





INSCRIÇÕES ABERTAS

Associado Pessoa Física SBAC, com as anuidades dos últimos **3 anos quitadas (2023, 2024 e 2025)**, tem direito a uma inscrição gratuita para o 50° CBAC.



Consulte as regras para saber se você tem direito à gratuidade no 50° CBAC.

Escaneie o QR Code ao lado ou acesse:



sbac.org.br/gratuidades-associados-profissionais-50o-cbac



cbac.org.br







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

Volume 56 - Número 3 - 2024

Edição online - ISSN 2448-3877

Editor Emérito/Emeritus Editor Paulo Murillo Neufeld Editora-chefe/Editor-in-Chief
Mauren Isfer Anghebem

Produção Editorial/ *Publisher*Editorarte Projetos de Comunicação e

Editora I tda

Editores Associados/Associate Editors

Bacteriologia Clínica/Clinical Bacteriological Joseli Maria da Rocha Nogueira

Bioquímica Clínica/Clinical Biochemistry Mauren Isfer Anghebem

Citologia Clínica/Clinical Cytology Júlio Cézar Merlin

Gestão e Controle da Qualidade/Quality Management and Control Flávia Martinello Hematologia Clínica/Clinical Hematology Marcos Kneip Fleury

Imunologia e Virologia Clínica/Clinical Immunology and Virology Dennis Armando Bertolini

Micologia Clínica/Clinical Micology Sarah Gonçalves Paulo Murillo Neufeld 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 Adriana Medianeira Rossato - Brasil Alceu Toledo Júnior - Brasil Alexandre Januário da Silva - EUA Alexandre Sherlley Casimiro Onofre - Brasil Amadeo Sáez-Alguézar - Brasil Ana Cristina Rivas Da Silva - Brasil Ana Paula Giolo Franz - Brasil Andréa Regina De Souza Baptista - Brasil Andrea Silva - Chile Antônio Walter Ferreira - Brasil Carlos Alberto Mayora Aita - Brasil Carlos Álvarez - Chile Carmen Paz Oplustil - Brasil Claudia Regina Bonini - Brasil Diogo André Pilger - Brasil

Eduardo Álvarez Duarte - Chile

Eleine Kuroki Anzai - Brasil Fabiane Gomes de Moraes Rego - Brasil Fabrício Souza Campos - Brasil Fernando Finoketti - Brasil Izabella Castilho R. dos Santos Weiss - Brasil Jaime Antônio Abrantes - Brasil José Antonio Mainardi de Carvalho - Brasil Juliane Araújo Greinert Goulart - Brasil Lisiane da Luz Rocha Balsan - Brasil Luis Conrado Zaror Cornejo - Chile Marcos Kneip Fleury - Brasil Maria Elizabeth Menezes - Brasil Maria Regina Reis Amendoeira - Brasil Marileia Scartezini - Brasil Marilise Brittes Rott - Brasil Neci Matos Soares - Brasil

Patrício Godoy Martinez - Chile Patrick Menezes Lourenço - Brasil Pedro Alves D'azevedo - Brasil Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães - EUA Raíssa Nunes dos Santos - Brasil Raul Girardi - Argentina Ricardo David Couto - Brasil Ricardo Luiz Dantas Machado - Brasil Samuel Ricardo Comar - Brasil Silvia Helena Rabelo dos Santos - Brasil Simone Martins de Castro - Brasil Tiana Tasca - Brasil Valdiery Silva de Araújo - Brasil Victor Silva - Chile Viviana Galimbert Arruk - Brasil Vlademir Vicente Cantarelli - Brasil



DIRETORIA EXECUTIVA/EXECUTIVE BOARD

Maria Elizabeth Menezes (SC)
Presidente/President

Marcos Kneip Fleury (RJ) Vice-Presidente/Vice-President

Juno Damasceno Silva (RJ) Secretário-Geral/General Secretary Vanderlei Eustáquio Machado (MG) Secretário/Secretary

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

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

Conselho Fiscal/Fiscal Board Titulares/Holders

Cláudio José de Freitas Brandão (BA) Marcello Ávila Mascarenhas (RS) Flávia Martinello (SC)

Suplentes/Alternates

Iberê Ferreira da Silva Júnior (MT) Fernando Luís Bacelar de Carvalho Lobato (MA) Júlio Cézar Merlin (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



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

Volume 56/Volume 56 - Número 3/Number 3

Sumário / Contents

| 131 | PT RBAC bilíngue estreia com edição temática |
|-----|--|
| 132 | EN RBAC bilingual edition debuts with thematic issue |
| | Anghebem MI |
| | |
| | Nota Técnica / Technical notes |
| | |
| | |

- Prosicionamento da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) sobre o relato da presença de espermatozoides em amostra de urina 2024
- Position statement of the Brazilian Society of Clinical Analysis (SBAC) on the report of the presence of spermatozoa in urine samples

 Anghebem MI, Franz APG, Martinello F
- 143 PT Recomendações da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas SBAC quanto à preservação de amostras de urina, para fins forenses, de indivíduos do sexo feminino sob suspeita de abuso sexual
- Recommendations from the Brazilian Society of Clinical Analysis SBAC regarding the preservation of urine samples for forensic purposes from female individuals suspected of sexual abuse

 Alves HB, Anghebem MI, Franz APG, Martinello F, Menezes ME

Posicionamento da SBAC/SBAC Position Statement

- 149 PT Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico no Contexto da Atenção à Saúde PNDL
- 153 EN Structuring the National Policy for Laboratory Diagnosis in the Context of Healthcare PNDL Menezes ME, Boff PR, Martinello F, Costa e Silva L, Denez KB, Silva PEA

Artigos de revisão / Review articles

157 PT Exame coprológico funcional

Editorial / Editorial

170 EN Functional coprology exam
Lima LM, Castilho VLP



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

Volume 56/Volume 56 - Número 3/Number 3

Sumário / Contents

| 183 | Principais métodos clássicos de coloração em bacteriologia: aplicações, técnicas, fundamentos e limitações |
|-----|---|
| 197 | Main classical staining methods in bacteriology: applications, techniques, principles, and limitations |
| | Costa RG, Esteves WTC, Nogueira JMR |
| | |
| 211 | PT Reference Change Value: Uma ferramenta do laboratório para interpretar resultados de exames |
| 221 | Reference Change Value: A laboratory tool for interpreting test results |
| | Martinello F, Seidler AB, Anghebem MI |
| | |
| 231 | Estimativas de incerteza de medição associada ao Laboratório Clínico e suas implicações na prática clínica |
| 242 | EN Estimates of measurement uncertainty associated with Clinical Laboratories and their implications for clinical practice |
| | Venturim JR, Vieira LV |
| 253 | Exames laboratoriais para o diagnóstico do diabetes com ênfase nos testes de sobrecarga |
| | |
| 266 | Laboratory tests for diabetes diagnosis with an emphasis on glucose load testing |
| | Anghebem MI, Zonatto CH, Leite JSCT, Marques VM, Toledo Júnior AO, Rego FGM, Picheth G |
| | |
| 270 | Instruções aos autores/Instructions for authors |
| 278 | mstruções aos autores/mstructions for authors |

RBAC bilíngue estreia com edição temática

RBAC bilingual edition debuts with thematic issue

Mauren Isfer Anghebem | Editora Chefe da RBAC

Pela primeira vez, desde seu lançamento em 1969, a Revista Brasileira de Análises Clínicas publica uma edição bilíngue, marcando o início de uma nova fase do periódico científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC.

A RBAC passará a publicar os artigos na sua versão original (português) e custeará a tradução e publicação da versão em inglês do mesmo artigo, ampliando o acesso à informação pela comunidade internacional.

Esta edição especial selecionou artigos com temáticas voltadas à fundamentos, técnicas, e aplicação prática do assunto pelos laboratórios de análises clínicas, com artigos na área de Bioquímica Clínica, Gestão e Controle de Qualidade, Parasitologia Clínica e Uroanálise.

O artigo intitulado "Reference Change Value: Uma ferramenta do laboratório para interpretar resultados de exames" mostra a importância de cada uma das fases de um exame laboratorial para a interpretação dos resultados quantitativos, com foco no conceito de reference change value (RCV), uma importante ferramenta que avalia a significância de mudanças nos resultados laboratoriais, especialmente em exames consecutivos. Outro artigo temático da área da Gestão e Controle de Qualidade, "Estimativas de incerteza de medição associada ao Laboratório Clínico e suas implicações na prática clínica", traz informações detalhadas sobre a incerteza da medição, que requer uma série de cálculos matemáticos e estatísticos fundamentados na validação e verificação dos métodos analíticos empregados no laboratório.

O "Exame Coprológico Funcional" é detalhado em um artigo que relata as técnicas e procedimentos para a realização deste exame, com imagens ilustrativas, fornecendo aos analistas clínicos um rico material científico para consulta.

Na área de Bioquímica Clínica, o artigo "Exames laboratoriais para o diagnóstico do Diabetes com ênfase nos testes de sobrecarga" aborda os critérios recentemente atualizados para o diagnóstico do diabetes e traz luz aos testes de sobrecarga de glicose, que geram dúvidas frequentes nos analistas clínicos.

Esta edição com caráter especial também contempla importantes recomendações e posicionamentos elaborados por comissões técnicas-científicas da SBAC. Um deles é o "Posicionamento da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) sobre o reporte de espermatozoides em urina 2024", que estabelece um algoritmo para relato no laudo laboratorial da presença de espermatozoides em urina, com sugestões de comentários e observações que podem ser inseridas no laudo laboratorial. Outro, intitulado "Recomendação da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC - quanto a preservação de amostras de urina de indivíduos do sexo feminino sob suspeita de abuso sexual para fins forenses", propõe procedimentos e orientações referentes à cadeia de custódia da amostra e à preservação da amostra de urina para fins forenses de identificação genética humana.

E, por fim, esta edição tem um artigo importantíssimo para o segmento laboratorial que trata da Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial no Contexto da Atenção à Saúde - PNDL.

Convido todos a se debrucar nesta leitura e divulgar a novidade da RBAC bilíngue aos colegas analistas, gestores, estudantes e pesquisadores.

Recebido em 10/12/2024 | Aprovado em 11/12/2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400214.pt

RBAC bilingual edition debuts with thematic issue

RBAC bilínque estreia com edição temática

Mauren Isfer Anghebem | Editor-in-Chief of RBAC

For the first time since its launch in 1969, the Brazilian Journal of Clinical Analyses (RBAC -Revista Brasileira de Análises Clínicas) publishes a bilingual edition, marking the beginning of a new phase of the scientific journal of the Brazilian Society of Clinical Analysis – SBAC.

RBAC will now publish articles in their original version (Portuguese) and will fund the translation and publication of the English version of the same article, expanding access to information for the international community.

This special edition selected articles focused on fundamentals, techniques, and practical application of the subject by clinical laboratories, with articles in the fields of Clinical Chemistry, Quality Management and Control, Clinical Parasitology, and Urinalysis.

The article titled "Reference Change Value: A laboratory tool for interpreting test results" highlights the importance of each phase of a laboratory test for interpreting quantitative results, with a focus on the concept of reference change value (RCV), an important tool that assesses the significance of changes in laboratory results, especially in consecutive tests. Another thematic article in the area of Quality Management and Control, "Estimates of measurement uncertainty associated with Clinical Laboratories and their implications for clinical practice", provides detailed information on measurement uncertainty, which requires a series of mathematical and statistical calculations based on the validation and verification of the analytical methods used in the laboratory.

The "Functional Coprological Examination" is detailed in an article that outlines the techniques and procedures for conducting this test, with illustrative images, providing clinical analysts with a rich scientific resource for consultation.

In the field of Clinical Biochemistry, the article "Laboratory tests for Diabetes diagnosis with an emphasis on glucose load testing" addresses the recently updated criteria for diagnosing diabetes and sheds light on glucose load tests, which often raise questions among clinical analysts.

This special edition also includes important recommendations and positions developed by the technical-scientific committees of SBAC. One of them is the "Position statement of the Brazilian Society of Clinical Analysis (SBAC) on the report of the presence of spermatozoa in urine samples – 2024", which establishes an algorithm for reporting the presence of spermatozoa in urine in laboratory reports, with suggestions for comments and observations that can be included in the report. Another, titled "Recommendation from the Brazilian Society of Clinical Analysis – SBAC regarding the preservation of urine samples for forensic purposes from female individuals suspected of sexual abuse", proposes procedures and guidelines related to the chain of custody of the sample and the preservation of the urine sample for forensic human genetic identification purposes.

Finally, this edition includes a very important article for the laboratory segment that discusses the structuring of the National Policy for Laboratory Diagnosis (PNDL - Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial) in the context of healthcare.

I invite everyone to delve into this reading and spread the news of the bilingual RBAC edition to colleagues, managers, students, and researchers.

Received on Dec 10, 2024 | Approved on Dec 11, 2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400214.en

Posicionamento da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) sobre o relato da presença de espermatozoides em amostra de urina - 2024

Position statement of the Brazilian Society of Clinical Analysis (SBAC) on the report of the presence of spermatozoa in urine samples

Mauren Isfer Anghebem¹, Ana Paula Giolo Franz², Flávia Martinello³

- ¹ Farmacêutica, Doutora em Ciências Farmacêuticas/Análises Clínicas, Professora Adjunta da Escola de Medicina e Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica e Professora Adjunta do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná/UFPR. Curitiba – Paraná – Brasil. Membro do Grupo Técnico-Científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC.
- ² Biomédica, Doutoranda em Bioexperimentação, Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Passo Fundo, Passo Fundo-RS, Brasil. Membro do Grupo Técnico-Científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC.
- ³ Farmacêutica, Pós-doutora em Análises Clínicas, Professora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis - Santa Catarina - Brasil. Membro do Grupo Técnico-Científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC.

INTRODUÇÃO

O exame de urina é uma importante ferramenta diagnóstica. O resultado deste exame, analisado em conjunto com os dados da anamnese e exame físico do paciente, é capaz de diagnosticar e monitorar doenças do sistema urinário, distúrbios metabólicos e quadros infecciosos, mesmo em pacientes assintomáticos.(1)

O exame de urina compreende 3 fases principais: pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase pré-analítica do exame de urina é essencial para garantir um resultado acurado e reduzir a rejeição da amostra e as recoletas. Neste sentido, o laboratório de análises clínicas é responsável por fornecer ao paciente informações detalhadas sobre o preparo para a

coleta e o procedimento para a coleta da amostra de urina. Deve ser enfatizado ao paciente que o resultado do exame de urina pode sofrer interferência de fatores como a alimentação e a hidratação, a diurese, o uso de medicamentos, a prática de exercícios físicos e a atividade sexual anterior à coleta.(2)

No sexo masculino, urinas coletadas após relação sexual ou masturbação podem conter espermatozoides que permaneceram na uretra, sem significado clínico. No entanto, a presença de espermatozoides na urina também pode estar associada à doenças ou ao uso de determinados medicamentos, motivo pelo qual se torna relevante o seu relato em laudos de adultos do sexo masculino.(3) Já em amostras de urina de indivíduos do sexo feminino o achado destes elementos requer cautela e condutas específicas apresentadas na sequência.

Este posicionamento deverá ser citado como:

Anghebem, Mauren Isfer; Franz, Ana Paula Giolo; Martinello, Flávia. Posicionamento da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) sobre o relato da presença de espermatozoides em amostra de urina - 2024. Comissão de Publicações da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC. RBAC. 2024; 56(3):133-137.

Recebido em 13/08/2024 | Aprovado em 19/08/2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400195.pt

Espermatozoides em urina de adultos do sexo masculino

Os espermatozoides são comumente observados na primeira micção pós-ejaculatória, independente da idade do paciente. Em pessoas do sexo masculino com idade avançada também é possível encontrar espermatozoides na urina devido à contração reduzida do esfíncter uretral interno. (3) Nestas duas condições, o achado destes elementos não assume importância clínica.

O líquido seminal pode, portanto, contaminar a urina tanto após a ejaculação normal quanto nos casos de ejaculação retrógrada. A ejaculação retrógrada é um distúrbio decorrente de condições anatômicas, traumáticas, neuropáticas e/ou farmacológicas, caracterizado pelo fluxo reverso do líquido seminal da uretra posterior para a bexiga durante a ejaculação, podendo resultar em infertilidade masculina. (4)

Embora a presença de espermatozoides na urina não seja determinante, é um fator importante no diagnóstico da ejaculação retrógrada. A pesquisa de espermatozoides na urina após a ejaculação (urina pós-ejaculatória) para determinar a presença de ejaculação retrógrada parcial é recomendada em pacientes inférteis que apresentam baixo volume de sêmen. (5)

A ejaculação retrógrada ocorre mais comumente como resultado de prostatectomia transuretral, dissecção de linfonodos retroperitoneais e neuropatia diabética. A neuropatia diabética contribui para um amplo espectro de distúrbios clínicos, incluindo distúrbios da ejaculação, motivo pelo qual é possível encontrar espermatozoides em urina de indivíduos com diabetes. A ejaculação retrógrada também pode estar associada à história de cirurgia pélvica para câncer colorretal ou história de ressecção transuretral da próstata, devido a lesões em nervos envolvidos na ejaculação durante o procedimento cirúrgico. E, ainda, espermatozoides podem ser encontrados em urinas de indivíduos em uso de alfabloqueadores ou inibidores seletivos da recaptação da serotonina, que são fatores de risco conhecidos para distúrbios de ejaculação. (6) Espermatozoides podem ser observados em urinas de usuários de drogas psicoativas e álcool, uma vez que estas substâncias afetam o fechamento do esfíncter uretral interno durante a ejaculação, facilitando o fluxo de sêmen para a bexiga.(3)

Espermatozoides em urina de crianças e adolescentes do sexo masculino

Semenarca ou espermarca é o termo utilizado para descrever a primeira ejaculação do menino, uma emissão espontânea de sêmen que acontece por volta de 12 ou 13 anos de idade. É um evento involuntário que geralmente ocorre durante o sono, quando é chamada de polução noturna. Trata-se de um

processo fisiológico normal, motivo pelo qual a partir desta idade é possível encontrar espermatozoides na urina de adolescentes do sexo masculino, sem que tenham praticado relação sexual ou masturbação nas horas que antecederam a coleta da amostra de urina. (7) A espermatúria é um evento comum e regular nas fases inicial e média da puberdade, podendo ocorrer antes de qualquer outro sinal da puberdade, sendo, portanto, útil para determinar a maturação gonadal. (8) Assim, fica a critério do médico assistente determinar a relevância clínica e a necessidade de pesquisa de espermatozoide na urina de crianças e adolescentes do sexo masculino.

Espermatozoides em urina de adultos do sexo feminino

A observação de espermatozoides na urina de adultos do sexo feminino está associada à exposição sexual recente, indicando falha na fase pré-analítica do exame de urina. A presença destes elementos na urina desta população só assume relevância em contextos forenses, onde há suspeita de abuso sexual ou outras formas de exposição não consentida. Apenas nesta situação específica, sob demanda judicial, a pesquisa de espermatozoides na urina deverá ser realizada e sua presença, obrigatoriamente, ser relatada. Nestes casos, é necessário que sejam asseguradas todas as etapas da cadeia de custódia. A cadeia de custódia define todo o percurso da prova material, desde o seu reconhecimento até o seu descarte, com o objetivo de garantir a autenticidade, a idoneidade e a preservação dos vestígios.

Espermatozoides em urina de crianças e adolescentes do sexo feminino

O achado de espermatozoides em crianças e adolescentes do sexo feminino requer a investigação de possíveis erros pré-analíticos. O laboratório de análises clínicas deve garantir a qualidade de todas as etapas do exame, incluindo a rastreabilidade, a fim de evitar e excluir possível troca de amostra ou contaminação durante a coleta e/ou processamento da amostra.

Segundo o Decreto-Lei nº 2.848/40 (Código Penal), artigo 217-A, é considerado crime ter conjunção carnal ou praticar ato libidinoso com menor de 14 anos. (9) Portanto, uma vez garantida a qualidade da amostra, a observação de espermatozoides em urina de crianças e adolescentes do sexo feminino menores de 14 anos pode caracterizar abuso sexual e sempre deverá ser reportada no laudo do exame de urina. Além disso, o laboratório deve comunicar o Conselho Tutelar ou a Vara da Infância e Juventude ou o Ministério Público, na ausência do primeiro. Esta ação vai ao encontro do Parecer nº 18/2024, (10) do Conselho

Federal de Medicina, publicado em 27 de julho de 2024, que afirma que configura omissão e negligência não relatar no laudo do exame de urina a presença de espermatozoides em pacientes do sexo feminino de até 13 anos, 11 meses e 29 dias.

De acordo com o Art. 245 do Estatuto da Criança e do Adolescente, incorre em infração administrativa passível de multa o médico ou responsável por estabelecimento de atenção à saúde que deixar de comunicar à autoridade competente os casos de que tenha conhecimento, envolvendo suspeita ou confirmação de maus-tratos contra criança ou adolescente. (11) De acordo com o Conselho Federal de Medicina, "a notificação ao Conselho Tutelar pelo médico ou responsável pelo estabelecimento de saúde é, portanto, compulsória nos casos de suspeita ou confirmação de abuso sexual contra crianças e adolescentes de até 13 anos, 11 meses e 29 dias, sob pena de multa e multa em dobro em caso de reincidência. Todas as amostras de crianças e adolescentes do sexo feminino de até 13 anos, 11 meses e 29 dias em que tenha sido detectada a presença de espermatozoides deverão ser armazenadas em condições adequadas para eventuais estudos forenses. O Conselho Tutelar costuma disponibilizar formulário padrão para as notificações, que pode variar conforme o estado."(10)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fase pré-analítica, que abrange desde a orientação e o preparo do paciente, a coleta, transporte e armazenamento da amostra, desempenha um papel crucial na acurácia dos resultados laboratoriais e deve ser rigorosamente controlada para assegurar a validade dos dados.

Relações sexuais devem ser evitadas um dia antes da coleta da amostra de urina devido à probabilidade de contaminação da amostra com proteínas e outros elementos, como células epiteliais e espermatozoides. É fundamental reforçar a orientação aos pacientes para que descartem o primeiro jato de urina, promovendo a eliminação de elementos normalmente presentes na abertura uretral. Isso também minimiza as chances da amostra de urina ser contaminada por espermatozoides que permaneceram na uretra.

Embora a literatura esteja amplamente focada em indivíduos adultos do sexo masculino, a presença de espermatozoides em amostras de urina de outras populações deve ser criteriosamente avaliada devido às implicações clínicas e legais. O Parecer CFM nº 18/2024, (10) que recomenda o relato no laudo do achado de espermatozoides na urina de crianças e adolescentes do sexo feminino de até 13 anos, 11 meses e 29 dias, é direcionado aos laboratórios dirigidos por médicos e regularmente inscritos nos Conselhos Regionais de Medicina. Todavia, poderá ser seguido pelos laboratórios de análises clínicas sob responsabilidade técnica dos demais profissionais legalmente habilitados para exercer as análises clínicas.

O relato da presença de espermatozoides na urina de crianças e adolescentes do sexo masculino fica facultado ao laboratório. No entanto, recomenda-se que seja relatada para que o médico assistente determine a relevância clínica do achado.

Em amostras de urina de indivíduos do sexo feminino com 14 anos ou mais, não é aconselhável o relato da presença de espermatozoides, pela falta de relevância clínica. Nestes casos, a rejeição da amostra com solicitação de nova coleta pode ser indicada e padronizada pelo laboratório, para garantir uma amostra livre da interferência do material seminal. É importante que o laboratório tenha procedimentos bem estabelecidos que garantam toda a cadeia de custódia nos casos sob demanda judicial.

Ressalta-se que, neste documento, o termo **sexo** é definido pelos aspectos anatômicos (genitália) da espécie humana, ou seja, o termo foi utilizado para se referir ao gênero, masculino ou feminino, designado ao nascimento.⁽¹²⁾

RECOMENDAÇÕES DA SBAC

A SBAC recomenda que:

- Diante da observação inequívoca de espermatozoides na urina, os laboratórios sigam o algoritmo ilustrado na Figura 1.
- Os laboratórios de análises clínicas solicitem Termo de Consentimento para o relato de todos os elementos observados no exame de urina, e incluam as observações descritas na Figura 1.
- 3. Os laboratórios implementem procedimentos detalhados com o fluxo de notificação de casos de amostras de urina de crianças e adolescentes do sexo feminino menores de 14 anos com presença de espermatozoides para o Conselho Tutelar, de acordo com sua rotina, resguardando-se de penalidades éticas e criminais.



Figura 1

Algoritmo para relato no laudo laboratorial da presença de espermatozoides em urina.

Observações:

Os comentários I, II, III e IV, a seguir, poderão ser utilizados como notas explicativas nos laudos de exame de urina.

(I) Espermatozoides podem ser observados na urina pós-ejaculatória, independente da idade do paciente; e, em idosos, devido à contração reduzida do esfíncter uretral interno, sem relevância clínica. A presença de espermatozoide pode, também, estar associada à ejaculação retrógrada, que consiste no fluxo reverso do líquido seminal da uretra posterior para a bexiga durante a ejaculação, decorrente de condições anatômicas, traumáticas, neuropáticas e/ou farmacológicas. A interpretação fica a critério do médico. De medico.

- ¹ Tomita M, Kikuchi E, Maeda T, Kabeya Y, Katsuki T, Oikawa Y, Kato K, Ohashi M, Nakamura S, Oya M, Shimada A. Clinical Background of Patients with Sperm in Their Urinary Sediment. PLoS One. 2015 Sep 11;10(9):e0136844.
- ² Gupta S, Sharma R, Agarwal A, Parekh N, Finelli R, Shah R, et al. A Comprehensive Guide to Sperm Recovery in Infertile Men with Retrograde Ejaculation. World J Mens Health. 2022 Apr;40(2):208-216. doi: 10.5534/wjmh.210069.

(II) O relato da presença de espermatozoides em urina de crianças e adolescentes do sexo masculino pode ser útil para determinar a maturação gonodal, ficando a critério médico a relevância clínica do achado.⁽¹⁾

¹ Engelbertz F, Korda JB, Engelmann U, Rothschild M, Banaschak S. Longevity of spermatozoa in the post-ejaculatory urine of fertile men. Forensic Sci Int. 2010 Jan 30;194(1-3):15-9.

(III) O laboratório pode definir como critério de rejeição e solicitar nova amostra quando observar a presença de espermatozoides em amostras de urina de pessoas do sexo feminino maiores de 14 anos.

(IV) A presença de espermatozoides em amostras de urina de crianças e adolescentes menores de 14 anos será reportada em laudo pelo laboratório e notificada ao Conselho Tutelar ou à Vara da Infância e Juventude ou ao Ministério Público, em respeito à Lei nº 8.069/90 (Estatuto da Criança e do Adolescente)⁽¹⁾ e ao Decreto-Lei nº 2.848/40 (Código Penal),⁽²⁾ sob risco de infração criminal.

- 1 Brasil. Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente e dá outras providências. Diário Oficial da União, 27 set. 1990.7.
- ² Brasil. Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940. Código Penal. Diário Oficial da União, 3 jan. 1941.

REFERÊNCIAS

- Haq K, Patel DM. Urinalysis: Interpretation and Clinical Correlations. Med Clin North Am. 2023 Jul;107(4):659-679.
- 2. Coppens A, Speeckaert M, Delanghe J. The pre-analytical challenges of routine urinalysis. Acta Clin Belg. 2010 May-Jun;65(3):182-9.
- Tomita M, Kikuchi E, Maeda T, Kabeya Y, Katsuki T, Oikawa Y, Kato K, Ohashi M, Nakamura S, Oya M, Shimada A. Clinical Background of Patients with Sperm in Their Urinary Sediment. PLoS One. 2015 Sep 11;10(9):e0136844.
- Gupta S, Sharma R, Agarwal A, Parekh N, Finelli R, Shah R, et al. A Comprehensive Guide to Sperm Recovery in Infertile Men with Retrograde Ejaculation. World J Mens Health. 2022 Apr;40(2):208-216.
- Mieusset R, Walschaerts M, Isus F, Almont T, Daudin M, Hamdi SM. Diagnosis of Partial Retrograde Ejaculation in Non-Azoospermic Infertile Men with Low Semen Volume. PLoS One. 2017 Jan 6;12(1):e0168742.
- Ariagno JI, Mendeluk GR, Pugliese MN, Sardi SL, Acuña C, Repetto HE, Curi SM. The only presence of sperm in urine does not imply retrograde ejaculation. Arch Androl. 2005 Nov-Dec;51(6):431-6.

- Pedersen JL, Nysom K, Jørgensen M, Nielsen CT, Müller J, Keiding N, Skakkebaek NE. Spermaturia and puberty. Arch Dis Child. 1993 Sep;69(3):384-7.
- 8. Engelbertz F, Korda JB, Engelmann U, Rothschild M, Banaschak S. Longevity of spermatozoa in the post-ejaculatory urine of fertile men. Forensic Sci Int. 2010 Jan 30;194(1-3):15-9.
- 9. Brasil. Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940. Código Penal. Diário Oficial da União, 3 jan. 1941.
- Conselho Federal de Medicina. Parecer CFM nº 18/2024, de 27 de julho de 2024. Disponível em: https://sistemas.cfm.org.br/normas/visualizar/ pareceres/BR/2024/18.
- Brasil. Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente e dá outras providências. Diário Oficial da União, 27 set. 1990.
- Posicionamento Conjunto Medicina Diagnóstica Inclusiva: cuidado de pacientes transgênero. SBEM, CBR, SBPC-ML, 2019.

