"Chop" technique: innovative protocol for transporting fresh frozen plasma samples for quality control

Adriana Guimarães Estácio[1], Higor Raphael Freitas Lavareda[2], Amanda Larissa Fiqueiredo do Rosário[2], Lacy Cardoso de Brito Junior[3]

[1] Mestre. Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA), Gerente da Gerência de Controle de Qualidade, Biomédica. Belém, PA, Brasil.

[2] Especialista em Hematologia Clínica com ênfase em Citologia Hematológica, Centro Universitário Faculdade Integrada Brasil Amazônia, Biomédico(a). Belém, PA, Brasil.

[3] Doutor / Universidade Federal do Pará – Professor / Pesquisador. Belém, PA, Brasil.

Resumo

Objetivo: Descrição e validação de um novo protocolo de congelamento individual de amostras de plasma fresco congelado (PFC), técnica do "Chop" (sacolé), para o transporte de longas distâncias. *Método:* Baseia-se na adição de alíquota de 3mL de PFC em um tubo de ensaio seco com tampa, seguida de armazenamento do mesmo em um saco plástico de polietileno, padrão "chop" (sacolé), com retirada do ar e amarração superior; introdução desse conjunto em um copo plástico descartável de 200mL; posterior contenção da estrutura do tubo e saco plástico ao copo com fita adesiva de papel; e, por fim, preenchimento do copo com água e congelamento a -20°C por 24 horas. A validação foi realizada em duas etapas: uma randômica, para determinar o tempo máximo de estabilidade e de conservação das amostras através das dosagens do teor de fator VIII (FVIII:C) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa); e a outra em tempo real, através da avaliação do TTPa após transporte entre duas unidades da hemorrede estadual. *Resultados:* A validação randômica revelou perda média de ≤ 20% de FVIII:C para transportes que não ultrapassem 8 horas. Na validação em tempo real as amostras foram transportadas entre os hemocentros regionais de Marabá ou Santarém e o hemocentro coordenador em Belém, com as dosagens de TTPa mostrando resultados semelhantes aos do estudo randômico. *Conclusão:* A técnica do "Chop" mostrou-se eficiente em manter a estabilidade da estrutura de gelo e das amostras de PFC durante o transporte por até 8 horas, com perda média de FVIII:C ≤ 20%.

Palavras-chave: Plasma; Estudo de Validação; Controle de Qualidade; Fator VIII.

Abstract

Objective: Description and validation of a new individual freezing protocol of frozen fresh plasma samples (FFPS), "Chop" technique (sacolé) for the transport of long distances. *Methods:* It is based on the addition of 3ml FFPS aliquot in a dry test tube with stored covers of the same in a plastic polyethylene bag, standard "chop" (sacolé), with air withdrawal and upper mooring; introduction of that set in a disposable plastic cup of 200ml; posterior containment of the tube structure and plastic bag to the glass with paper adhesive tape; and filling the glass with water and freezing at -20°C per 24 hours. Validation was carried out in two stages: a random to determine the maximum stability and storage time of the samples through the dosages of the factor VIII (FVIII: C) and the activated partial thromboplastin time (APTT); and another real-time, through the evaluation of APTT after transport between two units of the state hemorrhide. *Results:* Random validation revealed average loss of ≤ 20% of FVIII: C for transportation that did not exceed 8 hours. In real-time validation the samples were transported between the regional hemocenters of Marabá or Santarém and the coordinator hemocenter in Bethlehem, with APTT dosages showing results similar to those of the random study. *Conclusion*: The "chop" technique was efficient in maintaining the stability of the ice structure and FFPS samples during transport for up to 8 hours, with a mean loss of FVIII: C ≤ 20%.

Keywords: Plasma; Validation Study; Quality Control; Factor VIII.

Correspondência
Lacy Cardoso de Brito Junior
E-mail: lcdbrito2@gmail.com

Recebido em 26/07/2021 | Aprovado em 10/03/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202202169

INTRODUÇÃO

O plasma humano é constituído basicamente de água, proteínas (albumina, globulinas, fatores de coagulação, entre outras), carboidratos e lipídios. Sua constituição permite a produção de diversos produtos de uso na prática médica, como hemocomponente e hemoderivado. Em especial o hemocomponente chamado plasma fresco congelado (PFC) pode ser produzido por processo de centrifugação de uma unidade de sangue total ou por extração direta do paciente através do método de aférese. Nos dois casos, o hemocomponente produzido deve ser submetido a congelamento em -20ºC (ou temperaturas inferiores), entre 8 horas e 24 horas após a coleta, e mantido sob as mesmas condições afim de manter a estabilidade dos fatores de coagulação.[1-4]

O PFC, em função das suas características bioquímicas, pode ter o seu uso terapêutico associado a pelo menos três condições específicas, como bolsas de plasma convalescente rico em anticorpos neutralizantes para uso em pacientes graves no curso da Covid-19;[5-7] fracionado a crioprecipitado rico em fator VIII:C da coagulação para uso em pacientes deficientes desse fator; ou ainda para ser beneficiado na indústria para a produção de medicamentos (hemoderivados).[1,3,4]

Especificamente em relação ao uso terapêutico das bolsas de PFC para o tratamento de distúrbios da coagulação é necessário, porém, após o descongelamento das bolsas, garantir a qualidade desse produto mediante testes laboratoriais de controle de qualidade para a determinação do teor de fator VIII da coagulação (FVIII:C) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Segundo a legislação brasileira vigente, essa prática é realizada de forma amostral de pelo menos 1% da produção mensal de PFC ou de 10 unidades/mês produzidas.[2,3,8] Os resultados desses testes, contudo, podem ser prejudicados quando as amostras de bolsas de PFC a serem testadas precisam ser transportadas de uma unidade hemoterápica para outra, seja pelas grandes distâncias a serem percorridas, por falhas nas condições de acondicionamento das amostras ou mesmo em função do tipo de transporte (aéreo ou terrestres) das mesmas, ocasionando o decréscimo de FVIII:C na amostra em função de descongelamento da amostra.[8]

Este cenário é bem evidenciado, por exemplo, na hemorrede do estado do Pará, onde as condições geográficas, grandes distâncias intermunicipais e a logística de transporte aéreo diário são os grandes desafios para manter a qualidade das amostras de PFC transportadas entre as unidades da hemorrede estadual e o hemocentro coordenador (Fundação HEMOPA). Sendo essa também a realidade de tantas outras unidades da federação em todo o País.

Assim, o objetivo deste estudo foi promover a descrição e validação de um novo protocolo de congelamento individual de amostras de plasma fresco congelado (PFC), técnica do "Chop" (sacolé), para o transporte de longas distâncias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização do estudo

Estudo metodológico de descrição e validação randomizada e em tempo real da técnica do "Chop" (sacolé) de transporte de amostras de PFC destinadas a teste de controle de qualidade entre unidades da hemorrede do estado do Pará a ser implantada na Fundação HEMOPA.

Descrição da técnica do "Chop"

Baseou-se na criação de metodologia inovadora e de baixo custo para o transporte de amostras de PFC destinadas a teste de controle de qualidade entre unidades de uma hemorrede. Para tanto, primeiro realizou-se o descongelamento de quatro unidades de bolsa de PFC em banho-maria a 37°C (+/-1ºC), com posterior coleta de 3mL de amostras de cada uma das bolsas em tubos de ensaio de vidro de dimensões de 12x75mm com tampas devidamente identificados.

Em seguida cada tubo tampado foi armazenado individualmente em um saco plástico de polietileno de dimensões de 6x24cm, padrão "Chop" (sacolé), sendo retirado todo o ar do saco e feita uma amarração na extremidade aberta do mesmo. Em seguida esse conjunto tubo-saco foi colocado dentro de um copo plástico descartável com capacidade de 200mL que, por sua vez, foi envolto com fita adesiva de papel desde a parte superior da tampa do tubo até o fundo do copo, dando-se uma volta completa da fita sobre este conjunto tubo-copo, com o intuito de fixar o tubo a 90º em relação ao fundo do copo. Posteriormente, esse conjunto tubo-copo foi preenchido com água até o volume máximo do copo e submetido a congelamento em temperatura -20°C por, no mínimo 24 horas para a formação de bloco de gelo que envolveu o tubo com a amostra de PFC.

Embalagem de transporte

As amostras de PFC já congeladas através da técnica do "Chop" foram então colocadas em uma embalagem secundária de isopor de tamanho médio, com capacidade de 8 litros e dimensões externas de 286x204x244mm e dimensões internas de 250x168x202mm, contendo quatro unidades de

gelox distribuídas da seguinte forma: uma unidade de gelox no fundo do isopor e sobre essa uma folha de papelão ou isopor fino; duas unidades de gelox nas paredes laterais de maior extensão da caixa de isopor; e por fim uma folha de papelão ou isopor fino que foi colocada sobre as amostras seguida da última unidade de gelox. Posteriormente, essa embalagem de isopor foi tampada, vedada com fita gomada transparente e acondicionada em uma embalagem terciária rígida de papelão de dimensões externas de 286x204x244mm que foi submetida a validação de transporte em tempo real.

Validação da técnica do "Chop"

Para a validação da técnica primeiro foi feita a validação do tempo máximo de estabilidade e de conservação das amostras de modo a simular de forma randômica o transporte de amostra de PFC. Para tanto, o tempo máximo de conservação das amostras foi testado com quatro amostras de bolsas de PFC descongeladas e armazenadas em tubos em duplicatas (n=50). O primeiro tubo de cada amostra, identificado como "tubo A", foi submetido aos testes de dosagens do teor de FVIII:Ce TTPa de forma imediata; enquanto o segundo tubo de cada amostra, identificado como "tubo B", foi submetido a congelamento pela técnica do "Chop" para dosagem posterior.

Em seguida, as quatro amostras dos "tubos B", já congeladas pela técnica do "Chop" e embaladas conforme descrito, foram colocadas na embalagem secundária de isopor contendo agora um termômetro digital externo com sensor de temperatura acoplado à parede interna da embalagem de modo a garantir o controle de temperatura desse conjunto hora a hora. E ainda a identificação do momento exato do início do descongelamento e o tempo máximo de conservação das amostras de PFC congeladas pela técnica do "Chop".

Depois dessa etapa foi realizada a validação em tempo real do transporte das amostras de PFC congeladas pela técnica do "Chop" através do transporte de amostras entre os Hemocentros Regionais de Marabá e de Santarém, que tem transporte aéreo e as maiores distâncias a serem percorridos, 441km e 697km, além do maior tempo entre a entrega das amostras, transporte e o recebimento das mesmas no hemocentro coordenador da Fundação HEMOPA.

Nesta validação, após o recebimento das amostras de PFC congeladas pela técnica do "Chop", foi realizada a inspeção visual da integridade do conjunto do copo-tubo em relação à qualidade da estrutura de gelo e do congelamento da amostra. Posteriormente, procedeu-se à avaliação da qualidade do plasma recebido através da dosagem TTPa.

Metodologia de determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e dosagem de fator VIII da coagulação (FVIII:C)

As dosagens de TTPa e de teor FVIII:C foram realizadas por metodologia automatizada com o uso dos quites STA®-PTT Automate 5e STA®-Immuno Def VIII, Stago® (Paris, França), através do equipamento STA Compact. Contudo, como não existe um valor de referência para a avaliação da conformidade de TTPa no PFC na legislação brasileira, foi realizado o que preconiza o Ministério da Saúde,[8] isto é, a obtenção do valor de testemunho normal para o TTPa através da dosagem de um *pool* de PFC acrescido de 20% do valor encontrado. Assim, para este estudo adotou-se como testemunho normal para o TTPa o intervalo de 35 a 42 segundos.

Análise estatística

As determinações de médias, desvio padrão, máximos e mínimos foram realizadas através do software Graph Pad Prism 5.0.

RESULTADOS

No Quadro 1 estão apresentados os resultados da validação randômica para as condições de tempo máximo de estabilidade da estrutura de gelo e da conservação das amostras de PFC congeladas pela técnica do "Chop". Como resultados dessa validação foi observado que a estrutura de gelo e a conservação das amostras congeladas pela técnica do "Chop" são mantidas estáveis por até 8 horas.

No Quadro 2, por sua vez, são apresentados os resultados de teor de FVIII:C entre os tubos A e B do processo de validação randomizada para a definição da perda de FVIII:C pós-descongelamento. Tendo sido observado que para o tempo máximo de 8 horas a perda do teor FVIII é em média de 20%.

Já no Quadro 3 são apresentados os resultados da estabilidade das amostras de PFC congeladas pela técnica do "Chop" que foram submetidas à validação em tempo real através de transporte de amostras entre os Hemocentros Regionais de Marabá ou Regional de Santarém e o hemocentro coordenador da Fundação HEMOPA, em Belém. Para tanto, foram realizadas as dosagens de TTPa de todas as amostras em relação ao tempo máximo de transporte validado de 8 horas. Para esta etapa não foram realizadas as dosagens do teor de FVIII:C por não serem essas dosagens parte da rotina dessa Fundação HEMOPA.

Quadro 1

Resultado do tempo máximo de estabilidade da estrutura de gelo e de conservação das amostras de PFC congeladas pela técnica do "Chop" utilizadas na validação randômica de transporte.

Tempo Decorrido	Temperatura Interna do Isopor	Estado da Amostra e da Estrutura de Gelo
No momento do armazenamento	-25°C	Congelada
1 hora após	-25°C	Congelada
2 horas após	-25°C	Congelada
3 horas após	-24°C	Congelada
4 horas após	-23°C	Congelada
5 horas após	-23°C	Congelada
6 horas após	-21°C	Amostra congelada com bloco de gelo iniciando descongelamento
7 horas após	-20°C	Amostra congelada com bloco de gelo iniciando descongelamento
8 horas após	-20°C	Amostra congelada com bloco de gelo iniciando descongelamento
9 horas após	-18°C	Amostra descongelada com bloco de gelo diminuído de volume

Fonte: Gerência de Controle de Qualidade da Fundação HEMOPA.

Quadro 2

Resultado das dosagens de TTPa e do teor FVIII:C das amostras de PFC congeladas pela técnica do "Chop" utilizadas na validação randômica.

Amostra	Tubo A FVIII:C (UI/mL)	Tubo B FVIII:C (UI/mL)	Perda de FVIII (%)	Recuperação de FVIII:C (%)	Tubo A TTPa (seg)	Tubo B TTPa (seg)
1	1,00	0,90	10	90	37,1	42,4
2	0,90	0,70	22	78	39,3	44,5
3	1,50	1,20	20	80	35,0	37,6
4	1,60	1,30	19	81	38,8	47,5
Média	1,20	1,00	17,7	82,2	37,5	43
Mínimo	0,90	0,70	10	78	35,0	37,6
Máximo	1,60	1,30	22	90	39,3	47,5
Referência*	[3]0,70 UI/mL	[3]0,70 UI/mL	----	----	----	----
Testemunho Normal	----	----	Até 20%	[3]75%	35-42 seg	

Fonte: Gerência de Controle de Qualidade da Fundação HEMOPA.

Legenda: FVIII:C– teor de Fato VIII; TTPa - tempo de tromboplastina parcial ativado; seg – segundo; % - valor relativo; *Dados extraídos da Portaria de Consolidação nº 05/2017 (MS/Brasil).

Quadro 3

Resultados das dosagens de TTPa referentes às amostras de PFC congeladas pela técnica do "Chop" utilizadas na validação em tempo real para as condições de transporte do Hemocentro Regional de Marabá (HRM), do Hemocentro Regional de Santarém (HRS) para o hemocentro coordenador da Fundação HEMOPA em Belém, Pará.

HRM	**Amostras**	**1**	**2**	**3**	**4**	**Testemunho Normal**
	TTPa (seg)	46,5	58,7	48,2	44,3	36,5-44 seg
HRS	Amostras	1	2	3	4	
	TTPa (seg)	46,5	58,7	48,2	44,3	

Fonte: Gerência de Controle de Qualidade da Fundação HEMOPA.

Legenda: TTPa - tempo de tromboplastina parcial ativado; seg - segundo.

DISCUSSÃO

A Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017,[8] no item que trata sobre a prática de controle de qualidade de bolsas de PFC, estabelece que esses testes devem ser realizados em 1% da produção mensal ou dez unidades/mês,[2,3,8] e deve obedecer a percentual mínimo de conformidade ≥75% em relação ao quantitativo do teor de Fator VIII (FVIII:C), Fator V da coagulação e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).[8,9]

Essa realidade, porém, fica prejudicada quando os testes de controle de qualidade nessas amostras precisam ser realizados em uma unidade hemoterápica diferente da que produziu a bolsa de PFC, com condições geográficas, de logística e tempo de transporte desafiadoras. Nesse sentido, a Portaria Conjunta Anvisa/SAS nº 370 de 7 de maio de 2014[10] foi criada para dispor sobre o Regulamento Técnico-Sanitário para o transporte de sangue e componentes, e ainda assim, mesmo que todos os procedimentos preconizados nessa portaria sejam observados, não fica claro qual a melhor embalagem secundária ou terciária para o transporte de amostras congeladas, a temperatura ideal de conservação e nem o tempo máximo que essas embalagens conseguem manter a amostra viável para os testes de controle de qualidade.

Diante desse cenário, criamos uma embalagem primária, técnica do "Chop" (sacolé), que permite o transporte das amostras de PFC congeladas entre unidades hemoterápicas distantes por até 8 horas de transporte, sem descongelamento da estrutura de gelo ou da amostra a ser submetida a dosagens do teor de FVIII:C e TTPa para controle de qualidade. Sendo ainda evidenciado que a perda de teor de FVIII:C nas amostras acondicionadas através da técnica do "Chop" (sacolé) tende uma perda de teor de FVIII:C de 20%, o que está em consonância com a legislação vigente.[8]

Outra vantagem oferecida com a utilização da técnica do "Chop" (sacolé) de transporte de amostras de PFC para testes no controle de qualidade é que a embalagem primária, nesse caso, composta pelo conjunto tubo com amostra – saco plástico – copo plástico com estrutura de gelo, impede o vazamento da amostra para a embalagem secundária ou intermediária, garantindo assim a integridade e a estabilidade da amostra.

Na literatura, porém, são escassos os trabalhos que versam sobre esse tema. Um dos poucos estudos que encontramos que avaliam o transporte de unidades de PFC para a indústria farmacêutica como insumo para produção de medicamentos hemoderivados foi o de Adati et al.,[11] que analisaram apenas indicadores do processo de obtenção das unidades de PFC como: validação do processo de congelamento e o tempo e a temperatura praticados entre a coleta do sangue total e o congelamento das unidades de PFC,[12-15] ao passo que a metodologia de transporte das unidades de PFC se baseou no acondicionamento das unidades de PFC de forma individual em sacos plásticos munidos de fecho hermético em caixas de material rígido e gelo reciclável visando à manutenção das amostras e seguindo o recomendado na Portaria Conjunta Anvisa/SAS nº 370.[10]

Esses autores, contudo, não avaliaram a temperatura do transporte de amostras como fator crítico para os resultados de teor de Fator VIII:C, e desse modo apenas 38,5% (131) das unidades de PFC analisadas puderam ser consideradas conformes, com teor de Fator VIII:C recuperado ≥0,70 UI/mL, para uso como insumo farmacêutico. Isso sugere que possivelmente as embalagens secundárias, terciárias e quaternárias poderiam ter influenciado no baixo número de unidades de PFC com teor de FVIII:C dentro do esperado.

CONCLUSÃO

A descrição e a validação do protocolo de congelamento individual de amostras de plasma fresco congelado (PFC), técnica do "Chop" (sacolé), para o transporte de longas distâncias aqui propostas mostraram-se eficientes em manter a estabilidade da estrutura de gelo e as amostras de PFC congeladas por até 8 horas de transporte, com perda média do teor de FVIII de 20%, demonstrando assim a sua viabilidade para uso entre unidades da federação brasileira que tenham características geográficas e de logística semelhantes à da hemorrede do estado do Pará.

REFERÊNCIAS

1. Sousa RL, Ferreira LC, Garcia FL, Franco LHM, Alves LL. Plasma fresco congelado, plaquetas e crioprecipitado: quando e como usar. Hospital Madre Teresa, Belo Horizonte, MG, Brasil. Rev Méd Minas Gerais. 2014;24(Supl.8):S81-S86. doi: 10.5935/2238-3182.20140131.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação no 05 de 28/09/2017, do Ministério da Saúde. Brasília: Diário Oficial da União, 2017.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Guia para uso de hemocomponentes, 2. ed., 1. Reimp. Brasília, 2015. 136p.
4. Campos LR, Cerqueira AJB, Campos CJB, Souza JGBP, Novello R, Pessôa VLR, Feitosa ACF. Transfusão de hemocomponentes em crianças: o quê, quando e como usar? Resid Pediatr. 2015;5(1):14-20. doi: https://doi.org/10.25060/residpediatr-2015.v5n1-03.
5. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al. China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. N Engl J Med. 2020;28. doi: 10.1056/NEJMoa2002032.