Position statement of the Brazilian Society of Clinical Analysis (SBAC) on the report of the presence of spermatozoa in urine **samples** – **2024**

Posicionamento da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) sobre o relato da presença de espermatozoides em amostra de urina - 2024

Mauren Isfer Anghebem¹, Ana Paula Giolo Franz², Flávia Martinello³

- ¹ Farmacêutica, Doutora em Ciências Farmacêuticas/Análises Clínicas, Professora Adjunta da Escola de Medicina e Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica e Professora Adjunta do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná/UFPR. Curitiba – Paraná – Brasil. Membro do Grupo Técnico-Científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC.
- ² Biomédica, Doutoranda em Bioexperimentação, Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Passo Fundo, Passo Fundo-RS, Brasil. Membro do Grupo Técnico-Científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC.
- ³ Farmacêutica, Pós-doutora em Análises Clínicas, Professora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis - Santa Catarina - Brasil. Membro do Grupo Técnico-Científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC.

INTRODUCTION

Urinalysis is an important diagnostic tool. The results of this examination, when analyzed in conjunction with the patient's medical history and physical examination, can diagnose and monitor urinary system diseases, metabolic disorders, and infectious conditions, even in asymptomatic patients. (1)

Urinalysis comprises three main phases: pre-analytical, analytical, and post-analytical. The pre-analytical phase is essential to ensure accurate results and reduce sample rejection and recollection. In this regard, the clinical laboratory is responsible for providing the patient with detailed information regarding preparation and urine sample collection

procedures. It should be emphasized to the patient that factors such as diet, hydration, diuresis, medication use, physical exercise, and sexual activity prior to sample collection may interfere with the urinalysis results. (2)

In males, urine samples collected after sexual intercourse or masturbation may contain spermatozoa that remained in the urethra, without clinical significance. However, the presence of spermatozoa in urine may also be associated with certain diseases or the use of specific medications, which is why its documentation in the reports of adult males is relevant. (3) In urine samples from females, the presence of these elements requires caution and specific measures, which are discussed below.

This position should be cited as:

Anghebem, Mauren Isfer; Franz, Ana Paula Giolo; Martinello, Flávia. Position statement of the Brazilian Society of Clinical Analysis (SBAC) on the report of the presence of spermatozoa in urine samples - 2024. Comissão de Publicações da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC. RBAC. 2024; 56(3):138-142.

Received on Aug 13, 2024 | Approved on Aug 19, 2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400195.en

Spermatozoa in the urine of adult males

Spermatozoa are commonly observed in the first post-ejaculatory urination, regardless of the patient's age. In older males, spermatozoa can also be found in the urine due to reduced contraction of the internal urethral sphincter. (3) In both conditions, the presence of these elements has no clinical significance.

Seminal fluid can therefore contaminate urine both after normal ejaculation and in cases of retrograde ejaculation. Retrograde ejaculation is a disorder resulting from anatomical, traumatic, neuropathic, and/or pharmacological conditions, characterized by the reverse flow of seminal fluid from the posterior urethra into the bladder during ejaculation, potentially leading to male infertility. ⁽⁴⁾

Although the presence of spermatozoa in urine is not conclusive, it is an important factor in the diagnosis of retrograde ejaculation. Testing for spermatozoa in post-ejaculatory urine to determine the presence of partial retrograde ejaculation is recommended in infertile patients with low semen volume. (5)

Retrograde ejaculation most commonly occurs as a result of transurethral prostatectomy, retroperitoneal lymph node dissection, and diabetic neuropathy. Diabetic neuropathy contributes to a broad spectrum of clinical disorders, including ejaculatory disorders, which is why spermatozoa can be found in the urine of individuals with diabetes. Retrograde ejaculation can also be associated with a history of pelvic surgery for colorectal cancer or transurethral resection of the prostate, due to nerve damage involved in ejaculation during the surgical procedure. Additionally, spermatozoa may be found in the urine of individuals using alpha-blockers or selective serotonin reuptake inhibitors, which are known risk factors for ejaculatory disorders. (6) Spermatozoa can also be observed in the urine of individuals who use psychoactive drugs and alcohol, as these substances affect the closure of the internal urethral sphincter during ejaculation, facilitating the flow of semen into the bladder. (3)

Spermatozoa in the urine of male children and adolescents

Semenarche or spermarche is the term used to describe a boy's first ejaculation, a spontaneous release of semen that typically occurs around 12 or 13 years of age. This involuntary event usually happens during sleep and is referred to as a nocturnal emission. It is a normal physiological process, which is why, starting from this age, spermatozoa can be found in

the urine of male adolescents, even if they have not engaged in sexual intercourse or masturbation in the hours prior to urine sample collection. Spermaturia is a common and regular event during the early and middle stages of puberty and may occur before any other sign of puberty, making it a useful indicator for determining gonadal maturation. Thus, it is up to the attending physician to determine the clinical relevance and the need for testing spermatozoa in the urine of male children and adolescents.

Spermatozoa in the urine of adult females

The observation of spermatozoa in the urine of adult females is associated with recent sexual exposure, indicating a failure in the pre-analytical phase of urinalysis. The presence of these elements in the urine of this population is only relevant in forensic contexts, where there is suspicion of sexual abuse or other forms of non-consensual exposure. Only in this specific situation, under judicial request, should the testing for spermatozoa in urine be performed, and its presence must be mandatorily reported. In such cases, all stages of the chain of custody must be ensured. The chain of custody defines the entire path of the material evidence, from its recognition to its disposal, with the aim of guaranteeing the authenticity, integrity, and preservation of the evidence.

Spermatozoa in the urine of female children and adolescents

The finding of spermatozoa in the urine of female children and adolescents requires the investigation of possible pre-analytical errors. The clinical laboratory must ensure the quality of all stages of the examination, including traceability, to avoid and rule out possible sample mix-ups or contamination during the collection and/or processing of the sample.

According to Decree-Law number 2,848/40 (Brazilian Criminal Code), Article 217-A, it is considered a crime to have carnal conjunction or practice libidinous acts with a minor under 14 years of age. ⁽⁹⁾ Therefore, once the quality of the sample is guaranteed, the observation of spermatozoa in the urine of female children and adolescents under 14 years of age may characterize sexual abuse and should always be reported in the urine examination report. Furthermore, the laboratory must notify the Guardianship Council or the Childhood and Youth Court or the Public Prosecutor's Office, in the absence of the former. This action is in line with Opinion number 18/2024,⁽¹⁰⁾ of the Brazilian Federal Council of

Medicine (CFM), published on July 27, 2024, which states that it constitutes omission and negligence not to report in the urine examination report the presence of spermatozoa in female patients up to 13 years, 11 months, and 29 days old.

According to Article 245 of the Brazilian Child and Adolescent's Statute (ECA), a physician or person responsible for a healthcare facility who fails to report to the competent authority cases of which they have knowledge, involving suspicion or confirmation of mistreatment against a child or adolescent, commits an administrative infraction subject to a fine. (11) According to the CFM, "notification to the Guardianship Council by the physician or person responsible for the healthcare facility is, therefore, mandatory in cases of suspected or confirmed sexual abuse against children and adolescents up to 13 years, 11 months, and 29 days old, under penalty of a fine and double fine in case of recurrence. All samples from female children and adolescents up to 13 years, 11 months, and 29 days old in which the presence of spermatozoa has been detected should be stored under appropriate conditions for possible forensic studies. The Guardianship Council usually provides a standard form for notifications, which may vary according to the state."(10)

FINAL CONSIDERATIONS

The pre-analytical phase, which encompasses patient orientation and preparation, sample collection, transport, and storage, plays a crucial role in the accuracy of laboratory results and must be rigorously controlled to ensure the validity of the data.

Sexual intercourse should be avoided one day prior to urine sample collection due to the likelihood of sample contamination with proteins and other elements, such as epithelial cells and spermatozoa. It is essential to reinforce guidance to patients to discard the first urine stream, promoting the elimination of elements normally present at the urethral opening. This also minimizes the chances of the urine sample being contaminated by spermatozoa that remain in the urethra.

Although the literature has largely focused on adult males, the presence of spermatozoa in urine samples from other populations must be carefully evaluated due to clinical and legal implications.

The CFM Opinion number 18/2024⁽¹⁰⁾, which recommends reporting the finding of spermatozoa in the urine of female children and adolescents up to 13 years, 11 months, and 29 days of age, is directed to laboratories run by physicians and regularly registered with the Regional Medical Councils. However, it may also be followed by clinical analysis laboratories under the technical responsibility of other professionals legally qualified to perform clinical analyses.

The reporting of the presence of spermatozoa in the urine of male children and adolescents is at the discretion of the laboratory. However, it is recommended that it be reported so that the attending physician can determine the clinical relevance of the finding.

In urine samples from individuals aged 14 years or older, it is not advisable to report the presence of spermatozoa due to the lack of clinical relevance. In these cases, the rejection of the sample with a request for a new collection may be indicated and standardized by the laboratory to ensure a sample free from seminal material interference. It is important for the laboratory to have well-established procedures that guarantee the entire chain of custody in cases under judicial request.

It is emphasized that, in this document, the term "sex" is defined by the anatomical aspects (genitalia) of the human species; thus, the term has been used to refer to the gender, male or female, assigned at birth.⁽¹²⁾

RECOMMENDATIONS FROM SBAC

The SBAC recommends that:

- 1. In the event of unequivocal observation of spermatozoa in the urine, laboratories should follow the algorithm illustrated in Figure 1.
- Clinical analysis laboratories should request a Consent Form for the reporting of all elements observed in the urinalysis and include the observations described in Figure 1.
- Laboratories should implement detailed procedures with a flow for notifying cases of urine samples from female children and adolescents under 14 years of age with the presence of spermatozoa to Guardianship Council, according to their routine, safeguarding against ethical and criminal penalties.

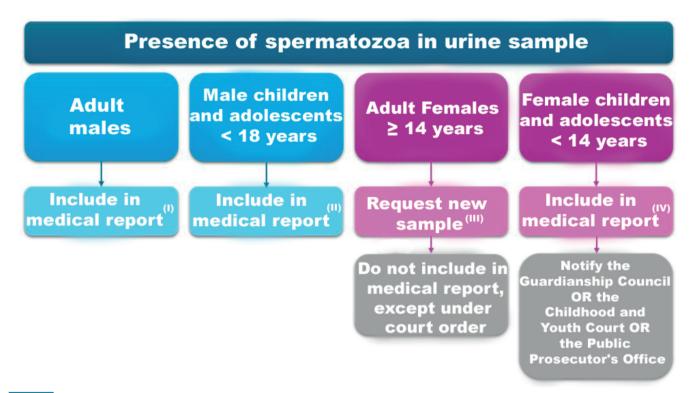


Figure 1

Algorithm for reporting the presence of spermatozoa in urine in the laboratory report.

Notes:

The comments I, II, III, and IV below may be used as explanatory notes in urinalysis reports.

(I) Spermatozoa may be observed in post-ejaculatory urine, regardless of the patient's age; and in older adults, due to reduced contraction of the internal urethral sphincter, without clinical relevance. The presence of spermatozoa may also be associated with retrograde ejaculation, which consists of the reverse flow of seminal fluid from the posterior urethra into the bladder during ejaculation, resulting from anatomical, traumatic, neuropathic, and/or pharmacological conditions. Interpretation is at the discretion of the physician. (2)

- ¹ Tomita M, Kikuchi E, Maeda T, Kabeya Y, Katsuki T, Oikawa Y, Kato K, Ohashi M, Nakamura S, Oya M, Shimada A. Clinical Background of Patients with Sperm in Their Urinary Sediment. PLoS One. 2015 Sep 11;10(9):e0136844.
- ² Gupta S, Sharma R, Agarwal A, Parekh N, Finelli R, Shah R, et al. A Comprehensive Guide to Sperm Recovery in Infertile Men with Retrograde Ejaculation. World J Mens Health. 2022 Apr;40(2):208-216. doi: 10.5534/wjmh.210069.

(II) The reporting of the presence of spermatozoa in the urine of male children and adolescents may be useful in determining gonadal maturation, with the clinical relevance of the finding left to the physician's discretion.⁽¹⁾

- ¹ Engelbertz F, Korda JB, Engelmann U, Rothschild M, Banaschak S. Longevity of spermatozoa in the post-ejaculatory urine of fertile men. Forensic Sci Int. 2010 Jan 30;194(1-3):15-9.
- (III) The laboratory may establish criteria for rejection and request a new sample when observing the presence of spermatozoa in urine samples from individuals aged over 14 years.

(IV) The presence of spermatozoa in urine samples from children and adolescents under 14 years of age will be reported in the laboratory report and notified to Guardianship Council or to the Childhood and Youth Court or to the Public Prosecutor's Office, in accordance with Law No. 8,069/90 (Brazilian Child and Adolescent's Statute (ECA)⁽¹⁾ and Decree-Law number 2,848/40 (Criminal Code)⁽²⁾, under the risk of criminal infringement.

- ¹ Brasil. Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente e dá outras providências. Diário Oficial da União, 27 set. 1990.7.
- ² Brasil. Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940. Código Penal. Diário Oficial da União, 3 jan. 1941.

REFERENCES

- Haq K, Patel DM. Urinalysis: Interpretation and Clinical Correlations. Med Clin North Am. 2023 Jul;107(4):659-679.
- 2. Coppens A, Speeckaert M, Delanghe J. The pre-analytical challenges of routine urinalysis. Acta Clin Belg. 2010 May-Jun;65(3):182-9.
- 3. Tomita M, Kikuchi E, Maeda T, Kabeya Y, Katsuki T, Oikawa Y, Kato K, Ohashi M, Nakamura S, Oya M, Shimada A. Clinical Background of Patients with Sperm in Their Urinary Sediment. PLoS One. 2015 Sep 11;10(9):e0136844.
- Gupta S, Sharma R, Agarwal A, Parekh N, Finelli R, Shah R, et al. A Comprehensive Guide to Sperm Recovery in Infertile Men with Retrograde Ejaculation. World J Mens Health. 2022 Apr;40(2):208-216.
- Mieusset R, Walschaerts M, Isus F, Almont T, Daudin M, Hamdi SM. Diagnosis of Partial Retrograde Ejaculation in Non-Azoospermic Infertile Men with Low Semen Volume. PLoS One. 2017 Jan 6;12(1):e0168742.
- Ariagno JI, Mendeluk GR, Pugliese MN, Sardi SL, Acuña C, Repetto HE, Curi SM. The only presence of sperm in urine does not imply retrograde ejaculation. Arch Androl. 2005 Nov-Dec;51(6):431-6.

- Pedersen JL, Nysom K, Jørgensen M, Nielsen CT, Müller J, Keiding N, Skakkebaek NE. Spermaturia and puberty. Arch Dis Child. 1993 Sep;69(3):384-7.
- 8. Engelbertz F, Korda JB, Engelmann U, Rothschild M, Banaschak S. Longevity of spermatozoa in the post-ejaculatory urine of fertile men. Forensic Sci Int. 2010 Jan 30:194(1-3):15-9.
- 9. Brasil. Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940. Código Penal. Diário Oficial da União, 3 jan. 1941.
- Conselho Federal de Medicina. Parecer CFM nº 18/2024, de 27 de julho de 2024. Available at: https://sistemas.cfm.org.br/normas/visualizar/ pareceres/BR/2024/18.
- 11. Brasil. Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente e dá outras providências. Diário Oficial da União, 27 set. 1990.
- 12. Posicionamento Conjunto Medicina Diagnóstica Inclusiva: cuidado de pacientes transgênero. SBEM, CBR, SBPC-ML, 2019.

Recomendações da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC quanto à preservação de amostras de urina, para fins forenses, de indivíduos do sexo feminino sob suspeita de abuso sexual

Recommendations from the Brazilian Society of Clinical Analysis – SBAC regarding the preservation of urine samples for forensic purposes from female individuals suspected of sexual abuse

Hemerson Bertassoni Alves¹, Mauren Isfer Anghebem², Ana Paula Giolo Franz³, Flávia Martinello⁴, Maria Elizabeth Menezes⁵

- 1 Farmacêutico, Doutor em Genética Forense pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Perito Criminal da Polícia Científica do Paraná, Professor Adjunto do Centro Universitário Santa Cruz, Curitiba, PR, Brasil.
- ² Farmacêutica, Doutora em Ciências Farmacêuticas/Análises Clínicas, Professora Adjunta da Escola de Medicina e Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e Professora Adjunta do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná/UFPR, Curitiba, PR, Brasil. Membro do Grupo Técnico-Científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC.
- ³ Biomédica, Doutoranda em Bioexperimentação, Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Passo Fundo, Passo Fundo RS, Brasil. Membro do Grupo Técnico-Científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC.
- ⁴ Farmacêutica, Pós-doutora em Análises Clínicas, Professora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis, SC, Brasil. Membro do Grupo Técnico-Científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC.
- ⁵ Farmacêutica, Doutora em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Assessora do Programa Nacional de Controle de Qualidade. Membro do Grupo Técnico-Científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC.

INTRODUÇÃO

A presença de espermatozoides em amostras de urina de crianças e adolescentes do sexo feminino menores de 14 anos deve ser reportada em laudo pelo laboratório (1,2) e notificada ao Conselho Tutelar ou à Vara da Infância e Juventude ou ao Ministério Público, em respeito à Lei nº 8.069/90 (Estatuto da Criança e do Adolescente)(3) e ao Decreto-Lei nº 2.848/40 (Código Penal), (4) sob risco de infração criminal.

A amostra de urina pode conter vários elementos, como as células da uretra peniana e vaginal e espermatozoides, (5) que podem ser utilizados para fins de identificação humana forense. Por meio da comparação entre amostras referência e células espermáticas, é possível a identificação do autor do delito em casos de violência sexual. A detecção

de espermatozoides auxilia na comprovação da ocorrência de ato sexual e a análise de DNA subsequente pode levar à identificação do suposto autor. (6)

A coleta de urina é uma opção não invasiva em casos de suspeita de abuso sexual, uma vez que é possível detectar vestígios de DNA ligado ao cromossomo Y (marcador sexual masculino) e de espermatozoides na urina de pacientes do sexo feminino até 24 horas após a penetração peniana-vaginal. São necessários mais estudos para determinar exatamente o efeito do tempo na detecção de espermatozoides em amostras de urina após suposto ato sexual não consentido, no entanto, evidências mostram que os espermatozoides podem ser observados após ato sexual em urinas de pacientes em período menstrual, bem como pacientes que urinaram previamente ou tomaram banho antes da realização da coleta de urina. (6,7)

Este artigo deverá ser citado como:

Alves, Hemerson Bertassoni; Anghebem, Mauren Isfer; Franz, Ana Paula Giolo; Martinello, Flávia; Menezes, Maria Elizabeth. Recomendações da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC quanto à preservação de amostras de urina, para fins forenses, de indivíduos do sexo feminino sob suspeita de abuso sexual. RBAC. 2024; 56(3):143-145.

Recebido em 10/09/2024 | Aprovado em 12/09/2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400196.pt

Em virtude da escassez de material científico, este artigo tem como objetivo propor procedimentos e orientações referentes à cadeia de custódia da amostra e à preservação da amostra de urina para fins forenses de identificação genética humana.

CADEIA DE CUSTÓDIA DA AMOSTRA

Considera-se Cadeia de Custódia da Prova Pericial, segundo a Lei 13964/2019 que atualizou o Código de Processo Penal, o "conjunto de todos os procedimentos utilizados para manter e documentar a história cronológica do vestígio coletado em locais ou em vítimas de crimes, para rastrear sua posse e manuseio a partir de seu reconhecimento até o descarte".⁽⁸⁾

Na hipótese do Laboratório de Análises Clínicas ser notificado para preservação de uma amostra de urina para fins de identificação humana forense, ele deve respeitar as premissas dos artigos 158-A ao art. 158-F do Código de Processo Penal Brasileiro, cujas normas foram publicadas e instituídas pela Lei Federal 13.964/2019. O laboratório passa a ser fiel depositário da amostra sob demanda judicial, ou seja, assume a guarda da amostra e não poderá descartá-la até que o processo esteja encerrado, sob pena de responder por perdas e danos (artigo 640 do Código Civil). (9)

Em suma, a amostra de urina deve ser registrada/ cadastrada em meio eletrônico, pelo sistema de cadastro do Laboratório, com todas as informações identificadoras possíveis, como: nome, sobrenome, data, hora de coleta e demais informações relevantes sobre a urina e seu doador, descrevendo como a amostra chegou ao laboratório e quais procedimentos analíticos foram executados, possibilitando rastrear sua posse e manuseio a partir de seu reconhecimento até o descarte.

PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA EXAMES GENÉTICOS

A preservação adequada de amostras de urina é crucial para garantir a integridade do DNA para exames genéticos de identificação humana. O armazenamento em condições de frio e técnicas de manuseio assépticas são fundamentais para obter resultados precisos e confiáveis. Além disso, a comunicação clara com o laboratório que realizará a análise genética é importante para garantir que os métodos de preservação e transporte sejam adequados às necessidades específicas do exame.⁽¹⁰⁾

Tecnicamente, qualquer matriz congelada que não tenha influência de inibidores da reação em cadeia da polimerase (*PCR – polymerase chain reaction*), incluindo a urina, pode ficar guardada por longos períodos.⁽¹⁰⁾

Procedimento técnico

A depender da situação, o laboratório de análises clínicas deverá proceder da seguinte forma, sempre garantindo a cadeia de custódia:

1. Amostra primária de urina para identificação genética coletada no próprio laboratório ou em outro local:

Amostras de urina de crianças e adolescentes do sexo feminino menores de 14 anos suspeitas de contaminação por material seminal, coletadas no próprio laboratório ou coletadas em outro local (hospital, clínica, escola, creche, residência) e enviadas ao laboratório de análises clínicas para análises forenses, devem ser processadas da seguinte maneira:

- Separar uma alíquota de 10 mL de urina em tubo estéril e, caso ainda tenha amostra de urina, guardar o tubo primário devidamente identificado em freezer a -20 °C até o encerramento do processo.
- 2. Centrifugar o tubo estéril a 2000-3000 g, por 10-15 minutos;
- 3. Descartar o sobrenadante com auxílio de pipeta e ressuspender o *pellet* (sedimento) no próprio resíduo líquido urinário:
- 4. Congelar esta amostra em tubo tipo *eppendorf*, em freezer a -20 °C ou, preferencialmente, em freezer a -80 °C.
- 5. Registrar esta amostra congelada no sistema do laboratório para o envio aos laboratórios indicados pela justiça, seguindo as recomendações contidas na RDC ANVISA 504/2021,⁽¹¹⁾ ou suas atualizações, que dispõe sobre as boas práticas para o transporte de material biológico humano.
- 6. Repetir os passos 1 a 5, mantendo uma amostra guardada no laboratório para análise de contraprova.

2. Amostra de urina já processada para posterior identificação genética

Se for identificada a presença de espermatozoides durante a análise microscópica do sedimento urinário de crianças e adolescentes do sexo feminino menores de 14 anos, o achado deve ser reportado conforme sugerido no Posicionamento da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) sobre o relato da presença de espermatozoides em amostra de urina, (2) e uma alíquota deste material deve ser preservada para fins de exame de identificação genética.

- O procedimento para o armazenamento é o seguinte:
- 1. Separar duas alíquotas do *pellet* (sedimento) em tubo tipo *eppendorf*, sendo uma alíquota para a prova e outra, para a análise de contraprova. Caso ainda tenha amostra de urina no tubo primário, guardá-lo devidamente identificado, em freezer a -20 °C, até o encerramento do processo.
- 2. Congelar ambos os tubos em freezer a -20 °C ou, preferencialmente, em freezer a -80 °C.
- Registrar estas amostras congeladas no sistema do laboratório para o envio aos laboratórios indicados pela justiça*, seguindo as recomendações contidas na RDC ANVISA 504/2021.⁽¹⁰⁾

REFERÊNCIAS

- Conselho Federal de Medicina. Parecer CFM nº 18/2024, de 27 de julho de 2024. Disponível em: https://sistemas.cfm.org.br/normas/visualizar/ pareceres/BR/2024/18.
- Anghebem, Mauren Isfer; Franz, Ana Paula Giolo; Martinello, Flávia. Posicionamento da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) sobre o relato da presença de espermatozoides em amostra de urina – 2024. Comissão de Publicações da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC. RBAC. 2024; 56(3):133-137.
- Brasil. Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente e dá outras providências. Diário Oficial da União, 27 set. 1990.7.
- Brasil. Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940. Código Penal. Diário Oficial da União, 3 jan. 1941.
- Kouri TT, Hofmann W, Falbo R, Oyaert M, Schubert S, Gertsen JB, Merens A, Pestel-Caron M; Task and Finish Group for Urinalysis (TFG-U), European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). The EFLM European Urinalysis Guideline 2023. Clin Chem Lab Med. 2024 Jun 5;62(9):1653-1786.

- Smith DA, Webb LG, Fennell AI, Nathan EA, Bassindale CA, Phillips MA. Early evidence kits in sexual assault: an observational study of spermatozoa detection in urine and other forensic specimens. Forensic Sci Med Pathol. 2014 Sep;10(3):336-43.
- Joki-Erkkilä M, Tuomisto S, Seppänen M, Huhtala H, Ahola A, Karhunen PJ. Urine specimen collection following consensual intercourse - A forensic evidence collection method for Y-DNA and spermatozoa. J Forensic Leg Med. 2016 Jan; 37:50-4.
- 8. Brasil. Lei nº 13.964, de 24 de dezembro de 2019. Aperfeiçoa a legislação penal e processual penal. Diário Oficial da União, 29 abril 2021.
- Brasil. Lei nº 10.406, de 10 de janeiro de 2002. Institui o Código Civil. Diário Oficial da União, 11 jan. 2002.
- 10. Sambrook, Joseph; Russell, David William. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 11. Resolução RDC nº 504, de 27 de maio de 2021. Dispõe sobre as boas práticas para o transporte de material biológico humano. Publicação: Diário Oficial da União, 31 maio 2021.

^{*} O Laboratório notificado pela Justiça deve entrar em contato com o Laboratório de Análises Clínicas e/ou Forenses indicado pela Justiça para a realização das análises, para estabelecer procedimentos orientativos sobre o encaminhamento destas amostras.

Recommendations from the Brazilian Society of Clinical Analysis - SBAC regarding the preservation of urine samples for forensic purposes from female individuals suspected of sexual abuse

Recomendações da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC quanto à preservação de amostras de urina, para fins forenses, de indivíduos do sexo feminino sob suspeita de abuso sexual

Hemerson Bertassoni Alves¹, Mauren Isfer Anghebem², Ana Paula Giolo Franz³, Flávia Martinello⁴, Maria Elizabeth Menezes⁵

- 1 Farmacêutico, Doutor em Genética Forense pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Perito Criminal da Polícia Científica do Paraná, Professor Adjunto do Centro Universitário Santa Cruz, Curitiba, PR, Brasil.
- ² Farmacêutica, Doutora em Ciências Farmacêuticas/Análises Clínicas, Professora Adjunta da Escola de Medicina e Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e Professora Adjunta do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná/UFPR, Curitiba, PR, Brasil. Membro do Grupo Técnico-Científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC.
- ³ Biomédica, Doutoranda em Bioexperimentação, Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Passo Fundo, Passo Fundo RS, Brasil. Membro do Grupo Técnico-Científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC.
- ⁴ Farmacêutica, Pós-doutora em Análises Clínicas, Professora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis, SC, Brasil. Membro do Grupo Técnico-Científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC.
- ⁵ Farmacêutica, Doutora em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Assessora do Programa Nacional de Controle de Qualidade. Membro do Grupo Técnico-Científico da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC.

INTRODUCTION

The presence of spermatozoa in urine samples from female children and adolescents under 14 years old must be described in the laboratory report^(1,2) and notified to the Guardianship Council or to the Childhood and Youth Court or to the Public Prosecutor's Office, in compliance with Law number 8.069/90 (Brazilian Child and Adolescent's Statute -ECA)(3) and Decree-Law number 2,848/40 (Brazilian Criminal Code),⁽⁴⁾ under the risk of criminal violation.

The urine sample may contain various elements, such as cells from the from the vagina, penile urethra, and spermatozoa, (5) which can be used for forensic human identification purposes. By comparing reference samples with sperm cells, it is possible to identify the perpetrator in

cases of sexual violence. The detection of spermatozoa helps confirm the occurrence of sexual activity, and subsequent DNA analysis may lead to the identification of the alleged perpetrator.(6)

Urine collection is a non-invasive option in cases of suspected sexual abuse, as it is possible to detect traces of Y chromosome-linked DNA (male sex marker) and spermatozoa in the urine of female patients up to 24 hours after penilevaginal penetration. More studies are needed to precisely determine the effect of time on the detection of spermatozoa in urine samples after an alleged non-consensual sexual act; however, evidence shows that spermatozoa can be observed after sexual activity in the urine of patients during menstruation, as well as in patients who have previously urinated or bathed before urine collection. (6,7)

This article should be cited as:

Alves, Hemerson Bertassoni; Anghebem, Mauren Isfer; Franz, Ana Paula Giolo; Martinello, Flávia; Menezes, Maria Elizabeth. Recommendations from the Brazilian Society of Clinical Analysis – SBAC regarding the preservation of urine samples for forensic purposes from female individuals suspected of sexual abuse. RBAC. 2024; 56(3):146-148.

Received on Sep 10, 2024 Approved on Sep 12, 2024 DOI: 10.21877/2448-3877.202400196.en

Due to the scarcity of scientific material, this article aims to propose procedures and guidelines regarding the chain of custody and preservation of urine samples for forensic purposes of human genetic identification.