6. Chenguang Shen, Zhaoqin Wang, Fang Zhao, Yang Yang, Jinxiu Li, Jing Yuan, et al. Treatment of 5 Critically Ill Patients WithCOVID-19 With Convalescent Plasma. JAMA. 2020;323(16):1582-89.
7. Roback JD, Guarner J. Convalescent Plasma to Treat COVID-19 Possibilities and Challenges. JAMA. 2020;323(16):1561-2.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Manual de vigilância sanitária para o transporte de sangue e componentes no âmbito da hemoterapia. 2. ed. Brasília, DF: MS; 2016.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 34, de 11 de junho de 2014. Dispõe sobre as boas práticas no ciclo do sangue. Diário Oficial União, nº113, de 16 de junho de 2014.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Secretaria de Atenção a Saúde – SAS. Portaria conjunta Anvisa/ SAS nº 370, de 07 de maio de 2014. Dispõe sobre o regulamento técnico sanitário para transporte de sangue e componentes. Diário Oficial União. 8 de maio de 2014.
11. Adati MC, Almeida AECC, Ribeiro AS, Balthazar HC, Borges G, Issobe MAS. Plasma fresco congelado: insumo farmacêutico para produção de medicamentos hemoderivados. Vigil. sanit. debate 2019;7(2):51-61. https://doi.org/10.22239/2317-269x.01283.
12. Farrugia A. Plasma for fractionation: safety and quality issues. Haemophilia. 2004;10(4):334-40. https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2004.00911.
13. Naghadeh HT, Roudkenar MH. A study of the quantity of some stable and labile coagulation factors in freshfrozen plasma produced from whole blood stored for 24 hours in Iran. Blood Transfus. 2009;7(1):39-42. https://doi.org/10.2450/2008.0022-08.
14. Cardigan R, Lawrie AS, Mackie IJ, Williamson LM. The quality of fresh-frozen plasma produced from whole blood stored at 4ºC overnight. Transfusion. 2005;45(8):1342-8. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.00219.x.
15. Cardigan R, Van der Meer PF, Pergande C, Cookson P, Baumann-Baretti B, Cancelas JA et al. Coagulation factor content of plasma produced from whole blood for 24 hours at ambient temperature: results from an international multicenter BEST Collaborative study. Transfusion. 2011;51 (Supl.1); s50-7. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02963.

Resultados histopatológicos frente à presença de ASC-US pela citologia de Papanicolaou no rastreio do câncer cervical

Histopathological results against the presence of ASC-US by Papanicolaou cytology in the screening of cervical cancer

Ednéia Peres Machado[1], Gabriela Livai Fagundes[2], Andrea Timóteo dos Santos Dec[3], Ana Paula Xavier Ravelli[4]

[1] Profa. Assistente – Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa, PR, Brasil.

[2] Acadêmica de Farmácia – Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa, PR, Brasil.

[3] Profa. Dra. Adjunta – Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa, PR, Brasil.

[4] Profa. Dra. Adjunta – Universidade Estadual de Ponta Grossa, vinculada ao Departamento de Enfermagem e Saúde Pública. Ponta Grossa, PR, Brasil.

Resumo

Objetivo: Avaliar a correspondência citológica de laudos classificados como células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) frente aos seus resultados na histopatologia. *Métodos:* Estudo transversal, quantitativo e descritivo de exames citológicos e histopatológicos no rastreio do câncer do colo do útero, no município de Ponta Grossa, Paraná, de 2014 a 2020. Foram incluídos neste trabalho os exames citopatológicos que tiveram seguimento com anatomopatologia. Os dados foram extraídos do SISCAN. *Resultados:* Sendo ASC-US dúvida citológica, teoricamente deveria corresponder, no máximo, à histologia NIC I, e este estudo observou que mais de 50% dos resultados ASC-US remeteram ao seguimento histológico NIC II/NIC III com ou sem extensão glandular. *Conclusão:* O diagnóstico citológico ASC-US pode causar um impacto negativo para a saúde da paciente. Portanto, é crucial a discussão dos vários fatores que influenciam o diagnóstico citológico ASC-US e sua correspondência com o teste de papilomavírus humano (HPV).

Palavras-chave: Células Escamosas Atípicas do Colo do Útero; Teste de Papanicolaou; Neoplasias do Colo do Útero

Abstract

Objective: This study aimed to evaluate the cytological correspondence of reports classified as ASC-US against their results in histopathology. *Methods:* Cross-sectional, quantitative and descriptive study of cytological and histopathological exams in the screening of cervical cancer in the city of Ponta Grossa, Paraná, from 2014 to 2020. The cytopathological exams that were followed up with anatomopathology were included in this work. Data were extracted from SISCAN. *Results:* As ASC-US is cytologically doubtful, theoretically it should correspond to at most the NIC I histology, and this study observed that more than 50% of the ASC-US results referred to the NIC II/NIC III histological follow-up with or without gland extension. *Conclusion:* The ASC-US cytological diagnosis can have a negative impact on the patient's health. Therefore, it is crucial to discuss the various factors that influence ASC-US cytological diagnosis and its correspondence with the HPV.

Keywords: Atypical Squamous Cells of the Cervix; Papanicolaou Test; Uterine Cervical Neoplasms

Correspondência
Ednéia Peres Machado
E-mail: edpmach@gmail.com

Recebido em 18/10/2021 | Aprovado em 10/03/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202202191

INTRODUÇÃO

Segundo a estimativa mundial, em 2018 ocorreram 18 milhões de casos novos e 9,6 milhões de óbitos por câncer. Neste contexto, o câncer do colo do útero foi o quarto mais frequente, com uma estimativa de 570 mil casos novos, representando 3,2% de todos os cânceres.[1] Na população brasileira, entre 2020 e 2022, é estimada a ocorrência de 625 mil casos novos de câncer. Desse total, estima-se que 16.590 serão de câncer do colo do útero, caracterizando o quarto mais incidente, atingindo 7,4% das mulheres no país.[2]

No Brasil, os indicadores do Programa de Prevenção do Câncer do Colo do Útero e Mama são acompanhados pelo Sistema de Informação do Câncer (SISCAN), cujo trabalho de rastreio do câncer do colo do útero apoia-se no exame convencional de Papanicolaou.[3] Os laudos são baseados no Sistema Bethesda,[3] cuja proposta terminológica visa à comunicação adequada, relevante para o clínico, reprodutível e adaptável à grande variedade de laboratórios e configurações geográficas integrando-se aos avanços da prática laboratorial.[4]

O Sistema Bethesda classifica a lesão intraepitelial escamosa (SIL) em duas gradações: baixo (LSIL) referente a NIC I, e alto grau (HSIL), referente a NIC II, NIC III/*in situ*, e carcinoma invasor (CA). Essa classificação de lesão celular busca refletir os diferentes estados biológicos na infecção pelo HPV de acordo com lesões celulares significativas para maior risco de transição para pré-câncer e câncer.[4] As limitações inerentes à interpretação morfológica receberam destaque no Sistema Bethesda com a introdução do termo ASC-US, atipia em células escamosas de significância indeterminada e ASC-H, atipia em células escamosas não podendo excluir HSIL. Essa terminologia é considerada adequada para as lesões relacionadas ao HPV, na qual alterações celulares de baixo grau representam infecção transitória e lesões de alto grau uma lesão pré-cancerosa oriunda da persistência viral.[4]

A implantação do termo ASC-US refere-se a alterações celulares duvidosas sugestivas de lesão escamosa de baixo grau, contudo os critérios citológicos são insuficientes para a definitiva interpretação. Além do mais, condições diversas podem promover alterações citológicas do tipo ASC-US como inflamação, secagem ao ar da lâmina, atrofia com degeneração, efeitos hormonais e outros artefatos.[4]

A classificação ASC-US requer a diferenciação do epitélio escamoso em células compatíveis com superficiais ou intermediárias, aumento da relação núcleo-citoplasma, com núcleo aumentado em 2,5 a 3 vezes o tamanho comparado a uma célula intermediária, com alterações nucleares mínimas que incluem hipercromasia discreta, distribuição irregular da cromatina, anisocariose discreta, cromatina em grumos, multinucleação, anormalidade nuclear associada à presença de citoplasma denso de tonalidade alaranjada (paraqueratose ou hiperqueratose), presença de alterações sugestivas de coilócitos, como halos perinucleares sugerindo coilócitos incompletos ou mal definidos.[4]

Além disso, ASC-US pode caracterizar-se num achado de células redondas ou ovais com aproximadamente 1/3 do tamanho das células superficiais, comparáveis a células metaplásicas grandes ou células intermediárias de camadas mais profundas. Ressalta-se que a categoria ASC envolve a interpretação do esfregaço como um todo e não a avaliação exclusivamente de células individuais.[4]

A prevalência de ASC-US é frequente em mulheres mais jovens, por isso, ter em mãos os dados clínicos da paciente, como idade e histórico de citologias anteriores, o teste DNA para HPV de alto risco, assim como a revisão microscópica por mais de um citologista, auxilia na interpretação final do exame.[4] Há uma preocupação quanto aos elevados índices de falsos negativos e positivos, sendo ASC-US as atipias predominantes e em excesso nos diagnósticos citológicos.

De acordo com as recomendações de Bethesda, o percentual de atipias indeterminadas não deve representar 5% do número total de casos de um laboratório, ou duas a três vezes o número de casos de lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) no período de um ano em determinado serviço. Por isso, é importante que os laboratórios de citopatologia estejam comprometidos com programas de controle de qualidade sobre laudos citológicos na prevenção do câncer do colo de útero, em busca de melhor qualidade na análise citológica.[3]

A experiência relata que o termo "significado indeterminado" para ASC-US se mostra adequado já que é uma dúvida citológica que sugere LSIL e que, na histologia, deve corresponder a, no máximo, NIC I. Entretanto, em 10% a 20% dos casos a histopatologia demonstra a presença de NIC II ou NIC III.[3] Sendo assim, este trabalho tem por objetivo avaliar a correspondência citológica de laudos classificados como ASC-US frente aos seus resultados na histopatologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal, quantitativo e descritivo, no qual foram analisados dados relativos aos exames citológicos e histopatológicos realizados no rastreio do câncer

do colo do útero no município de Ponta Grossa, Paraná, nos anos de 2014 a 2020. Foram incluídos neste trabalho os resultados dos exames citopatológicos que tiveram seguimento com anatomopatologia. Estes dados foram obtidos do Sistema de Informação do Câncer (SISCAN). Os dados foram tabulados em planilha Excel® (Microsoft) e a estatística realizada por frequência simples.

A triagem dos dados demonstrou que o algoritmo do rastreio do câncer cervical apresentou distorções, uma vez terem sido realizados 211 (42%) exames histológicos sem citologia prévia. Assim, este estudo excluiu das análises os casos sem registro de exame citológico anterior à histologia, sendo estabelecido um n=289.

ÉTICA

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa, com Parecer Consubstanciado nº 4.259.158 de 04/09/2020.

RESULTADOS

No município de Ponta Grossa, no período de 2014 a 2020, foram realizados 96.784 exames citopatológicos e 500 (0,52%) histopatológicos, cujos dados detalhados encontram-se na Tabela 1.

Neste trabalho foram analisados os resultados de exames de 289 pacientes que possuíam laudos citopatológicos e histopatológicos. Dos 289 exames citológicos encaminhados para biópsia no período pesquisado, 87 (30,1%) foram negativos para malignidade. Contudo, ao realizar busca retroativa desses exames, verificou-se que 37 desses resultados negativos realizados no mesmo ano da histopatologia apresentaram laudos citológicos anormais no ano anterior, correspondendo ao que é proposto pelo algoritmo de seguimento de casos positivos no rastreio do câncer cervical no Brasil. Desta forma, os resultados negativos de fato foram considerados em 50 (17,3%) amostras.

Assim, dos exames citológicos encaminhados para biópsia no período pesquisado, 50 (17,3%) foram negativos para malignidade. Entre os demais 239 foram classificados: 40 (13,84%) ASC-US, 66 (22,84%) ASC-H, 17 (5,88%) LSIL, 115 (39,79%) HSIL e 1 (0,35%) AIS.

Os resultados histopatológicos mostraram que 1 (0,35%) caso foi não conclusivo e 3 (1,05%) casos foram negativos. Dentre as diversas observações foram encontrados 54 (18,7%) casos de cervicites/metaplasia/hiperplasia/pólipo, 17 (5,88%) NIC I, 42 (14,5%) NIC II/extensão glandular foram 152 (52,6%) NIC III/extensão glandular, 17 (5,88%) carcinoma e 3 (1,0%) AIS/*in situ*/invasor.

Sendo ASC-US dúvida citológica, teoricamente deveria corresponder a, no máximo, a histologia NIC I, entretanto este estudo observou que 21, ou seja, mais de 50% dos resultados ASC-US remeteram ao segmento histológico a NICII/NICIII com ou sem extensão glandular.

Foi observado também, e relevante de nota, que 25 amostras (50%) apresentaram alteração histopatológica, das quais 1 (2%) resultou em anatomopatologia NIC I, 22 (44%) citologias negativas resultaram em anatomopatológico com alterações NIC I e NIC II/ III com ou sem extensão glandular, 1 (2%) carcinoma cervical e 1 (2%) adenocarcinoma *in situ* (AIS).

Já o diagnóstico citológico ASC-H mostrou-se bastante assertivo frente à histologia, com 51 (77%) dos resultados histológicos correspondendo a NIC II/III, sendo observado também em ASC-H 4 (6,0%) casos de carcinoma cervical e 1 (1,5%) AIS invasor. A correlação entre os exames citológicos e os resultados histopatológicos em número absoluto encontra-se na Tabela 2, e em percentual na Tabela 3.

Das 17 (5,88%) leituras citológicas correspondentes a LSIL, que teoricamente deveriam remeter à NIC I, 3 (17,6%) apresentaram esse resultado histológico esperado e 13 (76,5%) a anatomopatologia relatou NIC II/III com ou sem extensão glandular.

Tabela 1

Total de exames citopatológicos e histopatológicos realizados no município de Ponta Grossa no período de 2014 a 2020

Ano	Exames Citopatológicos	Exames Histopatológicos	
		N absoluto	%
2014	11.731	89	0,76
2015	17.760	124	0,7
2016	19.469	81	0,42
2017	14.964	85	0,57
2018	12.863	44	0,34
2019	13.350	56	0,42
2020	6.647	21	0,31
Total	**96.784**	**500**	**0,52**

Fonte: SISCAN.

Tabela 2

Correlação entre 289 exames citopatológicos e histológicos realizados no município de Ponta Grossa no período de 2014 a 2020 no rastreio do câncer do colo do útero em números absolutos.

Resultado do Exame Histopatológico	Resultado do Exame Citológico						
	Negativo	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	AIS	Total
Não conclusivo	0	0	0	0	1	0	**1**
Negativo	1	1	1	0	0	0	**3**
Cerv/endoc crônica*	2	3	1	0	1	0	**7**
Cerv/endoc crônica M E**	10	5	3	0	6	0	**24**
Cerv/endoc crônica H ME***	2	1	1	1	3	0	**8**
Hiperplasia	2	3	0	0	1	0	**6**
Pólipo	8	0	0	0	1	0	**9**
NIC I	1	6	4	3	3	0	**17**
NIC II	4	6	13	4	12	0	**39**
NIC II com extensão glandular	0	0	1	1	1	0	**3**
NIC III	6	3	20	2	20	0	**51**
NIC III com extensão glandular	12	12	17	6	54	0	**101**
Carcinona	1	0	4	0	12	0	**17**
Adenocarcinoma *in situ*	1	0	0	0	0	1	**2**
Adenocarcinoma invasor	0	0	1	0	0	0	**1**
Total	**50**	**40**	**66**	**17**	**115**	**1**	**289**

Fonte: SISCAN. (*) = cervicite/endocervicite crônica; (**) = cervicite/endocervicite crônica com metaplasia escamosa; (***) = cervicite/endocervicite crônica com hiperplasia e metaplasia escamosa.

Tabela 3

Correlação entre 289 exames citopatológicos e histológicos realizados no município de Ponta Grossa no período de 2014 a 2020 no rastreio do câncer do colo do útero em porcentagem.

Resultado do Exame Histopatológico	Resultado do Exame Citológico						
	Negativo	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	AIS	Total
Não conclusivo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35	0,00	**0,35**
Negativo	0,35	0,35	0,35	0,00	0,00	0,00	**1,04**
Cerv/endoc crônica*	0,69	1,04	0,35	0,00	0,35	0,00	**2,42**
Cerv/endoc crônica M E**	3,46	1,73	1,04	0,00	2,08	0,00	**8,30**
Cerv/endoc crônica H ME***	0,69	0,35	0,35	0,35	1,04	0,00	**2,77**
Hiperplasia	0,69	1,04	0,00	0,00	0,35	0,00	**2,08**
Pólipo	2,77	0,00	0,00	0,00	0,35	0,00	**3,11**
NIC I	0,35	2,08	1,38	1,04	1,04	0,00	**5,88**
NIC II	1,38	2,08	4,50	1,38	4,15	0,00	**13,49**
NIC II com extensão glandular	0,00	0,00	0,35	0,35	0,35	0,00	**1,04**
NIC III	2,08	1,04	6,92	0,69	6,92	0,00	**17,65**
NIC III com extensão glandular	4,15	4,15	5,88	2,08	18,69	0,00	**34,95**
Carcinona	0,35	0,00	1,38	0,00	4,15	0,00	**5,88**
Adenocarcinoma *in situ*	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35	**0,69**
Adenocarcinoma invasor	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00	0,00	**0,35**
Total	**17,30**	**13,84**	**22,84**	**5,88**	**39,79**	**0,35**	**100,00**

Fonte: SISCAN. (*) = cervicite/endocervicite crônica; (**) = cervicite/endocervicite crônica com metaplasia escamosa; (***) = cervicite/endocervicite crônica com hiperplasia e metaplasia escamosa.

O resultado citológico HSIL também apresentou alto percentual de acerto ao remeter o resultado histológico a 87 (75,6%) NIC II/III com ou sem extensão glandular, sendo 3 (2,6%) com confirmação histológica para NIC I e 12 (10,4%) para carcinoma cervical na anatomopatologia. Já o caso de AIS *in situ*, 1 (100%) na citologia teve seu resultado confirmado pela histologia.

Segundo o algoritmo do Ministério da Saúde, no Brasil, o seguimento dos casos positivos deve ocorrer considerando-se a idade da mulher *versus* o resultado do exame citológico, os quais são encaminhados para colposcopia, e se esta confirmar presença de lesão segue para biópsia, conforme Figura 1.

Na população pesquisada, 266 (92%) mulheres que participaram do rastreio do câncer cervical em Ponta Grossa, Paraná, no período de 2014 a 2020, encontravam-se na faixa etária entre 25 e 64 anos, como preconizado para o rastreio do câncer cervical no Brasil, 20 (6,9%) abaixo dessa faixa etária e 3 (1,03%) acima da mesma. A menor faixa etária foi de 17 anos e a maior 71 anos. Os detalhes dos dados citológicos e histopatológicos frente à faixa etária encontram-se nas Tabelas 4 e 5.

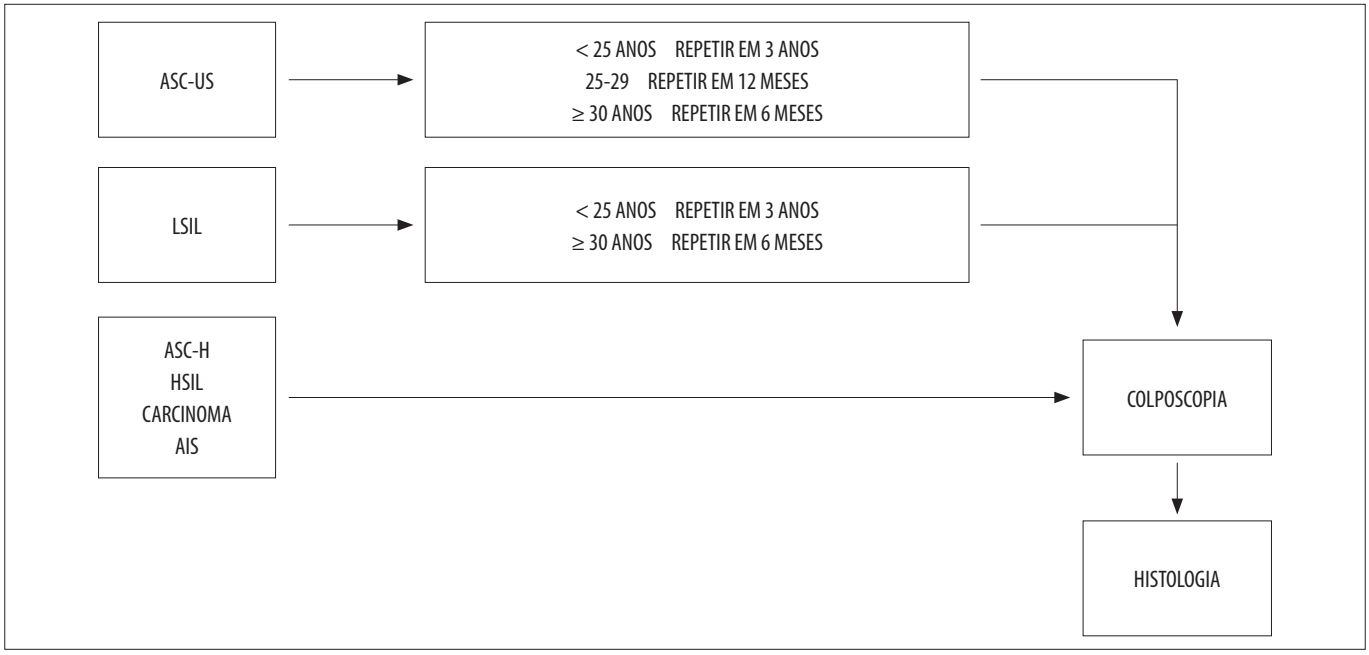


Figura 1

Algoritmo dos casos positivos no rastreio do câncer cervical no Brasil.