CHAIN OF CUSTODY OF THE SAMPLE

The chain of custody of forensic evidence, according to Law number 13,964/2019, which updated the Code of Criminal Procedure, is defined as the "set of all procedures used to maintain and document the chronological history of the evidence collected at crime scenes or from victims, to trace its possession and handling from its recognition to its disposal." (8)

If the Clinical Analysis Laboratory is notified to preserve a urine sample for forensic human identification purposes, it must adhere to the principles outlined in Articles 158-A to 158-F of the Brazilian Code of Criminal Procedure, the rules of which were published and established by Federal Law number 13,964/2019.⁽⁸⁾ The laboratory becomes the faithful custodian of the sample under judicial demand, meaning it assumes responsibility for the sample and may not discard it until the legal proceedings are concluded, under penalty of liability for loss and damages (Article 640 of the Civil Code).⁽⁹⁾

In summary, the urine sample must be registered in an electronic system by the laboratory's registration system, including all possible identifying information, such as: first name, last name, date, time of collection, and other relevant details about the urine and its donor, describing how the sample arrived at the laboratory and what analytical procedures were performed, allowing for the tracking of its possession and handling from its recognition to its disposal.

PRESERVATION OF SAMPLES FOR GENETIC TESTING

Proper preservation of urine samples is crucial to ensure the DNA integrity for genetic testing used in human identification. Storage under cold conditions, and aseptic handling techniques are essential for obtaining accurate and reliable results. Additionally, clear communication with the laboratory that will conduct the genetic analysis is important to ensure that the preservation and transport methods are appropriate for the specific needs of the test.⁽¹⁰⁾

Technically, any frozen matrix that is not influenced by inhibitors of the polymerase chain reaction (PCR), including

urine, can be stored for long periods. (10)

Technical Procedure

Depending on the situation, the clinical analysis laboratory should proceed as follows, always ensuring the chain of custody:

1. Primary urine sample for genetic identification collected at the laboratory or elsewhere:

Urine samples from female children and adolescents under 14 years old suspected of being contaminated by seminal material, collected at the laboratory or another location (hospital, clinic, school, daycare, residence). These samples should then be sent to the clinical analysis laboratory for forensic analysis, and processed as follows:

- Separate a 10 mL aliquot of urine into a sterile tube and, if any urine sample remains, store the properly labeled primary tube in a freezer at -20 °C until the conclusion of the process.
- 2. Centrifuge the sterile tube at 2000-3000 g for 10-15 minutes.
- 3. Discard the supernatant with a pipette and resuspend the pellet (sediment) in the remaining urine.
- 4. Freeze this sample in an Eppendorf-type tube in a freezer at least-20 °C or, preferably, at -80 °C.
- Register this frozen sample in the laboratory's system for submission to the laboratories indicated by the court for testing, following the recommendations contained in RDC ANVISA 504/2021,⁽¹¹⁾ or its updates, which stipulate good practices for the transporting of human biological material.
- 6. Repeat steps 1 to 5, storing one sample in the laboratory for counter-testing analysis.

2. Processed urine sample for subsequent genetic identification

If the presence of spermatozoa is identified during the microscopic analysis of the urinary sediment from female children and adolescents under 14 years old, the finding must be reported as suggested in the Positioning of the Brazilian Society of Clinical Analysis (SBAC) regarding the description of the presence of spermatozoa in urine samples⁽²⁾ and an aliquot of this material must be preserved for genetic identification testing.

The procedure for storage is as follows:

- 1. Separate two aliquots of the pellet (sediment) into Eppendorf-type tubes, one aliquot for the test and another for counter-testing analysis. If any urine sample remains in the primary tube, store it properly labeled in a freezer at -20 °C until the conclusion of the process.
- 2. Freeze both tubes in a freezer at -20 °C or, preferably, in a freezer at -80 °C.
- Register these frozen samples in the laboratory's system for submission to the laboratories indicated by the court*, following the recommendations contained in RDC ANVISA 504/2021.⁽¹⁰⁾

REFERENCES

- Conselho Federal de Medicina. Parecer CFM nº 18/2024, de 27 de julho de 2024. Available at: https://sistemas.cfm.org.br/normas/visualizar/ pareceres/BR/2024/18.
- Anghebem, Mauren Isfer; Franz, Ana Paula Giolo; Martinello, Flávia. Posicionamento da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) sobre o relato da presença de espermatozoides em amostra de urina – 2024. Comissão de Publicações da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC. RBAC. 2024; 56(3):133-137.
- Brasil. Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente e dá outras providências. Diário Oficial da União. 27 set. 1990.7.
- Brasil. Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940. Código Penal. Diário Oficial da União, 3 jan. 1941.
- Kouri TT, Hofmann W, Falbo R, Oyaert M, Schubert S, Gertsen JB, Merens A, Pestel-Caron M; Task and Finish Group for Urinalysis (TFG-U), European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). The EFLM European Urinalysis Guideline 2023. Clin Chem Lab Med. 2024 Jun 5;62(9):1653-1786.

- Smith DA, Webb LG, Fennell AI, Nathan EA, Bassindale CA, Phillips MA. Early evidence kits in sexual assault: an observational study of spermatozoa detection in urine and other forensic specimens. Forensic Sci Med Pathol. 2014 Sep;10(3):336-43.
- Joki-Erkkilä M, Tuomisto S, Seppänen M, Huhtala H, Ahola A, Karhunen PJ. Urine specimen collection following consensual intercourse - A forensic evidence collection method for Y-DNA and spermatozoa. J Forensic Leg Med. 2016 Jan; 37:50-4.
- 8. Brasil. Lei nº 13.964, de 24 de dezembro de 2019. Aperfeiçoa a legislação penal e processual penal. Diário Oficial da União, 29 abril 2021.
- Brasil. Lei nº 10.406, de 10 de janeiro de 2002. Institui o Código Civil. Diário Oficial da União, 11 jan. 2002.
- Sambrook, Joseph; Russell, David William. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Resolução RDC nº 504, de 27 de maio de 2021. Dispõe sobre as boas práticas para o transporte de material biológico humano. Publicação: Diário Oficial da União, 31 maio 2021.

^{*} The laboratory notified by the court must contact the Clinical and/ or Forensic Analysis Laboratory designated by the court to conduct the analyses, in order to establish guiding procedures for the forwarding of these samples.

Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico no Contexto da Atenção à Saúde - PNDL

Structuring the National Policy for Laboratory Diagnosis in the Context of Healthcare - PNDL

Maria Elizabeth Menezes¹, Paulo Roberto Boff², Flavia Martinello³, Lenira Costa e Silva⁴, Karen Berenice Denez⁵, Pedro Eduardo Almeida da Silva⁴

- ¹ Farmacêutica; Doutora em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ; Presidente da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC; Coordenadora da Comissão Técnica-Cientifica Temporária de Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial (Análises Clínicas, Toxicológicas e Ambientais) no Contexto da Atenção à Saúde.
- ² Farmacêutico; Membro da Comissão Técnica-Cientifica Temporária de Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial (Análises Clínicas, Toxicológicas e Ambientais) no Contexto da Atenção à Saúde.
- ³ Farmacêutica; Pós-doutora em Análises Clínicas; Professora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina UFSC; Membro da Comissão Técnica-Cientifica Temporária de Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial (Análises Clínicas, Toxicológicas e Ambientais) no Contexto da Atenção à Saúde.
- ⁴ Farmacêutica; Vice-Presidente do Conselho Federal de Farmácia; Membro da Comissão Técnica-Científica Temporária de Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial (Análises Clínicas, Toxicológicas e Ambientais) no Contexto da Atenção à Saúde.
- ⁵ Farmacêutica; Mestre em Assistência Farmacêutica pela Universidade Federal de Santa Catarina UFSC; Membro da Comissão Técnica-Cientifica Temporária de Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial (Análises Clínicas, Toxicológicas e Ambientais) no Contexto da Atenção à Saúde
- ⁶ Farmacêutico; Doutor em Medicina (Microbiologia Molecular) pela Universidade de Zaragoza/Espanha; Professor Titular de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande - FURG; Membro da Comissão Temporária de Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial (Análises Clínicas, Toxicológicas e Ambientais) no Contexto da Atenção à Saúde.

CONTEXTUALIZAÇÃO

A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC - preocupada com a evolução das atividades de Análises Clínicas no Brasil, motivada pelos debates em torno da atualização da RDC 302/2005 que culminou na publicação da RDC 786 /2023 da ANVISA, e com o impacto causado no setor que pode gerar consequências para a população usuária do Sistema Único de Saúde, se posiciona em prol da construção de uma Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial (PNDL).

A SBAC, apoiada por entidades estratégicas, vem unificando forças políticas para que as ações de diagnóstico laboratorial se destaquem como protagonistas no cenário da Atenção à Saúde no Brasil. As alianças são fundamentais para a consecução deste importante objetivo de abrangência nacional. Portanto, este documento é também uma chamada para a união de esforços na conquista de uma PNDL que alcance as análises clínicas, toxicológicas e ambientais. O contexto atual das Análises Clínicas no Brasil advém da ausência de uma Política Nacional de Atenção à Saúde, que contemple a inclusão das Ações de Diagnóstico no Processo de Atenção à Saúde. As análises clínicas, toxicológicas e ambientais se destacam pela contribuição com elementos essenciais na promoção da saúde pública, reforçando a relevância da qualidade analítica, bem como da segurança dos usuários e dos trabalhadores e a viabilização de respostas em tempo oportuno sobre a situação de saúde das pessoas.

As políticas públicas voltadas para Atenção à Saúde dependem da participação e envolvimento político, exigem o aprimoramento científico e técnico, além de ferramentas adequadas para a gestão, incorporação de tecnologias e a aplicação de estratégias para a superação das fragmentações dos serviços, na perspectiva concreta das efetivas universalidade e integralidade das ações de saúde, com equidade.

Recebido em 11/12/2024 | Aprovado em 12/12/2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400218.pt

As análises clínicas e toxicológicas são essenciais para o diagnóstico, a prevenção e o tratamento de diversas doenças, o que ficou evidente durante e após a pandemia da COVID-19, que exigiu uma demanda sem precedentes de exames laboratoriais. No entanto, esses serviços não são reconhecidos adequadamente no contexto dos serviços de Atenção à Saúde, que desconhece, muitas vezes, a importância e a complexidade das análises clínicas no Sistema de Saúde.

É senso comum que o diagnóstico laboratorial desempenha um papel fundamental na detecção precoce, tratamento e prevenção de doenças, auxiliando em torno de 70% das decisões médicas. No entanto, é importante reconhecer que o acesso a esses serviços nem sempre é equitativa para toda a população. Existem diversas dificuldades que precisam ser superadas para garantir um acesso efetivo e igualitário aos serviços de diagnóstico laboratorial.

Integrar as ações de diagnóstico laboratorial ao processo de Atenção à Saúde, dentro das Linhas do Cuidado e considerando a estruturação em rede na Rede de Atenção à Saúde (RAS), requer não apenas a incorporação crítica e sustentável de tecnologias, mas uma revisão da logística adotada atualmente na prestação desses serviços e a redefinição dos profissionais envolvidos nas análises clínicas e toxicológicas.

Destaca-se aqui a importância de os profissionais atuarem de maneira multiprofissional, proporcionando acolhimento, atenção integral e acompanhamento aos usuários do SUS em seus processos de promoção, proteção e recuperação da saúde, levando em consideração seus diversos condicionantes.

A reorganização e expansão da rede de assistência ao diagnóstico, tanto pública quanto complementar, desempenha um papel estratégico na orientação dos critérios para a incorporação de tecnologias, na definição de custos e na garantia da qualidade dos serviços diagnósticos. Esta última perspectiva está intrinsecamente ligada às políticas governamentais de resumir segurança do paciente e de financiamento, evidenciando relações indissociáveis.

POLÍTICA NACIONAL DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL NO CONTEXTO DA ATENÇÃO À SAÚDE

A inclusão do Diagnóstico Laboratorial no Contexto da Política da Atenção à Saúde no âmbito do Sistema Único de Saúde, tem amparo em uma variedade de documentos e referências, entre os quais pode-se destacar:

- a) Documentos do Ministério da Saúde:
 - Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT).

- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME).
- Manuais e orientações específicas da área de Assistência Farmacêutica.
- b) Guias Técnicos e Científicos
 - Guias técnicos relacionados à prática farmacêutica e de análises clínicas.
 - Manuais técnicos e científicos produzidos por sociedades científicas farmacêuticas.
- c) Publicações Acadêmicas e Científicas:
 - Artigos científicos que abordam a relevância do diagnóstico clínico laboratorial.
 - Teses e dissertações que exploram a integração praticado diagnóstico laboratorial na Assistência Farmacêutica.
- d) Experiências Internacionais:
 - Documentos de organizações internacionais de saúde (OMS, OPAS) que descrevem experiências bem-sucedidas na integração do diagnóstico clínico laboratorial com o cuidado e/ou assistência farmacêutica.
- e) Consultas Públicas e Participação Social
 - Conferências de saúde gerais e temáticas.
- f) Resoluções e Normativas do CFF:
 - Resoluções e normativas específicas do Conselho Federal de Farmácia que abordam o papel do farmacêutico no diagnóstico clínico laboratorial.
- g) Relatórios e Avaliações:
 - Relatórios de avaliação da Assistência Farmacêutica no SUS.
 - Avaliações de programas pilotos ou iniciativas regionais relacionadas ao diagnóstico clínico laboratorial farmacêutico.

O Brasil possui várias políticas e programas voltados para o diagnóstico laboratorial, especialmente na área da saúde. Alguns dos principais são:

- a) Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ): Este programa tem como objetivo garantir a qualidade dos exames laboratoriais por meio da participação de laboratórios em programas de avaliação externa do controle da qualidade.
- b) Oferta de exames pelo Sistema Único de Saúde (SUS): O SUS oferece uma série de exames laboratoriais gratuitos à população, especialmente aqueles considerados essenciais para o diagnóstico e acompanhamento de doenças.

- c) Programa de Laboratórios de Saúde Pública (LACEN): Os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) são responsáveis por realizar exames laboratoriais de média e alta complexidade, especialmente relacionados ao monitoramento e controle de doenças transmissíveis.
- d) Política Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (PNLSP):
 Esta política tem como objetivo fortalecer a rede laboratorial do SUS, garantindo a qualidade dos exames e a integração entre os diferentes laboratórios do país.
- e) Programa de Expansão e Melhoria da Assistência Especializada (AMA/AME): Este programa tem como objetivo ampliar e qualificar o acesso a exames laboratoriais de alta complexidade, especialmente para diagnóstico e acompanhamento de doenças crônicas.
- f) Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN): Também conhecido como "Teste do Pezinho", este programa oferece exames laboratoriais para a detecção precoce de doenças metabólicas, genéticas e infecciosas em recém-nascidos.
- g) Programa da Saúde da Mulher. Este programa garante os direitos das mulheres para redução da morbimortalidade por causas preveníveis e evitáveis, incluindo a realização de exames citopatológico cérvico vaginal.

A rápida disponibilização de novas tecnologias aplicadas ao diagnóstico, dado o dinamismo do segmento, viabiliza a oferta de produtos e serviços que incorporam conceitos como miniaturização, paralelismo e conectividade. A demanda crescente por soluções que atendam cada vez mais aos objetivos de ampliação de acesso, diagnóstico precoce e orientação à conduta clínica direcionam os olhares a soluções voltadas a levar o diagnóstico aos mais remotos locais, atendendo a populações negligenciadas pelas políticas públicas vigentes. Novas tecnologias em saúde têm o potencial de transformar o atendimento ao paciente, melhorar os procedimentos de diagnóstico e prognóstico e aprimorar os processos de gerenciamento e prestação de serviços de saúde permitindo o monitoramento contínuo do paciente para várias condições de saúde, assim como serviços de saúde personalizados e direcionados.

Considerando que mais de 70% de todos os diagnósticos clínicos são embasados nos resultados dos exames de laboratório, recurso indispensável para afirmar ou informar precisamente o estado clínico dos pacientes e para auxiliar na escolha da terapêutica aplicável a cada doença, e ainda que mais de 98% do diagnóstico laboratorial do SUS é realizado pela rede complementar, há de se pensar também na revisão

dos procedimentos realizados, para extrair os exames obsoletos e efetivamente remunerar os serviços a serem realizados para manter a saúde e adequar a remuneração do trabalhador que opera os serviços laboratoriais, bem como manter a qualidade evolutiva que é uma constante no diagnóstico laboratorial.

A Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial deve incluir um programa de educação amplo e acessível ao cidadão para a compreensão do papel essencial do laboratório de análises clínicas como instrumento para a avaliação da situação de saúde, a recuperação física e o restabelecimento da saúde humana, enfatizando a segurança e a confiabilidade dos resultados laboratoriais. A Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial deve contribuir para a gestão da qualidade laboratorial, sem tornar a sua prática um instrumento rígido em conceitos e atividades, possibilitando, para bem da qualidade e segurança dos serviços de diagnóstico laboratorial, que as ações admitam variações para incluir especificidades regionais e culturais próprias do território brasileiro, face a sua grande extensão territorial.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelo exposto é mandatório um documento técnico, científico e estratégico, que possa ser adotado como referência para o desenvolvimento, implementação e governança de uma política nacional que inclua as ações de diagnóstico laboratorial (análises clínicas, toxicológicas e ambientais) no processo de Atenção à Saúde no Brasil, visando preencher lacunas existentes, assegurando a qualidade dos diagnósticos e promovendo a eficácia nas intervenções de saúde pública.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 2.488, de 21 de outubro de 2011. Aprova a Política Nacional de Atenção Básica, estabelecendo a revisão de diretrizes e normas para a organização da atenção básica, para a Estratégia Saúde da Família (ESF) e o Programa de Agentes Comunitários de Saúde (PACS). Brasília-DF, Diário Oficial da União, Seção 1, 22 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 4.279, de 30 de dezembro de 2010. Estabelece diretrizes para organização da Rede de Atenção à Saúde no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Brasília-DF, Diário Oficial da União, Seção 1, 31 dez. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Documento de diretrizes para o cuidado das pessoas com doenças crônicas nas Redes de Atenção à Saúde e nas linhas de cuidado prioritárias / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 34 p.: il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

CECÍLIO, L.C.O. Uma sistematização e discussão de tecnologia leve de planejamento estratégico aplicada ao setor governamental. In: MERHY, E.E.; ONOKO, R. (Orgs.). Inventando a mudança na saúde. São Paulo: Hucitec, 1994.

CECÍLIO, L.C.O. Uma sistematização e discussão de tecnologia leve de planejamento estratégico aplicada ao setor governamental. In: MERHY, E.E.; ONOKO, R. (Orgs.). Agir em saúde, um desafio para o público. São Paulo: Hucitec, 1997. P.151-67.

DONNANGELO, M.C.F.; PEREIRA, L. Saúde e sociedade. São Paulo: Duas Cidades, 1976.

FRANCO, T.B & MAGALHÄES Jr., H. A Integralidade e as Linhas de Cuidado; in Merhy, E.E. et al, O Trabalho em Saúde: Olhando e Experienciando o SUS no Cotidiano. Hucitec, São Paulo, 2003.

MALTA, D.C. et al. Perspectivas da regulação na saúde suplementar diante dos modelos assistenciais. Cienc. Saude Colet., v.9, n.2, p.433-44, 2004.

MALTA, D.C.; MERHY, E.E. The path of the line of care from the perspective of non- transmissible chronic diseases. Interface – Comunic., Saude, Educ., v.14, n.34, p.593-605, jul./set. 2010.

MENDES, E. V. As redes de atenção à saúde. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2011.

MENDES, E. V. As redes de atenção à saúde. Rev. Med. Minas Gerais, v. 18, p. 3-11, 2008. (Suplemento 4)

MERHY, E.E.; CECÍLIO, L.C.O. A integralidade do cuidado como eixo da gestão hospitalar. Campinas: Unicamp, 2003.

MERHY, E.E.; CECÍLIO, L.C.O.; NOGUEIRA, R.C. Por um modelo tecno-assistencial da política de saúde em defesa da vida: contribuição para as conferências de saúde. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, DESCENTRALIZANDO E DEMOCRATIZANDO O CONHECIMENTO, 9., 1992, Brasília. p.91-6. V.1.

RECH N. *et al.* Diretrizes gerais para uma política nacional de inclusão das ações de diagnóstico no processo de atenção à saúde: a atenção em análises clínicas e toxicológicas como um dos eixos estruturantes. Arq. Ciênc. Saúde Unipar, 19(3):229-234, 2015.

Structuring the National Policy for Laboratory Diagnosis in the **Context of Healthcare – PNDL**

Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico no Contexto da Atenção à Saúde -**PNDL**

Maria Elizabeth Menezes¹, Paulo Roberto Boff², Flavia Martinello³, Lenira Costa e Silva⁴, Karen Berenice Denez⁵, Pedro Eduardo Almeida da Silva⁴

- ¹ Farmacêutica; Doutora em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ; Presidente da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC; Coordenadora da Comissão Técnica-Cientifica Temporária de Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial (Análises Clínicas, Toxicológicas e Ambientais) no Contexto da Atenção à Saúde.
- ² Farmacêutico; Membro da Comissão Técnica-Cientifica Temporária de Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial (Análises Clínicas, Toxicológicas e Ambientais) no Contexto da Atenção à Saúde.
- ³ Farmacêutica; Pós-doutora em Análises Clínicas; Professora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina UFSC; Membro da Comissão Técnica-Cientifica Temporária de Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial (Análises Clínicas, Toxicológicas e Ambientais) no Contexto da Atenção à Saúde.
- ⁴ Farmacêutica; Vice-Presidente do Conselho Federal de Farmácia; Membro da Comissão Técnica-Científica Temporária de Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial (Análises Clínicas, Toxicológicas e Ambientais) no Contexto da Atenção à Saúde.
- ⁵ Farmacêutica; Mestre em Assistência Farmacêutica pela Universidade Federal de Santa Catarina UFSC; Membro da Comissão Técnica-Cientifica Temporária de Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial (Análises Clínicas, Toxicológicas e Ambientais) no Contexto da Atenção à Saúde
- ⁶ Farmacêutico; Doutor em Medicina (Microbiologia Molecular) pela Universidade de Zaragoza/Espanha; Professor Titular de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande - FURG; Membro da Comissão Temporária de Estruturação da Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial (Análises Clínicas, Toxicológicas e Ambientais) no Contexto da Atenção à Saúde.

CONTEXTUALIZATION

The Brazilian Society of Clinical Analysis (SBAC), concerned with the evolution of Clinical Analysis activities in Brazil, motivated by debates surrounding the update of RDC 302/2005, which culminated in the publication of RDC 786/2023 by ANVISA, and the impact on the sector that may bring consequences for users of the Unified Health System (SUS), positions itself in favor of the development of a National Policy for Laboratory Diagnosis (PNDL - Política Nacional de Diagnóstico Laboratorial).

The SBAC, supported by strategic entities, has been consolidating political forces to ensure that laboratory diagnostic actions emerge as key players in the healthcare landscape in Brazil. Alliances are essential for achieving this important nationwide objective. Therefore, this document also serves as a call to unite efforts toward the establishment

of a PNDL that encompasses clinical, toxicological, and environmental analyses. The current state of Clinical Analysis in Brazil stems from the absence of a National Healthcare Policy that incorporates Diagnostic Actions into the Healthcare Process. Clinical, toxicological, and environmental analyses stand out for their contribution of essential elements to public health promotion, emphasizing the importance of analytical quality, user and worker safety, and the provision of timely responses regarding individuals' health status.

Public policies aimed at Healthcare depend on political participation and engagement, requiring scientific and technical advancements, as well as appropriate tools for management, technology integration, and the application of strategies to overcome service fragmentation. These efforts must align with the concrete perspective of achieving the effective universality and comprehensiveness of healthcare actions, with equity.

Received on Dec 11, 2024 | Approved on Dec 12, 2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400218.en

Clinical and toxicological analyses are essential for the diagnosis, prevention, and treatment of various diseases, a fact that became particularly evident during and after the COVID-19 pandemic, which demanded an unprecedented volume of laboratory testing. However, these services are often inadequately recognized within the context of Healthcare services, which frequently overlooks the significance and complexity of clinical analyses within the Health System.

It is widely acknowledged that laboratory diagnostics play a crucial role in early detection, treatment, and disease prevention, contributing to approximately 70% of medical decisions. However, it is important to recognize that access to these services is not always equitable across the population. Numerous challenges must be addressed to ensure effective and equal access to laboratory diagnostic services.

Integrating laboratory diagnostic actions into the Healthcare process, within the Care Pathways and considering the network-based organization within the Health Care Network (HCN), requires not only the critical and sustainable incorporation of technologies but also a reevaluation of the logistics currently employed in delivering these services and a redefinition of the professionals involved in clinical and toxicological analyses.

The importance of professionals working in a multidisciplinary manner is underscored here, ensuring reception, comprehensive care, and ongoing support to SUS users in their processes of health promotion, protection, and recovery, taking into account the various determinants of health.

The reorganization and expansion of the diagnostic assistance network, both public and complementary, play a strategic role in guiding the criteria for technology incorporation, defining costs, and ensuring the quality of diagnostic services. This latter perspective is intrinsically linked to government policies aimed at ensuring patient safety and funding, highlighting their inseparable interconnections.

NATIONAL POLICY FOR LABORATORY DIAGNOSIS IN THE CONTEXT OF HEALTHCARE

The inclusion of Laboratory Diagnosis within the framework of Healthcare Policy under the Unified Health System is supported by a range of documents and references, including:

- a) Documents from the Ministry of Health:
 - Clinical Protocols and Therapeutic Guidelines (PCDT).

- National List of Essential Medicines (RENAME).
- Manuals and specific guidelines for the Pharmaceutical Assistance sector.
- b) Technical and Scientific Guidelines:
 - Technical guides related to pharmaceutical practice and clinical analyses.
 - Technical and scientific manuals produced by pharmaceutical scientific societies.
- c) Academic and Scientific Publications:
 - Scientific articles highlighting the relevance of clinical laboratory diagnosis.
 - Theses and dissertations exploring the integration of laboratory diagnosis into Pharmaceutical Assistance practices.
- d) International Experiences:
 - Documents from international health organizations (WHO, PAHO) describing successful cases of integrating clinical laboratory diagnosis with care and/or pharmaceutical assistance.
- e) Public Consultations and Social Participation:
 - General and thematic health conferences.
- f) Resolutions and Norms from the Federal Pharmacy Council (CFF):
 - Specific resolutions and norms from the Federal Pharmacy Council addressing the role of pharmacists in clinical laboratory diagnosis.
- g) Reports and Evaluations:
 - Evaluation reports on Pharmaceutical Assistance in SUS.
 - Assessments of pilot programs or regional initiatives related to pharmaceutical clinical laboratory diagnosis.

Brazil has several policies and programs aimed at laboratory diagnosis, particularly in the healthcare sector. Some of the main ones include:

- National Quality Control Program (PNCQ): This program aims to ensure the quality of laboratory tests through the participation of laboratories in external quality control evaluation programs.
- b) Provision of Tests by the Unified Health System (SUS): SUS offers a range of laboratory tests free of charge to the population, particularly those considered essential for disease diagnosis and monitoring.
- c) Public Health Laboratory Program (LACEN): The Central Public Health Laboratories (LACENs) are responsible for

performing medium- and high-complexity laboratory tests, especially those related to the monitoring and control of communicable diseases.

- d) National Policy for Public Health Laboratories (PNLSP): This policy seeks to strengthen the SUS laboratory network by ensuring the quality of tests and fostering integration among the country's various laboratories.
- e) Program for the Expansion and Improvement of Specialized Assistance (AMA/AME): This program aims to expand and improve access to high-complexity laboratory tests, especially for the diagnosis and management of chronic diseases.
- f) National Neonatal Screening Program (PNTN): Also known as the "Heel Prick Test," this program offers laboratory tests for the early detection of metabolic, genetic, and infectious diseases in newborns.
- g) Women's Health Program: This program ensures women's rights by reducing morbidity and mortality from preventable and avoidable causes, including the performance of cervical-vaginal cytopathological examination.

The rapid availability of new technologies applied to diagnostics, given the dynamic nature of this sector, enables the provision of products and services that incorporate concepts such as miniaturization, parallelism, and connectivity. The growing demand for solutions that increasingly meet the goals of expanding access, enabling early diagnosis, and guiding clinical decision-making highlights the need for innovations aimed at delivering diagnostics to the most remote areas, serving populations neglected by current public policies.

Emerging health technologies have the potential to transform patient care, improve diagnostic and prognostic procedures, and enhance the processes of health service management and delivery. They enable continuous patient monitoring for various health conditions, as well as the provision of personalized and targeted healthcare services.

Considering that over 70% of all clinical diagnoses are based on laboratory test results—an indispensable resource for accurately determining patients' clinical conditions and aiding in the selection of appropriate therapeutic approaches for each disease—and given that more than 98% of the diagnostic services within the SUS are performed by the complementary network, it is essential to review the procedures conducted. This review should aim to eliminate obsolete tests, ensure proper remuneration for

the services performed to maintain public health, and adjust the compensation of professionals operating laboratory services, while upholding the ongoing quality advancements that are inherent to laboratory diagnostics.

The National Policy on Laboratory Diagnostics must include a broad and accessible educational program for citizens to foster an understanding of the critical role of clinical laboratories as tools for assessing health status, physical recovery, and the restoration of human health. This policy should emphasize the safety and reliability of laboratory results. Furthermore, the National Policy on Laboratory Diagnostics should contribute to laboratory quality management without rigidly constraining its practice with fixed concepts and activities. Instead, it should allow flexibility to accommodate regional and cultural specificities inherent to Brazil's vast territorial expanse, ensuring the quality and safety of diagnostic services while respecting the diversity of the country's territories.

FINAL CONSIDERATIONS

Given the aforementioned, it is imperative to have a technical, scientific, and strategic document that can be adopted as a reference for the development, implementation, and governance of a national policy that includes laboratory diagnostic actions (clinical, toxicological, and environmental analyses) within the healthcare process in Brazil. This policy aims to address existing gaps, ensuring the quality of diagnoses and promoting effectiveness in public health interventions.