Fonte: BRASIL, 2016.

Tabela 4

Resultado do exame citológico segundo a faixa etária da população em estudo.

Exame citológico	< 25 anos		25 a 64 anos		> 64 anos		Total	
	N absoluto	%	N absoluto	%	N absoluto	%	N absoluto	%
Negativo	1	0,35	48	16,61	1	0,35	50	17,30
ASC-US	0	0,00	39	13,49	1	0,35	40	13,84
ASC-H	10	3,46	55	19,03	1	0,35	66	22,84
LSIL	0	0,00	17	5,88	0	0,00	17	5,88
HSIL	9	3,11	106	36,68	0	0,00	115	39,79
AIS	0	0,00	1	0,35	0	0,00	1	0,35
Total	**20**	**6,92**	**266**	**92,04**	**3**	**1,04**	**289**	**100,00**

Fonte: SISCAN.

Tabela 5

Resultado do exame histológico segundo a faixa etária da população em estudo.

Exame Histopatológico	< 25 anos		25 a 64 anos		> 64 anos		Total	
	N absoluto	%	N absoluto	%	N absoluto	%	N absoluto	%
Não conclusivo	1	0,35	0	0,00	0	0,00	1	0,35
Negativo	0	0,00	3	1,04	0	0,00	3	1,04
Cervicite/endocervicite crônica	0	0,00	7	2,42	0	0,00	7	2,42
Cervicite/endocervicite crônica com metaplasia escamosa	0	0,00	23	7,96	1	0,35	24	8,30
Cervicite/endocervicite crônica com hiperplasia e metaplasia escamosa	0	0,00	8	2,77	0	0,00	8	2,77
Hiperplasia	0	0,00	6	2,08	0	0,00	6	2,08
Pólipo	0	0,00	9	3,11	0	0,00	9	3,11
NIC I	4	1,38	12	4,15	1	0,35	17	5,88
NIC II	4	1,38	35	12,11	0	0,00	39	13,49
NIC II com extensão glandular	1	0,35	2	0,69	0	0,00	3	1,04
NIC III	5	1,73	46	15,92	0	0,00	51	17,65
NIC III com extensão glandular	5	1,73	96	33,22	0	0,00	101	34,95
Carcinona	0	0,00	17	5,88	0	0,00	17	5,88
Adenocarcinoma in situ	0	0,00	2	0,69	0	0,00	2	0,69
Adenocarcinoma invasor	0	0,00	0	0,00	1	0,35	1	0,35
Total	**20**	**6,92**	**266**	**92,04**	**3**	**1,04**	**289**	**100,00**

Fonte: SISCAN.

Chamou a atenção deste trabalho a precocidade no diagnóstico histológico para NIC III frente a uma citologia ASC-H em paciente de 17 anos, e a presença de adenocarcinoma invasor em paciente de 71 anos, com citologia também para ASC-H.

A presença de ASC-US na citologia foi observada dentro da faixa etária preconizada para o rastreio e acima desta.

Este estudo observou que dos 40 casos de ASC-US apenas 2 (5%) apresentaram citologia anterior para ASC-US, e nos 17 casos de LSIL apenas 1 (5,9%) apresentou citologia anterior para esta lesão.

Entre os 115 casos de HSIL, foi constatado que 45 (39,1%) pacientes haviam feito exames de rastreio anuais com três exames anteriores negativos, configurando casos de falsos negativos exclusivamente para HSIL dentro da população estudada. Dos 66 casos de ASC-H, 2 (3,03%) apresentaram três exames citológicos anteriores anuais negativos, configurando no período deste estudo em 1 anatomopatológico NIC III e 1 adenocarcinoma invasor respectivamente para ASC-H. Assim, no total da população estudada, observou-se 47 (16,3%) casos de resultados citológicos falsos negativos no período de rastreio realizado nos três anos anteriores.

DISCUSSÃO

Dos exames realizados no rastreio do câncer cervical analisados nesta pesquisa, 0,5% foram encaminhados para a histologia, percentual abaixo do perfil de estudo realizado em laboratório de referência no rastreio do câncer brasileiro, cuja necessidade estimada de exames anatomopatológicos correspondeu a cerca de 0,7% a 0,9% das mulheres rastreadas.[2] Contudo, deve ser considerado o grave impacto negativo que a pandemia pelo coronavírus acarretou no rastreio do câncer cervical no município de Ponta Grossa, Paraná, pois em 2020 houve uma queda de 50% do volume de exames.

O algoritmo do atendimento às mulheres no rastreio do câncer cervical no Brasil, na faixa etária de 25 a 64 anos, prevê o encaminhamento para a colposcopia, de mulheres

com alteração citológica HSIL, ASC-H, AGC, AIS e carcinoma, e mulheres que apresentaram ASC-US e LSIL positivas em repetição de 6 meses a um ano.[2]

Neste estudo em questão, observou-se que 42% das mulheres que realizaram o exame anatomopatológico não apresentaram exame citológico anterior. Tal fato ocorre em duas situações no município de Ponta Grossa, Paraná: ou a paciente apresentou lesão no colo do útero no momento do exame especular, durante a consulta de enfermagem, e então para agilizar o atendimento foi encaminhada diretamente para a colposcopia, ou são mulheres que iniciaram o atendimento na rede particular e não conseguiram dar continuidade por motivos financeiros, e passaram a receber o atendimento pelo SUS.

Pesquisas têm apontado falhas no seguimento do rastreio do câncer cervical. Leyden et al.,[5] nos Estados Unidos, demonstraram que 13% dos insucessos na detecção e triagem de um câncer cervical foram causados por falha de seguimento e que 21% das mulheres atendidas não possuíam nenhum retorno entre a detecção da anormalidade citológica e o diagnóstico de câncer cervical invasivo. No Brasil, Oliveira[6] verificou em sua pesquisa uma frequência de 40,5% de pacientes sem qualquer tipo de seguimento, após realizarem uma citologia com resultado ASC-US e ASC-H.

Segundo Araújo et al.,[7] em seu estudo, 41,62% das mulheres com exames citopatológicos classificados como ASC-US/LSIL repetiram a citopatologia em seis meses, frente a 58,38% que tiveram o seguimento ignorado e aproximadamente 15% foram submetidas a colposcopia e biópsia. Já Farias et al.[8] observaram que das mulheres com alterações no rastreio e que deveriam fazer acompanhamento em 6 meses, apenas 7,3% retornaram para seguimento e das pacientes que deveriam realizar colposcopia apenas 21,7% o fizeram.

Em estudo retrospectivo de Delabeneta et al., analisaram-se os resultados ASC-US e ASC-H de exames citopatológicos e histopatológicos em um laboratório que atende os municípios do oeste do Paraná, no período de 2016 a 2017, foi observado que 73,2% das mulheres com resultado ASC-US repetiram o exame citológico e, destas, 18% permaneceram com o exame alterado após repetição. Também foi observado que 42,8% das pacientes com ASC-H não seguiram as condutas recomendadas pelo Ministério da Saúde no programa de prevenção do câncer do colo do útero.[9]

ASC-US é um diagnóstico para achados citopatológicos em que as alterações morfológicas celulares não são suficientemente claras para permitir um diagnóstico mais específico à alteração citológica que sugere LSIL. Apesar dos esforços para fornecer critérios definidos para as alterações morfológicas constituintes de ASC-US, o uso desse termo por vários patologistas pode diferir quanto às alterações citológicas observadas.[4]

Assim, tendo em vista maior precisão e exatidão no exame citológico, normas para o controle de qualidade interno são propostas na literatura. É recomendado que, se a frequência de SIL na prática laboratorial for 2%, a frequência do ASC-US deva ser menor ou igual a 6% e assim a frequência de diagnósticos ASC-US não deve exceder em três vezes a taxa da SIL.[10]

Já a dúvida citológica ASC-H refere-se às interpretações citológicas sugestivas de HSIL e são frequentemente associadas a NIC II e NIC III. Bethesda sugere que essa classificação represente menos de 10% de todas as interpretações ASC.[4]

ASC-H pode ser observada como metaplasia imatura atípica, na qual as células apresentam núcleos degenerados, frequentemente irregulares, envolvendo todo o contorno nuclear e hipercromasia. A classificação ASC-H é apropriada na presença de células marcadamente atípicas nas quais a distinção clara de HSIL ou carcinoma não é possível. Contudo, células endocervicais, endometriais degeneradas e macrófagos podem possuir núcleos que imitem HSIL, implicando interpretações excessivas de ASC-H/HSIL.[4] Percentuais elevados de ASC (ASC-US e ASC-H) apontam a necessidade de treinamento dos citologistas quanto aos critérios morfológicos dessa categorização citológica.[3]

No Brasil,[3] o Ministério da Saúde, para fins de controle de qualidade, propõe os seguintes cálculos, baseados em: Índice de positividade (IP), cuja categorização considera IP <2% (muito baixa), IP entre 2% e 2,9% (baixa), IP entre 3% e 10% (esperado) e IP acima de 10% para prestadores que podem atender a serviços de referência secundária. Percentual de exames compatíveis com ASC entre os exames satisfatórios (ASC), cujo parâmetro não deve ultrapassar 5%; Percentual de exames compatíveis com ASC entre os exames alterados (ASC/ALT) não deve ser superior a 60%; Razão ASC/SIL (R) não deve ser superior a 3 e Percentual de exames compatíveis com HSIL (HSIL), com parâmetro estabelecido ≥ 0,4%.[3]

Em um levantamento realizado por Yoshizawa et al.,[11] no município de Ponta Grossa, esses índices apresentaram-se da seguinte forma: em 2014 – IP 2,27%, ASC 1,44%, ASC/ALT 63,20%, R 1,72 e HSIL 0,31%; em 2015 – IP 1,54%, ASC 0,80%, ASC/ALT 54,77%, R 2,17 e HSIL 0,27%; e em 2016 – IP 1,30%, ASC 0,62%, ASC/ALT 47,6%, R 0,93 e HSIL 0,39%. Assim, alguns problemas relacionados à qualidade no rastreio do câncer foram observados quanto aos índices de positividade e percentual de HSIL baixos, dentro dos padrões brasileiros de excelência.

Apesar do termo ASC referir-se à dúvida citológica, é inviável citologicamente a exclusão desse termo, por não se enquadrar nem em NILM (negativo para malignidade) nem em SIL (lesão intraepitelial), implicando a diminuição da sensibilidade do teste de Papanicolaou na detecção da lesão pré-câncer.[12] Nos Estados Unidos, cerca de 45% das mulheres com ASC estão infectadas pelo HPV de alto risco. Igualmente, embora ASC-US sugira LSIL, o termo "significado indeterminado" é adequado pois cerca de 10% a 20% das mulheres com ASC-US apresentam HSIL inexplícito[13]. Neste estudo observou-se que 50% dos resultados ASC-US corresponderam à histologia NIC II/III.

Nos Estados Unidos, cerca de 1/3 das NIC foram descobertas após seguimento de citologia ASC-US,[14] e num estudo de metanálise, foi verificado que, após dois anos de acompanhamento de citologia ASC-US a lesão evolui para HSIL em 7,1% e para carcinoma em 0,25% dos casos. Já a regressão foi observada em 68%, e sendo assim, supõe-se que de 1.000 mulheres com ASC-US uma desenvolverá carcinoma.[15]

Em outro estudo nos Estados Unidos que avaliou 33.858 amostras citológicas, foi observado 5,7% de casos com ASC-US e 2,5% casos de LSIL, onde a prevalência de NIC II foi de 4,3% e NIC III foi de 2,2% na citologia com ASC-US.[16]

Um estudo realizado em Fortaleza – Ceará mostrou que 12,5% das biópsias de citologias ASC-US e 55,6% ASC-H resultaram em HSIL ou superior.[6] Já uma revisão realizada nos EUA estimou que 1/3 das NIC foram descobertas após seguimento de um esfregaço anterior com ASC-US.[17] Outro estudo avaliou 111 casos citológicos de ASC-US, cujo seguimento na histologia resultou em 61% NIC, demonstrando a relação de ASC-US com NIC.[18]

Um levantamento de resultados ASC-US identificou que 71,7% das mulheres permaneceram no rastreio, cuja maioria dos resultados posteriores foram NILM, 11,6% mantiveram ASC-US, 5,6% LSIL, 1,9% ASC-H, 1,7% HSIL e 0,8% AGC. O seguimento histopatológico apresentou 13,3% NIC II/III.[19]

A citologia ASC-US é mais prevalente em mulheres mais jovens com citologia reflexiva positiva para HPV em comparação com mulheres mais velhas,[20] sendo assim o conhecimento simultâneo do resultado HPV de alto risco positivo pode influenciar o citologista na interpretação NILM/ASC-US, por isso a análise e revisão de amostras positivas para HPV de alto risco devem ser realizadas de forma cautelosa e criteriosa.[21] Contudo, o estudo ALTS relatou que a taxa de positividade de HPV de alto risco foi de 50,6% nos casos ASC-US observados por citologistas experientes.[22]

Segundo Abdulaziz et al.,[23] ASC-US é o resultado mais comum na China, e como esta classificação citológica tem uma ampla gama de resultados patológicos finais podendo ser um aviso inicial de NIC de alto grau, os autores recomendam triagem com teste HPV como medida útil de desvio para pacientes com ASC-US, assim como imediata colposcopia como estratégia para lidar com a citologia ASC-US a fim de aumentar a taxa de detecção de lesões cervicais de alto grau ou câncer invasivo.

ASC-H e HSIL são associadas à NIC II e NIC III e cerca de 70% dos resultados HSIL são confirmados para este grau histológico e 2% para carcinoma invasor.[4] Este estudo observou que 77% dos resultados ASC-H e 75% de HSIL corresponderam à histologia NIC II/NIC III.

Segundo Kinney et al.,[24] mais NIC II é detectada no segmento de casos de ASC em relação a HSIL, por ser ASC uma interpretação mais comum. Quando ASC-US e ASC-H são acompanhados de teste positivo para HPV de alto risco, o risco para NIC e carcinoma são de 18% para ASC-US e 45% para ASC-H com HPV positivo.[25]

Wang et al.[26] realizaram um estudo na China envolvendo 250.000 mulheres e correlacionaram a presença de ASC-US com a histologia e teste para HPV. Observaram a presença de 7.001 (2,8%) casos de ASC-US e destes foram positivos para HPV de alto risco 3.459 (49%) amostras. Dentre as mulheres positivas para HPV de alto risco na citologia ASC-US, 683 (19,7%) apresentaram HPV - 16, 209 (2,98%) HPV - 52, 198 (5,72%) HPV - 58 e 194 (5,6%) HPV - 18. Ao correlacionarem a citologia ASC-US HPV positivas, os autores detectaram um percentual de 35,65% de NIC II/III.

Este estudo deparou-se com 8,6% de resultados falsos negativos, devido à presença de 25 citológicos negativos cuja histologia constatou a presença de NIC a AIS *in situ*. O método de Papanicolaou, apesar de amplamente utilizado no rastreio do câncer cervical, tem sido alvo de muitas críticas em função de sua baixa sensibilidade. A precisão do teste de Papanicolaou permanece controversa, pelo relato de várias metanálises que detectaram sensibilidades bastante baixas do esfregaço de Papanicolaou, na faixa de 20% a 50%.[27] Algumas mulheres desenvolvem essa neoplasia, mesmo realizando o exame repetidas vezes, pois as taxas de resultados falsos negativos podem variar de 2% a 50%.[28] Consequentemente, acarretando ao sistema de saúde gastos sem resultados devido a erros de coleta, de escrutínio e de interpretação do diagnóstico.[29]

Resultados falsos negativos ocorrem por erro de amostragem ou preparação – células de interesse não coletadas,

células coletadas, mas não transferidas, células mal preservadas e mal fixadas, falha técnica – inflamação, sangue (2/3 dos resultados falsos negativos).[30] Erro de leitura microscópica e interpretação: células atípicas negligenciadas, células classificadas de forma errada (1/3 dos resultados falsos negativos). Vinte por cento do material coletado é transferido para a lâmina, 80% do material restante é descartado.[31]

A porta de entrada das Redes de Atenção à Saúde é a atenção primária, que agrega o rastreio do câncer cervical,[3] e o principal profissional que atua na atenção primária, na coleta do material cervicovaginal, é o enfermeiro. Neste contexto, o reflexo da política de expansão da estratégia de saúde da família aumentou consideravelmente a demanda de exames realizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), acarretando sobrecarga do número de exames de Papanicolaou, e, como consequência, a delonga no repasse dos resultados dos exames e a coleta de material mal realizada.

Assim, no Brasil foi demonstrado estatisticamente uma crescente quantidade de amostras insatisfatórias para análise citológica, seja pela hipocelularidade, pela ausência de células representantes da junção escamocolunar (JEC), e pela má fixação do material. Esses fatores diminuem consideravelmente a sensibilidade e especificidade do teste de Papanicolaou, tornando necessárias repetições de exames, tardando o processo de diagnóstico e tratamento dos casos de neoplasia.[3]

As lacunas na formação dos profissionais que atuam na coleta de material cervical no Sistema Único de Saúde também são uma preocupação. Em estudo realizado por Machado et al. (2021),[32] com participação de 25% dos enfermeiros que atuam na coleta de material cervical no município de Ponta Grossa, 55% dos entrevistados reconheceram que a graduação não supriu as suas necessidades para atuar na coleta de preventivo de Papanicolaou e 70% sentiram-se sobrecarregados em suas funções administrativas e assistenciais.

Frente a essa problemática, a Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela atuação do projeto extensionista "Prevenção e educação na atenção à saúde da mulher: coleta de exame Papanicolaou", tem realizado treinamento teórico-prático junto ao quadro de enfermeiros da Secretaria de Saúde do município, visando a qualidade da amostra cervical. A Universidade Estadual de Ponta Grossa tem por objetivo difundir a extensão por meio de ações voltadas à sociedade, fortalecendo as bases científica, tecnológica e de inovação, norteando-se pelo princípio da indissociabilidade entre o ensino, pesquisa e extensão cooperando com as entidades públicas.[33]

Na análise de três Unidades Básicas de Saúde (UBS) que participam do treinamento na qualidade da amostra via extensão da UEPG, observou-se que a sensibilização dessas 25% das UBS do município de Ponta Grossa, no processo de capacitação, beneficiou 4.950 usuárias do SUS pela melhoria na qualidade na coleta de material cervical.[33]

CONCLUSÃO

Com objetivo de avaliar a correspondência citológica de laudos classificados como ASC-US frente aos seus resultados na histopatologia, este estudo analisou exames de 289 pacientes do município de Ponta Grossa.

Verificou-se que apenas seis casos apresentaram a correspondência entre ASC-US e NIC I. Observou-se a prevalência de resultados histológicos NIC II e NIC III para o diagnóstico citológico ASC-US.

Portanto, é crucial a discussão dos fatores que podem influenciar o diagnóstico citológico e levar a uma classificação diagnóstica ASC-US com impacto negativo para a saúde da paciente. Fatores como adequabilidade da amostra, seguimento adequado, assim como a capacitação dos profissionais envolvidos na interpretação da lâmina e o controle de qualidade dos laboratórios devem ser observados com critério. Outro ponto importante, como foi discutido no decorrer desse estudo, é a correlação da presença de ASC-US com o resultado do teste para HPV, visto que HPV de alto risco na citologia ASC-US resulta em bom percentual a histologia NIC II/III.

REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394-424.
2. BRASIL. Ministério da Saúde; Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2020: incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Brasil, 2019. [Acesso em: 31/03/2020]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-bhttpsrasil.pdf>
3. BRASIL. Ministério da Saúde. INCA. Manual de gestão da qualidade para laboratório de citopatologia. 2. ed., INCA, 2016.
4. Nayar R, Wilbur DC. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. 3. ed. New York: Editora Springer; 2015.
5. Leyden WA, Manos MM, Geiger AM, Weinmann S, Mouchawar J, Bischoff K, Yood MU, Gilbert J. Cervical Cancer in Women With Comprehensive Health Care. J Natl Cancer Inst. 2005 May 4;97(9):675-83.
6. Oliveira GG. Achados cito-histológicos e genótipos de HPV observados nas células escamosas atípicas de significado indeterminado. Fortaleza. Dissertação – Universidade Federal do Ceará; 2017.

7. Araújo ES, Barbosa FM, Ázara CZS, Ferreira TAM, Tavares SBN, Amaral RG. Avaliação do seguimento de Mulheres com Exames Citopatológicos Alterados de acordo com as Condutas Preconizadas pelo Ministério da Saúde do Brasil em Goiânia, Goiás. Rev. Bras. de Cancerologia 2014;60(1):7-13.
8. Farias ACB, Barbieri AR. Seguimento do câncer de colo de útero: Estudo da continuidade da assistência à paciente em uma região de saúde. Esc. Anna. Nery Rev. de Enfermagem 2016;20(4):e20160096. doi: 10.5935/1414-8145.20160096.
9. Delabeneta MF, Costa DB, Plewka J, Santos MA, Turkiewicz M. Seguimento das Atipias Escamosas e Avaliação das Condutas Segundo as Recomendações do Ministério da Saúde. J. Bras. Patol Med Lab 2021; v.57, p.1-7.
10. Kurman RJ, Solomon D. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. New York: Editora Springer; 1994.
11. Yoshizawa DH, Perek KV, Machado EP. Indicadores de qualidade no rastreamento do câncer do colo uterino em Ponta Grossa-PR. In: XIII Semana Acadêmica e Mostra Científica de Farmácia-UEPG; 2017 out. 5; Ponta Grossa.
12. Pitman MB, Cibas ES, Power SCN, Renshaw AA, Frable WJ. Reducing or eliminating use of the category of atypical squamous cells of undetermined signifi cance decreases the diagnostic accuracy of the Papanicolaou smear. Cancer Cytopathol 2002; v. 96, n. 3, p. 128-34. [Acesso em: 25 ago. 2021]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12115299/>
13. The alts group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined signifi cance. Am J Obstet Gynecol. 2003; v. 188, n. 6, p. 1383–92. [Acesso em: 25 ago. 2021]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12824967/>
14. Arbyn M, Roelens J, Simoens C, Buntinx F, Paraskevaidis E, Martin-hirsch PPL, Prendiville WJ. Human papillomavirus testing versus repeat cytology for triage of minor cytological cervical lesions. Cochrane Databse Syst Rev 2013; v. 13, n. 3. [Acesso em: 26 ago.2021]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23543559/>
15. Jahic M, Jahic E. Diagnostic Approach to Patients with Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance Cytologic Findings on Cervix. Med Arch. 2016; v.70, n. 4, p. 296-298.
16. Wright Junior TC, Stoler MK, Parvu V, Yanson K, Cooper C, Andrews TC. Risk detection for high-grade cervical disease using Onclarity HPVextended genotyping in women,≥21 years of age, with ASC-US or LSILcytology. Gynecologic Oncology, 2019; v. 154, p. 360-367.
17. Arbyn M, Roelens J. Simoens C, Buntinx F, Paraskevaidis E, Martin-hirsch PPL, Prendiville WJ. Human papillomavirus testing versus repeat cytology for triage of minor cytological cervical lesions. Cochrane Databse Syst Rev 2013; v. 13, n. 3. [Acesso em: 26 ago.2021]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23543559/>.
18. Lima DNO, Câmara S, Mattos MGG, Ramalho R. Diagnóstico citológico de ASC-US: sua importância na conduta clínica. J. Bras. Patol Med Lab 2001; v. 38, n. 1, p. 45-9.
19. Rosendo DA, Lorente, S, Santos SM, Canello LM, Etlinger-Colonelli, D. Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US): seguimento de exames analisados no Instituto Adolfo Lutz. Rev. Bras. Anal. Clin. 2018; v. 50, n. 3, p. 265-9.
20. Stoler MH, Wright Junior TC, Sharma A, Zhang G, Apple R, Wright TL; Behrens CM, Athena Study Group. The interplay of age stratifi cation and HPV testing on the predictive value of ASC-US Cytology: results from the ATHENA HPV study. Am J Clin Pathol. 2021; v. 137, p. 295-303.
21. Cormier K, Schaaf M, Hamilton S, Tickman RJ, Perez-reyes N, Sturgis CD. NILM Pap slides from women 30 years of age and older with positive high-risk HPV DNA. Focused rescreening prior to report issuance, an enhanced quality control measure. Am J Clin Pathol. 2014; v. 141, n. 4, p.494–500. [Acesso em: 26 ago.2021]. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/24619749>.
22. Geisinger KR, Yrbin C, Grzybicki DM, Wagner P, Garvin, AJ, Raab SS. Interobserver variability in human papillomavirus test results in cervicovaginal cytologic specimens interpreted as atypical squamous cells. Am J Clin Pathol. 2007; v. 128, n. 6, p.1010-1014. [Acesso em: 26 ago.2021]. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcp/article/128/6/1010/1765164?login=true>.
23. Abdulaziz AMA, Liu J, Sun Y, You X; Cui B, Han S, Zhang Y. Clinicopathologic significance and treatment of ASC-US in cervical cytology. Int J Clin Exp Pathol. 2020 fev; v. 13, n. 2, p. 307-316.
24. Kinney WK, Manos MM, Hurley LB, Ransley JE. Where's the high-grade cervical neoplasia? The importance of minimally abnormal Papanicolaou diagnosis. Obstet Gynecol. 1998; v. 91, n. 6, p. 973–6. [Acesso em: 26 ago.2021]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0029784498000805>.
25. Schiffman M, Solomon D. Cervical-cancer screening with human papillomavirus and cytologic cotesting. N Engl J Med. 2013; v. 369, p. 2324–31. [Acesso em: 26 ago.2021]. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMcp1210379>.
26. Wang Z, Gu Y, Wang H, Chen J, Zheng Y, Cui B, Yang X. Distribution of cervical lesions in high-risk HPV (hr-HPV) positive women with ASC-US: a retrospective single-center study in China. Virology Journal. 2020; v. 17, n. 1., p. 185-195.
27. Nanda K, Mccrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Hickey DB. Accuracy of the papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: A systematic review. Ann Intern Med. 2000; v. 132, n. 10, p. 810-819. [Acesso em: 06 mai.2021]. Disponível em: <https://www.acpjournals.org/doi/full/10.7326/0003-4819-132-10-200005160-00009>.
28. Tavares SBN, Amaral RG, Manrique EJC, Sousa NLA, Albuquerque ZBP, Zeferina LC. Quality Control in Cervical Cytopathology: a leterature Review. Revista Brasileira de Cancerologia 2007; 53(3): 355-364.
29. Bortolon PC, da Silva MAF, Corrêa F de M, Dias MBK, Knupp VM de AO, de Assis M; Claro IB. Avaliação da Qualidade dos Laboratórios de Citopatologia do Colo do Útero no Brasil. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 58, n. 3, p. 535-444, 2012. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/revista/index.php/revista/article/view/600/369>. Acesso em: 13 mai.2021.
30. Avaliação da Qualidade dos Laboratórios de Citopatologia do Colo do Útero no Brasil. Revista Brasileira de Cancerologia 2012; v. 58, n. 3, p. 535-444. [Acesso em: 13 mai.2021]. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/revista/index.php/revista/article/view/600/369>.
31. Hutchinson ML, Isenstein LM, Goodman A, Hurley AA, Douglass KL, Mui KK, Patten FW, Zahniser DJ. Homogeneous sampling accounts for the increased diagnostic accuracy using the ThinPrep® Processor. Am J Clin Pathol. 1994; v. 101, n. 2, p. 215-9. [Acesso em: 25 mai.2021]. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcp/article-abstract/101/2/215/1755279>
32. Machado EP, Dalgallo L, Someya RLNC, Skupien SV, Cavalheiro APG. Exame de Papanicolaou: atuação e dificuldades do enfermeiro na atenção primária do Sistema Único de Saúde. Revista Extensão em Foco. Palotina, 2021; n. 22, p. 1-16.
33. Machado EP, Wosniack C, Reche PM, Costa BR, Perek KV, Ravelli APX. Abordagem interdisciplinar: qualidade da coleta cervicovaginal na prevenção do câncer de colo uterino. Revista Extensão em Foco. Palotina, 2018; n. 16, p. 12-2.

Memory immune response in Dengue: successive exposures modify this profile?

Resposta imune de memória em Dengue: exposições sucessivas modificam este perfil?

Janaína Santos Machado Lacerda[1], João Vítor Tiveron Teodoro[1], Mateus Fernandes Alves dos Reis[1], Djalma Alexandre Alves Silva[2], Virmondes Rodrigues Júnior[2], Marcos Vinícius Silva[2], Luciana Almeida Silva Teixeira[1]

[1] Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias. Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

[2] Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Laboratório de Imunologia. Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

Abstract

Characterization of the response of memory cells in patients with previous dengue episodes can contribute to the development of immunization strategies. This study evaluated the response of peripheral blood mononuclear cells of patients with a previous diagnosis of dengue to stimulation with antigens of four viral serotypes. Thirty-six patients were invited to participate, including 16 with one previous confirmed dengue episode and 17 with two previous confirmed dengue episodes. In all patients, the clinical classification was classic dengue. Cytokines IL-2, IL-4, IL 5, IL-10, IFN-γ, and TNF-α were quantified by flow cytometry. The results showed significant production of IL-10 and TNF-α in response to antigen stimulation, with IL-10 production being more intense in the DNG-1ep group compared to DNG-2ep. In addition, a correlation between IL-10 and TNF-α was observed in both groups, which was more frequent in DNG-1ep after stimulation with the different antigens. In conclusion, the production of IFN-γ, TNF-α and IL-10 by PBMCs appears to actively participate in the organization of the immune response to new stimuli of dengue virus infections. Further studies including severe patients are necessary to determine whether these findings are related to the clinical form of the disease.

Keywords: Dengue; Immunology; Peripheral blood mononuclear cells

Resumo

A caracterização da resposta de células de memória de indivíduos com episódios prévios de dengue pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de imunização. Este estudo avaliou a resposta de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com diagnóstico prévio de dengue, frente à estimulação com antígenos dos 4 sorotipos virais. Para isso, foram convidados 36 indivíduos, dos quais 16 apresentaram um episódio confirmado de dengue e 17 indivíduos com dois episódios confirmados de dengue. A classificação clínica de todos os pacientes deste estudo foi Dengue Clássica. As citocinas IL-2, IL-4, IL 5, IL-10, IFN-γ, TNF-α. foram quantificadas por citometria de fluxo. Como resultados, houve produção significativa das citocinas IL-10 e TNF-α frente à estimulação antigênica, sendo a produção de IL10 mais intensa no grupo DNG-1ep quando comparado com DNG-2ep. Observou-se também correlação entre IL-10 e TNF-α em ambos os grupos, sendo mais frequente nas estimulações do grupo DNG-1ep. Em conclusão, a produção das citocinas IFN-γ, TNF-α e IL-10 por PBMCs deve participar ativamente da organização da resposta imune frente aos novos estímulos de infecções por vírus dengue. Mais estudos incluindo pacientes graves poderão verificar se tais achados estão relacionados à forma clínica dos pacientes.

Palavras-chave: Dengue; Imunologia; Células mononucleares do sangue periférico

Correspondência
Luciana Almeida Silva Teixeira
E-mail: lalmeidast@gmail.com

Recebido em 13/01/2022 | Aprovado em 24/10/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202200011

INTRODUCTION

Dengue is a tropical disease caused by the dengue virus (DENV) that belongs to the family Flaviviridae. Global estimates indicate that 3.6 billion people are at risk of contracting the disease, with 400 million new infections and 100 million new symptomatic cases each year.[1] There are four different serotypes of this virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4); despite homology of approximately 90%, these serotypes can cause heterologous infections in successive episodes of the disease.[1] Considering the global impact of this arboviral disease on the economy and health of populations in different countries, the development of an effective vaccine would contribute enormously to the fight against this tropical disease.

Characterization of the immune response of individuals exposed to dengue episodes can contribute to the understanding of the modulation of the response of memory cells, and thus help develop more effective immunization strategies. One challenge in the immunization of individuals against dengue is the need to create a safe vaccine that is ideally effective against the four serotypes. Within this context, the literature recognizes the potential progression of patients exposed to a heterologous dengue serotype in a second episode to a more severe form of the disease.[2] This risk would be modulated by components of both the cell-mediated and the humoral immune response.[1] It is worth noting that the increased risk of severity would be more related to the second episode of the disease than to the third or fourth episode.[3-5] There are even reports of a reduced risk of progressing to severe disease in dengue infections after the second episode.[6]

The present study aimed to understand the dynamics of peripheral blood mononuclear cells (PMBCs) from patients with successive episodes of dengue in response to stimulation with antigens of the four viral serotypes compared to PBMCs from patients with only one previous episode of the disease stimulated with the same antigens.

MATERIALS AND METHODS

Sample

Patients with a previous diagnosis of dengue made at the Macroregional Referral Laboratory of Uberaba, Minas Gerais, were included and divided as follows: dengue group – 2 episodes (DNG-2ep), which consisted of all patients with two confirmed episodes of dengue (positive ELISA IgM and/or NS1 and/or viral isolation) at an interval of more than one year, identified at the laboratory between 2007 and 2017; dengue group – 1 episode (DNG-1ep), which consisted of patients with one confirmed previous episode of dengue (positive ELISA IgM and/or NS1 and/or viral isolation) more than 4 months ago, matched for sex and age to patients of the DNG-2ep group.

The patients were examined clinically on an outpatient basis, including the characterization of signs and symptoms of the dengue episodes, as well as potential symptoms that persisted after the disease. Symptoms that had started during the acute phase of the disease (first and/or second episode) and that had a duration longer than 14 days as reported by the patient were defined as persistent symptoms of dengue. The dengue episodes were clinically classified according to the World Health Organization as classic dengue, warning signs, and severe dengue.[7] After this clinical assessment, a peripheral blood sample was collected for the measurement of cytokine production by PBMCs stimulated with antigens of inactivated DENV.

Preparation of dengue virus antigen for in vitro stimulation

Samples of the different DENV serotypes (DENV-1 strain Mochizuki, DENV-2 strain New Guinea, DENV-3 strain H87, and DENV-4 strain BEH) were used at a final concentration of 1×10^6 pfu/mL. For preparation of the DENV antigen stock solutions, cell culture flasks containing 3×10^6 Vero cells in 5% RPMI (Gibco, Grand Island, NY, USA) were prepared for each viral serotype and cultured in a humidified incubator at 37ºC in a 5% CO_2 atmosphere.

After 48 hours, 100 µL of the viral antigen (DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4) was inoculated into the respective culture flask and allowed to adsorb for 1 hour. Next, 5% RPMI medium was added to the flasks and the cultures were incubated at 37ºC in 5% CO_2 for 7 days and observed daily under an inverted microscope to monitor the development of a cytopathic effect (presence of cellular syncytium) resulting from infection with DENV. After this period, the flasks were washed with sterile PBS and 2.5 mL trypsin was added for 3 minutes for lysis of the cells and release of viral particles. The suspension was centrifuged at 400 × *g* for 10 minutes at 4ºC. The supernatants were transferred, 20% fetal bovine serum was added, and the solutions were stored in a freezer at -80ºC until the time of use. All DENV-1, 2, 3 and 4 stock solutions were inactivated for one hour at 60ºC before use.

Separation of peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood samples were collected by venipuncture into heparinized tubes. The PBMCs were isolated on a Ficoll-Hypaque density gradient (GE Health Care, Uppsala, Sweden) by centrifugation at 400 × *g* for 30 minutes at 21ºC. The cells were resuspended in 5% RPMI 1640 medium (GE) containing 50 mM Hepes (Gibco), 5% inactivated fetal bovine serum (Gibco), 2 mM L-glutamine (Gibco), 40 µg/mL gentamycin (Neoquímica, Anápolis, GO, Brazil), and 1 mL 2-mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Germany) at a final concentration of 2×10^6 cells/mL.

Culture of peripheral blood mononuclear cells

For culture, 500 µL of PBMCs (2×10^6 cells/mL) resuspended in RPMI medium were added to 48-well culture plates (Corning, New York, USA). The cells were stimulated in the presence or absence of 2.5 µL viral antigen (DENV 1-4) derived from the supernatant and in the presence of 2.5 µL supernatant of uninfected Vero cells. The cells were incubated for 5 days at 37ºC in 5% CO_2. The supernatants were then collected and stored at -80ºC for subsequent cytokine measurement.

Determination of cytokines in the supernatants of PBMC cultures

Cytokines IL-2, IL-4, IL 5, IL-10, IFN-γ, and TNF-α were quantified by flow cytometry using the BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA). The data were analyzed using the FCAP Array 2.0 software (SoftFlow, USA) and the cytokine concentrations were calculated compared to a standard curve. The data are expressed as pg/mL.

Statistical analysis

The data were analyzed with the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) using the Microsoft Excel 2010 and Statview 4.5 programs. Cytokine levels were compared between groups by the Mann-Whitney test for comparison of two independent groups. The level of significance was set at $p < 0.05$. Spearman's correlation test was used to analyze the correlation between cytokine levels. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

ETHICS

The project was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Triângulo Mineiro (Ethical Clearance Certificate 51785715.5.0000.5154) and was conducted in accordance with the recommendations of Resolution 466/12 of the National Health Council for research involving humans.

RESULTS

Thirty-six patients were included in the study, 16 in the DNG-1ep group and 17 in the DNG-2ep group. All patients of this study had classic dengue.

Analysis of cytokine production in the DNG-1ep group showed higher production of TNF-α in response to stimulation with DENV-1 ($p = 0.0063$), DENV-2 ($p = 0.0034$), DENV-3 ($p = 0.0052$), and DENV-4 antigen ($p = 0.0013$). In addition, higher production of IL-10 was observed in response to stimulation with DENV-1 ($p \leq 0.0001$), DENV-2 ($p \leq 0.0001$), DENV-3 ($p = 0.0002$), and DENV-4 antigen ($p \leq 0.0001$), as well as higher production of IFN-γ in response to DENV-2 antigen stimulation ($p = 0.0182$) (Figure 1).

Similarly, evaluation of cytokine production in the DNG--2ep group showed higher production of TNF-α in response to stimulation with DENV-1 ($p = 0.0021$), DENV-2 ($p = 0.0067$), DENV-3 ($p = 0.0002$), and DENV-4 antigen ($p \leq 0.0001$). Furthermore, there was higher production of IL-10 in response to the DENV-1 ($p \leq 0.0001$), DENV-2 ($p = 0.0003$), DENV-3 ($p \leq 0.0001$), and DENV- 4 antigen ($p \leq 0.0001$) (Figure 1).

Comparison of the DNG-1ep and DNG-2ep groups showed a significant difference in IL-10 production in response to stimulation with DENV-2 ($p = 0.0008$), DENV-3 ($p = 0.0279$), and DENV-4 antigen ($p = 0.0037$), with higher production of this cytokine in patients of the DNG-1ep group. In addition, higher production of IFN-γ was observed in response to stimulation with DENV-4 antigen ($p = 0.0003$) (Figure 2).

Analysis of correlations in the DNG-1ep group revealed a positive correlation between IL-10 and TNF-α for serotypes DENV-1 ($r = +0.6054$, $p = 0.0115$), DENV-2 ($r = +0.7623$, $p = 0.0006$), DENV-3 ($r = +0.4971$, $p = 0.0453$), and DENV-4 ($r = +0.5334$, $p = 0.0293$). No negative correlations were observed (Figure 3).

In patients of the DNG-2ep group, a positive correlation between TNF-α and IL-10 was observed for DENV-2 ($r = +0.4667$, $p = 0.044$) and DENV-4 ($r = +0.4982$, $p = 0.0299$). No negative correlations were observed (Figure 3).

With respect to the presence of persistent symptoms attributed by the patient to residual symptoms of dengue during clinical assessment, 23 patients reported the presence of at least one symptom, including 12 in the DNG-1ep group and 11 in the DNG-2ep group. The most prevalent symptoms were

arthralgia (56.25%), headache (43.75%), and myalgia (37.5%). Comparison of the DNG-1ep and DNG-2ep groups according to the persistence of symptoms showed significantly higher production of IL-10 in response to stimulation with DENV-2 (p=0.0083) and DENV-4 antigen (p=0.0123) in non-symptomatic patients (Figure 4).