REFERENCES

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 2.488, de 21 de outubro de 2011. Aprova a Política Nacional de Atenção Básica, estabelecendo a revisão de diretrizes e normas para a organização da atenção básica, para a Estratégia Saúde da Família (ESF) e o Programa de Agentes Comunitários de Saúde (PACS). Brasília-DF, Diário Oficial da União, Seção 1, 22 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 4.279, de 30 de dezembro de 2010. Estabelece diretrizes para organização da Rede de Atenção à Saúde no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Brasília-DF, Diário Oficial da União, Seção 1, 31 dez. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Documento de diretrizes para o cuidado das pessoas com doenças crônicas nas Redes de Atenção à Saúde e nas linhas de cuidado prioritárias / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 34 p.: il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

CECÍLIO, L.C.O. Uma sistematização e discussão de tecnologia leve de planejamento estratégico aplicada ao setor governamental. In: MERHY, E.E.; ONOKO, R. (Orgs.). Inventando a mudança na saúde. São Paulo: Hucitec, 1994.

CECÍLIO, L.C.O. Uma sistematização e discussão de tecnologia leve de planejamento estratégico aplicada ao setor governamental. In: MERHY, E.E.; ONOKO, R. (Orgs.). Agir em saúde, um desafio para o público. São Paulo: Hucitec, 1997. P.151-67.

DONNANGELO, M.C.F.; PEREIRA, L. Saúde e sociedade. São Paulo: Duas Cidades, 1976.

FRANCO, T.B & MAGALHÄES Jr., H. A Integralidade e as Linhas de Cuidado; in Merhy, E.E. et al, O Trabalho em Saúde: Olhando e Experienciando o SUS no Cotidiano. Hucitec, São Paulo, 2003.

MALTA, D.C. et al. Perspectivas da regulação na saúde suplementar diante dos modelos assistenciais. Cienc. Saude Colet., v.9, n.2, p.433-44, 2004.

MALTA, D.C.; MERHY, E.E. The path of the line of care from the perspective of non- transmissible chronic diseases. Interface – Comunic., Saude, Educ., v.14, n.34, p.593-605, jul./set. 2010.

MENDES, E. V. As redes de atenção à saúde. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2011.

MENDES, E. V. As redes de atenção à saúde. Rev. Med. Minas Gerais, v. 18, p. 3-11, 2008. (Suplemento 4)

MERHY, E.E.; CECÍLIO, L.C.O. A integralidade do cuidado como eixo da gestão hospitalar. Campinas: Unicamp, 2003.

MERHY, E.E.; CECÍLIO, L.C.O.; NOGUEIRA, R.C. Por um modelo tecno-assistencial da política de saúde em defesa da vida: contribuição para as conferências de saúde. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, DESCENTRALIZANDO E DEMOCRATIZANDO O CONHECIMENTO, 9., 1992, Brasília. p.91-6. V.1.

RECH N. *et al.* Diretrizes gerais para uma política nacional de inclusão das ações de diagnóstico no processo de atenção à saúde: a atenção em análises clínicas e toxicológicas como um dos eixos estruturantes. Arq. Ciênc. Saúde Unipar, 19(3):229-234, 2015.

Exame coprológico funcional

Functional coprological examination

Lenilza Mattos Lima¹, Vera Lucia Pagliusi Castilho²

Resumo

O coprológico funcional visa o estudo das funções motoras, digestivas e de absorção do tubo digestivo por meio do exame das fezes. O objetivo deste artigo foi oferecer aos profissionais das análises clínicas e áreas afins uma revisão descritiva atualizada sobre o exame coprológico funcional. A avaliação coprológica funcional fornece dados que auxiliam na investigação e no diagnóstico de patologias digestivas. A análise das fezes para esta finalidade compreende o exame macroscópico - com observação da cor, consistência, forma e odor das fezes, presença de sangue e muco, presença de vermes adultos e proglotes, além do exame microscópico e de testes químicos, imunológicos e microbiológicos. Os resultados do exame podem levar o clínico ao diagnóstico de eventuais distúrbios funcionais gastroentéricos, estabelecendo síndromes coprológicas.

Palavras-chave: coprológico funcional, exame de fezes, diagnóstico, síndromes coprológicas, marcadores inflamatórios, resíduos alimentares.

Abstract

The functional coprological examination aims to study the motor, digestive, and absorptive functions of the digestive tract through stool analysis. The objective of this article was to provide clinical laboratory professionals and related fields with an updated descriptive review of the functional coprological examination. The functional coprological assessment provides data that assist in the investigation and diagnosis of digestive pathologies. The stool analysis for this purpose includes macroscopic examination—observing stool color, consistency, shape, and odor, as well as the presence of blood, mucus, adult worms, and proglottids. Additionally, it includes microscopic examination and chemical, immunological, and microbiological tests. The results of the examination can guide the clinician toward diagnosing potential gastroenteric functional disorders, establishing coprological syndromes.

Keywords: functional coprological, stool analysis, diagnosis, coprological syndromes, inflammatory markers, food residues.

Correspondência Lenilza Mattos Lima E-mail: lenilzamattos@gmail.com

Recebido em 09/10/2024 | Aprovado em 23/10/2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400215.pt

¹ Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, Brasil.

² Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP, Divisão de Laboratório Central – Parasitologia Clínica. São Paulo, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

O sistema digestivo é um dos mais importantes do corpo humano. Ele é responsável por todo o processamento e absorção dos nutrientes provenientes dos alimentos ingeridos, permitindo o bom funcionamento do organismo. Para o intestino funcionar adequadamente é preciso um conjunto de hábitos que incluem uma boa ingesta de fibras (frutas, verduras, legumes e cereais) e de água.^(1,2)

A presença de fibras nas fezes ajuda a promover o bom funcionamento do intestino, prevenindo a constipação e promovendo a regularidade intestinal. Além disso, as bactérias intestinais presentes no bolo fecal desempenham um papel importante na manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal. O aspecto e a consistência do bolo fecal podem variar de acordo com a dieta, a hidratação e a saúde do indivíduo. (1,2)

A consistência das fezes está diretamente relacionada à quantidade de água que contém. Normalmente, as fezes apresentam a seguinte composição:⁽¹⁾

| Água | .75% |
|--------------------|-----------|
| Matéria sólida | 25% |
| Bactérias mortas | 30% |
| Gordura | 10% a 20% |
| Matéria inorgânica | 10% a 20% |
| Proteínas | 2% a 3% |
| Resto não digerido | 30% |

O objetivo da coprologia funcional é o estudo das funções motoras, digestivas e de absorção do tubo digestivo por meio do exame das fezes. O estudo abrange as provas de digestibilidade macroscópica e microscópica, e exames químicos. A dosagem de gordura fecal é solicitada separadamente, devido a dieta preconizada ser diferente. O parasitológico de fezes e a coprocultura são exames complementares e solicitados de forma isolada.⁽¹⁻³⁾

Os resultados do exame coprológico funcional podem levar o clínico ao diagnóstico de eventuais distúrbios funcionais gastroentéricos, estabelecendo síndromes coprológicas como as descritas a seguir: insuficiência gástrica, insuficiência pancreática, insuficiência biliar, putrefação, fermentação hidrogenada, síndrome fecal e do íleo, constipação, colites e deficiência de dissacaridase intestinal. (1,2)

O papel do laboratório de análises clínicas é de grande relevância na análise das fezes, interpretando e liberando resultados que irão auxiliar o médico nas síndromes coprológicas. Na literatura temos poucas publicações sobre o exame coprológico funcional, a maioria delas é antiga, mas de grande valor no estudo das funções digestivas. Neste sentido, o presente artigo objetiva oferecer aos profissionais das análises clínicas e áreas afins uma revisão, com informações compiladas e atualizadas, para uma consulta mais prática do exame coprológico funcional.

EXAME COPROLÓGICO FUNCIONAL

Fase pré-analítica

Preparo do paciente

Para a realização do coprológico funcional, recomenda-se uma alimentação rica em substâncias que irão facilitar a observação diagnóstica. A alimentação deve conter hidratos de carbono, gorduras e proteínas. A padronização de um regime de prova com a inclusão de todos os alimentos digeríveis facilitará a leitura do exame e permitirá a comparação dos resultados obtidos, ampliando a possibilidade de investigação das funções do aparelho gastrointestinal.⁽²⁾

Os clássicos regimes preconizados por Schmidt-Strasburger para o exame das funções digestivas nem sempre correspondem aos costumes e necessidades calóricas dos habitantes de cada país, como no Brasil. No entanto, o regime de prova criado por outros gastroenterologistas usou a mesma linha de alimentos fundamentais proposto por Schmidt-Strasburger. (1,4) Recomenda-se ao paciente durante três dias (72 horas) um regime alimentar normal contendo carne, leite, batata, feijão e manteiga. O paciente conserva seus hábitos alimentares, acrescentando os alimentos necessários e fundamentais ao exame. Deve-se ainda recomendar uma boa mastigação e advertência para não usar qualquer medicamento como antiácidos, enzimas digestivas, antiespasmódicos, laxantes e antidiarreicos. Evitar o uso de bebidas gasosas e alcoólicas. (1,2,4)

Em lactentes e crianças até 12 anos não se aplica os critérios de regime de prova para avaliação digestiva.⁽¹⁾

É relevante que o paciente receba, de forma verbal e por escrito, as informações claras e detalhadas do regime de prova, e recomendação sobre a importância de cumprir a dieta com exatidão.

Coleta das fezes

Realizar a coleta das fezes no quarto dia após o regime de prova. Caso haja prisão de ventre, prolongar o regime por um ou dois dias, mas nunca usar laxante que irá interferir nos resultados e interpretação do exame. (1,2)

Colher todo o material fecal ou cerca de 50g da parte média da evacuação, em frasco de boca larga, de plástico com tampa rosqueável, limpo e seco. Evitar a contaminação com urina, água e terra. Não colher as fezes do vaso sanitário. Para a coleta de amostras de fezes de crianças que ainda usam fraldas, colocar o saquinho coletor de urina na região anal. As fezes devem ser frescas, sem conservante. Enviar o material fecal imediatamente ao laboratório (em, no máximo, 2 horas), para que se proceda o exame o mais rápido possível, tendo em vista a possibilidade de desenvolvimento de fermentação e putrefação e degeneração dos elementos observados.

As instruções para a coleta da amostra de fezes devem ser fornecidas ao paciente verbalmente e por escrito ou de forma digital.^(1,2)

Fase analítica

Exame macroscópico e características físicas das fezes

As amostras fecais devem ser examinadas macroscopicamente para determinar as características físicas das fezes como consistência, aspecto, forma, odor, cor, viscosidade, elementos anormais e resíduos alimentares.⁽³⁾ O exame macroscópico permite ainda verificar a presença de vermes adultos e proglotes.

- Peso: o peso das fezes eliminadas em 24 horas varia em função direta da quantidade e qualidade dos alimentos ingeridos. O volume normal das fezes varia de 100g/dia a 150g/dia, podendo chegar a 250g/dia na dieta mais abundante e dependendo da quantidade de fibras ingeridas.^(1,4)
- Interpretação e correlação clínica: algumas condições patológicas podem interferir no volume da massa fecal. Assim, o aumento do peso pode ser observado na insuficiência pancreática, nos processos inflamatórios no intestino e na fermentação intestinal intensa. Já nos casos de constipação e na pouca ingestão de água o volume está diminuído. (1,4)
- Consistência, aspecto e forma: as fezes normais e consideradas sólidas contêm aproximadamente 75% de água; fezes moles ou pastosas contêm cerca de 80% de água; e as diarreicas ou líquidas, aproximadamente 90% de água. As fezes normais são cilíndricas, moldadas pelo esfíncter anal.
 (1,4) É recomendado avaliar as fezes observando a escala de Bristol de consistência das fezes (Figura 1). Trata-se de uma escala médica desenvolvida na Universidade de Bristol, Inglaterra, para classificar as fezes humanas em sete tipos de formatos e consistências das fezes.^(3,5)

| | ESCALA DE BRISTOL | |
|--------|---|----------------------|
| Tipo 1 | Caroços duros separados | Constipação severa |
| Tipo 2 | Forma de salsicha com grumos | Constipação moderada |
| Tipo 3 | Forma de salsicha com rachaduras na superfície | Normal |
| Tipo 4 | Forma de salsicha ou cobra, regular e macio | Normal |
| Tipo 5 | Caroços macios com cantos demarcados | Falta de fibra |
| Tipo 6 | Caroços macios com cantos rasgados | Diarreia moderada |
| Tipo 7 | Totalmente líquida | Diarreia severa |

Figura 1

Escala de Bristol para consistência das fezes.

Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Escala de Bristol

- Cor: as fezes normais apresentam a cor castanho-parda, e esta coloração decorre da presença de estercobilina, um dos pigmentos derivados da bilirrubina. Em outras condições podem ser: esverdeadas ou verdes, amareladas, pretas (melenas), vermelhas e descoradas. A coloração pode variar com a ingestão de alimentos como verduras, medicamentos e até patologias. (1,4)
- Interpretação e correlação clínica: as fezes de cor verde geralmente indicam o consumo excessivo de vegetais verde-escuros, como couve, brócolis, agrião, rúcula e espinafre. (1) As fezes pretas ou melenas podem indicar sangue digerido, proveniente das partes altas do trato digestivo, ou ingestão de alimentos ou uso de suplemento de ferro; as fezes vermelhas podem indicar a presença de sangue não digerido, ou pode ser após a ingestão de grande quantidade de beterraba. As fezes podem estar descoradas pela ausência de estercobilina e condições patológicas. (1,4)
- Odor: as fezes normais apresentam odor fecal característico, sui generis ou fétido.
- Interpretação e correlação clínica: odor butírico ou rançoso nas fezes é associado à fermentação intestinal; odor pútrido indica putrefação intestinal. Nos carcinomas de cólon e reto o odor das fezes é pútrido.^(1,4)
- Viscosidade: a viscosidade é pequena nas fezes normais.
 Na putrefação intestinal e na colite, as fezes são muito viscosas. (1,4)
- Elementos anormais: presença ou ausência de muco, pus e sangue.
- A presença de uma pequena quantidade de muco nas fezes é normal. No entanto, a presença de muco abundante ou muco sanguinolento é sinal de irritação ou inflamação do trato intestinal, e deve ser investigado.^(3,4)
 A presença de sangue visível também pode indicar problemas no trato gastrointestinal inferior, como hemorroidas ou fissuras anais.
- Pestos alimentares: para dispersar os detritos macroscópicos é recomendado fazer esta análise após diluição de uma parte da amostra fecal com água (10mL), vertendo a diluição em placa de Petri, espalhando em camada fina e observando em fundo negro. Nas fezes podem--se encontrar sementes, grãos de feijão e de milho. Em casos de insuficiência pancreática ou trânsito intestinal acelerado observam-se fragmentos de cenoura, maçã, carne ou de batata.^(1,2,4)

Exame químico

Reação e determinação do pH

As fezes têm reação neutra, fracamente ácida ou fracamente alcalina, ou seja, o pH das fezes normalmente oscila entre 6,8 e 7,2. Na criança, principalmente o lactente, o pH poderá estar entre 5,0 e 6,0.^(1,4)

A determinação da reação e do pH é um procedimento importante, mas que não exige o uso de equipamento pHmetro. É um método colorimétrico, e o papel indicador de pH ou fitas indicadoras de pH são comumente utilizados para esta determinação em laboratórios.^(1,4)

Procedimento: homogeneizar as fezes com a ponta de um bastão de vidro ou palito de madeira, coletar de pontos diferentes da massa fecal, e aplicar uma pequena porção na tira do papel indicador de pH. O papel mudará a cor, a qual deve ser comparada com a cor correspondente da escala que vai representar o pH das fezes.^(1,4)

Diluição das fezes

Em um frasco plástico ou Becker, fazer uma diluição de fezes a 10% (10g para 100mL de água), coleta de várias partes do bolo fecal, misturando gradualmente a água destilada ou deionizada, e dissolvendo as fezes com bastão de vidro até a obtenção de uma suspensão bem homogênea. (1,4)

Pesquisa de substâncias redutoras

A presença de substâncias redutoras nas fezes pode indicar uma deficiência congênita de dissacaridases intestinais (lactase, maltase, sacarase) ou uma lesão não específica da mucosa. A má absorção dos diferentes açúcares, ocasionada por essas deficiências enzimáticas, determina o aparecimento das substâncias redutoras e uma queda no pH das fezes. (1,4) A intolerância aos dissacarídeos, especialmente a lactose, é a mais predominante intolerância aos carboidratos na infância. (6)

O método colorimétrico utilizando reativo de Benedict geralmente é usado para detectar a presença de açúcares redutores. O teste é essencialmente qualitativo.⁽⁷⁾

Procedimento: para a realização do exame é necessário que as fezes sejam recentes (estar no laboratório para análise, no máximo, dentro de 1 hora).

 Resultado e interpretação: a mudança da cor azul do reativo para vermelho-tijolo significa reação positiva. Podem ocorrer variações colorimétricas de acordo com os intervalos de concentração de açúcares, variando de um azul intenso, passando por tons de verde, amarelo e posteriormente para vermelho-tijolo.

Leitura de (+), (++), (+++), (++++), conforme a intensidade de cor indicando a quantidade de açúcares redutores na amostra fecal.

É possível encontrar resultados falsos em material fecal não recente devido à fermentação dos açúcares pelas bactérias intestinais.

Valor de referência: Não reagente.

Pesquisa de pigmentos biliares

As fezes apresentam a cor castanho-parda resultante da presença de estercobilina, que é o pigmento biliar normal. Verifica-se a presença de pigmentos biliares pela reação do sublimado. (1,2)

Agitar e deixar em repouso entre 5 minutos e 24 horas para a leitura.

Resultado e interpretação: cor vermelho-tijolo do líquido e do sedimento indica presença de estercobilina ou estercobilinogênio; cor verde indica presença de bilirrubina; sem coloração: ausência de pigmentos biliares.

Correlação clínica: a ausência de estercobilina pode ser indicativo de obstrução biliar. (1,4)

Pesquisa de albumina nas fezes

A reação do sublimado também é utilizada para a pesquisa de albumina nas fezes, empregando-se o mesmo reativo e o mesmo procedimento para pigmentos biliares descrito anteriormente. (1,2)

Procedimento: Em um tubo de ensaio colocar: Fezes diluídas5mL Solução aquosa saturada de bicloreto de mercúrio......5mL (33g de bicloreto de mercúrio/500mL de água)⁽²⁾

Agitar e deixar em repouso entre 5 minutos e 24 horas para a leitura.

Resultado: reação negativa: sedimentação dos resíduos fecais com sobrenadante turvo e sem grumos; reação

positiva: colagem das proteínas (floculação) com o líquido sobrenadante límpido.

Valor de referência: Ausência

Correlação clínica: diagnóstico de lesão da mucosa intestinal e colite ulcerosa.⁽¹⁾

Exame microscópico

Pesquisa de leucócitos nas fezes

Este exame deve ser realizado em fezes frescas e recentes, e enviadas imediatamente ao laboratório ou em até 2 horas após a coleta. (2,4)

O exame microscópico direto a fresco ou após coloração pelo Lugol é empregado para a pesquisa de leucócitos (Figura 2). A utilização do corante azul de metileno facilita visualizar mais facilmente os leucócitos polimorfonucleares. (2,4)

Procedimento:

Exame direto a fresco e após coloração: em uma lâmina limpa e seca colocar uma gota de fezes diluídas ou uma porção de fezes de vários pontos da amostra fecal, dando preferência se tiver muco misturado nas fezes; cobrir com uma lamínula 22mm x 22mm e observar ao microscópio com aumento de 400x.

Na preparação com Lugol, coloca-se uma gota de Lugol e mistura-se na porção de fezes na lâmina, e procede-se como anteriormente.

Na preparação com azul de metileno deve-se misturar a porção de fezes com o corante e proceder como anteriormente descrito.

Resultado: positivo, na presença de leucócitos ou piócitos (quando degenerados) que devem ser quantificados em raros, poucos, muitos ou numerosos; negativo, na ausência de leucócitos na amostra fecal.

Observação: Para a pesquisa de neutrófilos e eosinófilos fazer um esfregaço fino das fezes diluídas em lâmina, corar com corantes hematológicos e examinar ao microscópio com aumento de 1000x.

Interpretação: o exame de pesquisa de leucócitos nas fezes visa verificar a presença e a quantidade de leucócitos no trato intestinal, o que pode indicar um processo inflamatório ou infeccioso. Nos processos inflamatórios infecciosos intensos os leucócitos se encontram em grande quantidade e aglutinados. (2,4)

Valor de referência: Ausentes.

Correlação clínica: a grande quantidade de leucócitos pode ser causa de retocolite ulcerativa, infecção bacteriana, câncer, tuberculose ou amebíase.^(2,4)

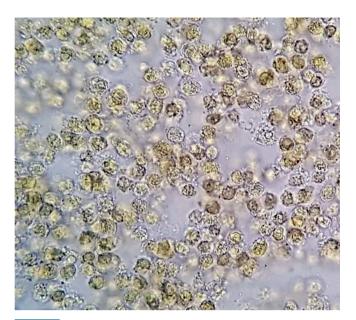


Figura 2

Leucócitos no sedimento fecal corado pelo Lugol. Aumento de 400x.

Fonte: Cortesia de Lenilza Mattos Lima

Resíduos alimentares e elementos de origem intestinal

Vários elementos podem ser encontrados nas fezes, sendo resíduos alimentares de origem animal e vegetal, e elementos de origem intestinal. Assim, as fezes podem conter resíduos de alimentos digeridos e não digeridos, em sua maioria de origem vegetal como o amido e a celulose; podem conter células epiteliais e microrganismos como leveduras e bactérias.^(1,2,8)

Após a diluição das fezes, faz-se uma preparação em lâmina a fresco e outra com Lugol, cobre-se com lamínula 22mm x 22mm, examinando ao microscópio com aumento de 100x e 400x. (1,2) Interessante analisar o sedimento fecal da diluição em repouso por cerca de 30 minutos.

Resultado: para reporte qualitativo, deve ser mencionado no laudo como ausência e presença do elemento; para reportes quantitativos, as estruturas visualizadas ao microscópio devem ser quantificadas como raras, poucas, muitas ou numerosas.

Resíduos alimentares de origem animal

Fibras musculares

Ao exame microscópico do sedimento fecal é possível encontrar fibras musculares bem digeridas e maldigeridas, geralmente coradas de amarelo ou alaranjado pela bile. As fibras musculares bem digeridas aparecem ovaladas, circulares, em forma de arestas arredondadas, sem estrias e sem ângulos (Figura 3). As fibras maldigeridas são retangulares ou como cilindros alongados, com estrias longitudinais ou transversais nítidas (Figura 3).

Interpretação: na digestão normal podem ser encontradas fibras musculares bem digeridas, enquanto a presença de fibras musculares maldigeridas em grande quantidade indicam trânsito intestinal acelerado ou insuficiência pancreática. (1,2)

Resíduos alimentares de origem vegetal

Celulose digestível

A celulose digestível constitui o arcabouço das células de feculentos. Ao exame microscópico aparecem isoladas ou em grupos, ovais, arredondadas ou poliédricas, com contorno nítido e septadas no seu interior. Tem coloração castanha, e pode conter grânulos de amido (amido incluso). Esta celulose tem valor semiológico (Figura 4 A-B).

Interpretação: em fezes normais o aparecimento é em quantidade insignificante, enquanto a presença em grande quantidade pode indicar trânsito intestinal acelerado. (2,4)

Celulose não digestível

A celulose não digestível é constituída pelas fibras vegetais, cutícula dos cereais, vasos e pelos vegetais, anel de celulose, células em paliçadas, grãos de pólen com variações na sua forma e tamanho, esporos, estômato e outras estruturas vegetais, sem valor semiológico. (2.8) A Figura 5 (A,B,C,D,E) mostra celulose não digestível no material fecal.



Figura 3

Fibras musculares no sedimento fecal corado pelo Lugol: bem digerida (ângulo arredondado) e maldigerida (retangular e estriada).

Fonte: https://parasitologiaclinica.ufsc.br/

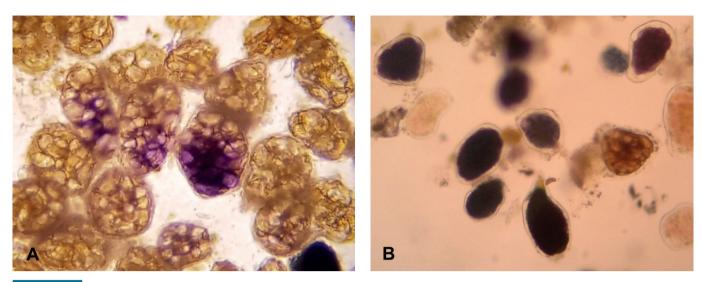


Figura 4 A e B

Celulose digestível sem amido e com amido incluso, no sedimento fecal corado pelo Lugol. Aumento de 400x.

Fonte: Cortesia de Lenilza Mattos Lima.

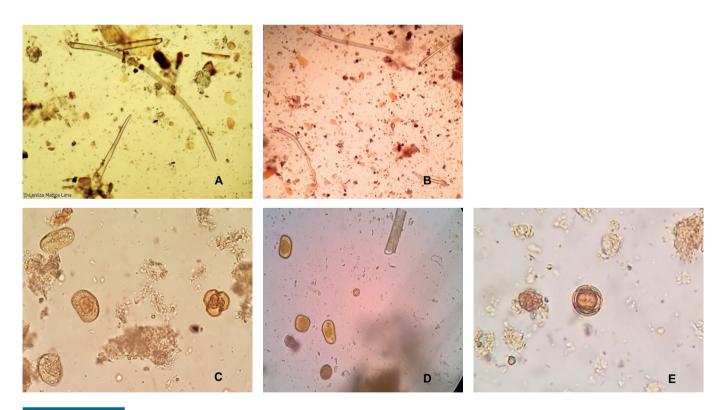


Figura 5 A, B, C, D e E

Celulose não digestível no sedimento fecal corado pelo Lugol. Em A e B: pelos vegetais (400x,100x); em C e D: grãos de pólen (400x,100x); em D observa-se ao alto um vaso vegetal espiralado; em E: grão de pólen (400x).

Fonte: Cortesia de Lenilza Mattos Lima.

Amido

O amido é encontrado em alimentos como batatas, arroz, trigo, mandioca, milho, aveia e frutas, que fazem parte da alimentação humana. Ao exame microscópico de preparações fecais em lâmina observa-se o amido em formas diferentes: amido intracelular ou incluso, amido cru e amido amorfo. O amido intracelular apresenta-se dentro das células dos feculentos, com formato de pequenos grãos esbranquiçados, ovais ou redondos (Figura 4 A-B). O amido cru ou sem digerir está sob forma de grãos ovalados ou arredondados, organizados por camadas concêntricas na sua maioria (Figura 6). O amido amorfo apresenta-se em geral em faixas isoladas ou irregulares, podendo estar tapetadas com bactérias iodófilas, e a identificação se faz com Lugol. Nas preparações coradas com Lugol, o amido se cora em negro ou rósea ou azul intenso. (1,2,4)

Interpretação: a grande quantidade de amido nas fezes, principalmente amido não digerido, pode indicar trânsito intestinal acelerado, excesso de ingesta de feculentos, mastigação deficiente e fermentação intestinal hidrocarbonada. (1,2)

Flora iodófila

Normalmente encontrada ao nível do ceco e cólon direito, constituindo-se de bactérias que contêm amido, e nas preparações fecais em lâmina coradas pelo Lugol adquirem coloração violeta, azul ou preto (Figura 7 A-B).

Interpretação: no trânsito intestinal acelerado ou na fermentação intestinal a flora iodófila aparece em grande quantidade. (1,4)

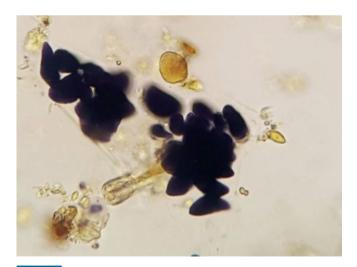
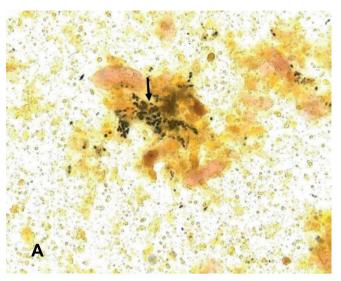


Figura 6

Grãos de amido no sedimento fecal corado pelo Lugol. Aumento de 400x.

Fonte: Cortesia de Lenilza Mattos Lima.



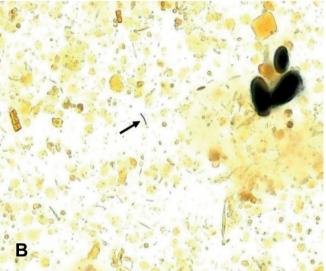


Figura 7 A e B

Flora iodófila no sedimento fecal corado pelo Lugol. Aumento de 400x.

Fonte: https://controllab.com/ensino/atlas/coprologia-funcional-ii/

Elementos de origem intestinal

As substâncias de origem intestinal mais comuns são: hemácias, leucócitos e células epiteliais. As hemácias são observadas com sua cor, forma e tamanhos conhecidos, isoladas ou aglutinadas. (2) A presença de leucócitos no trato intestinal está descrita acima em "pesquisa de leucócitos nas fezes". As células epiteliais não são encontradas em fezes normais, apenas se o trânsito intestinal estiver acelerado. (2)

Outros elementos

Outros elementos, como fungos e cristais, descritos a seguir, também podem ser encontrados nas fezes.

Fungos nas fezes

As leveduras e outros elementos fúngicos são comuns nas fezes. Os fungos nas fezes podem ser veiculados pelos alimentos e, em geral, não determinando sintomas ou sinais de natureza digestiva. São reconhecidos pela forma oval ou esférica, pela coloração castanha e alguns pela presença de micélio gemulante. As leveduras podem produzir pseudo-hifas. A presença de leveduras do gênero *Candida* nas fezes pode indicar candidíase intestinal.⁽²⁾ As Figuras 8 e 9 mostram presença de fungos nas fezes.

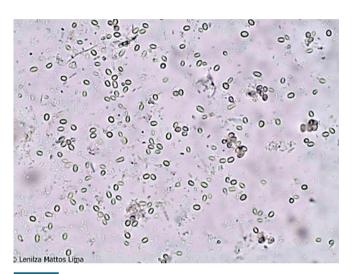


Figura 8

Fungos no sedimento fecal. Aumento de 400x.

Fonte: https://parasitologiaclinica.ufsc.br/

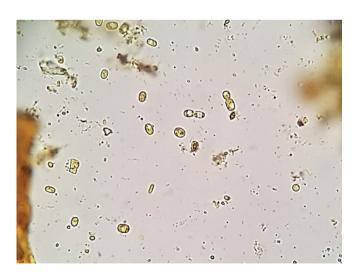


Figura 9

Fungos no sedimento fecal corado pelo Lugol. Aumento de 400x.

Fonte: Cortesia de Leticia Porto Coelho.

Cristais nas fezes

Vários cristais podem aparecer nas fezes, (2,4) porém os de maior interesse nas funções digestivas são:

- a) **Cristais de oxalato de cálcio**: aparecem sob a forma de envelope. Interpretação: eles surgem após a ingestão de tomate, feijão, vagem e outros vegetais. São dissolvidos pelo ácido clorídrico do estômago, e quando aparecem em grande quantidade nas fezes pode indicar insuficiência gástrica.
- b) **Cristais de fosfato-amoníaco-magnesiano**: apresentam a forma de tampa de ataúde e em diferentes tamanhos. Interpretação: surgem em fezes alcalinas com dispepsias putrefativas. Também podem surgir durante a coleta das fezes, contaminando com urina.
- c) **Cristais de ácidos graxos**: aparecem sob a forma de finas agulhas longas e entrecruzadas, formando feixes.
- d) **Cristais de Charcot-Leyden**: apresentam a forma de losangos maiores ou menores, alongados e de extremidades pontiagudas (Figura 10), e são derivados de eosinófilos.

Interpretação: têm relação com infecções parasitárias, alergias e ulcerações. Os cristais de Charcot-Leyden são observados quando há infiltrado inflamatório, com predomínio de eosinófilos.



Figura 10

Cristal de Charcot-Leyden.

Fonte: https://www.cdc.gov/dpdx/artifacts/index.html

Exame bacterioscópico

Para verificar as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em esfregaço fecal corado pelo Gram. Pode-se observar a presença de outros elementos (células, leveduras e leucócitos).⁽⁴⁾

Gorduras nas fezes

A digestão da gordura ocorre normalmente no intestino delgado, realizada pela ação de enzimas pancreáticas, como a lipase. As fezes normais podem conter pequena quantidade de gorduras na forma de gorduras neutras, ácidos graxos e sabões. A presença de grandes quantidades de gorduras eliminadas nas fezes, definida como esteatorreia, pode indicar má absorção intestinal.(1,9,10)

Coloração pelo Sudan III

A pesquisa de gordura fecal é realizada pelo exame microscópico com corante Sudan III (solução a 1% em álcool a 70%). Trata-se de um teste de triagem qualitativo e de fácil execução, com boa correlação com a dosagem de gordura fecal (descrita a seguir) na investigação da esteatorreia. O teste Sudan III foi relatado como tendo sensibilidade de 77% e especificidade de 98%. (3)

O paciente deve coletar as fezes sem uso de laxante e/ ou supositório, não deve usar pomada na região anal, óleo de rícino, vaselina líquida e óleo mineral, os quais podem simular gorduras neutras.

Procedimento: em uma lâmina limpa e seca colocar uma a duas gotas de fezes diluídas, adicionar uma a duas gotas da solução de Sudan III, cobrir com uma lamínula 22mm x 22mm e observar ao microscópio com aumento de 400x.

Resultado e interpretação: as gorduras neutras aparecem como gotas ou gotículas ou glóbulos, ou sob a forma de lagos corados em vermelho. A visualização de 60 ou mais gotas de gorduras neutras, por campo, coradas em vermelho, sinaliza esteatorreia.⁽²⁾

Leitura: a observação de 10 a 20 glóbulos com um diâmetro de 10 μ m ou mais é considerada (+), 20 a 100 glóbulos com um diâmetro de 10 a 50 μ m é considerada (++), e mais de 100 glóbulos de gordura com grandes diâmetros são considerados (+++).

Valor de referência: Ausência/raras

Correlação clínica: o diagnóstico de esteatorreia pode indicar insuficiência pancreática (ausência de lipase), fibrose cística, e parasitoses, como a giardíase e criptosporidíase.

Esteatócrito (Micrométodo de Phuapradit)

O esteatócrito foi desenvolvido por Phuapradit e colaboradores (1981)⁽¹¹⁾ para avaliar a concentração de gordura nas fezes de crianças. É um método semiquantitativo baseado em microcentrifugação, de fácil realização e baixo custo, e que apresenta boa correlação com o balanço de gordura na avaliação da esteatorreia.^(11,12) Tem sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo de 100%, 95% e 90% respectivamente. ⁽¹³⁾ O procedimento descrito a seguir por Mello e Silveira⁽¹²⁾ se baseou no método original de Phuapradit e colaboradores.⁽¹¹⁾

O paciente deve colher as fezes sem uso de laxante.

Procedimento: a) com um bastão de vidro homogeneizar as fezes para que haja uma distribuição uniforme do bolo fecal; b) separar uma alíquota de fezes com uma medida padrão (cerca de 05g); c) misturar esta pequena quantidade de fezes com 0,06g de areia fina, com auxílio de um gral; d) adicionar água destilada (4 volumes da medida padrão) para diluir as fezes, misturando-se novamente com o auxílio do gral, e homogeneizar durante 1 minuto com um agitador vortex; e) aspirar esta mistura de fezes homogeneizada para um tubo capilar de micro-hematócrito sem heparina; f) centrifugar por 15 minutos em uma centrífuga de micro-hematócrito a 12.000 rotações por minuto. Após a centrifugação, o capilar é imediatamente colocado na posição vertical, havendo a formação de três camadas: uma camada sólida inferior (areia e resíduos sólidos); uma camada líquida intermediária (água e substâncias solúveis); uma camada superior que constitui a gordura nas fezes.

Com uma régua milimetrada com precisão de 0,025cm e com o auxílio de lupa, é feita a leitura medindo a camada sólida (S) e a camada de gordura (G).

Resultado: é expresso em porcentagem pela fórmula % esteatócrito=G/(G+S) x100

Valor de referência: criança na 1ª semana de vida: até 25%; da 1ª à 4ª semana: até 13%; de 1 a 3 meses: até 7%; acima de 3 meses: até 2%; adultos: até 2%. (12)

Correlação clínica: diagnóstico de má absorção de gorduras em crianças e adultos, insuficiência pancreática e fibrose cística.

Outros exames adicionais

Entre os exames adicionais citam-se: pesquisa de sangue oculto nas fezes, dosagem de gordura fecal, determinação da calprotectina fecal e dosagem de alfa-1 antitripsina nas fezes.

Pesquisa de sanque oculto nas fezes

O sangramento do trato gastrointestinal pode não ser percebido clinicamente, e o exame de sangue oculto nas fezes possibilita auxiliar o médico no diagnóstico de diferentes condições clínicas, pois consegue detectar a presença de pequenas quantidades de sangue na amostra fecal. (14,15)

Vários são os métodos descritos na literatura, os quais têm como fundamento a detecção de hemoglobina nas fezes, e baseados nos efeitos catalíticos do grupo heme, com atividade da peroxidase do sangue. Entre eles citam-se reação da benzidina, reação de Meyer-Johannessen e reação do guáiaco. (1,2) São técnicas colorimétricas que determinam que o paciente faça uma dieta de 3 a 4 dias antes da realização do método. O paciente não pode ingerir carnes, vegetais clorofilados (espinafre, alface, brócolis, rabanete, nabo, beterraba etc.), banana, melão, pera, maçã, medicamentos à base de ferro, corticoides e aspirina. (1,15)

O método imunocromatográfico é específico para a detecção de hemoglobina humana nas fezes. Este método utiliza uma combinação de anticorpo monoclonal marcado ou anticorpo policlonal anti-hemoglobina humana. Não há interferência do resultado com a presença de hemoglobina de outros animais, e não há necessidade do uso de dieta específica para a realização do exame. (14,15) A técnica é realizada de acordo com as descrições das bulas dos *kits*.(14)

O método imunocromatográfico para a pesquisa de sangue oculto, portanto, pode ser realizado quando da solicitação do coprológico funcional.

Correlação clínica: o exame de sangue oculto é utilizado no rastreamento do câncer colorretal e de outras lesões do trato gastrointestinal como úlceras, diverticulites e varizes esofágicas.^(14,15)

Dosagem de gordura fecal

A dosagem e quantificação de gordura fecal para o diagnóstico com suspeita de má absorção intestinal tem sido uma coleta de fezes de 72 horas, e processadas pelo método de titulação de Van de Kamer. (2) A excreção fecal acima de 7g/d de gordura permite estabelecer o diagnóstico de esteatorreia. É necessário que o paciente faça uma dieta balanceada de 100g de gordura por dia, coletando-se as fezes de 3 dias. (1-3)

Correlação clínica: a dosagem ou balanço de gordura nas fezes é útil na investigação das síndromes de má absorção de origem pancreática, fibrose cística, doença celíaca e doença de Crohn.⁽²⁾

Determinação de calprotectina em amostras de fezes

A calprotectina é uma proteína encontrada no citosol de neutrófilos e macrófagos, e composta de duas subunidades, S100A8 e S100A9. É estável nas fezes por até 7 dias em temperatura ambiente e tem uma distribuição homogênea na amostra fecal. A calprotectina é classificada como uma proteína de padrão molecular associada a danos com propriedades de proteção antimicrobiana. A liberação extracelular de calprotectina durante o período de estresse/dano celular a torna um marcador preciso de inflamação intestinal.^(3,16)

Em laboratórios clínicos a técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) é utilizada para medir a concentração de calprotectina fecal. Vários *kits* de ELISA estão disponíveis no mercado. (16,17) Os testes imunocromatográficos também foram desenvolvidos para o diagnóstico de calprotectina fecal.

Correlação clínica: a calprotectina fecal serve como um biomarcador de inflamação intestinal e útil no diagnóstico de doenças inflamatórias intestinais, avaliação da resposta à terapia médica e na previsão de recidiva clínica. Esta proteína fecal está elevada em pacientes com colite ulcerativa, doença de Crohn, fibrose cística e câncer colorretal. (3,16,17)

Dosagem de alfa-1 antitripsina nas fezes

A alfa-1 antitripsina é uma proteína plasmática resistente à degradação por enzimas digestivas. A dosagem de alfa-1 antitripsina nas fezes é um exame que analisa a perda de proteínas pelo trato digestivo. O método de imunodifusão radial tem sido empregado para medir a alfa-1 antitripsina fecal, assim como métodos imunoturbidimétricos. (18)

Correlação clínica: valores aumentados são encontrados nas doenças que causam perda de proteínas como a doença inflamatória intestinal, doença celíaca, intolerância ao leite de vaca, carcinoma gástrico, linfomas do tubo digestivo, doença de Whipple, gastroenteropatia alérgica, hipogama-globulinemia congênita e síndrome de Menetrier. (18)

Fase pós-analítica

O laudo do exame coprológico funcional deve fornecer informações sobre o exame macroscópico das fezes e características físicas, exames químicos e análise microscópica. Além disso, é interessante que no laudo constem informações sobre a dieta recomendada pelo laboratório.

A seguir, um modelo proposto para o laudo.

| Coprológico Funcional | | |
|------------------------------|-----------|---------------------|
| Exame Macroscópico | Resultado | Valor de referência |
| Caracteres físicos das fezes | | |
| Consistência | | |
| Forma | | |
| Cor | | |
| Odor | | |
| Viscosidade | | |
| Sangue | | |
| Muco | | |
| Pus | | |
| Restos alimentares | | |

Exame Químico

рН

(Papel indicador universal)

Substâncias redutoras

(Reativo de Benedict)

Estercobilina

(Reação do sublimado)

Bilirrubina

(Reação do sublimado)

Albumina

(Reação do sublimado)

Sangue oculto

(Método imunocromatográfico)

Exame Microscópico

Leucócitos

Hemácias

Células epiteliais

Fibras musculares mal digeridas

Fibras musculares bem digeridas

Celulose digestível

Celulose não digestível

Amido cru

Amido amorfo

Amido incluso

Fungos/leveduras

Cristais

Flora iodófila

Parasitos

Gorduras neutras

(Coloração pelo Sudan III)

Coloração pelo Gram

Esteatócrito

(Micrométodo de Phuapradit)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os exames coprológicos são realizados para avaliar o funcionamento do sistema gastrointestinal e o estado funcional de seus órgãos. Os resultados do exame coprológico funcional irão auxiliar o diagnóstico de síndromes de má absorção intestinal, doenças inflamatórias do intestino, distúrbios pancreáticos, doenças infeciosas e parasitárias. O exame também aponta patologias que cursam com sangramento no tubo digestivo. O diagnóstico precoce facilita o tratamento rápido e melhora o prognóstico da doença.

Alguns médicos solicitam o parasitológico de fezes e o coprológico funcional em conjunto. Ressalta-se, no entanto, que quando solicitado somente o coprológico funcional é importante ficar atento ao exame microscópico do sedimento fecal, pois a presença de parasitos pode ser observada e deve ser reportada nos resultados do exame.

REFERÊNCIAS

- Vallada EP. Manual de exames de fezes: coprologia e parasitologia. Rio de Janeiro: Atheneu;1998.
- Lima AO, Soares JB, Greco JB, Galizzi J, Cançado JR. Exame de fezes. In: Lima AO, Soares JB, Greco JB, Galizzi J, Cançado JR. Métodos de laboratório aplicados à clínica. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.5.1-5.49.
- 3. Kasırga E. The importance of stool tests in diagnosis and follow-up of gastrointestinal disorders in children. Turk Pediatri Ars, 2019;54(3):141-8.
- Silveira Junior AO. O exame coprológico e as funções digestivas. São Paulo: Livraria Editora Santos;1988.
- Martinez AP, Azevedo GR. Tradução, adaptação cultural e validação da Bristol Stool Form Scale para a população brasileira. Rev. Latino-Am. Enfermagem, 2012; 20(3): [7 telas]. DOI: https://doi.org/10.1590/S0104-11692012000300021

- Carvalho LC, Silva SCM, Moraes JB, Pissolatto GG, Fernandes RB, Faria JP, et al. A intolerância a lactose e a alergia a proteína do leite de vaca (APLV): as principais considerações clínicas. Res Soc Dev, 2022;11(7):2-9. DOI:http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i7.29651
- Universidade Federal da Paraíba. Laboratório Didático de Bioquímica. Teste de Benedict. 2017. Disponível em: http://plone.ufpb.br/ldb/contents/paginas/teste-de-benedict-1. Acesso em: 20 ago 2024.
- 8. Carli GA. Artefatos confundíveis com os estágios de diagnóstico dos parasitos. In: Carli GA. Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. 2a ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2011.p.139-151.
- 9. Wikipedia. Esteatorreia. 2020. Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Esteatorreia. Acesso em: 20 ago 2024.
- Campagnaro ED, Jáuregui, Aparicio A, Lobo D. Valores normales de la prueba sudan III en niños sanos menores de un año de edad. Arch Venez Puer Ped, 2012;75(1):16-19.
- 11. Phuapradit P, Narang A, Mendonça P, Harris DA, Baum JD. The Steatocrit: a simple method for estimating stool fat content in newborn infants. Arch Dis Child, 1981;56:725-7. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1627297/. Acesso em: 20 ago 2024.
- 12. Mello ED, Silveira TR. Esteatócrito: um método semiquantitativo de avaliação de gordura fecal-padronização do teste. J Pediatr, 1995;71(5):273-278.
- Kamath MG, Pai CG, Kamath A, Kurien A. Comparing acid steatocrit and faecal elastase estimations for use in M-ANNHEIM staging for pancreatitis. World J Gastroenterol, 2017;23(12):2217-2222.
- Kroth K, Caumo KS, Lima LM. Saúde dos idosos: pesquisa de sangue oculto nas fezes. RBAC, 2023;55(4):276-281
- Honório JC, Tizzot MRP. Análise dos métodos de pesquisa de sangue oculto nas fezes. Cadernos da Escola de Saúde. Curitiba, 2010;3:01-11.
- Smith LA, Gaya RD. Utility of faecal calprotectin analysis in adult inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol, 2012;18(46): 6782-6789.
- Badawy AM, Ali AAE, El Ghany AMA, El Halim EFA, Mohamed HI, Nouh MAE. Calprotectin as a fecal marker for diagnosis and follow-up in patients with ulcerative colitis. Menoufia Med J, 2014;27(1):35-43. Disponível em: https://www.menoufia-med-j.com/journal/vol27/iss1/6/. Acesso em: 27 ago 2024. DOI: https://doi.org/10.4103/1110-2098.132726
- Strygler B, Nicar MJ, Santangelo WC, Porter JL, Fordtran JS. α1-Antitrypsin excretion in stool in normal subjects and in patients with gastrointestinal disorders. Gastroenterol, 1990;99(5):1380-1387.

Functional coprological examination

Exame coprológico funcional

Lenilza Mattos Lima¹, Vera Lucia Pagliusi Castilho²

Abstract

The functional coprological examination aims to study the motor, digestive, and absorptive functions of the digestive tract through stool analysis. The objective of this article was to provide clinical laboratory professionals and related fields with an updated descriptive review of the functional coprological examination. The functional coprological assessment provides data that assist in the investigation and diagnosis of digestive pathologies. The stool analysis for this purpose includes macroscopic examination—observing stool color, consistency, shape, and odor, as well as the presence of blood, mucus, adult worms, and proglottids. Additionally, it includes microscopic examination and chemical, immunological, and microbiological tests. The results of the examination can guide the clinician toward diagnosing potential gastroenteric functional disorders, establishing coprological syndromes.

Keywords: functional coprological, stool analysis, diagnosis, coprological syndromes, inflammatory markers, food residues.

Resumo

O coprológico funcional visa o estudo das funções motoras, digestivas e de absorção do tubo digestivo por meio do exame das fezes. O objetivo deste artigo foi oferecer aos profissionais das análises clínicas e áreas afins uma revisão descritiva atualizada sobre o exame coprológico funcional. A avaliação coprológica funcional fornece dados que auxiliam na investigação e no diagnóstico de patologias digestivas. A análise das fezes para esta finalidade compreende o exame macroscópico – com observação da cor, consistência, forma e odor das fezes, presença de sangue e muco, presença de vermes adultos e proglotes, além do exame microscópico e de testes químicos, imunológicos e microbiológicos. Os resultados do exame podem levar o clínico ao diagnóstico de eventuais distúrbios funcionais gastroentéricos, estabelecendo síndromes coprológicas.

Palavras-chave: coprológico funcional, exame de fezes, diagnóstico, síndromes coprológicas, marcadores inflamatórios, resíduos alimentares.

Correspondence Lenilza Mattos Lima E-mail: lenilzamattos@gmail.com

Received on Oct 09, 2024 | Approved on Oct 23, 2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400215.en

¹ Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, Brasil.

² Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP, Divisão de Laboratório Central – Parasitologia Clínica. São Paulo, SP, Brasil.

INTRODUCTION

The digestive system is one of the most important systems in the human body. It is responsible for the processing and absorption of nutrients from ingested food, enabling the proper functioning of the organism. For the intestines to function adequately, a set of habits is necessary, including a good intake of fiber (fruits, vegetables, legumes, and cereals) and water.^(1,2)

The presence of fiber in stool helps promote proper intestinal function, preventing constipation and fostering bowel regularity. Furthermore, the intestinal bacteria present in fecal matter play a significant role in maintaining the balance of the gut microbiota. The appearance and consistency of the fecal matter can vary according to diet, hydration, and the individual's health status.^(1,2)

The consistency of stool is directly related to its water content. Typically, stool has the following composition:⁽¹⁾

| Water | 75% |
|--------------------|------------|
| Solid matter | 25% |
| Dead bacteria | 30% |
| Fat | 10% to 20% |
| Inorganic matter | 10% to 20% |
| Proteins | 2% to 3% |
| Undigested residue | 30% |

The purpose of functional coprology is to study the motor, digestive, and absorptive functions of the digestive tract through stool analysis. The study encompasses macroscopic and microscopic digestibility tests, as well as chemical examinations. Fecal fat measurement is requested separately, as they require a distinct prescribed diet. Stool parasitology and stool culture are complementary examinations and are requested independently.⁽¹⁻³⁾

The results of the functional coprological examination can guide the clinician in diagnosing potential gastrointestinal functional disorders, establishing coprological syndromes such as the following: gastric insufficiency, pancreatic insufficiency, biliary insufficiency, putrefaction, hydrogen fermentation, fecal and ileal syndrome, constipation, colitis, and intestinal disaccharidase deficiency. (1,2)

The role of the clinical analysis laboratory is highly relevant in stool analysis, interpreting and releasing results that will assist the physician in coprological syndromes.

The literature contains few publications on functional coprological examination, the majority of which are outdated

yet highly valuable for studying digestive functions. In this regard, the present article aims to provide professionals in clinical analysis and related fields with a review, offering compiled and updated information for a more practical reference on functional coprological examination.

FUNCTIONAL COPROLOGICAL EXAMINATION

Pre-analytical phase

Patient preparation

For the performance of the functional coprological examination, a diet rich in substances that will facilitate diagnostic observation is recommended. The diet should include carbohydrates, fats, and proteins. Standardizing a test regimen that includes all digestible foods will facilitate the interpretation of the examination and allow for the comparison of the obtained results, enhancing the potential for investigating the functions of the gastrointestinal system.⁽²⁾

The classic regimens recommended by Schmidt-Strasburger for examining digestive functions do not always align with the customs and caloric needs of the inhabitants of each country, such as Brazil. However, the test regimen created by other gastroenterologists followed the same line of fundamental foods proposed by Schmidt-Strasburger. (1.4) Patients are advised to follow a normal diet for three days (72 hours) that includes meat, milk, potatoes, beans, and butter. The patient maintains their dietary habits while adding the necessary and fundamental foods for the examination. It is also advisable to recommend thorough chewing and to caution against the use of any medications such as antacids, digestive enzymes, antispasmodics, laxatives, and antidiarrheals. The use of carbonated and alcoholic beverages should be avoided. (1,2,4)

In infants and children up to 12 years of age, the criteria for the test regimen for digestive evaluation do not apply.⁽¹⁾

It is important that the patient receives clear and detailed information about the test diet both verbally and in writing, along with recommendations regarding the importance of adhering to the diet accurately.

Stool collection

Collect the stool on the fourth day after the test regimen. If constipation occurs, extend the diet for one or two additional days, but never use laxatives, as they will interfere with the results and interpretation of the test. (1,2)

Collect all fecal material or approximately 50g of the middle portion of the stool in a clean, dry, wide-mouthed

plastic container with a screw cap. Avoid contamination with urine, water, and soil. Do not collect stool from the toilet. For collecting stool samples from children who still use diapers, place a urine collection bag around the anal region. The stool must be fresh and free from preservatives. Send the fecal material to the laboratory immediately (within a maximum of 2 hours) to ensure the examination is conducted as quickly as possible, considering the potential for fermentation, putrefaction, and degeneration of the observed elements.

The instructions for stool sample collection should be provided to the patient both verbally and in writing or digitally.

Analytical phase

Macroscopic Examination and Physical Characteristics of Stool

Fecal samples must be examined macroscopically to determine the physical characteristics of the stool, such as consistency, appearance, shape, odor, color, viscosity, abnormal elements, and food residues.⁽³⁾ The macroscopic examination also allows for the detection of adult worms and proglottids.

- Weight: The weight of stool eliminated in 24 hours directly correlates with the quantity and quality of food consumed. The normal volume of stool ranges from 100g/ day to 150g/day, potentially reaching up to 250g/day with a more abundant diet, depending on the amount of fiber ingested. (1,4)
- Interpretation and clinical correlation: Certain pathological conditions can interfere with the volume of fecal mass. Thus, an increase in weight may be observed in cases of pancreatic insufficiency, inflammatory processes in the intestine, and intense intestinal fermentation. Conversely, in cases of constipation and low water intake, the volume is decreased. (1.4)
- Consistency, appearance, and shape: Normal stool, considered solid, contains approximately 75% water; soft or pasty stool contains about 80% water; and diarrheal or liquid stool contains approximately 90% water. Normal stool is cylindrical, shaped by the anal sphincter. (1.4) It is recommended to evaluate the stool using the Bristol Stool Scale for consistency (Figure 1). This medical scale was developed at the University of Bristol, England, to classify human stool into seven types of shapes and consistencies. (3.5)

| | | BRISTOL STOOL CHART | |
|----------|--------|--|---------------------|
| ಿಕ್ಕಿ | Type 1 | Separate hard lumps | SEVERE CONSTIPATION |
| | Type 2 | Lumpy and sausage like | MILD CONSTIPATION |
| | Type 3 | A sausage shape with cracks in the surface | NORMAL |
| | Type 4 | Like a smooth, soft sausage or snake | NORMAL |
| తిన్నోడ్ | Type 5 | Soft blobs with clear-cut edges | LACKING FIBRE |
| - | Туре 6 | Mushy consistency with ragged edges | MILD DIARRHEA |
| | Туре 7 | Liquid consistency with no solid pieces | SEVERE DIARRHEA |

Figure 1

Bristol Stool Scale for stool consistency.

Source: https://pt.wikipedia.org/wiki/Escala_de_Bristol#/media/Ficheiro:BristolStoolChart.png

- **Color:** Normal stool is brownish in color, which results from the presence of stercobilin, one of the pigments derived from bilirubin. Under different conditions, stool can appear greenish, yellowish, black (melena), red, or pale. The color may vary with the intake of foods such as vegetables, medications, and even underlying pathologies.^(1,4)
- Interpretation and clinical correlation: Green stool generally indicates excessive consumption of dark green vegetables, such as kale, broccoli, watercress, arugula, and spinach. (1) Black stool or melena may indicate digested blood from the upper parts of the digestive tract or the consumption of foods or iron supplements; red stool may indicate the presence of undigested blood or may occur after the intake of a large quantity of beetroot. Stool may be discolored due to the absence of stercobilin and pathological conditions. (1,4)
- Odor: Normal stool has a characteristic fecal odor, sui generis or foul.
- Interpretation and clinical correlation: A buttery or rancid odor in stool is associated with intestinal fermentation; a putrid odor indicates intestinal putrefaction. In colon and rectal carcinomas, the stool odor is putrid.^(1,4)
- **Viscosity:** Viscosity is low in normal stool. In intestinal putrefaction and colitis, stool is very viscous. (1,4)
- Abnormal elements: Presence or absence of mucus, pus, and blood.
- The presence of a small amount of mucus in the stool is normal. However, the presence of abundant mucus or bloody mucus is a sign of irritation or inflammation of the intestinal tract and should be investigated. (3,4)
 Visible blood may also indicate problems in the lower gastrointestinal tract, such as hemorrhoids or anal fissures.
- **Food residues:** To disperse macroscopic debris, it is recommended to perform this analysis after diluting a portion of the fecal sample with water (10 mL), transferring the dilution onto a Petri dish, spreading it in a thin layer, and observing it against a black background. In stool, one may find seeds, beans, and corn kernels. In cases of pancreatic insufficiency or accelerated intestinal transit, fragments of carrot, apple, meat, or potato may be observed. (1,2,4)

Chemical Examination

Reaction and pH determination

Stool has a neutral,c weakly acidic, or weakly alkaline reaction, meaning that the pH of stool typically ranges between 6.8 and 7.2. In children, especially in infants, the pH may be between 5.0 and 6.0.^(1,4)

The determination of reaction and pH is an important procedure that does not require the use of a pH meter. It is a colorimetric method, and pH indicator paper or pH indicator strips are commonly used for this determination in laboratories.^(1,4)

Procedure: homogenize the stool using the tip of a glass rod or wooden stick, collecting samples from different points of the fecal mass, and apply a small portion to the pH indicator paper strip. The paper will change color, which should be compared to the corresponding color on the scale representing the pH of the stool. (1.4)

Fecal Dilution

In a plastic container or beaker, prepare a 10% stool dilution (10 g for 100 mL of water) by collecting samples from various parts of the fecal mass, gradually mixing in distilled or deionized water, and dissolving the stool with a glass rod until a well-homogenized suspension is obtained. (1,4)

Research on Reducing Substances

The presence of reducing substances in the stool may indicate a congenital deficiency of intestinal disaccharidases (lactase, maltase, sucrase) or a nonspecific injury to the mucosa. The malabsorption of different sugars caused by these enzymatic deficiencies leads to the emergence of reducing substances and a decrease in stool pH.^(1,4) Intolerance to disaccharides, particularly lactose, is the most predominant carbohydrate intolerance in childhood.⁽⁶⁾

The colorimetric method using Benedict's reagent is generally employed to detect the presence of reducing sugars. The test is essentially qualitative.⁽⁷⁾

Procedure: for the examination to be valid, the stool must be fresh (analyzed in the laboratory within a maximum of 1 hour).

 Result and interpretation: The change in color from blue to brick-red in the reagent indicates a positive reaction. Colorimetric variations may occur depending on the concentration ranges of sugars, ranging from intense blue to shades of green, yellow, and finally to brick-red.