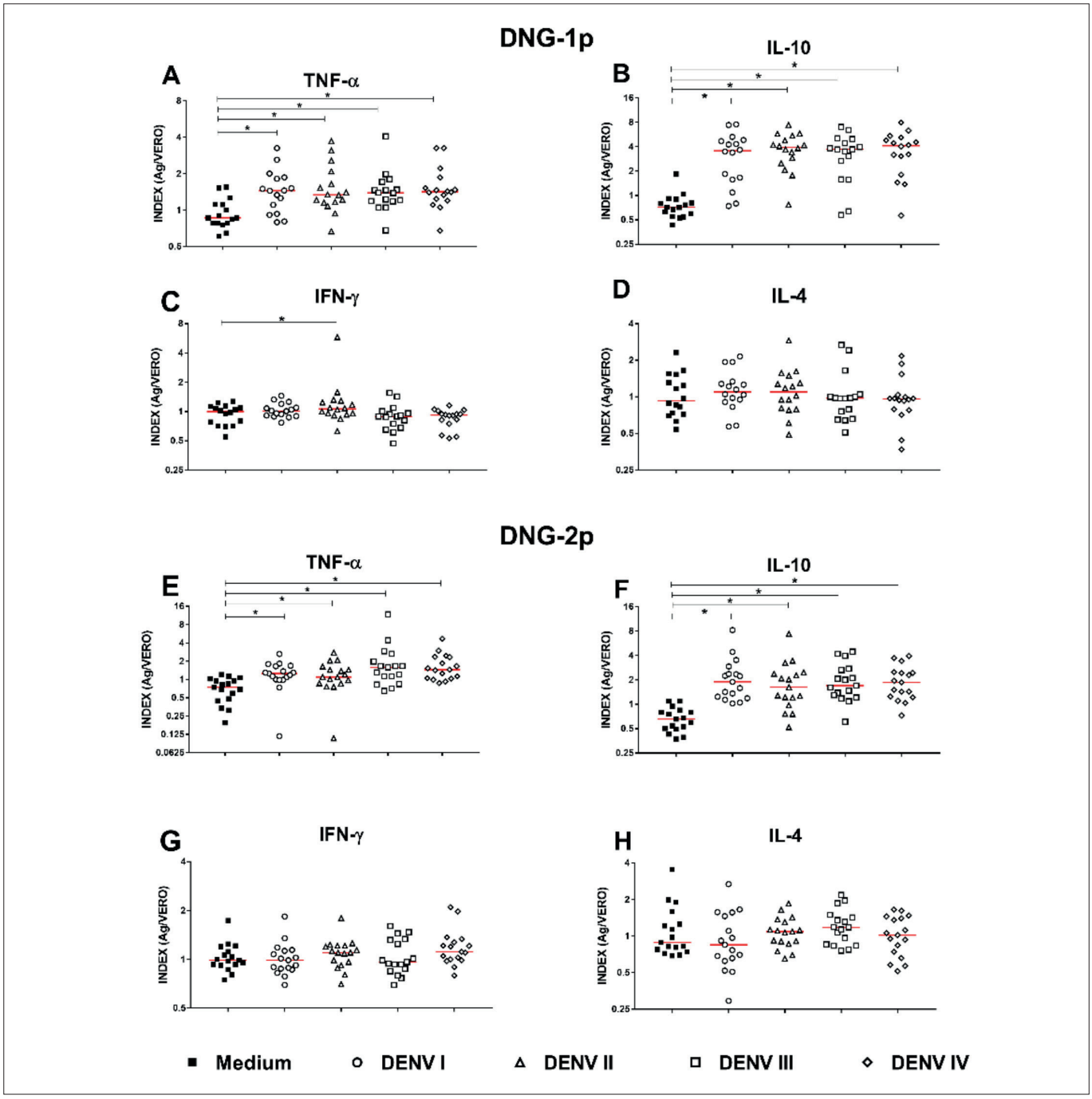


Figure 1

Dot plot of cytokine production in DENV-infected patients with records of one episode (DNG-1ep) and two episodes (DNG-2ep) compared to the mean.

Legend: The graphs represent the median and interquartile range (25-75%) of the production of (A) TNF-α, (B) IL-10, (C) IFN-γ and (D) IL-4 in patients with one episode (n=16), and production of (E) TNF-α, (F) IL-10, (G) IFN-γ, and (H) IL-4 in patients with two episodes (n=17). Index (Ag/Vero): cytokine levels detected in cultures stimulated with DENV (1-4) antigen divided by the levels detected in cultures stimulated with uninfected Vero cells. *$p < 0.05$ was considered statistically significant (nonparametric Mann-Whitney test).

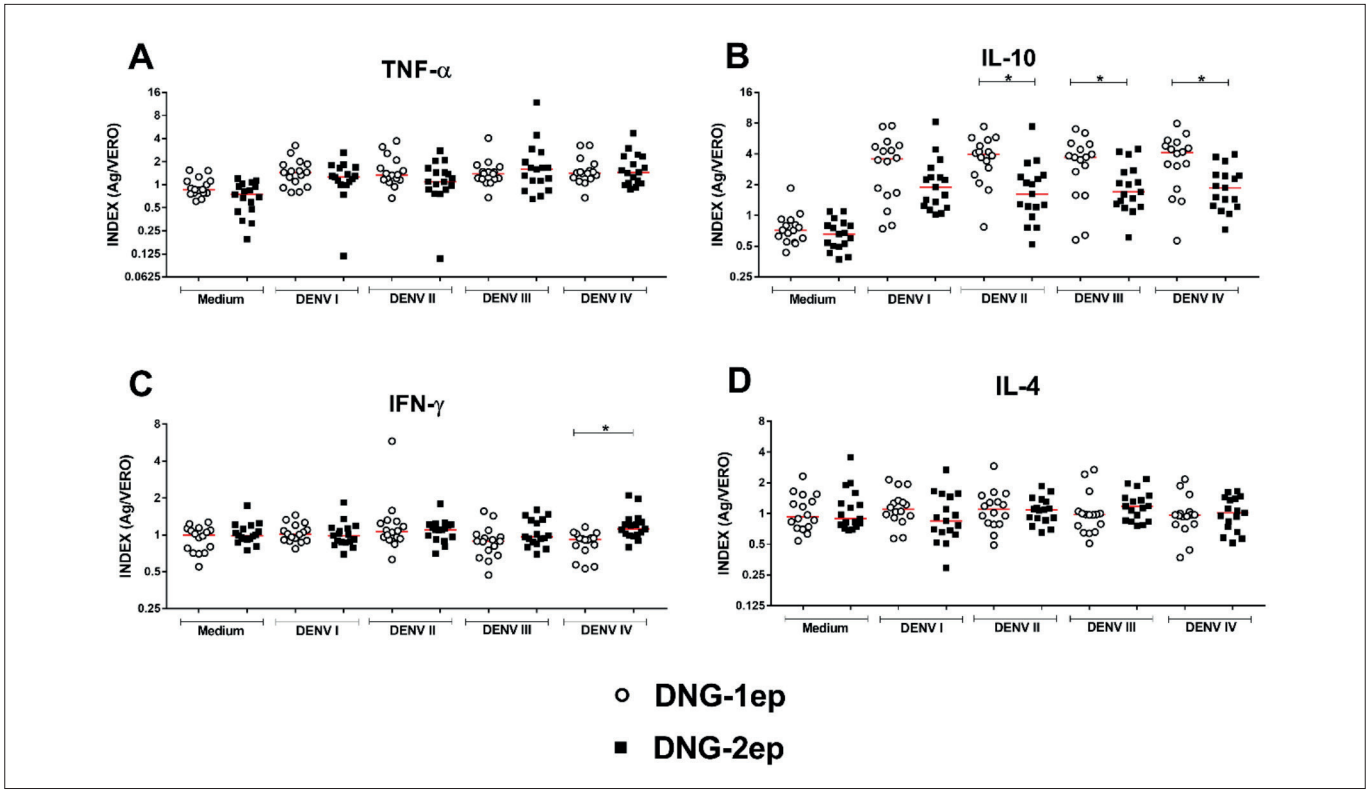


Figure 2

Dot plot comparing cytokine production between DENV-infected patients with records of one episode (DNG-1ep) and two episodes (DNG-2ep).

Legend: The graphs represent the median and interquartile range (25-75%) of the production of (A) TNF-α, (B) IL-10, (C) IFN-γ, and (D) IL-4 in infected patients with one episode (n=16) and two episodes (n=17). Index (Ag/Vero): cytokine levels detected in cultures stimulated with DENV (1-4) antigen divided by the levels detected in cultures stimulated with uninfected Vero cells. *$p < 0.05$ was considered statistically significant (nonparametric Mann-Whitney test).

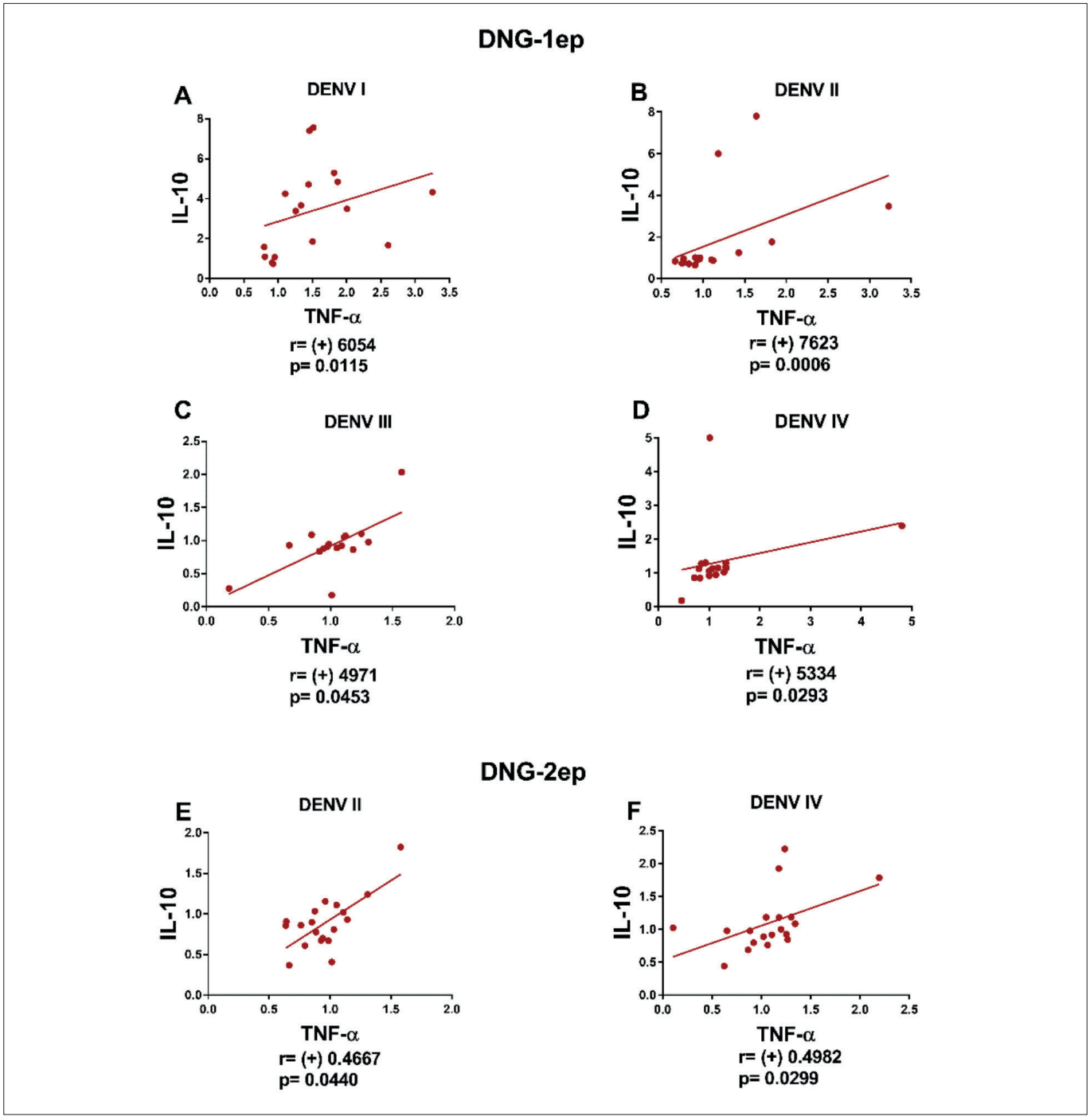


Figure 3

Graphs of the correlations between cytokines produced by patients of the DNG-1ep and DNG-2ep groups infected with different serotypes of DENV.

Legend: A positive correlation ($r > 0$, $p < 0.05$) was observed in the DNG-1ep group between IL-10 and TNF-α in response to stimulation with serotypes (A) DENV-1, (B) DENV-2, (C) DENV-3, and (D) DENV-4; in the DNG-2ep group, a positive correlation was observed between IL-10 and TNF-α in response to stimulation with serotypes (A) DENV-2 and (C) DENV-4. *$p < 0.05$ was considered statistically significant (nonparametric Mann-Whitney test). $r > 0$ indicated a positive correlation.

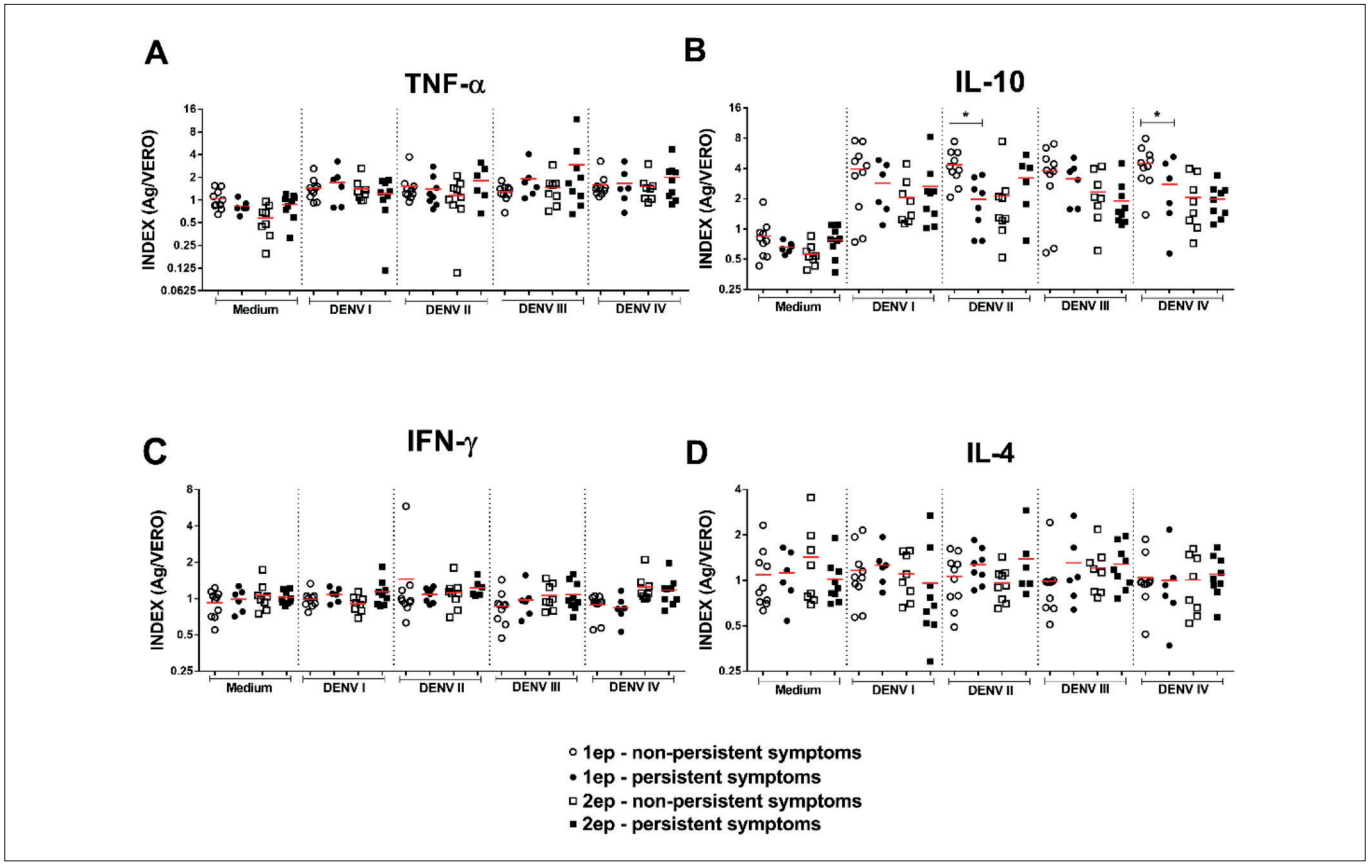


Figure 4

Dot plot comparing the production of TNF-α, IL-10, IFN-γ and IL-4 between patients of the DNG-1ep and DNG-2ep groups.

Legend: Dot plot comparing the production of (A) TNF-α, (B) IL-10, (C) IFN-γ and (D) IL-4 between patients of the DNG-1ep and DNG-2ep groups with and without persistent symptoms according to the four DENV serotypes. *$p < 0.05$ was considered statistically significant.

DISCUSSION

The response of PBMCs to antigen stimulation demonstrates the suitability of the model to evaluate what was proposed. The role of different cytokines in the modulation of the immune response, and consequently in the clinical expression of a disease, has been extensively studied.

IFN-γ, when produced in a robust and sustained manner, is associated with higher resistance of the individual to DENV.[8] Although the production of IFN-γ is high in patients with dengue when compared to healthy controls, studies found no significant difference in the production of this cytokine between classical and severe cases of this arboviral infection.[9]

The role of IL-10 in the response to DENV has not been fully elucidated. However, when evaluated as a biomarker, this cytokine can be considered a marker of disease severity, with its levels being elevated in patients with more severe forms of the disease compared to those with normal dengue.[9] This greater severity might be related to the immunosuppressive activity of IL-10, which reduces proinflammatory responses of the innate and adaptive immune systems. In addition, elevated levels of this cytokine are associated with chronic bacterial and viral infections.[10] This suppression results in greater resistance to the production of IFN-γ, which may explain the nonsignificant presence of this cytokine in the sample.

On the other hand, the exacerbated expression of IL-10 might be caused by antibody-dependent enhancement (ADE), a cross-reaction in which exposure to a heterologous serotype of the virus after a first infection promotes more intense binding to the Fcγ receptor during the second infection. This phenomenon is an intrinsic mechanism in which contact with the receptor facilitates the entry of the virus and activates intracellular signaling, which would potentiate the severity of the disease.[11]

TNF-α is also associated with progression to more severe manifestations of dengue. It is an important proinflammatory cytokine that plays a role in the regulation of the immune response in infectious, autoimmune and neurodegenerative diseases. Within the context of the pathogenesis of dengue and its consequent clinical presentation, TNF-α causes fever, increases vascular permeability and induces apoptosis in endothelial cells,[12] and is thus involved in the progression of the associated inflammatory process that can progress to significant hemodynamic instability, which is a worrisome outcome in the clinical management of the patient. In addition, this cytokine may also be associated with ADE and related immunological phenomena since its production is increased in this context.[1]

The increased production of TNF-α and IL-10 in response to individual antigen stimulation is coherent with the positive correlations observed in the present study and might be explained by the simultaneous elevation of these cytokines during the acute phase of DENV infection, which is characterized by higher production of IFN-γ, TNF-α and IL-10.[13] This higher cytokine expression is probably related to multiple-cytokine-producing $CD8^+$ T lymphocytes, which participate in this production in DENV infection and seem to be more effective than mono-producing cells.[14] A positive correlation between IL-10 and TNF-α was observed in both DNG-1ep and DNG-2ep patients.

Considering that the sample of this study included only patients with classic dengue without warning or severe signs, this result is consistent with the findings of Pereira et al.[14] who identified a higher frequency of multiple-cytokine-producing $CD8^+$ T lymphocytes (TNF-α and IL-10) in patients with mild dengue when compared to patients with severe dengue or warning signs. However, our study revealed no significant difference in the production of IFN-γ. This finding might be due to factors related to cell collection and culture, as well as to the sample.

Patients with a second episode of dengue are at higher risk of developing hemorrhagic manifestations. From an immunological point of view, tertiary or quaternary exposure to heterologous serotypes tends to result in milder inflammatory reactions when compared to secondary exposure; in addition, these patients exhibit a stronger regulatory profile.[15] In the case of secondary exposure, higher production of cytokines such as IFN-γ and TNF-α is observed whose proinflammatory activity is highly associated with symptoms of severe dengue.[15] In our study, the "challenged" samples of the DNG-1ep group exhibited higher production of IL-10 than those of the DNG-2ep group. Since our population sample had only classic dengue, the high expression of this regulatory cytokine and the lack of elevation of proinflammatory cytokines in the assays may explain the clinical presentation without warning signs.

Regarding the persistence of symptoms, higher production of IFN-γ in response to stimulation with DENV-1 was identified in patients with persistent symptoms. Within this context, García et al.,[16] investigating the association between immune disorders and symptom persistence, suggested that elevated levels of interleukins and interferon might be associated with the production of acute-phase proteins, which could be responsible for the persistence of symptoms. An important association between high production of IFN-γ by DENV-specific T cells and mild clinical forms of dengue has been reported in the literature, demonstrating a role of this cytokine in the resistance to infection.[14] However, dysregulation of cytokine levels may be associated with the persistence of the reported symptoms. The most prevalent persistent symptoms were arthralgia, headache and myalgia, which are compatible with the results of previous studies, and could have socioeconomic repercussions for the patients.[17,18]

As limitations, we highlight the size of the sample studied, the exclusive inclusion of patients with previous classic dengue, and the impossibility to previously define which serotype had caused the patients' dengue conditions. Considering this last aspect, we chose to perform cellular stimulation using the four serotypes. The results found must therefore be considered within this context.

CONCLUSION

In conclusion, the cytokines IFN-γ, TNF-α and IL-10 produced by PBMCs appear to actively participate in the organization of the immune response to new stimuli of DENV infections. The coordinated effect of these cytokines can potentially modulate the systemic response. Further studies including patients with severe dengue are necessary to determine whether these findings are related to the clinical form of the disease.

FUNDING SOURCES

FAPEMIG REDE Mineira 0313-16.

REFERENCES

1. Elong Ngono, A, Shresta S. Immune response to dengue and Zika. Annu Rev Immun. 2018; 36:279-308.
2. Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever – a public health problem and a field for research. Bull World Health Organ. 1980; 58(1):1-21.
3. Gibbons RV, Kalanarooj S, Jarman RG, Nisalak A, Vaugh DW, Endy TP, Mammen Junior MP, Srikiatkhachorn A. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. Am J Trop Med Hyg. 2007; 77(5):910-3.
4. Montoya M, Gresh L, Mercado JC, Williams KL, Vargas MJ, Gutierrez G, Kuan G, Aubree G, Balmaseda A, Harris E. Symptomatic versus inapparent outcome in repeat dengue virus infections is influenced by the time interval between infections and study year. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(8):1-10.
5. Bhoomiboonchoo P, Nisalak A, Chansatiporn N, Yoon IK, Kalayanarooj S, Thipayamongkolgul M, Endy T, Rothman AL, Green S, Srikiatkhachorn A, Buddhari D, Mammen MP, Gibbons RV. Sequential dengue virus infections detected in active and passive surveillance programs in Thailand, 1994–2010. BMC public health. 2015; 15(1):250-60.
6. Olkowski S, Forshey BM, Morrison AC, Rocha C, Vilcarromero S, Halsey ES, Kochel TJ, Scott TW, Stoddard ST. Reduced risk of disease during postsecondary dengue virus infections. J Infect Dis. 2013; 208(6);1026-33.
7. World Health Organization (WHO). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. WHO; 2009.
8. Mathew A, Townsley E, Ennis FA. Elucidating the role of T cells in protection against and pathogenesis of dengue virus infections. Future Microbiol. 2014; 9:411-25.
9. Soo KM, Khalid B, Ching SM, Tham CL, Bazir R, Chee HY. Meta-analysis of biomarkers for severe dengue infections. PeerJ. 2017; 5:e3589.
10. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. Annu Rev Immun. 2011; 29(1):71-109.
11. Tsai TT, Chuang YJ, Lin YS, Wan SW, Chen CL, Lin CF. An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. J Biomed Sci. 2013; 20(1):40.
12. Santos AC, de Moura EL, Ferreira JM, Santos BR, Alves VM, Farias KF, Figueiredo EVMS. Meta-analysis of the relationship between TNF-α (– 308G/A) and IL-10 (– 819C/T) gene polymorphisms and susceptibility to dengue. Immunol Invest. 2017; 46(2):201-20.
13. Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. J Clin Invest. 2004;113(7):946-51.
14. Pereira MG, Figueiredo MM, Queiroz CP, Magalhães TV, Mafra A, Diniz LMO, Costa UL, Gollob KJ, Antonelli LRV, Santiago HC. T-cells producing multiple combinations of IFNγ, TNF and IL10 are associated with mild forms of dengue infection. Immunology. 2020;160(1):90-102.
15. Sierra B, Perez AB, Alvarez M, García G, Vogt K, Aguirre E, Schmolke K, Volk HD, Guzmán MG. Variation in inflammatory/regulatory cytokines in secondary, tertiary, and quaternary challenges with dengue virus. Am J Trop Med Hyg. 2012;87(3);538-47.
16. García G, González N, Pérez AB, Sierra B, Aguirre E, Rizo D, Izquierdo A, Sánchez L, Díaz D, Lezcay M, Pacheco B, Hirayama K, Guzmán MG. Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. Int J Infect Dis. 2011;15(1):38-43.
17. Teixeira LA, Lopes JS, Martins AG, Campos FA, Miranzi SS, Nascentes GA. Persistência dos sintomas de dengue em uma população de Uberaba, Minas Gerais, Brasil. Cad Saúde Pública. 2010;26:624-30.
18. Teixeira LA, Nogueira FP, Nascentes GA. Prospective study of patients with persistent symptoms of dengue in Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2017;59:e65.

Giant Cell Arteritis – A Case Report

Arterite de Células Gigantes – Um Relato de Caso

Paulo Moacir Mesquita-Filho[1], Luciano Bambini Manzato[1], Daniel Lima Varela[1], Rubens Rodrigues[2], Wagner Lazaretto Padua[3], Laura de Cezaro Martini[4], Artur Eduardo Martio[4], Taís Otília Berres[4]

[1] Hospital de Clínicas de Passo Fundo, Neurocirurgia. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

[2] Hospital de Clínicas de Passo Fundo, Patologia. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

[3] Hospital de Clínicas de Passo Fundo, Residência em Neurocirurgia. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

[4] Faculdade Meridional IMED, Curso de Medicina. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

Abstract

Introduction: The Horto Disease/Temporal Arteritis, also known as Giant Cell Arteritis (GCA), is the most common vasculitis in the elderly population, with an incidence peak around the seventh decade of life. The myriad of symptoms in the topography of superficial temporal artery are the most important signs to its diagnosis. *Case Report:* We report the case of a 74-year-old female patient, with atypical symptomatology, which developed over weeks, opening discussion for alternative differential diagnosis. As the patient's visual status worsened, GCA was considered, and treatment was initiated. *Discussion:* Temporal Arteritis is a chronic, systemic vasculitis, of large and medium-sized vessels, that affects the cranial branches of arteries originating from the aortic arch, in individuals who are older than 50 years of age. Permanent visual loss occurs in 15 – 20% of patients with this pathology, making prompt diagnosis essential.

Keywords: The Horto Disease; Temporal Arteritis; Giant Cell Arteritis.

Resumo

Introdução: A Doença do Horto / Arterite Temporal, também conhecida como Arterite de Células Gigantes (ACG) é a vasculite mais comum na população idosa, com pico de incidência por volta da sétima década de vida. A miríade de sintomas na topografia da artéria temporal superficial são os dados mais importantes para o seu diagnóstico. *Relato do Caso:* Relatamos o caso de uma paciente do sexo feminino, 74 anos, com sintomas atípicos, que se desenvolveram ao longo de semanas, abrindo a discussão para alternativas diagnósticas diferenciais. À medida que o estado visual do paciente piorava, a ACG foi considerada e o tratamento foi iniciado. *Discussão:* A arterite temporal é uma vasculite crônica, sistêmica, de grandes e médios vasos, que acomete os ramos cranianos das artérias com origem no arco aórtico, em indivíduos com mais de 50 anos. Estima-se que a perda visual permanente ocorra em 15% a 20% dos pacientes com essa patologia, tornando o diagnóstico imediato essencial.

Palavras-chave: Doença de Horto; Arterite Temporal; Arterite de células gigantes.

Correspondência
Laura de Cezaro Martini
E-mail: lauradmartini@icloud.com

Recebido em 26/05/2022 | Aprovado em 24/10/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202200047

INTRODUCTION

Giant cell arteritis (GCA), also known as Horto disease or Temporal Arteritis, has an incidence that grows proportionately with aging, being the most frequent form of vasculitis in the elderly (incidence up to 200 cases / 100.000 people older than 60 years).[1] Nevertheless, it is extremely rare in the population younger than 50 years of age.[2,3] The incidence varies widely, according to gender, ethnics, and geographic region, being more common in women and in Asiatic patients and countries. It is a chronic, systemic disease, that usually affects the cranial vessels that originate from the aortic arch, but can compromise medium and large caliber vessels.[4]

The clinical scenario is wide, and the signs and symptoms are secondary to ischemia in the territory of the superficial temporal artery (STA) or any of its branches. The presence of the STA syndrome is highly suggestive of GCA, especially in patients older than 60 years.[5-8] In the present report, the authors describe one case of GCA with an atypical presentation.

CASE REPORT

We report the case of a 74-year-old female patient, with history of systemic arterial hypertension, diabetes mellitus and gastroesophageal reflux disease, who came to the emergency room (ER) complaining about progressive visual loss, headache and allodynia in the fronto-temporal region. The patient was struggling with a hemicranial intense headache for about 3 months, accompanied by photophobia and nausea, which were being treated as migraine. After starting treatment with Topiramate 50mg, the symptoms improved, but over weeks she developed recurrent episodes of visual loss, as well as periorbital and eye pain, predominantly with eye movement. After three days, the patient developed amaurosis in the right eye, and was evaluated by her ophthalmologist, who diagnosed unilateral papilledema, suggestive of optic neuritis. A couple of days later, the patient developed visual loss in the contralateral eye, being referenced to the ER.

In the ER, the patient complained of allodynia in the fronto-temporal region, associated with pain and swelling in the temporal artery topography (Figure 1). She was also complaining of pain in the temporo-mandibular articulation. Neurological examination evidenced bilateral papilledema, predominantly in her right eye, associated with decreased photopupillary reflex. An MRI was performed, which did not show any positive findings, as well as CSF analysis, although laboratory tests evidenced an elevation in the erythrocyte sedimentation rate, (> 100mm/hour).

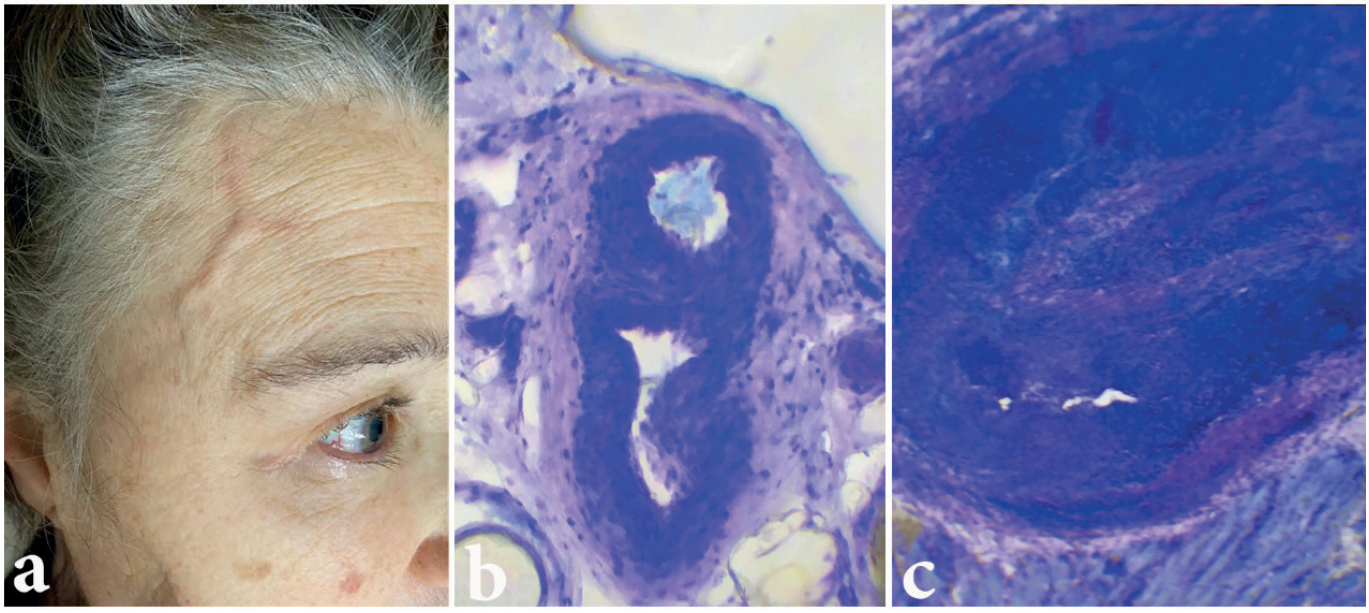


Figure 1

a) Neurological examination evidencing swelling of the STA. **b)** Intra-operative analysis of the STA, evidencing normal segment of the biopsy sample. **c)** Intra-operative analysis of the STA, evidencing abnormal segment of the biopsy sample, with narrowing of the arterial light and inflammatory process.

Treatment with intravenous 1g of Methylprednisolone was administered for 3 days, but the patient did not show any improvement in her visual loss. After three days of treatment, the patient was submitted to STA biopsy, which confirmed the diagnosis of GCA (Figure 2). After discharge, the patient maintained treatment with Prednisone 60mg per day, but, to the date, she did not show any improvement in her visual deficit.

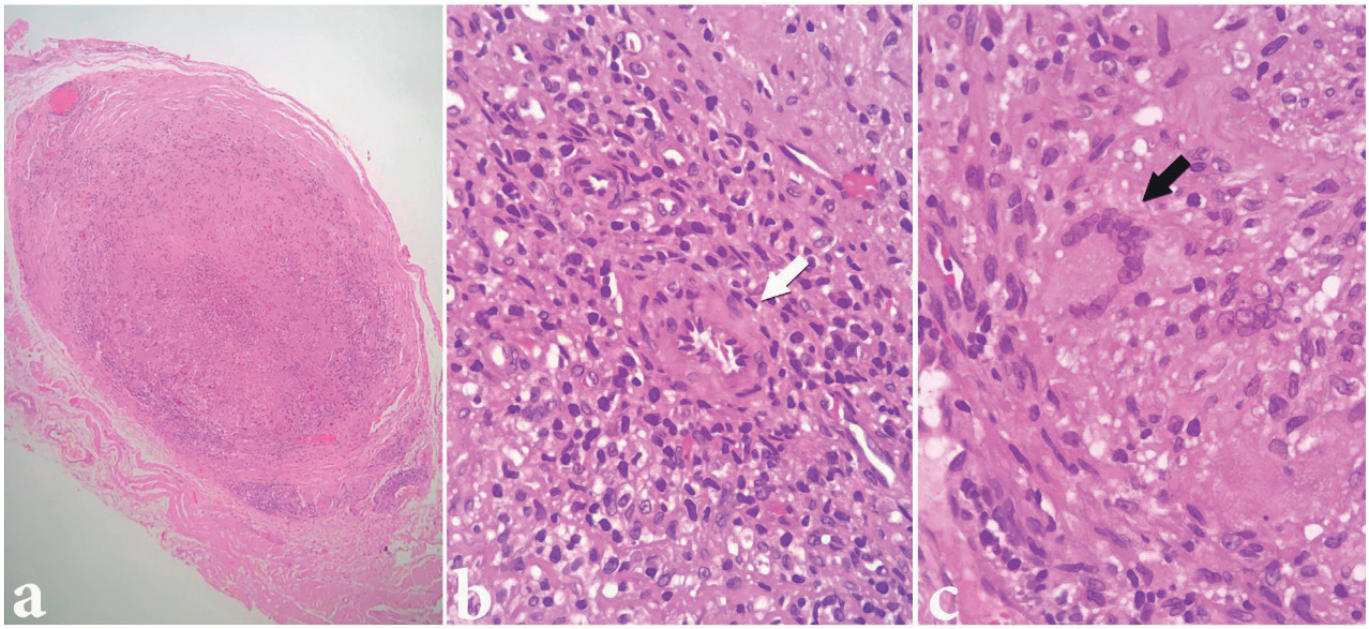


Figure 2

a) H&E stain, 50x, evidencing intense inflammatory process in the artery wall, and a near total occlusion of the vessel. b) H&E stain, 200x, highlighting the narrowing of the artery light (white arrow). c) H&E stain, 200x, evidencing a granuloma with giant cells.

DISCUSSION

In general, patients with GCA present signs and symptoms secondary to ischemia in the vascular territory of STA. Among those, headache, tenderness in the scalp and jaw claudication are the most frequent and/or relevant. Temporal headache is the most common symptom, and jaw claudication the most specific for GCA, sometimes accompanied by trismus. The mandibular claudication occurs when there is involvement of the facial artery. The occurrence of acute, progressive, and severe visual loss is a characteristic signal of GCA, appearing mainly after the other symptoms, as described earlier. Classically, the visual loss is unilateral, but it can compromise the other eyeball after a period of days or weeks, and its occurrence depends on anterior ischemic optic neuropathy, due to the inflammatory thrombosis of the posterior branches of the ciliary arteries.[5-8]

The diagnosis is essentially made through the clinical scenario. A detailed evaluation of the clinical signs and symptoms and elevated clinical suspicion are essential. Laboratory findings are helpful, but they are unspecific, and cannot be trusted as a definitive tool for the diagnosis confirmation or exclusion.[9] Erythrocyte sedimentation rate (ESR) and reactive C-protein are usually high, but variation in both exams is wide and not specific.[9] This feature evidence the high value of outpatient follow-up. The American College of Rheumatology (ACR) is developing clinical criteria for diagnosis of GCA, although the sensibility of the scores is only about 75%.[4] More recently, a review made by the ACR enhanced the sensibility of the criteria to 93% and the specificity to 91,2%.[8] The criteria are: 50 or more years of age; recent onset and localized headache (occipital or frontal headache can be caused by temporal artery arteritis); temporal artery abnormalities; erythrocyte sedimentation rate (ESR) > 50 mm/hour; abnormal findings on temporal artery biopsy (containing necrotizing arteritis or multinucleated giant cells, for example).[1,10] If three or more criteria are present, the patient can be diagnosed with GCA.

Nevertheless, STA biopsy for histopathological evaluation remains the gold-standard for definitive diagnosis and should be performed in every patient.[7] There are two patterns of findings in the biopsy that define diagnosis: inflammation of the vessel walls (active arteritis – thickening of adventitia, media and intima, with preponderance of lymphocytes, macrophages and giant cells) and post-inflammatory abnormalities (healed arteritis – fibrosis of the vessel walls with disruption of the internal elastic lamina). The presence of multinucleated giant cells, which are a coalescence of macrophages, is very typical, but is not absolutely necessary in the biopsy.[7]

Treatment of GCA aims to prevent progression of the disease to visual loss, and, if present, to cause its remission. Immunosuppressive therapy with steroids is the mainstay of treatment. It can be performed through high-dose intravenous steroids, or through continuous administration of smaller doses, depending on the clinical scenario. The therapy must be initiated immediately after the clinical diagnosis and should not be delayed to after the biopsy of the STA is performed. The corticosteroid of choice is Prednisone, with starting dosage of 40 – 60mg orally in adults, increasing to as high as 100mg per day.[3] Unfortunately, even considering the collateral effects of prolonged steroid therapy, its efficacy is not that high. The progression of the disease is not rare, even in patients receiving optimized treatment. Special attention should be paid to the risk of amaurosis that, although not frequent, is very morbid, justifying the aggressive treatment.[11] In the present case, the disease progressed slowly, with symptoms lasting for 3 months, and the diagnosis was suggested after development of visual loss. The prognosis in those cases, opposite to the optic neuritis, is poor, and since amaurosis is established, the recovery of visual status rarely occurs.

CONCLUSION

GCA is a vasculitis that predominantly affects people older than 50 years and can result in severe visual loss or even amaurosis. It can also cause deterioration in other organs, since it is a systemic disease. Aggressive treatment is necessary to prevent decrease in visual status. There is still no definitive pathological etiology. In that way, it is very important that further research is performed, in order to understand the disease and to improve the therapeutic methods.

REFERENCES

1. Pinheiro S, Horta A, Gomes P, Febra C, Ricardo A, Oliveira S, Góes MJ. Doença de Horton - a propósito de 40 casos. Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna. 2004, 11(1):7-12, março 2004. Disponível em: http://www.spmi.pt/revista/vol11/vol11_n1_2004_07_12.pdf. Acesso em: 03 Maio 2022.
2. Godoy P, Araújo SA, Paulino-Júnior E, Lana-Peixoto MA. Arterite de Células Gigantes Coronariana e Infarto Agudo do Miocárdio. Arq Bras Cardiol. 2007, 88(4):84-87. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/abc/v88n4/27.pdf. Acesso em: 03 Maio 2022.
3. Gonzalez EB, Varner WT, Lisse JR, Daniels JC, Hokanson JA. Giant-cell arteritis in the southern United States: an 11-year retrospective study from the Texas Gulf Coast. Arch Intern Med. 1989; *149*: 1561-1565.
4. Souza AW, Okamoto KY, Abrantes F, Schau B, Bacchiega AB, Shinjo SK. Giant cell arteritis: a multicenter observational study in Brazil. Clinics (São Paulo). 2013;68(3):317-22. doi: 10.6061/clinics/2013(03)oa06. PMID: 23644850; PMCID: PMC3611879.
5. Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Calabrese LH, Edworthy SM, Fauci AS, Leavitt RY, Lie JT, Lightfoot RW Jr, Masi AT, McShane DJ, Mills JA, Wallace SL, Zvaifler NJ: The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. Arthritis Rheum 33: 1122-1128, 1990
6. Melges LDM, Novaretti TMS. Arterite de Células Gigantes, Marília. 1998. Disponível em: http://www.famema.br/ligas/ cefaleia/arterite.htm. Acesso em: 03 Maio 2022.
7. Chacko, Joseph G et al. "Review of Giant cell arteritis." *Saudi journal of ophthalmology : official journal of the Saudi Ophthalmological Society* vol. 29,1 (2015):48-52. doi:10.1016/j.sjopt.2014.10.001
8. Lana MA. Perda de visão e arterite de células gigantes. Soc Bras Retina e Vítreo. Conselho Brasileiro Oftalmologia. Belo Horizonte, 1998. Disponível em: http://www.cbo. com.br/cbo/sociedades/retina/artigos/cmtrato6.htm. Acesso em: 05 Maio 2022.
9. Docken, MD. Diagnosis of giant cell arteritis. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. https://www.uptodate.com. Acesso em: 14 set 2020.
10. Almeida E. Diagnóstico e tratamento da arterite temporal. Disponível em: http://www.lincx.com.br/lincx/cientificos/ medicos/neurologia/arterite_temporal.asp. Acesso em: 05 Maio 2022.
11. Bozza A, Levy R. Vasculites. Acta Médica Portuguesa, Maceió. 2003. Disponível em: http://www.lava.med.br/ livro/pdf/alda_vasculites.PDF. Acesso em: 05 Maio 2022.