Readings of (+), (++), (+++), (++++), correspond to the intensity of color, indicating the amount of reducing sugars in the fecal sample.

False results may occur in non-fresh fecal material due to the fermentation of sugars by intestinal bacteria.

Reference value: Non-reactive.

Research on Bile Pigments

Stool appears brownish due to the presence of stercobilin, which is the normal bile pigment. The presence of bile pigments is verified by the reaction of the sublimed compound. (1,2)

Procedure: In a test tube, add:

| Diluted stool | 5 ı | mL |
|--|-----|----|
| Saturated aqueous solution of mercuric chloride | 5 ו | mL |
| (33 g of mercuric chloride/500 mL of water) ⁽²⁾ | | |

Shake and let it rest for a period of 5 minutes to 24 hours for reading.

Result and interpretation: A brick-red color of the liquid and sediment indicates the presence of stercobilin or stercobilinogen; a green color indicates the presence of bilirubin; no coloration indicates the absence of bile pigments.

Clinical Correlation: The absence of stercobilin may indicate biliary obstruction. (1,4)

Research on Albumin in stool

The sublimate reaction is also used to detect albumin in stool, employing the same reagent and procedure as described previously for bile pigments.^(1,2)

Procedure: In a test tube, add:

| Diluted stool | 5 | mL |
|--|---|----|
| Saturated aqueous solution of mercuric chloride | 5 | mL |
| (33 g of mercuric chloride/500 mL of water) ⁽²⁾ | | |

Shake and let it rest for a period of 5 minutes to 24 hours for reading.

Result:

Negative Reaction: Sedimentation of fecal residues with turbid supernatant and no clumps.

Positive Reaction: Coagulation of proteins (flocculation) with a clear supernatant liquid.

Reference value: Absence.

Clinical correlation: Diagnosis of intestinal mucosal lesion and ulcerative colitis. $^{(1)}$

Microscopic Examination

Stool Leukocyte Analysis

This test should be performed on fresh, recently collected stool samples and sent to the laboratory immediately or within 2 hours after collection. (2.4)

Direct fresh microscopic examination or staining with Lugol's solution is used for leukocyte detection (Figure 2). The use of methylene blue stain facilitates easier visualization of polymorphonuclear leukocytes.^(2,4)

Procedure:

Direct fresh examination and after staining: On a clean, dry slide, place a drop of diluted stool or a portion of stool from various points of the fecal sample, preferably if mucus is mixed with the stool; cover with a 22mm x 22mm coverslip and observe under a microscope at 400x magnification.

For the Lugol preparation, add a drop of Lugol's solution and mix with the stool portion on the slide, then proceed as described above.

For the methylene blue preparation, mix the stool portion with the stain and proceed as previously described.

Result: Positive: presence of leukocytes or pyocytes (when degenerated), which should be quantified as rare, few, many, or numerous; Negative: absence of leukocytes in the fecal sample.

Note: For the detection of neutrophils and eosinophils, prepare a thin smear of diluted stool on a slide, stain with hematological stains, and examine under a microscope at 1000x magnification.

Interpretation: The leukocyte detection test in stool aims to verify the presence and quantity of leukocytes in the intestinal tract, which may indicate an inflammatory or infectious process. In intense infectious inflammatory processes, leukocytes are present in large quantities and appear clustered. (2,4)

Reference Value: Absent.

Clinical Correlation: A large number of leukocytes may be caused by ulcerative colitis, bacterial infection, cancer, tuberculosis, or mebiasis. (2,4)

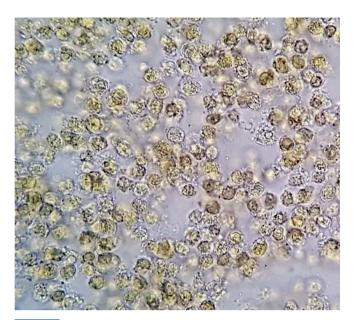


Figure 2

Leukocytes in fecal sediment stained with Lugol. 400x magnification.

Source: Courtesy of Lenilza Mattos Lima.

Food Residues and Elements of Intestinal Origin

Various elements can be found in stool, including food residues of animal and plant origin, as well as elements of intestinal origin. Thus, stool may contain residues of digested and undigested food, primarily of plant origin such as starch and cellulose; it may also contain epithelial cells and microorganisms such as yeast and bacteria. (1,2,8)

After stool dilution, prepare a fresh slide and another with Lugol's solution, cover with a 22mm x 22mm coverslip, and examine under a microscope at 100x and 400x magnification.

(1,2) It is recommended to analyze the fecal sediment after allowing the dilution to rest for approximately 30 minutes.

Result: For qualitative reporting, the element should be reported as present or absent; for quantitative reports, the structures observed under the microscope should be quantified as rare, few, many, or numerous.

Food Residues of Animal Origin

Muscle Fibers

Microscopic examination of fecal sediment may reveal well-digested and poorly digested muscle fibers, typically stained yellow or orange by bile. Well-digested muscle fibers appear oval, circular, or with rounded edges, lacking striations and angles (Figure 3). Poorly digested fibers

appear as rectangular or elongated cylinders, with distinct longitudinal or transverse striations (Figure 3).

Interpretation: In normal digestion, well-digested muscle fibers may be found, while the presence of poorly digested muscle fibers in large quantities indicates accelerated intestinal transit or pancreatic insufficiency.^(1,2)

Food Residues of Plant Origin

Digestible Cellulose

Digestible cellulose constitutes the framework of feculent cells. Under microscopic examination, it appears isolated or in groups, oval, rounded, or polyhedral, with distinct contours and internal septa. It has a brownish coloration and may contain starch granules (included starch). This cellulose has semiological significance (Figure 4 A-B).

Interpretation: In normal stool, it appears in insignificant quantities, while its presence in large amounts may indicate accelerated intestinal transit. (2,4)

Undigestible Cellulose

Undigestible cellulose is composed of plant fibers, cereal cuticles, vessels and plant trichomes, cellulose rings, palisade cells, pollen grains with variations in shape and size, spores, stomata, and other plant structures, which have no semiological significance.^(2,8) Figure 5 (A, B, C, D, E) shows undigestible cellulose in fecal material.



Figure 3

Muscle fibers in fecal sediment stained with Lugol: well-digested (rounded angle) and poorly digested (rectangular and striated).

Source: https://parasitologiaclinica.ufsc.br/

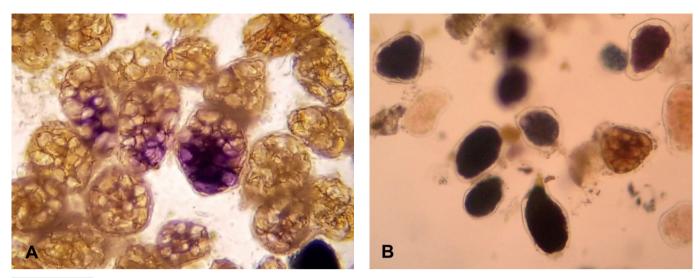


Figure 4 A and B

Digestible cellulose without starch and with included starch in fecal sediment stained with Lugol. 400x magnification.

Source: Courtesy of Lenilza Mattos Lima.

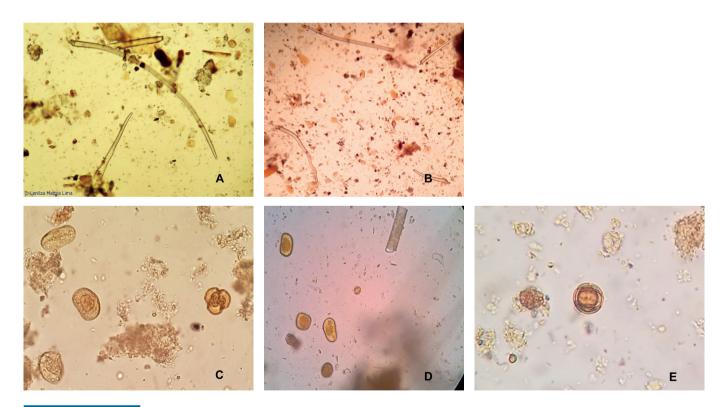


Figure 5 A, B, C, D, and E

Undigestible cellulose in fecal sediment stained with Lugol. In A and B: plant trichomes (400x, 100x); in C and D: pollen grains (400x, 100x); in D, a spiraled plant vessel can be observed at the top; in E: pollen grain (400x).

Source: Courtesy of Lenilza Mattos Lima.

Starch

Starch is found in foods such as potatoes, rice, wheat, cassava, corn, oats, and fruits, which are part of the human diet. Under microscopic examination of fecal preparations on slides, starch appears in different forms: intracellular or included starch, raw starch, and amorphous starch. Intracellular starch appears within the cells of starchy foods, in the form of small whitish grains that are oval or round (Figure 4 A-B). Raw or undigested starch is found as oval or rounded grains, mostly organized in concentric layers (Figure 6). Amorphous starch generally appears as isolated or irregular bands and may be covered with iodophilic bacteria, with identification performed using Lugol's solution. In preparations stained with Lugol, starch stains black, pink, or intense blue.^(1,2,4)

Interpretation: A large amount of starch in the stool, particularly undigested starch, may indicate accelerated intestinal transit, excessive intake of starchy foods, poor mastication, or hydrocarbon fermentation in the intestines. (1,2)

Iodophilic Flora

Normally found at the level of the cecum and right colon, it consists of bacteria that contain starch. In fecal preparations on slides stained with Lugol, they acquire a violet, blue, or black coloration (Figure 7 A-B).

Interpretation: In cases of accelerated intestinal transit or intestinal fermentation, iodophilic flora appears in large quantities. (1,4)

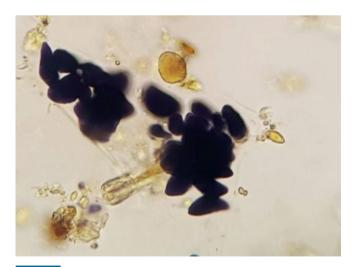
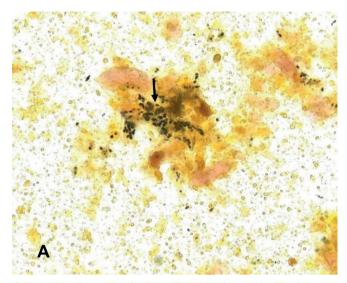


Figure 6

Starch grains in Lugol-stained fecal sediment. 400x magnification.

Source: Courtesy of Lenilza Mattos Lima.



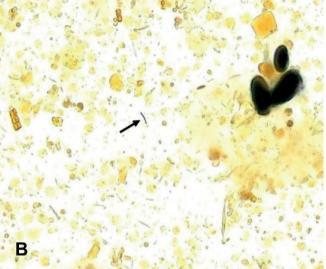


Figure 7 A and B

lodophilic flora in fecal sediment stained with Lugol's solution. 400x magnification.

Source: https://controllab.com/ensino/atlas/coprologia-funcional-ii/

Elements of Intestinal Origin

The most common substances of intestinal origin are erythrocytes, leukocytes, and epithelial cells. Erythrocytes are observed with their known color, shape, and sizes, either isolated or agglutinated. (2) The presence of leukocytes in the intestinal tract is described above in "leukocyte detection in stool." Epithelial cells are not found in normal stool, only if intestinal transit is accelerated. (2)

Other Elements

Other elements, such as fungi and crystals, described below, may also be found in stool samples.

Fungi in Stool

Yeasts and other fungal elements are common in stool. Fungi in stool may be transmitted through food and generally do not cause digestive symptoms or signs. They are recognized by their oval or spherical shape, brown coloration, and some by the presence of budding mycelium. Yeasts can produce pseudohyphae. The presence of yeasts from the genus *Candida* in stool may indicate intestinal candidiasis. ⁽²⁾ Figures 8 and 9 show the presence of fungi in stool.

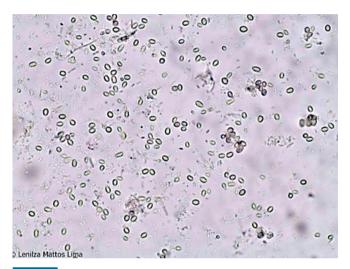


Figure 8

Fungi in fecal sediment. 400x magnification.

Source: https://parasitologiaclinica.ufsc.br/

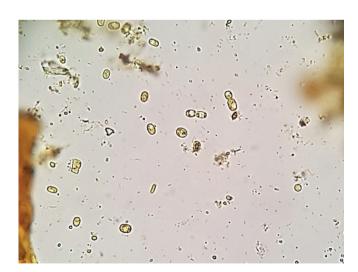


Figure 9

Fungi in fecal sediment stained with Lugol's solution. 400x magnification.

Source: Courtesy of Leticia Porto Coelho.

Crystals in Stool

Various crystals may appear in stool, (2,4) but those of greatest interest in digestive functions are:

- a) Calcium Oxalate Crystals: They appear in the form of envelopes. Interpretation: They arise after the ingestion of tomatoes, beans, green beans, and other vegetables. They are dissolved by hydrochloric acid in the stomach, and when found in large quantities in the stool, may indicate gastric insufficiency.
- b) Ammonium Magnesium Phosphate Crystals:
 They appear in the shape of coffin lids and in various sizes. Interpretation: They arise in alkaline stools with putrefactive dyspepsia. They may also appear during the collection of stool, contaminating it with urine.
- c) **Fatty Acid Crystals:** These appear as fine, long, and intercrossed needles, forming bundles.
- d) **Charcot-Leyden Crystals:** These have the shape of larger or smaller diamonds, elongated with pointed ends (Figure 10), and are derived from eosinophils.

Interpretation: They are associated with parasitic infections, allergies, and ulcerations. Charcot-Leyden crystals are observed when there is an inflammatory infiltrate with a predominance of eosinophils.



Figure 10

Charcot-Leyden crystal.

Source: https://www.cdc.gov/dpdx/artifacts/index.html

Bacterioscopic Examination

To verify the presence of Gram-positive and Gram-negative bacteria in Gram-stained fecal smears. The presence of other elements (cells, yeasts, and leukocytes) can also be observed. (4)

Fats in Stool

Fat digestion normally occurs in the small intestine, facilitated by the action of pancreatic enzymes, such as lipase. Normal stools may contain a small amount of fat in the form of neutral fats, fatty acids, and soaps. The presence of large amounts of fat excreted in the stool, defined as steatorrhea, may indicate intestinal malabsorption. (1,9,10)

Sudan III Staining

The detection of fecal fat is performed through microscopic examination with Sudan III dye (1% solution in 70% alcohol). This is a qualitative screening test that is easy to perform and shows good correlation with the measurement of fecal fat (described below) in the investigation of steatorrhea. (1-3) The Sudan III test has been reported to have a sensitivity of 77% and specificity of 98%. (3)

The patient should collect the stool without the use of laxatives and/or suppositories, and should not apply ointment to the anal region, castor oil, liquid vaseline, or mineral oil, as these can simulate neutral fats.

Procedure: On a clean, dry microscope slide, place one to two drops of diluted stool, add one to two drops of Sudan III solution, cover with a coverslip measuring 22mm x 22mm, and observe under a microscope at 400x magnification.

Result and interpretation: Neutral fats appear as droplets or globules, or in the form of red-stained lakes. The visualization of 60 or more droplets of neutral fat per field, stained red, indicates steatorrhea. (2)

Reading: The observation of 10 to 20 globules with a diameter of 10 μ m or more is considered (+); 20 to 100 globules with a diameter of 10 to 50 μ m is considered (++); and more than 100 globules of fat with large diameters are considered (+++).

Reference Value: Absence/Rare

Clinical correlation: The diagnosis of steatorrhea may indicate pancreatic insufficiency (absence of lipase), cystic fibrosis, and parasitic infections, such as giardiasis and cryptosporidiosis.

Steatocrit (Micromethod by Phuapradit)

The steatocrit was developed by Phuapradit and colleagues (1981)⁽¹¹⁾ to assess the fat concentration in the

stools of children. It is a semi-quantitative method based on microcentrifugation, which is easy to perform and low-cost, and it shows good correlation with fat balance in the evaluation of steatorrhea. It has a sensitivity, specificity, and positive predictive value of 100%, 95%, and 90%, respectively. The procedure described below by Mello and Silveira is based on the original method by Phuapradit and colleagues.

The patient should collect the stool without the use of laxatives.

Procedure:

- a) Use a glass rod to homogenize the stool to ensure an even distribution of the fecal mass;
- b) Separate a standard aliquot of stool (approximately 5 g);
- c) Mix this small amount of stool with 0.06 g of fine sand using a mortar;
- d) Add distilled water (4 volumes of the standard measurement) to dilute the stool, mixing again with the mortar, and homogenize for 1 minute with a vortex mixer:
- e) Aspirate this homogenized stool mixture into a heparinfree micro-hematocrit capillary tube;
- f) Centrifuge for 15 minutes in a micro-hematocrit centrifuge at 12,000 revolutions per minute. After centrifugation, the capillary tube is immediately placed in a vertical position, resulting in the formation of three layers: a lower solid layer (sand and solid residues); an intermediate liquid layer (water and soluble substances); and an upper layer that constitutes the fat in the stool.

Using a millimeter ruler with a precision of 0.025 cm and with the aid of a magnifying glass, measure the solid layer (S) and the fat layer (G).

Result: expressed as a percentage using the formula % steatocrit = $G/(G+S) \times 100$

Reference values: Infants in the first week of life: up to 25%; from the 1st to the 4th week: up to 13%; from 1 to 3 months: up to 7%; over 3 months: up to 2%; adults: up to 2%.

Clinical correlation: Diagnosis of fat malabsorption in children and adults, pancreatic insufficiency, and cystic fibrosis.

Additional tests

Additional tests include fecal occult blood testing, fecal fat quantification, fecal calprotectin determination, and measurement of alpha-1 antitrypsin in stool.

Fecal Occult Blood Test

Gastrointestinal bleeding may not be clinically apparent, and fecal occult blood testing assists physicians in diagnosing various clinical conditions by detecting the presence of small quantities of blood in the fecal sample. (14,15)

Several methods described in the literature are based on the detection of hemoglobin in feces, relying on the catalytic effects of the heme group, particularly the peroxidase activity of blood. Among these methods are the benzidine reaction, Meyer-Johannessen reaction, and guaiac reaction. (1,2) These colorimetric techniques require the patient to follow a specific diet for 3 to 4 days prior to the test. The patient should avoid consuming meats, chlorophyll-rich vegetables (such as spinach, lettuce, broccoli, radishes, turnips, beets, etc.), bananas, melons, pears, apples, as well as iron-based medications, corticosteroids, and aspirin. (1,15)

The immunochromatographic method is specific for the detection of human hemoglobin in stool. This method utilizes a combination of labeled monoclonal or polyclonal antibodies against human hemoglobin. The presence of hemoglobin from other animals does not interfere with the results, and there is no requirement for a specific diet prior to the examination. (14,15) The technique is performed according to the instructions provided in the package inserts of the test kits. (14)

Therefore, the immunochromatographic method for fecal occult blood testing can be conducted upon request for functional stool analysis.

Clinical Correlation: The fecal occult blood test is employed in screening for colorectal cancer and other gastrointestinal lesions, such as ulcers, diverticulitis, and esophageal varices. (14,15)

Fecal Fat Ouantification

Fecal fat quantification for diagnosing suspected intestinal malabsorption typically involves a 72-hour stool collection, processed using the Van de Kamer titration method (2). Fecal fat excretion above 7 g/day supports the diagnosis of steatorrhea. It is essential for the patient to follow a balanced diet of 100 g of fat per day during the 3-day stool collection period. (1-3)

Clinical Correlation: The quantification or balance of fat in feces is useful in investigating malabsorption syndromes of pancreatic origin, cystic fibrosis, celiac disease, and Crohn's disease. (2)

Calprotectin Determination in Stool Samples

Calprotectin is a protein found in the cytosol of neutrophils and macrophages, composed of two subunits, \$100A8 and \$100A9. It remains stable in stool for up to 7 days at room temperature and is evenly distributed throughout the stool sample. Calprotectin is classified as a damage-associated molecular pattern (DAMP) protein with antimicrobial protective properties. The extracellular release of calprotectin during periods of cellular stress or damage makes it an accurate marker of intestinal inflammation. (3,16)

In clinical laboratories, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique is employed to measure the concentration of fecal calprotectin. Several ELISA kits are commercially available. (16,17) Additionally, immunochromatographic tests have been developed for the diagnosis of fecal calprotectin.

Clinical Correlation: Fecal calprotectin serves as a biomarker for intestinal inflammation and is useful in diagnosing inflammatory bowel diseases, assessing the response to medical therapy, and predicting clinical relapse. This fecal protein is elevated in patients with ulcerative colitis, Crohn's disease, cystic fibrosis, and colorectal cancer. (3,16,17)

Measurement of Alpha-1 Antitrypsin in Stool

Alpha-1 antitrypsin is a plasma protein resistant to degradation by digestive enzymes. The measurement of alpha-1 antitrypsin in stool is a test that analyzes protein loss through the digestive tract. The radial immunodiffusion method has been employed to measure fecal alpha-1 antitrypsin, as well as immunoturbidimetric methods. (18)

Clinical correlation: Elevated values are found in diseases that cause protein loss, such as inflammatory bowel disease, celiac disease, cow's milk intolerance, gastric carcinoma, gastrointestinal lymphomas, Whipple's disease, allergic gastroenteropathy, congenital hypogammaglobulinemia, and Menetrier's syndrome.⁽¹⁸⁾

Post-Analytical Phase

The report of the functional coprological examination should provide information regarding the macroscopic examination of the stool and its physical characteristics, chemical tests, and microscopic analysis. Additionally, it is pertinent for the report to include information about the diet recommended by the laboratory.

Below is a proposed template for the report.

| Functional Coprological | | |
|-----------------------------------|--------|-----------------|
| Macroscopic Examination | Result | Reference value |
| Physical Characteristics of Stool | | |
| Consistence | | |
| Shape | | |
| Color | | |
| Odor | | |
| Viscosity | | |
| Blood | | |
| Mucus | | |
| Pus | | |
| Food Residues | | |

Chemical Examination

рΗ

(Universal indicator paper) Reducing Substances

(Benedict's reagent)

Stercobilin

(Sublimate reaction)

Bilirubin

(Sublimate reaction)

Albumin

(Sublimate reaction)

Occult Blood

(Immunochromatographic method)

Microscopic Examination

Leukocytes

Erythrocytes

Epithelial Cells

Undigested Muscle Fibers

Well-Digested Muscle Fibers

Digestible Cellulose

Non-Digestible Cellulose

Raw Starch

Amorphous Starch

Starch Inclusion

Fungi/Yeasts

Crystals

lodophilic Flora

Parasites

Neutral Fats

(Staining with Sudan III)

Gram Staining

Steatocrit

(Micromethod of Phuapradit)

FINAL CONSIDERATIONS

Coprological examinations are conducted to assess the functioning of the gastrointestinal system and the functional status of its organs. The results of the functional coprological examination will assist in the diagnosis of intestinal malabsorption syndromes, inflammatory bowel diseases, pancreatic disorders, and infectious and parasitic diseases. The examination also indicates pathologies associated with gastrointestinal bleeding. Early diagnosis facilitates prompt treatment and improves the prognosis of the disease.

Some physicians request both the stool parasitology test and the functional coprological examination simultaneously. However, it is important to note that when only the functional coprological examination is requested, attention should be given to the microscopic analysis of the fecal sediment, as the presence of parasites may be observed and must be reported in the test results.

REFERENCES

- Vallada EP. Manual de exames de fezes: coprologia e parasitologia. Rio de Janeiro: Atheneu;1998.
- 2. Lima AO, Soares JB, Greco JB, Galizzi J, Cançado JR. Exame de fezes. In: Lima AO, Soares JB, Greco JB, Galizzi J, Cançado JR. Métodos de laboratório aplicados à clínica. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.5.1-5.49.
- Kasırga E. The importance of stool tests in diagnosis and follow-up of gastrointestinal disorders in children. Turk Pediatri Ars, 2019;54(3):141-8.
- Silveira Junior AO. O exame coprológico e as funções digestivas. São Paulo: Livraria Editora Santos;1988.
- Martinez AP, Azevedo GR. Tradução, adaptação cultural e validação da Bristol Stool Form Scale para a população brasileira. Rev. Latino-Am. Enfermagem, 2012; 20(3): [7 telas]. Available at: DOI: https://doi. org/10.1590/S0104-11692012000300021

- Carvalho LC, Silva SCM, Moraes JB, Pissolatto GG, Fernandes RB, Faria JP, et al. A intolerância a lactose e a alergia a proteína do leite de vaca (APLV): as principais considerações clínicas. Res Soc Dev, 2022;11(7):2-9. Available at: DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i7.29651
- Universidade Federal da Paraíba. Laboratório Didático de Bioquímica. Teste de Benedict. 2017. Available at: http://plone.ufpb.br/ldb/contents/paginas/teste-de-benedict-1. Accessed: August 20, 2024.
- 8. Carli GA. Artefatos confundíveis com os estágios de diagnóstico dos parasitos. In: Carli GA. Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. 2a ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2011.p.139-151.
- 9. Wikipedia. Esteatorreia. 2020. Available at: https://pt.wikipedia.org/wiki/Esteatorreia. Accessed: Access: August 20, 2024.
- 10. Campagnaro ED, Jáuregui, Aparicio A, Lobo D. Valores normales de la prueba sudan III en niños sanos menores de un año de edad. Arch Venez Puer Ped, 2012;75(1):16-19.
- 11. Phuapradit P, Narang A, Mendonça P, Harris DA, Baum JD. The Steatocrit: a simple method for estimating stool fat content in newborn infants. Arch Dis Child, 1981;56:725-7. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1627297/. Accessed: August 20, 2024.
- 12. Mello ED, Silveira TR. Esteatócrito: um método semiquantitativo de avaliação de gordura fecal-padronização do teste. J Pediatr, 1995;71(5):273-278.
- Kamath MG, Pai CG, Kamath A, Kurien A. Comparing acid steatocrit and faecal elastase estimations for use in M-ANNHEIM staging for pancreatitis. World J Gastroenterol, 2017;23(12):2217-2222.
- Kroth K, Caumo KS, Lima LM. Saúde dos idosos: pesquisa de sangue oculto nas fezes. RBAC, 2023;55(4):276-281
- Honório JC, Tizzot MRP. Análise dos métodos de pesquisa de sangue oculto nas fezes. Cadernos da Escola de Saúde. Curitiba, 2010;3:01-11.
- Smith LA, Gaya RD. Utility of faecal calprotectin analysis in adult inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol, 2012;18(46): 6782-6789.
- Badawy AM, Ali AAE, El Ghany AMA, El Halim EFA, Mohamed HI, Nouh MAE. Calprotectin as a fecal marker for diagnosis and follow-up in patients with ulcerative colitis. Menoufia Med J, 2014;27(1):35-43. Available at: https://www.menoufia-med-j.com/journal/vol27/iss1/6/. Accessed: August 27, 2024. DOI: https://doi.org/10.4103/1110-2098.132726
- Strygler B, Nicar MJ, Santangelo WC, Porter JL, Fordtran JS. α1-Antitrypsin excretion in stool in normal subjects and in patients with gastrointestinal disorders. Gastroenterol, 1990;99(5):1380-1387.

Principais métodos clássicos de coloração em bacteriologia: aplicações, técnicas, fundamentos e limitações

Main classical staining methods in bacteriology: applications, techniques, principles, and limitations

Renata Garcia Costa¹, Wagner Thadeu Cardoso Esteves², Joseli Maria da Rocha Nogueira¹

Resumo

As técnicas de coloração consistem em uma importante ferramenta utilizada em laboratórios de microbiologia, sendo um recurso primário empregado na visualização e diferenciação de microrganismos. O presente artigo faz uma revisão narrativa, buscando artigos originais e atuais indicando os principais métodos de coloração utilizados em bacteriologia, apontando sua aplicabilidade em laboratórios de análises clínicas e/ou identificação de microrganismos de importância para Saúde Única, destacando não só os conceitos associados a esse tema e fundamentos dos métodos, mas também suas limitações. Tal abordagem incluiu os princípios dos métodos de coloração de Gram, Ziehl-Neelsen, Albert-Laybourn, impregnação de Fontana-Tribondeau, coloração negativa, coloração de esporos (Schaeffer-Fulton e Wirtz-Conklin, Moeller e Dorner) e coloração de flagelos. Sendo, de acordo com nossa revisão, as duas primeiras consideradas as técnicas mais empregadas atualmente em rotinas laboratoriais.

Palavras-chave: Bactérias Gram-Negativas. Bactérias Gram-Positivas. Coloração pela Prata. Bactérias. Corantes. Microscopia.

Abstract

Staining techniques are a critical tool used in microbiology laboratories, serving as a primary method for the visualization and differentiation of microorganisms. The present article provides a narrative review, focusing on original and recent studies that identify the main staining methods used in bacteriology. It highlights their applicability in clinical analysis laboratories and/or in identifying microorganisms significant to One Health. This review emphasizes not only the concepts associated with these methods and their foundational principles but also their limitations. This approach encompasses the principles of Gram staining, Ziehl-Neelsen staining, Albert-Laybourn staining, Fontana-Tribondeau impregnation, negative staining, spore staining (including Schaeffer-Fulton, Wirtz-Conklin, Moeller, and Dorner methods), and flagella staining. According to our review, the first two are currently the most widely used techniques in laboratory routines.

Keywords: Gram-Negative Bacteria, Gram-Positive Bacteria, Silver Staining, Bacteria, Dyes, Microscopy.