Estudo de caso: *Candida* spp., *Actinomyces* spp. e diagnóstico diferencial

Case Study: Candida *spp.,* Actinomyces *spp. and differential diagnosis*

Paula Cristina Mendonça[1], *Ana Sofia Rodrigues*[2], *Helena Ruivo*[3], *Ana Rita Santos*[3]

[1] H&TRC – Health and Technology Research Center, ESTeSL, IPL. Lisboa, Portugal.

[2] ESTeSL, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, IPL. Lisboa, Portugal.

[3] Anatomik, Laboratório de Anatomia Patológica, Grupo Clara Saúde. Lisboa, Portugal.

Resumo

Este estudo de caso referente a uma mulher de 37 anos com colo que apresenta características normais e com dispositivo intrauterino (DIU). Foi realizada uma colpocitologia através do método convencional e corada através da coloração Papanicolaou, cujas amostras foram reportadas como satisfatórias, apresentando zona de transformação. A nível microscópio observaram-se agrupamentos bacterianos compatíveis com *Actinomyces*, com centro denso e prolongamentos na periferia dispersos de forma radial. Observaram-se também pseudo-hifas e esporos, compatíveis com *Candida* spp. Simultaneamente, foram observadas alterações reativas nas células, como halos perinucleares e anfofilia, e presença de infiltrado inflamatório. Microscopicamente, existiam campos de visualização em que se tornava mais difícil a distinção entre os dois microrganismos, o que exigiu uma observação mais atenta de forma a termos um diagnóstico diferencial, para uma posterior abordagem terapêutica em duas linhas distintas, ou seja, antifúngico e antibiótico. Os achados citológicos apresentaram características que reforçam a importância do diagnóstico diferencial quando estão presentes infecções provocadas por diferentes microrganismos, sendo que o resultado citológico foi negativo para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna.

Palavras-chave: *Actinomyces* spp., *Candida* spp., Infecção, Inflamação, Alterações Reativas, Negativo para Lesão Intraepitelial.

Abstract

This case study belongs to a 37-year-old woman with a cervix that has normal characteristics and an intrauterine device (IUD). A colpocytology was performed using the conventional method and stained using Papanicolaou stain, whose samples were reported as satisfactory, showing a transformation zone. At the microscope level, bacterial clusters compatible with *Actinomyces* were observed, with a dense center and radially dispersed extensions on the periphery. Pseudohyphae and spores were also observed, compatible with *Candida spp*. Simultaneously, the existence of reactive alterations in the cells, such as perinuclear halos and amphophilia, and the presence of inflammatory infiltrate were observed. Microscopically, there were fields of view in which it became more difficult to distinguish between the two microorganisms, requiring a more attentive observation in order to have a differential diagnosis, for a later therapeutic approach that occurs in two distinct lines, that is, antifungal. and antibiotic. The cytological findings present characteristics that reinforce the importance of the differential diagnosis in the case of infections caused by different microorganisms, and the cytological result was negative for intraepithelial lesion or malignant neoplasia.

Keywords: *Actinomyces* spp., *Candida* spp., Infection, Inflammation, Reactive Changes, Negative for Intraepithelial Lesion.

Correspondência
Paula Cristina Mendonça
E-mail: paula.mendonca@estesl.ipl.pt

Recebido em 14/07/2022 | Aprovado em 24/10/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202200054

HISTÓRIA CLÍNICA

O presente caso clínico relata o caso de uma mulher de 37 anos, com dispositivo intrauterino (DIU), que na consulta de ginecologia apresenta colposcopia normal, sendo a mesma, por norma, caracterizada como mucosa lisa com coloração rosada a par de áreas avermelhadas sem características suspeitas. Foi realizada citologia pelo método convencional e corada através da coloração Papanicolaou.[1]

ACHADOS CITOLÓGICOS

Na observação microscópica observou-se a zona de transformação, sendo reportada a amostra como satisfatória. Identificou-se presença de infiltrado inflamatório com alterações reativas nas células, como halos perinucleares e anfofilia, a par de elementos fúngicos, como pesudo-hifas (Figuras 1 e 2). Simultaneamente, em outros campos, foram também encontrados agrupamentos bacterianos, com um centro denso e prolongamentos na periferia dispersos de forma radial (Figuras 3, 4 e 5).

Na realização do *screening* ao logo da lâmina, nem sempre foi fácil distinguir estes dois microrganismos, visto a ambiguidade dos achados encontrados, pois em alguns campos visualizavam-se achados compatíveis com cada um dos microrganismos sobrepostos um ao outro, tal como vemos nas Figuras 4 e 5. Nestes casos, foi necessária uma visualização mais atenta e rigorosa de forma a poder distinguir ambos os microrganismos, mediante a realização de diagnóstico diferencial.

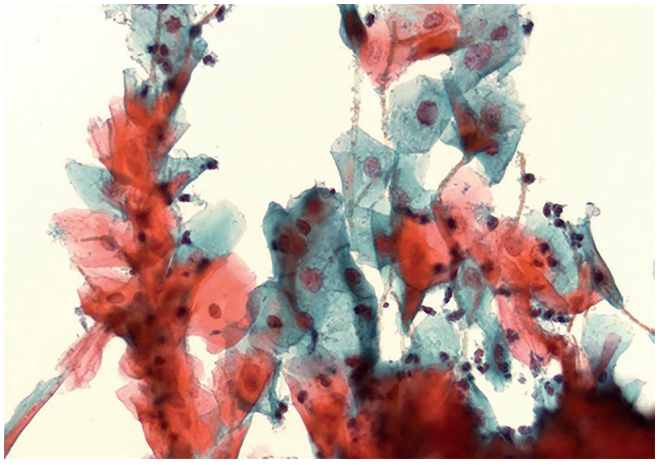


Figura 1

Achados compatíveis com *Candida* spp. num agrupamento de células pavimentosas (coloração Papanicolaou Obj. 40x).

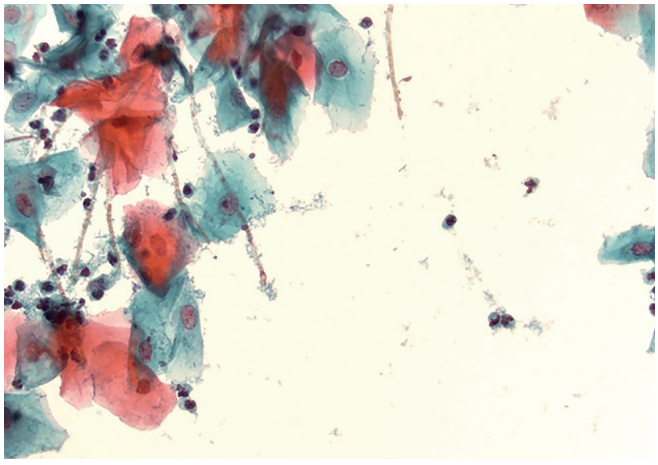


Figura 2

Achados compatíveis com *Candida* spp. num agrupamento de células pavimentosas (coloração Papanicolaou Obj. 40x).

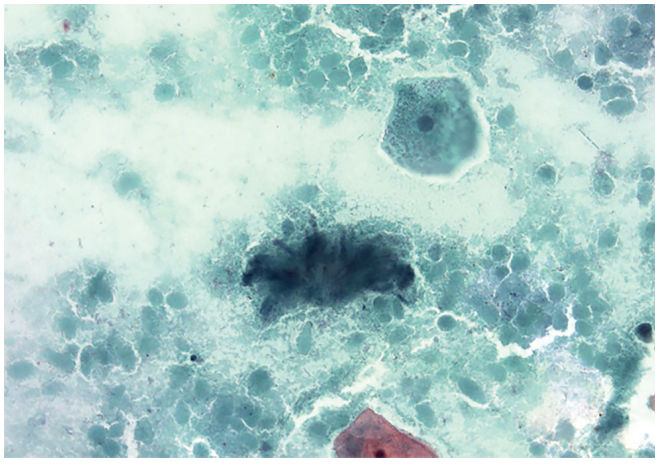


Figura 3

Achados compatíveis com *Actinomyces* spp. num agrupamento de células pavimentosas (coloração Papanicolaou Obj. 40x).

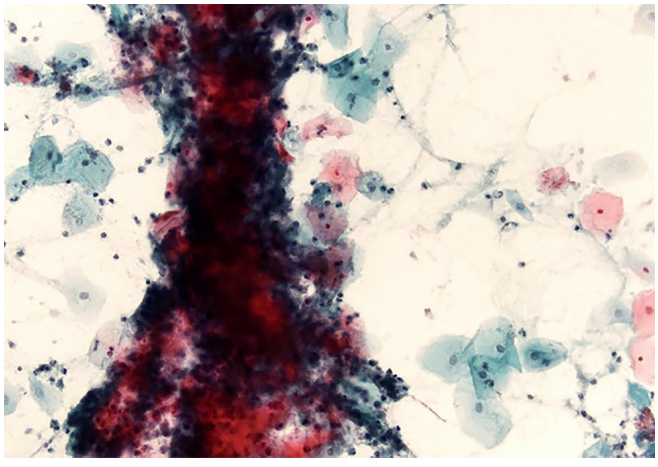


Figura 4

Achados compatíveis com *Candida* spp. e *Actinomyces* spp. junto de um agrupamento de células pavimentosas (coloração Papanicolaou Obj. 20x).

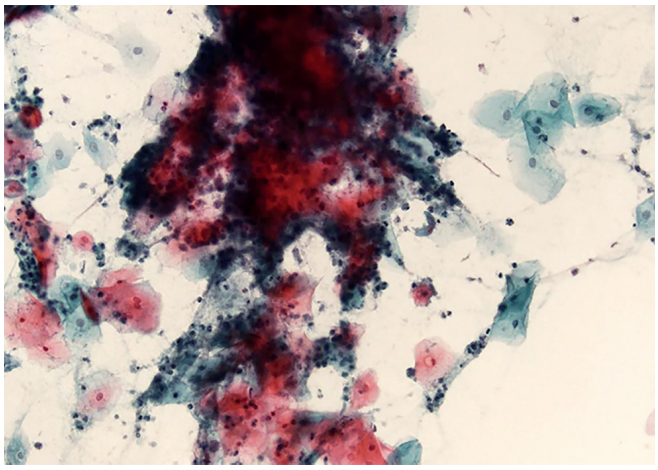


Figura 5

Achados compatíveis com *Candida* spp. e *Actinomyces* junto de um grupo de células pavimentosas (coloração Papanicolaou Obj. 20x).

DISCUSSÃO DO CASO CLÍNICO

De acordo com os aspectos encontrados, o resultado citológico foi de aspectos reativos a inflamação e infecção por *Candida* spp. e *Actinomyces* spp.

Conforme o The Bethesda System for Reporting Cervical Citology, a presença de achados citológicos compatíveis com *Candida* spp. é definida por esporos de 3µm a 7µm e/ou pseudo-hifas, sendo que estas podem ser bastante longas, atingindo várias células, coradas de tons eosinofílicos a um tom castanho acinzentado, com a coloração de Papanicolaou.[1,2,3] As pseudo-hifas são formadas a partir de extensões citoplasmáticas, não apresentam divisões completas, contudo mostram constrições ao longo do seu comprimento, o que indica a formação de novas células.[2,3,4] Podem-se apresentar de várias formas, e por vezes representam um efeito de espinha de peixe ao atravessarem o núcleo de leucócitos e dos grupos de células pavimentosas.[3,4]

Descrito através do The Bethesda System for Reporting Cervical Citology, a presença de achados citológicos compatíveis com *Actinomyces* spp. caracteriza-se por agregados de variadas dimensões de organismos filamentosos, com dispersão radial, sendo conhecidos por mimetizarem uma "bola de algodão".[2,5,6] Por vezes identificam-se massas de leucócitos aderentes às colônias bacterianas do *Actinomyces* spp., sendo também comum verificar-se uma resposta inflamatória aguda.[2,5,6] Novamente, é possível visualizar estas características nos achados encontrados na realização do *screening* da lâmina.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Existem inúmeros diagnósticos diferenciais que podem ser realizados quando encontrados achados possivelmente compatíveis com *Candida* spp., sendo alguns desses achados compatíveis com *Leptothrix vaginalis*, pela distinção das pseudo-hifas da *Candida* spp., por serem mais finas e se encontrarem septadas, como é possível visualizar na Figura 6. Também se distingue de achados compatíveis com *Actinomyces* spp. devido a estes serem mais espessos e normalmente formarem grupos com centro denso.[2,3,5]

As fibras de algodão também podem ser confundidas com achados compatíveis com a *Candida* spp. devido ao formato das fibras, contudo podem ser distinguidas pelo teu tamanho relativamente maior, assim como por se apresentarem num plano de visualização diferente[2,3,6] (Figura 7).

Os fios de muco, pela sua forma e prolongamentos, devem ser distinguidos de achados compatíveis com *Candida* spp. por serem mais encurvados e se apresentarem mais dispersos que as pseudo-hifas.[2,3,6] Estes podem ser também confundidos com achados compatíveis com *Actinomyces* spp., que se distinguem por apresentarem prolongamentos mais densos, dispersos e não formarem grupos com centro denso[2,3,5] (Figura 8).

A presença de espermatozoides também pode ser fonte de ambiguidade. Quando da presença de esporos de *Candida* spp., devem ser distinguidos pelo fato de os esporos serem birrefringentes, e os espermatozoides, por norma, apresentarem uma zona mais escura e outra mais clara[2,3,6] (Figura 9).

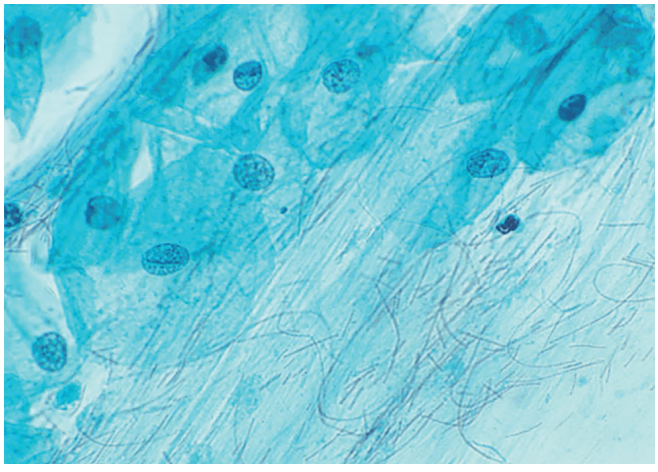


Figura 6

Leptothrix

Fonte: Case 138. Panel: Bacteria seen in vaginal smear preparations. Disponível em: https://pathos223.com/en/case/case138.htm (Visitado em 15/03/2022)

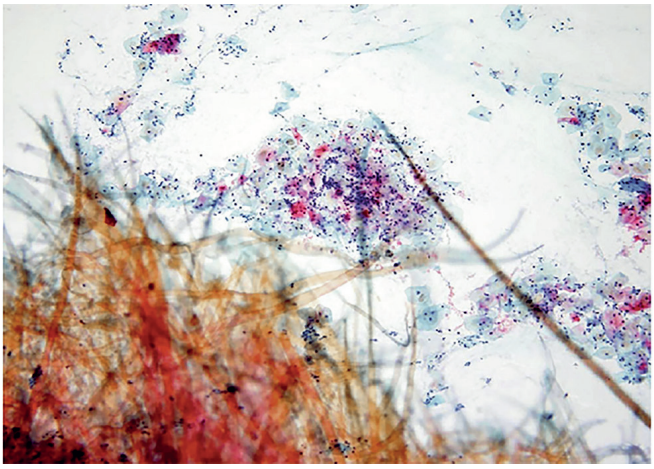


Figura 7

Fibras de algodão

Fonte: Walid E. Khalbuss e Marilee Means Gynecological and Breast Cytopathology Board Review and Self-Assessment, 2013.

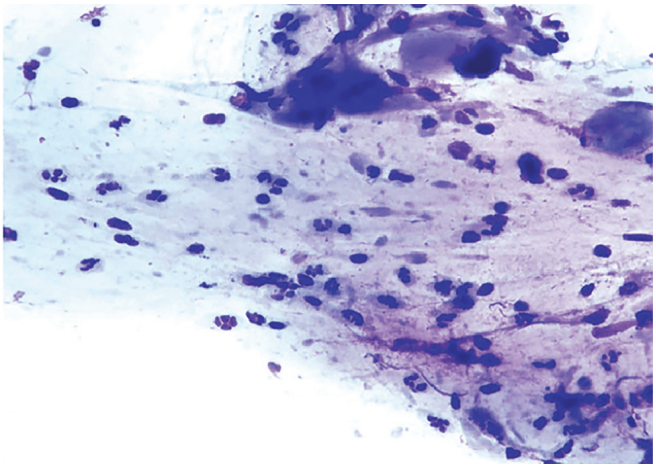


Figura 8

Fios de muco

Fonte: Case 138. Panel: Bacteria seen in vaginal smear preparations. Disponível em: https://pathos223.com/en/case/case138.htm (Visitado em 15/03/2022)

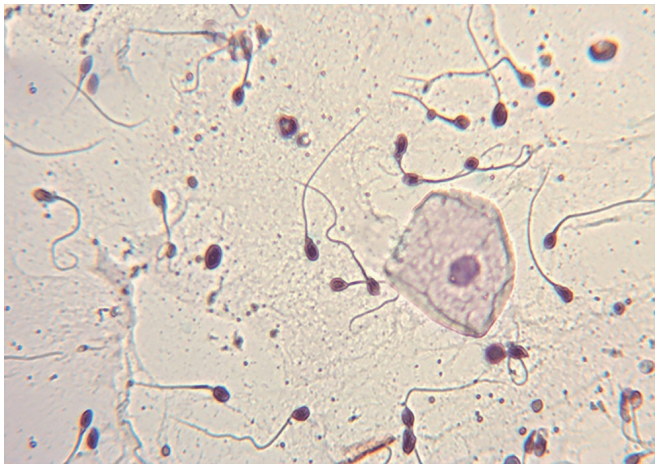


Figura 9

Espermatozoides

Fonte: Citopatologia General: Contaminantes. Disponível em: https://citopatologiageneral.wordpress.com/contaminantes/contaminantes-22/ (Visitado em 15/03/2022)

Segundo a literatura, a presença de lubrificante também pode ser um achado que influencia a identificação de *Actinomyces* spp., em alguns casos, sendo a ausência dos prolongamentos bacterianos um achado a ser considerado neste *pitfall*[2,7] (Figura 10).

É ainda referida a presença de lactobacilos (bacilos de *Döderlein*) como possível *pitfall* de *Actinomyces* spp., por estes se apresentarem mais finos e de tamanho menor, sendo que quando são observáveis agregados devemos diferenciar pelos lactobacilos isolados e a ausência de prolongamentos[2,7] (Figura 11).

No que diz respeito a outro *pitfall*, a presença de vaginose bacteriana deve ser diferenciada de achados de *Actinomyces* spp., dado a ausência de prolongamentos ou de um centro denso, que formam as típicas "bolas de algodão"[2,7] (Figura 12).

As alterações reativas associadas à inflamação foram relatadas tendo por base a presença de microrganismos e o aumento nuclear com grau variável, mas com contornos nucleares suaves, redondos e uniformes; concomitantemente, os núcleos apresentavam-se vesiculares e hipocromáticos.[2,3,5] Nestas alterações citomorfológicas, podemos também ter alguns campos com limites citoplasmáticos bem definidos, em que o citoplasma pode mostrar policromasia, vacuolização ou halos perinucleares, mas sem espessamento periférico.[2] É de notar que na presença de alterações reativas, as mesmas podem ser acompanhadas da presença de infiltrado inflamatório, ou seja, da presença de polimofornucleares e eritrócitos, como observado na avaliação do *screening* da lâmina.[2]

As alterações reativas causadas pela presença de microrganismos podem também fazer diagnóstico diferencial com achados citomorfológicos de células pavimentosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), sendo que nesta categoria está presente um aumento nuclear considerável, hipercromasia, um halo perinuclear mais marcado e ausência de eosinofilia[2,5,8] (Figura 13).