Correspondência Joseli Maria da Rocha Noqueira E-mail: joseli.maria@fiocruz.br

Recebido em 25/09/2024 | Aprovado em 09/10/2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400198.pt

¹ Fundação Oswaldo Cruz, LabMicro – Departamento de Ciências Biológicas – Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

² Fundação Oswaldo Cruz, Setor de Campylobacter – Laboratório de Zoonoses - IOC – Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

INTRODUÇÃO

Em microbiologia, métodos de coloração podem ser utilizados para auxiliar a identificação de microrganismos, possibilitando muitas vezes um diagnóstico presuntivo e precoce na sua classificação. Estes métodos são baseados nas características citomorfotintoriais, ou seja, composição e morfologia celular e afinidade pelos corantes, em que as estruturas podem ser visualizadas e diferenciadas com auxílio de microscópio.⁽¹⁾

Particularmente, as bactérias são naturalmente transparentes e possuem um índice de refração semelhante ao meio circundante, tornando-as translúcidas quando observadas ao microscópio de luz. Desta forma, faz-se necessária a utilização de corantes para aumentar o contraste entre as células bacterianas em relação ao fundo, facilitando a visualização.^(2,3)

Alguns métodos servem de aporte para a diferenciação de microrganismos e estruturas bacterianas baseando-se nas características estruturais e químicas, sendo muitas vezes essenciais para orientação do diagnóstico clínico assim como em atividades de pesquisa associadas à Saúde Única e outras vertentes. Essas técnicas padronizadas não só facilitam a identificação rápida e precisa de patógenos em amostras clínicas, mas também são essenciais para estudos que exploram a morfologia, distribuição e interações microbianas.⁽⁴⁾

Os processos de coloração utilizados em bacteriologia podem ser classificados como: Colorações simples e diferenciais. (5)

As primeiras englobam as metodologias em que se usa apenas um corante como contraste, como por exemplo azul de metileno, cristal violeta e carbol-fucsina, com a finalidade de tornar mais visíveis as formas e arranjos celulares. O uso de um simples corante pode revelar diferenças estruturais internas, dependendo da bactéria, como por exemplo o uso do azul de metileno, capaz de revelar os grânulos de volutina produzidos por *Corynebacterium diphteriae*, permitindo a visualização dos corpúsculos metacromáticos corados de vermelho frente ao corpo bacilar corado de azul⁽⁶⁾. Acrescente-se que, colorações simples também podem incluir algumas colorações especiais, idealizadas para evidenciar estruturas específicas da célula bacteriana, como esporos, flagelos, ou revelar a presença de cápsulas, aspectos que serão abordados com mais propriedade no decorrer deste artigo.^(5,7)

Em contrapartida, as colorações diferenciais são técnicas mais especializadas em que são utilizados diferentes corantes, mordentes e reveladores que permitem distinguir as estruturas celulares com base nas suas propriedades químicas, como as técnicas de coloração de Gram e coloração de Ziehl-Neelsen, consideradas ferramentas essenciais no diagnóstico laboratorial de microrganismos de importância clínica,⁽⁷⁻⁹⁾ mas que também podem ser usadas em pesquisas associadas à Saúde Única.

Embora existam na atualidade inúmeros testes fenotípicos e genotípicos para a identificação de microrganismos, os avanços na área de diagnóstico não substituem os métodos clássicos, pois estes ainda representam uma ferramenta valiosa de baixo custo, que fornece informações necessárias e básicas para identificação bacteriana, podendo em alguns casos até substituir, de forma rápida, exames mais complexos para a obtenção de um diagnóstico, como em quadros de difteria, meningite, tuberculose, hanseníase e algumas infecções sexualmente transmissíveis. (10-14)

OBJETIVO

Com base na importância desse tema, este artigo teve como objetivo realizar uma revisão narrativa mostrando o "estado da arte" associado às principais técnicas de coloração utilizadas na área de bacteriologia, destacando suas aplicações práticas e contribuições para a detecção dos microrganismos em diferentes contextos científicos e clínicos, pois acredita-se que esses assuntos são a base para o conhecimento da prática de bacteriologia e podem agregar informações pertinentes sobretudo para os alunos da área da Saúde, como um compilado para estudos acadêmicos.

METODOLOGIA

Segundo Rother, (15) os artigos de revisão narrativa são publicações amplas, adequadas para delinear e tratar o desenvolvimento ou o "estado da arte" de determinado assunto, sob o ponto de vista teórico ou contextual, não necessitando informar a metodologia para busca das referências, nem os critérios utilizados na avaliação e seleção dos trabalhos. Consistem, basicamente, de análise da literatura publicada em livros, artigos de revista impressas e/ou eletrônicas na interpretação e análise crítica pessoal dos autores. Todavia, optamos por indicar o critério que escolhemos, que tomou por base a pesquisa em livros de microbiologia disponíveis no Departamento de Ciências Biológicas – ENSP/FIOCRUZ, Acervo da Biblioteca de Manguinhos/FIOCRUZ e artigos científicos na *Word Wid Web*, utilizando os descritores informados.

MÉTODOS DE COLORAÇÃO UTILIZADOS EM BACTERIOLOGIA

Técnica de coloração de Gram

A coloração de Gram é a técnica diferencial mais utilizada na rotina laboratorial clínica em bacteriologia. Sua finalidade está na classificação de microrganismos quanto a suas bases tintoriais, tamanho, forma e arranjo celular.(1) A técnica de coloração de Gram foi idealizada pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram⁽²⁾ em 1884. O método consiste em submeter um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, a uma série sucessiva de corantes, permitindo diferenciar os microrganismos com base na composição química e integridade das paredes celulares⁽²⁾ em dois grandes grupos: Gram-positivos e Gram-negativos. O principal componente da parede celular é o peptideoglicano, também conhecido como glicopeptídeo ou mureína, um biopolímero constituído de cadeias alternadas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e N-acetilmurâmico, que conferem rigidez à célula bacteriana (MurNAc).(7)

A célula Gram-positiva apresenta uma parede celular basicamente constituída de peptideoglicano e ácido teicoico, enquanto a Gram-negativa é um pouco mais complexa, pois apresenta uma camada tênue de peptideoglicano e uma porção externa de composição lipopolissacarídica e lipoproteínas (Figura 1 e Figura 2).

No método clássico de coloração de Gram, um esfregaço delgado, homogêneo e seco de uma cultura bacteriana ou de um material clínico é tratado com um corante primário (cristal violeta fenicado) por 1 minuto, que penetra na parede celular e no protoplasma celular. Em sequência, utiliza-se a solução de Lugol (solução iodo-iodetada) por 1 minuto, que age como mordente, formando um complexo corante-iodo, insolúvel em água, denominado iodo-pararosanilina. Até esta etapa, tanto bactérias Gram-positivas quanto as Gram--negativas absorvem de forma idêntica o corante primário e o fixador, adquirindo inicialmente uma coloração violeta. Na sequência, é realizado o tratamento com um solvente orgânico (álcool- acetona) por 30 segundos, que tem função de descorar. Após esta etapa, a lâmina é submetida a uma lavagem com água (etapa obrigatória) para a retirada do excesso de resíduo do corante e, em seguida, coberta com fucsina de Ziehl diluída 1/10 (corante secundário) por 30 segundos, que tem a função de revelador.(2) Após todo o processo, a lâmina deve ser seca e observada no microscópio luminoso em objetiva de imersão 100X.⁽⁷⁾

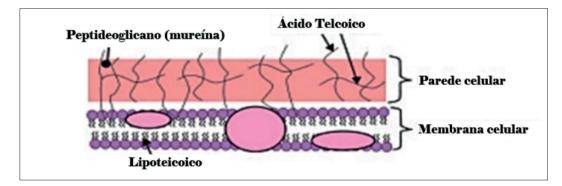


Figura 1

Estrutura básica da parede celular Gram-positiva⁽⁵⁾

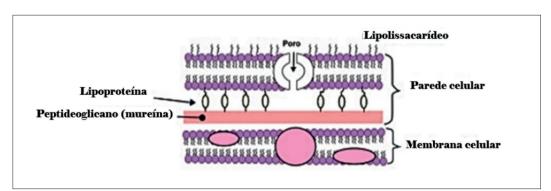


Figura 2

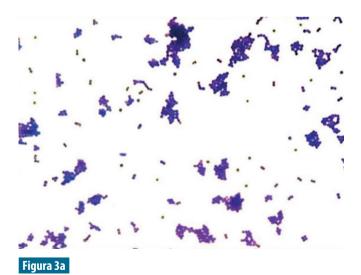
Estrutura básica da parede celular Gram-negativa⁽⁵⁾ É importante ressaltar que a solução descorante vai atuar de forma distinta de acordo com as características estruturais e diferentes graus de permeabilidade da parede celular. Em Gram-positivas, este solvente promove a contração dos poros do peptideoglicano, retendo o corante primário e mantendo-se corada de roxo (Figura 3a). No entanto, nas Gram-negativas, o solvente dissolve a porção lipídica (lipopolissacarídeos e lipoproteínas) da membrana externa, removendo o complexo cristal violeta-iodo, assumindo a coloração do corante secundário (fucsina ou safranina), revelando desta forma a coloração vermelha (Figura 3b). (9,7) A diferença geral observada nas tonalidades existe por uma divergência nas propriedades físicas e químicas das paredes celulares bacterianas, como composição, espessura, densidade, porosidade e integridade. (7,16,17)

Na literatura, alguns estudos sugerem métodos alternativos, indicando modificações e adaptações da técnica. Algumas variações estão relacionadas com alterações nas concentrações de corante, troca de reagentes, e modificações em relação ao tempo de exposição ao corante. Isto foi inicialmente embasado nos artigos de Lellis e colaboradores (2019), (18) que apontaram o potencial de toxicidade, carcinogênico e recalcificante dos corantes e o impacto para o ambiente e saúde humana devido ao descarte indevido após o uso em técnicas laboratoriais. (19)

No âmbito laboratorial, Reine e colaboradores (19) foram favoráveis à substituição dos métodos de Gram e Wirtz-Conklin

clássicos (em superfície da lâmina) pelo método de imersão das lâminas em corante, comprovando sua aplicabilidade para a coloração de muitas lâminas em uma única vez, sem comprometer a confiabilidade dos resultados, evitando a saturação das soluções após muitas passagens de lâminas, o desperdício de corante e consequentemente reduzindo gastos para a realização da técnica.

Atualmente existe a recomendação de substituição do cristal violeta por violeta de metila, tendo por base sua composição química que age como fixador, não sendo necessária, então, a fixação do esfregaço em chama, que atualmente caiu em desuso e é contraindicada. Outra alteração é a substituição da solução de álcool- acetona utilizada por Hurk, pelo álcool etílico 99,5°GL, pois este é considerado mais seguro e com menos potencial de toxicidade para o manipulador, além de evitar hiperdescoloração da lâmina e tornar a técnica mais reprodutível. No entanto, a modificação mais importante foi a substituição da fucsina fenicada, utilizada como corante secundário, pela safranina. Esta modificação foi baseada em estudos relacionados ao espectro de cor, comprovando que o uso da safranina possibilita uma maior distinção e nitidez entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, por se distanciar mais da cor do corante primário, quando comparado à fucsina, em que as Gram-negativas assumem a coloração vermelho-claro e as Gram-positivas, violeta. (7,20)



Característica tintorial de Gram-positiva (DCB, FIOCRUZ, 2024)

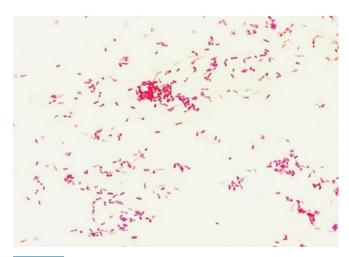


Figura 3b

Característica tintorial de Gram-negativa (DCB, FIOCRUZ, 2024)

TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE GRAM

| | MÉTODO CLÁSSICO | MÉTODO MODIFICADO | |
|----------------------|---|---|--|
| PREPARO DO ESFREGAÇO | Prepare um esfregaço delgado e homogêneo em uma lâmina previamente limpa e desengordurada; secar e fixar passando 3 x sobre a chama do bico de Bunsen | Prepare um esfregaço delgado e homogêneo em uma lâmina previamente limpa e desengordurada e deixe secar. No método modificado a fixação não acontece pelo calor, e sim pelo uso da violeta de metila, que age como um fixador químico. | |
| | Cubra com cristal violeta e deixe agir por 1 minuto. Escorra o corante e lave com um filete de água corrente (etapa não obrigatória, mas melhora a visualização) Cubra com solução Lugol e deixe agir por aproximadamente 1 minuto | Cubra o esfregaço com violeta de metila e deixe por aproximadamente 15 segundos Adicione quantidade igual de água sobre a lâmina coberta com violeta de metila e deixe agir por mais 45 segundos | |
| | Retire o excesso de corante e lave em um filete de água corrente (etapa não obrigatória) Adicione álcool-acetona, descorando por aproximadamente 30 segundos | Escorra o corante e lave em um filete de água corrente Cubra a lâmina com Lugol diluído (1/20) e deixe agir por aproximadamente 1 minuto | |
| COLORAÇÃO DA LÂMINA | Lave com um filete de água (etapa obrigatória) | Escorra o Lugol e lave em um filete de água corrente | |
| | Cubra a lâmina como o corante de fucsina de Ziehl Neelsen diluída 1/10, deixando agir por aproximadamente 30 segundos | Adicione álcool etílico (99,5º GL) sobre a lâmina, descorando-a, até que não desprenda mais corante | |
| | Lave com um filete de água (etapa obrigatória) | Lave em um filete de água corrente | |
| | | Cubra a lâmina com safranina e deixe agir por aproximadamente 30 segundos | |
| | | Lave em um filete de água corrente | |
| OBSERVAÇÃO DA LÂMINA | Deixe a lâmina secar naturalmente, leve ao microscópio e com o auxílio de óleo de imersão, observar em objetiva de imersão (100X) | | |

Fonte: Nogueira e Souza(5); Brasil(7)

PRINCIPAIS MODIFICAÇÕES NO MÉTODO DE GRAM (7,20)

| MÉTODO CLÁSSICO | MÉTODO MODIFICADO | JUSTIFICATIVA |
|------------------|------------------------|--|
| Cristal violeta | Violeta de metila | A violeta de metila já possui característica de fixador, dispensando a fixação do esfregaço pela chama do bico de Bunsen, que promove brusca desidratação dos componentes celulares |
| Lugol | Retirada desta etapa | |
| Álcool-acetona | Álcool etílico 99,5°GL | A solução de álcool etílico 99,5°GL tem menor potencial de toxicidade e diminui os efeitos de hiperdescoloração da lâmina |
| Fucsina fenicada | Safranina | No espectro de cor, a safranina se distancia mais do corante primário quando comparada à fucsina, permitindo mais diferenciação e nitidez entre as bactérias Gram-positivas e as Gram-negativas. |

Fonte: Brasil⁽⁷⁾; Pinto e Ribeiro⁽²⁰⁾

Cabe ressaltar que alguns grupos de bactérias não se coram pelo método de Gram, pois apresentam determinadas características que necessitam de técnicas específicas. Podemos citar como exemplo os espirilos, que apresentam o corpo celular muito fino, dificultando a visualização por métodos clássicos; e o gênero *Mycobacterium* que por apresentar uma

parede celular de composição diferenciada⁽³⁾ necessita de coloração especializada para esta estrutura. Devemos considerar ainda, as bactérias que não possuem parede celular, como por exemplo os micoplasmas. Estas bactérias apresentam apenas 0,2µ de tamanho, podendo ser observadas somente através de microscopia eletrônica, ou microscopia de fluorescência.

TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

A técnica de Ziehl-Neelsen é uma metodologia extremamente importante e rotineiramente uma das mais utilizadas na atualidade em bacteriologia clínica. Foi desenvolvida pelo bacteriologista Franz Ziehl e posteriormente modificada pelo patologista alemão Friedrich Carl Adolf Neelsen, no final do século XIX, quando buscavam alternativas para visualizar o *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose, que não podia ser corado de forma eficaz pelos métodos tradicionais devido à sua parede celular única e diferenciada.⁽³⁾

Além de possibilitar a coloração do gênero *Mycobacterium*, essa técnica é um método diferencial utilizado na identificação de todos os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), como também a do gênero *Nocardia*. A característica álcool-ácido resistente é conferida a essas bactérias devido ao alto teor de lipídios estruturais na parede celular, promovendo uma condição hidrofóbica que interfere na permeabilidade e ação de corantes aquosos e resulta na resistência à ação dos reagentes álcool-ácidos.^(12,21)

Entre os principais grupos bacterianos detectados em laboratórios de análises clínicas por essa técnica, destacam-se o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, reconhecidos pela OMS como agentes de problemas de saúde de grande relevância para a clínica humana. (11-13,22)

O complexo Mycobacterium tuberculosis é composto atualmente de 11 espécies distintas associadas com tuberculose humana e animal. Entre elas, a espécie Mycobacterium tuberculosis, que por ser altamente adaptada é a causadora de grande parte dos casos de tuberculose em humanos, sendo considerada, sob o ponto de vista sanitário, a mais importante do complexo. (23) A tuberculose é uma doença infecciosa transmissível que afeta prioritariamente os pulmões (forma pulmonar), mas pode acometer outros órgãos e/ou sistemas, (22) portanto a coloração de Ziehl-Neelsen é a técnica empregada para evidenciar BAAR em vários materiais clínicos, que podem englobar urina, líquor, peças de biópsia, ou ser de origem pulmonar como o lavado brônquico, lavado gástrico e swab de laringe, porém o exame baciloscópico do escarro é o método reconhecido pelo Ministério da Saúde como o mais importante, tanto para o diagnóstico, como para o controle do tratamento da tuberculose pulmonar no país. (12,22)

Por possuir uma parede celular diferenciada, fazendo com que a absorção de nutrientes seja lenta, o *M. tuberculosis* pode levar mais de um mês para produzir colônias visíveis em meio de isolamento.⁽⁹⁾ Neste caso, a pesquisa de BAAR em materiais clínicos pode constituir a primeira evidência de

doença, permitindo um diagnóstico precoce e embasamento para o início do tratamento terapêutico, enquanto ocorre a confirmação laboratorial da cultura positiva. (22)

Em contrapartida, o *Mycobacterium leprae* é o agente etiológico da hanseníase, doença caracterizada pelo comprometimento dos nervos periféricos e formação de lesões e manchas em áreas da pele, com alteração da sensibilidade térmica (calor e frio), motoras e/ou anatômicas.^(11,13,24)

O diagnóstico de hanseníase baseia-se essencialmente em critérios clínicos e epidemiológicos, pois o *Mycobacterium leprae* é um microrganismo não cultivável *in vitro*. Neste caso, a baciloscopia está entre os testes primários fundamentais para identificar a presença das bactérias nas regiões afetadas.⁽¹¹⁾

A técnica de Ziehl-Neelsen é um método de fácil execução, rápido e de baixo custo, que detecta a presença dos BAAR.⁽¹²⁾ Se executado corretamente, desde a coleta e processamento da amostra até a baciloscopia, permite uma eficácia diagnóstica em 80% dos casos.⁽²²⁾

Na rotina laboratorial, a pesquisa de M. tuberculosis é realizada, na maioria das vezes, com escarro espontâneo, utilizando a porção mais purulenta, que é colocada e distendida diretamente sobre a lâmina (baciloscopia direta). As secreções purulentas e o pus, por suas características físicas, também podem ser distendidos diretamente sobre a lâmina. Por outro lado, com o objetivo de aumentar a sensibilidade da baciloscopia, todas as amostras clínicas, sempre que possível e, de acordo com a necessidade, podem receber tratamento antes da realização do esfregaço. Esse tratamento pode ser: trituração, digestão com agentes químicos, como hidróxido de sódio (NaOH) ou NaCl, concentração, sedimentação, flotação ou mesmo filtração. (12) As metodologias recomendadas pelo Ministério da Saúde que visam a descontaminação e o tratamento do escarro para a realização da baciloscopia são: método de Petroff modificado, método de N-acetil-L--cisteína-hidróxido de sódio – NALC-NaOH, método do Swab - Ogawa-Kudoh e método do ácido oxálico. (12)

Embora o *M. tuberculosis* seja um microrganismo de alta periculosidade cuja transmissão ocorre por via aérea (Classe III), o processamento do material clínico para a realização da baciloscopia segue as recomendações de Biossegurança NB2, enfatizando o cuidado durante a manipulação do material biológico no preparo do esfregaço. (12) Segundo o Manual de Recomendações para o Diagnóstico Laboratorial da Tuberculose, (12) o depósito do material clínico deve ser de forma fluida em lâmina, com auxílio de palito de madeira estéril, pipeta Pasteur e/ou alça de platina, preconizados de acordo com os métodos de preparo. Recomenda-se não aquecer

a lâmina durante a preparação do esfregaço, não só pelo risco de formação de aerossóis no ambiente laboratorial, mas por produzir precipitados granulosos que prejudicam a coloração e a detecção do bacilo. Neste caso, a fixação do esfregaço só é realizada quando existe a garantia de que estejam completamente secos.⁽¹²⁾

Na técnica de coloração de Ziehl-Neelsen, utiliza-se a solução de fucsina de Ziehl (carbol-fucsina) como primeiro corante (esta é 10x mais concentrada que a fucsina utilizada no método de Gram). Nesta etapa, é necessário um tratamento com calor, para que ocorra a dilatação e a penetração do corante na parede celular das micobactérias. Desta forma, após cobrir a lâmina com fucsina de Ziehl, deve-se deixar agir por 5 a 10 minutos, aquecendo com chama branda (evitar a fervura), até o desprendimento de vapores. Após essa etapa, a lâmina é brevemente lavada e descorada com solução de álcool-ácido clorídrico a 1%. A lâmina é coberta com azul de metileno, que funciona como um contra-corante, por aproximadamente 30 segundos. Em sequência, lavar, deixar secar e observar em objetiva de imersão (100X).⁽¹²⁾

O diferencial da parede celular das micobactérias está na constituição da camada de peptideoglicano formada de N-glicolilmurâmico e ácidos micólicos, que são ácidos graxos de cadeia longa (gordura) presentes nesta estrutura que formam uma barreira e dificultam a entrada do corante. Os lipídios fortemente ligados na estrutura do ácido micólico vão promover a hidrofobicidade, impedindo a penetração de corantes aquosos, a ação dos mordentes e dos diferenciadores, o que não ocorre em outros gêneros bacterianos. O princípio da técnica de Ziehl-Neelsen baseia-se no fato de que após a etapa de aquecimento, ocorre uma dilatação, tornando possível transpor o corante carbol-fucsina para o interior da célula, que fica retido após o resfriamento. Este se mantém, mesmo após a descoloração com um agente ácido-alcoólico.⁽¹²⁾

No processo de coloração da amostra, a fucsina fenicada de Ziehl (carbol-fucsina) irá corar todos os elementos celulares de vermelho. No entanto, após o processo de descoloração com álcool-ácido, somente os bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) serão capazes de preservar essa coloração e irão sobressair em relação a outros microrganismos que não possuem essa propriedade. Os compostos celulares que são descorados irão absorver a coloração do corante de fundo, azul de metileno (contra-corante), conforme demonstrado na Figura 4.^(5,12)



Figura 4

Mycobacterium tuberculosis corado pela técnica de Ziehl-Neelsen(12)

Segundo o Ministério da Saúde, (12) a leitura e interpretação dos resultados de baciloscopia, seguem os seguintes critérios:

Leitura e interpretação dos resultados de baciloscopia de amostras de escarro: (12)

| LEITURA | RESULTADO |
|---|--|
| Não são encontrados BAAR em 100 campos observados | NEGATIVO |
| 1 a 9 BAAR em 100 campos observados | Relata-se a quantidade de bacilos encontrados |
| 10 a 99 BAAR em 100 campos observados | POSITIVO + |
| 1 a 10 BAAR em 50 campos observados | POSITIVO ++ |
| Em média, mais de 10 BAAR por campo em 20 campos observados | POSITIVO +++ |

Leitura e interpretação dos resultados de baciloscopia de outras amostras clínicas:⁽¹²⁾

| LEITURA | RESULTADO |
|---|-----------|
| Não são encontrados BAAR em 100 campos observados | NEGATIVO |
| São encontrados BAAR em qualquer quantidade do material examinado | POSITIVO |

MÉTODO DE FONTANA-TRIBONDEAU

Este método foi idealizado por Alfonso Fontana e Louis Tribondeau,⁽²⁵⁾ em 1920, e embora seja considerado uma prática laboratorial de coloração, isso não é verdadeiro. Trata-se de uma técnica de impregnação pela prata, utilizada na visualização de bactérias espiraladas extremamente finas que não se coram pela técnica usual de Gram, como por

exemplo os treponemas e as leptospiras. Na utilização desta técnica as espiroquetas são tratadas com prata amoniacal e se destacam contra um fundo claro. Desta forma, tornam-se visíveis na cor marrom-escuro ou negra sobre um fundo de cor amarelo-castanho ou marrom-claro. (5,9,25)

A metodologia consiste em depositar, sobre o esfregaço seco, algumas gotas da solução de Ruge (ácido acético glacial, formalina 40% e água destilada) deixando agir por 30 segundos (por 3 vezes). Esta etapa tem a função de fixar o esfregaço na lâmina. Isto porque, nesse tipo de material não é recomendada a fixação pelo calor, como realizado em outras metodologias, pois o aquecimento pode afetar a morfologia das espiroquetas. (5,9,25)

Após esta etapa, o esfregaço é coberto com a solução Mordente (composta de ácido tânico e ácido fênico) e submetido ao aquecimento até a emissão de vapores por 30 segundos. Lavar e posteriormente tratar com a solução impregnadora (nitrato de prata amoniacal), aquecendo ligeiramente até a emissão de vapores, deixando agir por 30 segundos. A prata então é reduzida a prata metálica, depositando-se nas espiroquetas, que poderão ser observadas em microscópio com uma coloração marrom, (5.9) conforme a Figura 5.

Entre as principais aplicações desta técnica, destaca-se sua importância para o diagnóstico de sífilis, pois a partir do material clínico é possível fazer a visualização direta do *Treponema pallidum*, que não pode ser cultivado *in vitro*. ⁽²⁶⁾

COLORAÇÃO DE ALBERT-LAYBOURN

Esse método de coloração foi sugerido inicialmente em 1920 por Henry Albert, e modificado posteriormente por Ross Laybourn⁽²⁸⁾ em 1924. Essa técnica tem sido utilizada para a

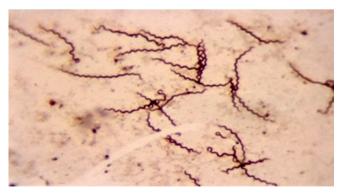


Figura 5

Treponema pallidum corado pelo método de Fontana-Tribondeau⁽²⁷⁾

pesquisa de corinebactérias no diagnóstico presuntivo de difteria e se baseia na presença de corpúsculos citoplasmáticos localizados nas extremidades dessas bactérias, conhecidos como corpúsculos metacromáticos ou corpúsculos de Babes Ernst. Estas estruturas são compostas de polifosfatos que se acumulam no interior da célula, quando outro nutriente diferente do fosfato se torna escasso, especialmente quando há pouca quantidade de sulfato. Nestas condições, detém-se a síntese dos ácidos nucleicos, e a volutina acumula-se no aguardo da sua utilização para esta síntese. Esse material rico em polifosfatos se cora muito pelo Lugol forte, dando a impressão de que são até maiores que o corpo bacilar e adquirem uma tonalidade marrom, sendo possível se observar em contraste com o corpo bacilar que se cora em verde-azulado pela solução de Laybourn. (5)

A coloração de Albert-Laybourn é indicada em diferentes estudos, como "padrão ouro" para triagem de *Corynebacterium diphteriae* a partir do exame direto de esfregaço de naso e orofaringe. Este microrganismo, responsável por um quadro infecioso transmissível, pode evoluir para a formação de placas pseudomembranosas típicas que se alojam nas amígdalas, laringe, faringe, nariz e até mesmo na conjuntiva e na pele. (9,21,24) Embora seja imunoprevenível e seu tratamento na atualidade seja realizado com soroterapia, quando ocorre a infecção, a rapidez no diagnóstico é um fator determinante para um bom desfecho.

O diagnóstico da doença é realizado a partir da avaliação da sintomatologia clínica, que combinada ao estudo de microscopia óptica como um teste complementar pode revelar a presença de bacilos metacromáticos no material clínico coletado, indicando presuntivamente a difteria. No entanto, a OMS preconiza, concomitantemente, a coleta do material clínico e realização da cultura bacteriana visando o isolamento de *Corynebacterium* sp. em meios específicos para a confirmação do diagnóstico. (21,24)

O método de Albert-Laybourn consiste em cobrir o esfregaço com a solução de Albert-Laybourn (azul de toluidina, verde malaquita, ácido acético glacial, álcool 95° e água destilada), por 3 a 5 minutos. Escorrer sem lavar e em seguida cobrir com solução Lugol forte (iodo metálico, iodeto de potássio e água destilada), deixando agir por aproximadamente 2 minutos. Após esse processo, lavar, secar e observar em microscópio, em objetiva de imersão, (5) os corpúsculos metacromáticos corados de marrom, conforme Figura 6.