No decorrer do *screening* deste caso, nem sempre foi fácil distinguir ambos os microrganismos em alguns campos conforme anteriormente mencionado, tornando-se assim fundamental uma apreciação descritiva das características, que se encontra descrita na Tabela 1.[2]

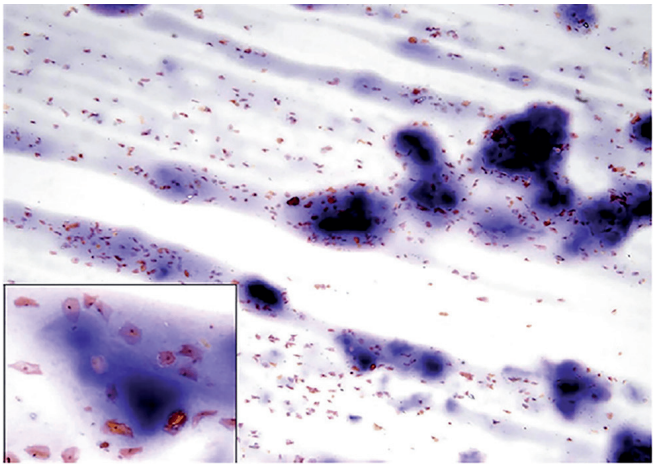


Figura 10

Lubrificante

Fonte: Walid E. Khalbuss e Marilee Means Gynecological and Breast Cytopathology Board Review and Self-Assessment, 2013.

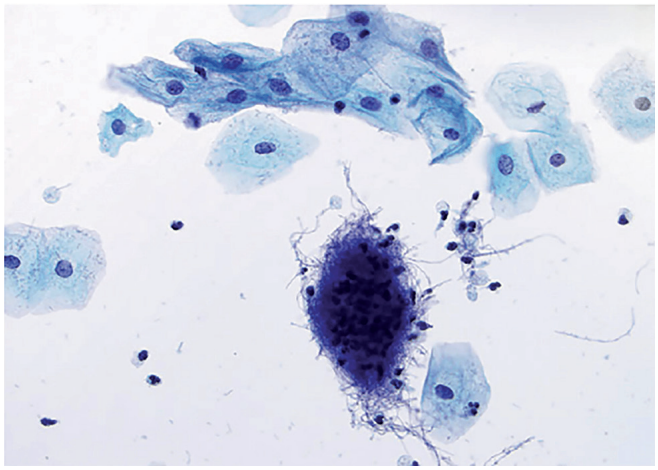


Figura 11

Lactobacilos

Fonte: Ritu Nayar; David C. Wilbur; The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology, 2015.

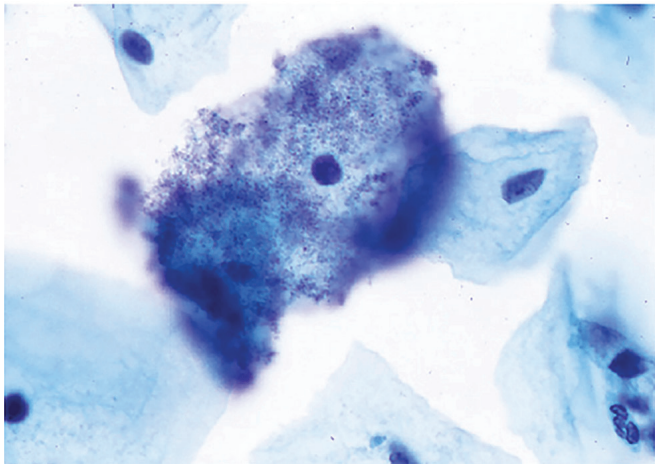


Figura 12

Vaginose Bacteriana

Fonte: Ritu Nayar; David C. Wilbur; The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology, 2015.

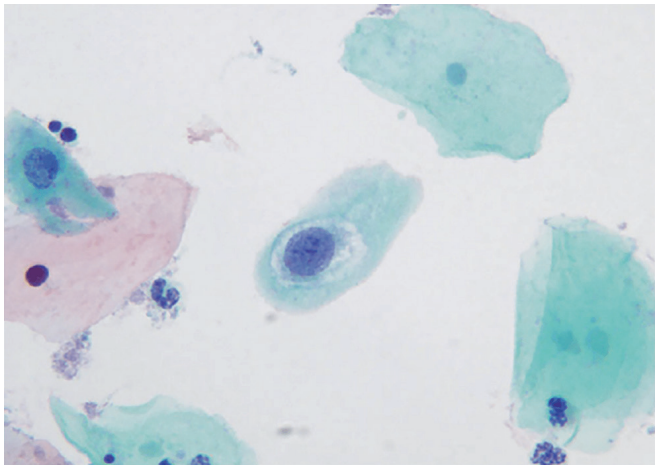


Figura 13

ASC-US

Fonte: Ritu Nayar; David C. Wilbur; The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology, 2015.

Tabela 1

Pitfalls entre *Candida* spp. e *Actinomyces*

***Candida* spp.**	***Actinomyces* spp.**
Pseudo-hifas hialinas	Prolongamentos arroxeados
Pseudo-hifas septadas como uma "cana de bambu"	Prolongamentos formados por cocos
Efeito *shish-kabob* com células intermediárias	Agrupamentos com centro denso e "fios" na periferia
Distribuição variada de hifas e esporos	Distribuição radial
Esporos têm tamanho maior que os cocos	Cocos; Tamanho menor
Fundo eosinofílico reesultante de inflamação	Fundo bacteriano

O diagnóstico diferencial revela-se fulcral quando da avaliação citológica, pois traz maior segurança ao diagnóstico e, consequentemente, à abordagem terapêutica.

A importância do diagnóstico diferencial se dá na situação de se realizar um relatório citológico de forma mais fidedigna, minimizando as consequências para a mulher, que se for somente relatada com uma situação de *Candida* spp. poderia vir a desenvolver infecções mais prolongadas por *Actinomyces* spp., as quais levariam a estados clínicos como actinomicose pélvica, cujo tratamento também é mais moroso/prologado.[9,10] Por outro lado, a identificação do *Actinomyces* spp. sem a descrição de achados compatíveis com *Candida* spp., apesar de esta ser mais facilmente tratada e sem consequências a longo prazo, poderá resultar em infecções prolongadas que, em situações extremas, podem levar à candidíase invasiva, especialmente em pacientes imunodeprimidos, que também pode ser uma das consequências da indicação de antibióticos.[11]

O relatório citológico também é relevante quando se avalia a abordagem terapêutica pelo fato de terem sido encontrados achados citológicos compatíveis com dois microrganismos de natureza distinta, fungos e bactérias, o que significa uma abordagem terapêutica diferente.[2,5]

Como forma terapêutica para estas duas infecções, está indicada a aplicação de clotrimazol e de nistatina na área afetada; a indicação do antifúngico fluconazol por via oral,[4,11] para o caso da infecção por *Candida* spp.; e penicilina ou tetraciclina durante pelo menos dois meses, com a remoção do DIU, para infecções por *Actinomyces* spp..[9,10] Nos casos em que a infecção se prolonga ou agrava, pode ser necessária a remoção dos ovários, das trompas de falópio e do útero.[9,10] A opção por uma terapêutica bastante mais invasiva deve-se ao fato de as infeções por este microrganismo poderem levar à formação de abcessos, envolvendo a drenagem dos mesmos com realização de uma tomografia computorizada.[7,10]

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Anatomik Pinhal Novo não só pela disponibilização do laboratório, mas também pelo apoio durante o período de estágio que proporcionou a realização deste caso clínico.

REFERÊNCIAS

1. Smith B, Gia-Khanh N. Essentials of Pap Smear and Breast Cytology (2012).
2. Nayar R, Wilbur DC. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology, 2015.
3. Khalbus W, Means M. Gynecological and Breast Cytopathology Board Review and Self-Assessment (2013).
4. Naglik J, Moyes D, et al. Candida albicans interactions with epithelial cells and mucosal immunity (2012).
5. Bush LM. Actinomicose, Charles E. Schmidt College of Medicine, Florida Atlantic University (2019) Manuais MSD edição para profissionais. Recuperado no dia 23 de Dezembro de 2020, a partir de https://www.msdmanuals.com/pt/casa/infec%C3%A7%C3%B5es/infec%C3%A7%C3%B5es-bacterianas-bact%C3%A9rias-anaer%C3%B3bias/actinomicose.
6. Wick MR, Scott MA. Pathology of selected infectious diseases. In: Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology [Internet]. Cambridge University Press; 2015. p. 85-183. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/9781139137201%23c02283-3-0/type/book_part
7. Gynaecology Guidelines Committee: Guidelines on the Management of Actinomyces – Like Organisms (Alos) on Smears in Patients with Intra-Uterine Devices (2018).
8. Zhu W, Filler SG. Interactions of Candida albicans with epithelial cells. Cell Microbiol, 2010.
9. Myint S. Textbook of pediatric infectious diseases (5th edition). J Infect [Internet]. 2005 Jan;50(1):89. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445304001306
10. Ferry T, Valour F, Karsenty J, Breton P, Gleizal A, Braun E, et al. Actinomycosis: etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. Infect Drug Resist [Internet]. 2014 Jul;183. Disponível em: http://www.dovepress.com/actinomycosis-etiology-clinical-features-diagnosis-treatment-and-manag-peer-reviewed-article-IDR
11. Reyankar SG. Candidíase, Manuais MSD edição para profissionais. Recuperado em Dezembro 17 de 2020, a partir de: <https://www.msdmanuals.com/pt/casa/infec%C3%A7%C3%B5es/infec%C3%A7%C3%B5es-f%C3%BAngicas/candid%C3%ADase?query=candidiase>.

Qual a razão para ainda usarmos máscaras?

Why do we still wear masks?

Joseli Maria da Rocha Nogueira[1]

[1] Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Ciências Biológicas - ENSP. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Prezado Editor,

Durante a Pandemia atual, o uso das máscaras como EPI tem sido recomendado por vários órgãos internacionais da área da saúde.

Todavia observa-se que a população não tem aderido adequadamente à essa utilização.

Mesmo em grupos ligados à área da saúde, muitas pessoas não conseguem entender a razão da utilização, acreditando que serviriam somente para autoproteção e, como já estão vacinadas, a doença apenas induziria sintomas gripais de diferentes intensidades, sempre com resolução benigna, esquecendo que imunossuprimidos, doentes crônicos e crianças não vacinadas, continuam expostos.

Devemos considerar que estamos lidando com um vírus que, só no Brasil, contaminou cerca de 34 milhões de pessoas, matando aproximadamente 680.000 até hoje e que possui RNA como codificante genético, aumentando consideravelmente sua taxa de mutação e produção de novas variantes, que podem ou não responder às vacinas já desenvolvidas.

Outro ponto a ser observado é que esses vírus somente produzem novas variantes se estiverem circulando na população, fato facilitado pelas aglomerações e liberação e/ou relutância em utilizar máscaras.

Nos últimos meses observou-se um novo aumento de casos e internações por Covid-19, aliado à baixa cobertura vacinal, pois além de não termos ainda autorização para vacinação na primeira infância, também identifica-se a relutância na vacinação em outras faixas etárias. Segundo o Ministério da Saúde, a cobertura da terceira dose no Brasil, não chegou a 50% dos adultos até meados de maio. Sendo ainda menor (30%) entre jovens de 18 a 24 anos. Outra preocupação é em relação à quarta dose dos idosos: A faixa etária com maior cobertura (17%) é dos maiores de 80 anos, e a menor (3,4%) entre 60 e 64 anos.

A falta do reforço, deixa as pessoas mais expostas. Estudos sugerem boa proteção vacinal somente por 5 meses, necessitando de reforços intermitentes.

Considerando esses dados paralelamente com a necessidade da utilização de máscaras, devemos avaliar que tipos seriam ideais para o uso da população. Este EPI feito de pano, apesar de menos custoso, não é tão eficaz e a recomendação da OMS é que tenha três camadas de tecido, a exterior resistente à água; a intermediária sintética ou de algodão para atuar como filtro, e a interior absorvente à água. As máscaras cirúrgicas são descartáveis, portanto pouco econômicas, apesar de filtrar partículas menores que outros tecidos. A N-95 é um dos tipos mais seguros, oferecendo cinco camadas

Correspondência
Joseli Maria da Rocha Nogueira
E-mail: joseli@ensp.fiocruz.br

Recebido em 12/08/2022 | Aprovado em 15/08/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202200061

de proteção que se encaixam no rosto vedando todas as extremidades do nariz, bochecha e queixo, mas possui custo maior. Ultimamente, a PFF2 com clipe nasal e elástico atrás da cabeça, tem sido recomendada, pois oferece alta proteção (compatível à N95) por um valor menor.

Portando reforçamos a necessidade de campanhas para a manutenção do uso de máscaras de forma adequada, tampando tanto a boca quanto o nariz, tanto em locais fechados como abertos, já que a disseminação dos vírus mesmo que a princípio possa não levar ao óbito, contribui para o avanço da sua variabilidade, aumentando também a chance de que as vacinas atuais tornem-se ineficientes para proteção.

BIBLIOGRAFIA

BRASIL, Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Vacinômetro. Disponível em: <https://conselho.saude.gov.br/vacinometro> Acessado em: 05/08/2022.

BRASIL, Radioagência Nacional. Fiocruz: cobertura da terceira dose da vacina segue abaixo da média. De 20/05/2022. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/radioagencia-nacional/saude/audio/2022-05/fiocruz-cobertura-da-terceira-dose-da-vacina-segue-abaixo-da-media> Acessado em 05/08/2022.

CONASS. Conselho Nacional das Secretários de Saúde. Painel Nacional: Covid-19. Disponível em: <https://www.conass.org.br/painelconasscovid19/> acessado em 05/08/2022.

SACANARI S.N.; NOGUEIRA J.M.R. A arquitetura laboratorial e a proteção dos profissionais de saúde em tempos de COVID-19. 2020. RBAC. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/artigos/arquitetura-laboratorial-e-protecao-dos-profissionais-de-saude-em-tempos-de-covid-19/> acessado em 05/08/2022.

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS
Brazilian Journal of Clinical Analyses

ISSN 2448-3877 – Versão Online
ISSN 0370-369-x – Versão Impressa

Instruções aos autores/*Instructions for authors*

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 Trail Number [SRCTN], Nederlands 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 categoriais 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**
Título Completo *Incluir versão em Inglês*	**Complete Title** *Incluir versão em Português*
Título Corrido *Incluir versão em Inglês*	**Running Title** *Incluir versão em Português*
Autores	**Authors**
Resumo *Incluir versão em Inglês*	**Abstract** *Incluir versão em Português*
Palavras-chave *Incluir versão em Inglês*	**Keywords** *Incluir versão em Português*
Introdução	**Introduction**
Material e Métodos	**Material and Methods**
Ética	**Ethics**
Resultados	**Results**
Discussão	**Discussion**
Conclusão	**Conclusion**
Conflito de interesse	**Conflicts of Interests**
Suporte Financeiro	**Funding Sources**
Agradecimentos	**Ackouledgements**
Referências	**References**

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".

SUPORTE 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-Excell 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-Excell em formato ".doc", ".docx" ou ".xls" e não como imagem. Imagens produzidas em software estatístico devem ser convertidas para formato MS-Excell, 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/rcbc/v35n6/v35n6a14.pdf (Versão em Português) ou em 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 partículas de ligação como "de" ou "da";
- Sobrenomes duplos, com hífens ou apóstrofos 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/dois autores:** No mesmo ano, Nishimura e Miyaji[26] mudaram a denominação do fungo para Hortaea werneckii, em homenagem a Parreiras Horta.
- **Mais de dois autores:** Giannopoulos et al.[32] 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,[17] 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,[5] 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.[14]

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 como 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. Paracoccidioidomycosis. 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, Cordoba 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 Penteado MV. Vigilância Sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2007. p. 72-80.
- **Reponsabilidade 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 União13 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, Brigido MM, Felipe MSS, Silva-Pereira I. Identification and Characterization of Phase-Specific cDNAs Encoding for Two Hydrophobins in the Fungus Paracoccidioides brasiliensis. In: 4o. Congreso Virtual de Micología de Hongos Patógenos en 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/. 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. _____

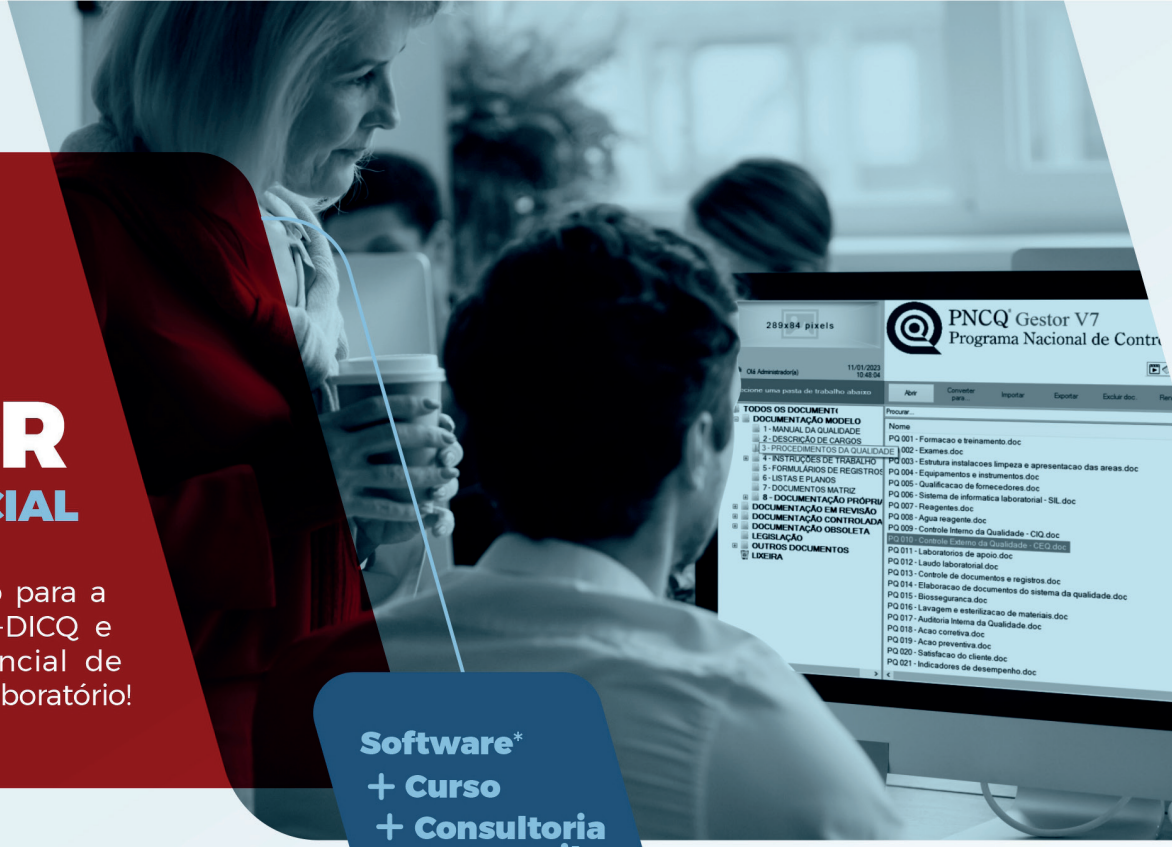
Data: ____/_____/_____.

CURSO

PNCQ GESTOR

PRESENCIAL

Prepare seu laboratório para a Acreditação pelo SNA-DICQ e conquiste esse diferencial de qualidade para o seu laboratório!



Software*
+ Curso
+ Consultoria por e-mail

Saiba mais
sobre o software

Curso Preparação do Laboratório para Implantação de um Sistema de Gestão da Qualidade - PNCQ Gestor e Formação de Auditores Internos.

Agenda de cursos PNCQ Gestor 2023

Quando		Onde
Março	9 e 10 23 e 24	Belo Horizonte/MG Belém/PA
Abril	13 e 14 27 e 28	São Paulo/SP Brasília/DF
Maio	4 e 5 18 e 19	Salvador/BA Uberlândia/MG
Junho	16 e 17	Florianópolis/SC **Pré 48º CBAC**

Quando		Onde
Agosto	3 e 4 17 e 18	Goiânia/GO Curitiba/PR
Setembro	14 e 15 28 e 29	Vitória/ES Fortaleza/CE
Outubro	5 e 6 19 e 20	Porto Alegre/RS Ribeirão Preto/SP
Novembro	9 e 10 23 e 24	Rio de Janeiro/RJ São Luís/MA

Valores diferenciados para os laboratórios que já possuem o software! Consulte!
Reserve sua vaga preenchendo a ficha de pré-inscrição – você não paga nada agora!
Descontos especiais na Auditoria Inicial do SNA-DICQ

**Software PNCQ Gestor em atendimento aos requisitos do Manual do SNA-DICQ.*

PNCQ®
Programa Nacional de Controle de Qualidade

Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

@pncqoficial @PNCQoficial /pncq-oficial

(21) 3172-7100 | 2569-6867 pncq@pncq.org.br

Inscreva-se pelo site
pncq.org.br