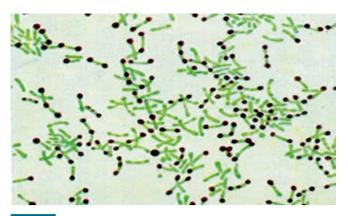


Figura 6

Corpúsculos Metacromáticos corados pelo método de Albert Laybourn⁽⁹⁾

COLORAÇÕES DE ESPOROS

Alguns grupos bacterianos, como os gêneros Bacillus e Clostridium, são capazes de formar estruturas de resistência chamadas endósporos. Geralmente essa condição acontece quando os microrganismos se encontram em condições desfavoráveis, com escassez de nutrientes, condições inadequadas de umidade e temperatura. Nestas condições, os microrganismos entram em fase de esporulação, produzindo no seu interior uma estrutura esférica ou ovoide resistente, cuja composição se caracteriza por altos teores de cálcio em associação ao ácido dipicolínico, relacionado à desidratação e à alta resistência, inclusive térmica. (5,7) Cada célula forma um único esporo, e essas estruturas são liberadas para o meio externo após a morte celular. Essas estruturas podem permanecer em estágio de latência ou em repouso por anos no ambiente, até encontrarem uma condição ideal para se tornarem viáveis novamente. (16)

Entre as principais funções dos endósporos destaca-se a sua proteção contra agentes físicos e químicos usados em processos de esterilização/desinfecção, visto que somente podem ser destruídos por autoclavação a 120°C durante 30 minutos.^(5,7)

Apesar da importância de sua detecção, visualizar esporos em microscópio luminoso óptico pode ser difícil, devido a refringência dessas estruturas, o que os torna resistentes a diversos corantes, pois estes não penetram a parede do endósporo. Em colorações comuns, o corpo bacteriano fica corado, todavia o endósporo permanece incolor.⁽⁷⁾

Entre as várias técnicas de coloração de esporos destaca-se a coloração de Schaeffer-Fulton, idealizada por A.B. Schaeffer e M.D. Fulton,⁽²⁹⁾ em 1933, para a coloração de endósporos bacterianos associados a infecções clínicas humanas, como tétano e botulismo, consideradas de grande relevância para Saúde Pública⁽²⁴⁾. Outra metodologia de coloração em bacteriologia para pesquisa de esporos é a coloração de Wirtz-Conklin,⁽³⁰⁾ descrita em 1837, que torna possível a visualização dessas estruturas em microscópio. Atualmente, essa ainda é a metodologia preconizada em pesquisa de amostras ambientais e clínicas, especificamente no diagnóstico de doenças como o carbúnculo.⁽⁵⁾

Para realizar a coloração de esporos, você deve ter uma cultura pura da cepa suspeita que deseja estudar. Recomenda-se que esta cultura seja submetida a temperaturas extremas por 24 horas para estimular o microrganismo a esporular. Para isso, a cultura pode ser colocada em um forno a 44°C ou em uma geladeira (8°C) por 24 ou 48 horas. É importante salientar que se as temperaturas mencionadas forem deixadas muito tempo, apenas exósporos serão observados, uma vez que todos os endósporos terão deixado o bacilo. No final desta etapa, em lâmina, algumas gotas de solução fisiológica estéril serão depositadas e homogeneizadas com a cultura previamente preparada. (7)

O princípio de ambas as técnicas se baseia no uso do verde malaquita, como corante primário, e da safranina como contra-corante. Na técnica de Wirtz-Conklin, a partir de um esfregaço homogêneo, delgado e fixado, deve-se cobrir a lâmina com o corante verde malaquita. Em um béquer, aquecer água até a emissão de vapores e depositar a lâmina sobre ele, mantendo o corante aquecido por 5 minutos. Como forma alternativa, pode-se aproximar a lâmina de uma chama branda até o desprendimento de vapor, sem deixar que o corante entre em ebulição. No intervalo de 1 a 2 minutos, repetir a operação por 3 a 4 vezes. O calor tem a função de auxiliar a penetração do corante na camada espessa formada pelo córtex. Após este processo, realizar a lavagem da lâmina, para retirada do excesso do corante, de forma suave, evitando choque térmico e quebra da lâmina. Adicionar a safranina sobre o esfregaço, que age como contra-corante, e aguardar por 30 segundos.

Já na coloração de Schaeffer-Fulton, a técnica é similar respeitando o tempo e uso dos mesmos corantes, no entanto o processo não passa pela etapa de aquecimento. Em ambas as técnicas, com um esfregaço corretamente preparado, os endósporos aparecem em verde dentro de células vermelhas ou rosadas (Figura 7). Como os endósporos são altamente refrativos, podem ser detectados no microscópio óptico quando não corados, mas não podem ser diferenciados de inclusões de material armazenado sem uma coloração especial. (5,7)

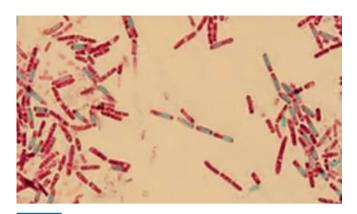


Figura 7

Coloração de esporos pela técnica de Wirtz-Conklin^(27,30)

Outras metodologias menos usuais para coloração de esporos estão descritas em literatura, como a coloração de Moeller, coloração de Dorner e coloração de Dorner modificada.⁽³¹⁾

A técnica de Moeller tem o princípio de utilizar o ácido crômico e fucsina como corante inicial, finalizando com azul de metileno como contra-corante. Nesta técnica os esporos irão se sobressair de vermelho, em relação ao corante de fundo azul. Esta técnica consiste em cobrir o esfregaço previamente preparado com álcool que será submetido ao fogo, até naturalmente apagar. Posteriormente, a lâmina será coberta com ácido crômico a 5%, deixando agir por 5 minutos. Após a sensibilização, a lâmina deve ser lavada e adicionada a solução de fucsina fenicada, que deve agir por 10 minutos. Durante esta etapa, a lâmina deve ser aquecida até a emissão de vapores. Em sequência, é realizada a etapa de descoloração, utilizando como alternativa inicial o ácido sulfúrico a 5% ou ácido nítrico a 10%, e terminando com álcool absoluto. O esfregaço então será lavado e corado com a solução de azul de metileno (1%), como contra-corante, por 3 minutos e, após seguem lavagem e secagem da lâmina, observada em objetiva de imersão os esporos corados de vermelho e corpo bacteriano corado de azul.(31)

Para a coloração dos esporos de acordo com Dorner, o esporo é sensibilizado e corado com fucsina e nigrosina. A nigrosina tem a função de extrair todo o corante das estruturas celulares, com exceção dos esporos, assumindo uma coloração distinta (vermelha) em relação ao corpo bacteriano. Na técnica de Dorner, deve-se preparar uma suspensão concentrada de microrganismo esporulado em água destilada e adicionar um volume igual de fucsina filtrada de Kinyoun (fucsina fenicada). Posteriormente, o tubo

deverá ser colocado em um banho com água fervente, onde deve permanecer de 5 a 10 minutos. Em uma lâmina limpa, misturar uma gota da suspensão anterior com uma gota de solução aquosa de nigrosina a 10%, fervida e filtrada. Espalhar e secar rapidamente com calor suave. Examinar com objetiva 100X (imersão). Nesta técnica os esporos ficam vermelhos e as células bacterianas parecem quase incolores contra um fundo cinza-escuro.⁽³¹⁾

Na técnica de Dorner modificada, a partir de uma lâmina fixada com uma suspensão de microrganismo esporulado, deve-se cobrir o esfregaço com uma tira de papel de filtro e adicionar fucsina fenolada. Posteriormente, submeter a lâmina ao aquecimento por 5 a 7 minutos até a liberação de vapor. Após esse processo, o papel é removido e a lâmina lavada e seca com papel absorvente. O esfregaço, então, é coberto com uma película fina de solução de nigrosina a 10%, o qual deve ser distendido com auxílio de uma segunda lâmina. Na observação em microscópio, se possível visualizar os esporos com a mesma tonalidade que foi citada na técnica acima.⁽³¹⁾

Cabe ressaltar que as colorações de esporos podem ser utilizadas como aporte em diferentes segmentos, seja na clínica, em indústrias de alimentos ou na área ambiental. (7,32-34)

Particularmente na clínica, a presença de esporos é preconizada na detecção de *Clostridium tetani*, agente etiológico do tétano.⁽⁷⁾ Essa doença é causada por toxinas eliminadas pela bactéria, a qual tem capacidade de formar endósporos esféricos terminais com um aspecto característico, semelhante a uma "raquete", facilmente visíveis pelas técnicas de coloração.⁽²⁴⁾

No contexto de Saúde Única, o controle de endósporos na área de produção de alimentos representa um grande desafio, pois são estruturas muito difíceis de eliminar e representam riscos associados à deterioração de alimentos e a doenças de origem alimentar, como o botulismo. (24) O botulismo é uma doença bacteriana rara, causada pelo Clostridium botulinum, podendo ser associada à ingesta de alimentos contaminados, principalmente os enlatados e os que não têm preservação adequada. (24,32) Nas etapas de controle de qualidade na produção de alimentos, as técnicas de coloração são fundamentais, pois permitem a rápida detecção e quantificação de esporos. (33) Outra aplicabilidade envolve a pesquisa de endospóros bacterianos em amostras ambientais, principalmente nos estudos de monitoramento e eficiência de Estação de Tratamento de Água (ETA), análise de água bruta da entrada e no efluente das unidades de filtração saída da Estação de Tratamento de Esgotos (ETE), preconizados pela Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021. (34)

Ainda no âmbito de técnicas de coloração bacteriana, cabe ressaltar metodologias mais simples, que embora pouco utilizadas em rotinas laboratoriais têm grande valor nas atividades de pesquisa que envolvem o estudo de alguma estrutura celular bacteriana específica, como a coloração de cápsula (coloração negativa ou tinta da China, coloração da tinta da China com fucsina diluída, coloração de Hiss) e coloração de flagelos. (5,7)

COLORAÇÃO NEGATIVA

A coloração negativa, recebe esse nome, quando o meio se cora e o corpo bacteriano não. Ela pode ser realizada com apenas um corante (coloração simples)⁽⁵⁾ como é o caso da tinta da China para observação de cápsulas, ou combinada com outros corantes como no método de Gins.⁽³⁵⁾

Essa metodologia é muito usada para visualizar as cápsulas, que são estruturas presentes em alguns microrganismos que, entre muitas funções, protegem a célula contra a fagocitose por leucócitos polimorfonucleares e contribuem para a aderência das bactérias às células e às superfícies. Esta aderência é necessária em muitos organismos para o estabelecimento de infecções em hospedeiros apropriados ou para a manutenção da célula bacteriana em uma determinada superfície no ambiente. (35) O material capsular é geralmente de natureza polissacarídica e fosfatos, que agem com propriedade antigênica, normalmente detectada em testes sorológicos. Entre as bactérias patogênicas produtoras de cápsula, podemos citar Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae, Haemophilus influenzae e Neisseria meningitidis, conhecidas pelo seu potencial de patogenicidade e implicação em diversas infecções clínicas de relevância para a saúde humana. (36)

A técnica de coloração de cápsula é uma ferramenta que auxilia na identificação de microrganismos encapsulados, e muitas das vezes contribui presuntivamente para o diagnóstico. A metodologia se baseia no tratamento da célula com corantes específicos que não penetram na cápsula, podendo variar de acordo com a técnica, que geralmente vai contrastar a estrutura capsular em relação à célula bacteriana. (7,37)

Essa abordagem já era apontada no artigo de Lima e Teles, (38) que descreveram a composição, funcionalidade da cápsula, importância para classificação e correlação com formas capsulares dos diferentes microrganismos, fazendo menção histórica e comparativa de diferentes técnicas de coloração de cápsula e suas adaptações ao longo do tempo. Neste, os autores discorrem pelas técnicas idealizadas por Rosenow (39) (1911) e de Muir (40) (1915), baseadas no emprego

de violeta genciana e eosina e Smith, (38) que defendiam o uso desses corantes seguido de azul de metileno. Com embasamento teórico e técnico, Lima e Teles (1942) enfatizaram a dificuldade, na época, da realização de determinadas técnicas, associando a baixa sensibilidade de diagnóstico. Esses autores citam, também, as técnicas descritas por Hiss⁽⁴¹⁾ (1901) e Anthony (42) (1931), quando estudaram as formas de avaliar cápsulas produzidas por klebsiella pneumoniae. Hiss⁽⁴¹⁾ (1901) idealizou dois processos distintos: o primeiro propondo o uso de violeta genciana diluída ao dobro de seu volume com água destilada, seguida da lavagem com solução aquosa a 0,25% de carbonato de potássio; e o segundo, sugerindo corar a quente com solução aquosa de violeta genciana ou fucsina, e posterior lavagem com solução de sulfato de cobre. Já na técnica de Anthony⁽⁴²⁾ (1931), o autor dispensa a fixação pelo calor, aplicando a frio uma solução a 1% de cristal de violeta como corante inicial por 2 minutos, e posteriormente o uso do sulfato de cobre agindo como descorante, similar ao processo de Hiss. Os estudos comparativos realizados por Lima e Teles (38) (1942) concluíram que a técnica de Anthony demonstrava melhores resultados, sendo possível observar cápsulas maiores e mais visíveis.

Atualmente estas técnicas antigas não são mais usadas e a literatura descreve, entre os principais métodos de detecção de cápsula, a coloração negativa, também conhecida por metodologia da tinta da China. Esta técnica simples permite a visualização de bactérias capsuladas sem a necessidade de corá-las diretamente. (5,7,16) Em microscopia de campo claro, a coloração negativa é normalmente realizada usando-se um fluido pigmentado preto (corante ácido), como a nigrosina ou tinta da China, que não tem a capacidade de penetrar na célula, colorindo o fundo e deixando as células incolores. Neste método, é necessário cultivar os microrganismos em meio rico em nutrientes, como por exemplo BHI (Broth Heart Infusion) para estimular a produção de cápsula. A metodologia consiste em depositar 1 ou 2 gotas desta cultura em uma lâmina, seguida de uma gota de tinta da China (negrosina, ou naguim) ao lado da cultura. Posteriormente, a lâmina é coberta por uma lamínula, comprimindo-a entre folhas de papel de filtro com a finalidade de retirar o excesso e obter uma quantidade tênue de corante e material. Em seguida, observar diretamente ao microscópio nas objetivas de 4X, 10X, 40X e 100X, respectivamente. (37) Cabe ressaltar que, por se tratar de células vivas, é importante obedecer aos critérios de biossegurança quanto ao uso de EPI para a manipulação da cultura e descarte das pipetas/ponteiras utilizadas e papel de filtro em recipiente destinado à autoclavação. (5,7,16)

Outro método descrito em literatura é uma variação do método da tinta da China, com a utilização de um corante adicional, que é a fucsina diluída. Neste método, as sequências preliminares são mantidas, no entanto é feito um esfregaço a partir da mistura da cultura com a tinta da China, que após secagem é submetido à coloração com fucsina diluída durante 2 minutos. Posteriormente a esse tempo, a lâmina é suavemente lavada com água, seca e observada em microscópio óptico em objetiva de imersão. (5.7,16)

COLORAÇÃO DE FLAGELOS

Os flagelos são estruturas de locomoção, formadas por apêndices muito finos, de composição proteica (flagelina), presentes em bactérias móveis. O flagelo é composto por milhares de monômeros polimerizados desta proteína, dispostos de forma a compor um único flagelo.^(5,16)

Algumas dificuldades podem ser encontradas quando se deseja demonstrar este tipo de organela através de microscopia óptica, visto que a produção bacteriana de flagelos não é contínua e depende de diferentes fatores, como por exemplo o meio de cultivo, a temperatura e o estágio do crescimento. (5,16) Os flagelos são estruturas frágeis e delicadas, que podem ser facilmente desprendidas do corpo celular quando submetidas a processos bruscos de pipetagem e homogeneização. Outro fator preponderante para o desprendimento é a característica de despolimerizar com facilidade, se dissociando em monômeros de flagelina em temperaturas acima de 60°C e pH ácido (± pH 4,0) e em presença de solventes orgânicos de álcalis e ureia. Levando em consideração tais características, para a visualização de flagelos é necessária uma coloração especial, que visa aumentar o diâmetro do flagelo. O princípio da técnica de coloração de flagelo se baseia no uso de ácido tânico, que se liga ao flagelo, aumentando o seu diâmetro e facilitando, assim, a observação. Apesar disso, ainda aparecem muito tênues na lâmina, dificultando fotografias com boa nitidez em microscopia luminosa. (5,16)

A técnica é realizada partindo de uma cultura em meio rico (normalmente BHI, conforme descrito anteriormente na coloração de cápsula) ou em ágar soja tripticase (com ou sem sangue). Uma alíquota desta cultura é transferida delicada e cuidadosamente, com auxílio de uma alça de platina, para um tubo contendo aproximadamente 3mL de água destilada e invertido 1x sem movimentos bruscos, com a finalidade de homogeneizar a suspensão. Com o auxílio de uma pipeta,

retirar uma alíquota por capilaridade, deixando escoar naturalmente sobre a superfície de uma lâmina inclinada a 45°, deixando secar em ambiente. Após esse processo, a lâmina deve ser coberta com uma mistura de corantes contendo fucsina e ácido tânico, deixando agir por 5 minutos, até que se forme um brilho metálico esverdeado cobrindo metade da área. Posteriormente, retirar o corante com água antes que ele seque sobre a lâmina, secar naturalmente e observar em microscópio óptico em objetiva de imersão (100X). (5,16)

IMPORTÂNCIA NO APRENDIZADO DESTAS METODOLOGIAS

Como já comentado, apesar da bacteriologia ter avançado muito nas últimas décadas, com o surgimento de métodos moleculares e da automação, conferindo maior rapidez nos diagnósticos clínicos e mesmo nas pesquisas de saúde única, o primeiro passo da análise bacteriológica no tocante à microscopia do material clínico permanece como uma etapa de extrema importância.

Como docentes da pós-graduação e orientadores experientes, os autores têm notado a dificuldade dos alunos de entenderem a importância da microscopia, os princípios das colorações bacterianas e a sua relação com a identificação dos agentes, seja ela definitiva ou presuntivamente.

Desta forma, concebemos este artigo como uma possibilidade de reforçar esse assunto, trazendo uma abordagem histórica, estado da arte, sua aplicação e a importância de conhecer os métodos mais utilizados na pesquisa e na rotina laboratorial, mesmo na atualidade, pois acreditamos que esses conhecimentos agregarão valores práticos para os alunos da área da Saúde, especialmente para os que lidam diretamente com a identificação bacteriana nas suas mais diversas abordagens.

PRINCIPAIS LIMITAÇÕES E CONTROLE DE QUALIDADE NAS TÉCNICAS DE COLORAÇÃO

O controle de qualidade é um conjunto de medidas, procedimentos e ferramentas aplicados durante a execução de um processo, com a finalidade de garantir que tenha sido bem executado. Desta forma, algumas recomendações devem servir de requisitos obrigatórios em atividades de rotina diária:

 1 – Durante a execução de qualquer técnica de coloração devem ser usar das cepas controle, como por exemplo as ATCC (American Type Culture Collection), tanto para

- realizar o controle de qualidade dos corantes como para se certificar de que sua metodologia foi bem realizada. O uso de cepas citomorfologicamente conhecidas será importante para o reconhecimento comparativo entre amostras, permitindo verificar a similaridade e/ou distincão das colorações e morfologias avaliadas.
- 2 Os corantes devem ser preparados seguindo os protocolos recomendados e mantidos em frasco âmbar, para não sofrerem a ação da luz, o que produz alterações variadas. Devem ser bem vedados para evitar a evaporação. É recomendado que sejam sistematicamente filtrados para retirada de cristais que normalmente precipitam no fundo do frasco. No momento da execução da técnica de coloração, não é recomendado homogeneizar o corante, para não ressuspender os possíveis cristais pré-formados.
- 3 As lâminas devem ser novas, previamente lavadas e desengorduradas antes de serem utilizadas.
- 4 É recomendado realizar a manutenção preventiva e limpeza dos microscópios, assim como das objetivas ao término de cada atividade.
- 5 A etapa da descoloração é crítica, pois a exposição prolongada ao solvente pode provocar a remoção total dos corantes utilizados, produzindo resultados questionáveis. A retenção ou não do corante primário depende, portanto, das propriedades físicas e químicas das paredes celulares bacterianas, como espessura, densidade, porosidade e integridade.

CONCLUSÃO

Apesar de todas as metodologias atuais de detecção e identificação bacteriana, as técnicas básicas de coloração em microbiologia ainda desempenham papel fundamental no diagnóstico, diferenciação e estudo de microrganismos, e o conhecimento e a aplicação adequada dessas técnicas são essenciais para profissionais de microbiologia em diferentes contextos clínicos e laboratoriais. Cada técnica apresenta princípios específicos que permitem a visualização de estruturas bacterianas distintas, e têm contribuído para avanços significativos na medicina e na pesquisa biomédica. Mesmo diante da inegável importância dessas técnicas, os autores apontam para a importância de estudos mais atuais com o objetivo de criar metodologias, visando não só a diminuição de uso de corantes com base no custo de reagentes, mas vislumbrando a redução do uso de substâncias tóxicas, o que contribuirá também para processos mais sustentáveis e preservação ambiental.

REFERÊNCIAS

- Freitas V, Picoli S. A Coloração de Gram e as Variações na sua Execução. Newslab. Novo Hamburgo. 2007; v.82 p124-128.
- Gram HCJ, Friedlaender C. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten: in Schnitt-und Trockenpräparaten. Berlin: Theodor Fischer's medicinischer Buchhandlung; 1884. (Fortschritte der Medicin; Bd. 2, 1884).
- 3. Ziehl F. Zur Färbung des Tuberkelbacillus. Dtsch Med Wochenschr. 1882; 8:451-451.
- Kanaan S. Laboratório com interpretações clínicas. 2ª ed. Editora Atheneu; 2021.
- Nogueira JMR, Souza LF. Bacteriologia. In: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. EPSJV - Fiocruz; 2009. p 221-397.
- Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Prescott's Microbiology. 8th. Ed McGraw-Hill; 2014.
- LeVeque RM, Martin N, Alst AJV, DiRita VJ. Microbiology. Microscopy and Staining: Gram, Capsule, and Endospore Staining. Em Cambridge, MA: JoVE Journal; Michigan State University; 2023.
- 8. McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 24 RD. Ed St. Louis, MO E-Book. Elsevier Health Sciences; 2021.ISBN: 9780323673204.
- Trento A. Colorações usadas em microbiologia [Internet]. [São José do Rio Preto – São Paulo]: Academia da Ciência e Tecnologia; 2018. Disponível em: http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/ IMAGENS/Artigos_cientificos/3-Coloracao_microbiologia.pdf. Acesso em: 23 de agosto de 2024.
- Teixeira AB, Cavalcante JCDV, Moreno ÍC, Soares IDA, Holanda FODA. Bacterial meningitis: an update. Rev Bras Análises Clínicas; 2018. 50 (4): 327-329. Disponível em: https://www.rbac.org.br/artigos/meningite-bacteriana-uma-atualizacao/. Acesso em: 02 de setembro de 2024.
- BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Ministério da saúde; 2022. 152p.
- 12. BRASIL. Manual de Recomendações para o Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose e Micobactérias não Tuberculosas de Interesse em Saúde Pública no Brasil. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis Ministério da Saúde; 2022. 492 p.
- BRASIL. Hanseníase. Agência Fiocruz de Notícias. Lab de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz. Fiocruz. Ministério da Saúde; 2024. Disponível em: https://portal.fiocruz.br/doença/hanseniase. Acesso em: 20 de agosto de 2024.
- Morales PS. O M. tuberculosis, a coloração de Ziehl-Neelsen e a interpretação do BAAR [Internet]. Portal Afya. Disponível em: https:// portal.afya.com.br/saude/o-mycobacterium-tuberculosis-e-a-classicacoloracao-de-ziehl-neelsen. Acesso em: 02 de setembro de 2024.
- Rother ET. Revisão Sistemática x Revisão Narrativa. Editorial, Acta paul. enferm. 2007. 20 (2). Disponível em: https://www.scielo.br/j/ape/a/ z7zZ4Z4GwYV6FR7S9FHTByr/ Acesso em: 02 de setembro de 2024.
- Moreira JLB, Carvalho CBM, Frota CC. Visualização bacteriana e colorações.
 Ed. Imprensa Universitária Universidade Federal do Ceará, CE; 2023. 68p
- 17. BRASIL. Técnica de Coloração de Gram. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 1997. 63p.
- 18. Lellis B, Fávaro-Polonio CZ, Pamphile JA, Polonio JC. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. Biotechnol Res Innov. 2019;3(2):275-90.
- Reine FU, Souza LABD, Menezes JLD, Gomes RFCC, Souza ACRD, Mota CA, et al. Método alternativo e sustentável para a realização de coloração bacteriana de Gram e Wirtz-Conklin: Relevância ambiental e econômica no ensino prático da microbiologia. Res Soc Dev. 22 de julho de 2021;10(9):e9510917585.

- Pinto AC, Ribeiro KTS. Guia prático de orientações básicas de microbiologia [Internet]. 10 ed. Editora Itacaiúnas; 2022. Disponível em: https://editoraitacaiunas.com.br/produto/guia-pratico-de-orientacoesbasicas-de-microbiologia/. Acesso em: 20 de setembro de 2024.
- Bush LM. Nocardiosis. MSD Manual, Charles E Schmidt Coll Med Florida Atlantic University. 2023; Disponível em: https://www.msdmanuals. com/home/infections/bacterial-infections-gram-positive-bacteria/ nocardiosis. Acesso em: 23 de setembro de 2024.
- BRASIL. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília, DF: Secretaria da Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Ministério da Saúde; 2019. 364p.
- 23. Silva-Pereira TT, Soler-Camargo NC, Guimarães AMS. Diversification of gene content in the *Mycobacterium tuberculosis* complex is determined by phylogenetic and ecological signatures. Jun SR, organizador. Microbiol Spectr. 2024;12(2):e02289-23.
- 24. BRASIL. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília, DF: Secretaria da Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Ações Estratégicas e Epidemiologia e Vigilância em Saúde e Ambiente. Ministério da Saúde; 2024. 6ed. rev.v.3.
- 25. Fontana A, Tribondeau P. Silver staining of spirochetes. Journal of Infectious Diseases. 1907.
- 26. Morris SR. Sífilis.Manual MSD versão para profissionais de Saúde;2023. Disponível em: https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/doenças-infecciosas/infecções-sexualmente-transmissíveis/sífilis. Acesso em: 23 de setembro de 2024.
- 27. INML. Métodos de Coloração em Microbiologia [Internet]. Instituto Nacional de Medicina Laboratorial. 2023 [citado 16 de agosto de 2024]. Disponível em: https://inml.com.br/metodos-de-coloracao-emmicrobiologia/. Acesso em: 23 de setembro de 2024.
- 28. Albert L, Laybourn A. A New staining method for the demonstration of volutin granules. Journal of Pathology and Bacteriology; 1934.
- Schaeffer AB, Fulton MD. A simplified method of staining endospores.
 Science. 17 de fevereiro de 1933;77(1990):194. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17741261/. Acesso em: 05 de setembro de 2024.
- 30. Wirtz R, Conklin R. A new method for ataining bacterial spores. Stain Technology; 1937.
- Hayama M, Oana K, Kozakai T, Umeda S, Fujimoto J, Ota H, et al. Proposal
 of a simplified technique for staining bacterial spores without applying
 heat Successful modification of Moeller's Method. Eur J Med Res. 2007.
- 32. Martin BXB, Carraro DC, Souza DCR, Duarte EMPD, Ribeiro, SM, Gomes AB. Tipos de Botulismo: Uma revisão bibliográfica. Brazilian Journal Surgery and Clinical Research; 2019. Vol 26, N2, p 43-48.

- 33. Silva ND, Junqueira VCA, Silveira NFDA. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água [Internet]. 60 ed. Blucher; 2021. Disponível em: https://www.blucher.com.br/livro/detalhes/manual-de-metodos-de-analise-microbiologica-de-alimentos-e-agua-1847. Acesso em: 20 de setembro de 2024.
- 34. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS no 888, de 04 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS no 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Of União. 2021;(85):127-127.
- 35. UFGRS. Manual virtual de aulas práticas do DEMIP/ICBS/UFRGS [Internet]. Departamentos de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (Instituto de Ciências Básicas da Saúde) e Interdisciplinar (Campus Litoral Norte) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2024. Disponível em: https://www.ufrgs.br/aulaspraticasdemip/?page_id=845. Acesso em: 20 de agosto de 2024.
- 36. Cunha AMG. Análises clínicas. 2ª ed. Vol. (Coleção Manuais de Farmácia, v.5). Salvador: Editora Sanar SA; 2021. 416 p.
- 37. Barbosa FHF, Barbosa LPJL. Alternativas metodológicas em Microbiologia viabilizando atividades práticas. Revista de Biologia e Ciências de terra. Campina Grande. 2010; v10, n2, p 134-143.
- 38. Lima JPDEC, Teles LQ. Demonstração de cápsulas bacterianas. Instituto Adolpho Lutz. 1942; 21p. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/40/rial-22_1942/b36.pdf. Acesso em: 17 de setembro de 2024.
- 39. Rosenow EC. A New Stain for Bacterial Capsules with Special Reference to Pneumococci. J Infect Dis. 10 de julho de 1911;9(1):1-8. Disponível em: https://academic.oup.com/jid/article-abstract/9/1/1/821027. Acesso em: 10 de setembro de 2024.
- 40. Muir R. Staining of bacterial capsules in films and sections. J Pathol Bacteriol. 10 de janeiro de 1915;20(2):257-9. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.1700200203. Acesso em: 20 de setembro de 2024.
- 41. Hiss PH. A Contribution to the physiological differentiation of *Pneumococcus* and *Streptococcus*, and to methods of staining capsules. J Exp Med. 10 de fevereiro de 1905;6(4-6):317-45. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19866975/. Acesso em: 20 de setembro de 2024
- 42. Anthony EE. A Note on Capsule Staining. Science. 1931;73(1890):319-20. Disponível em: https://www.science.org/doi/10.1126/science.73.1890.319. Acesso em: 20 de setembro de 2024.

Main classical staining methods in bacteriology: applications, techniques, principles, and limitations

Principais métodos clássicos de coloração em bacteriologia: aplicações, técnicas, fundamentos e limitações

Renata Garcia Costa¹, Wagner Thadeu Cardoso Esteves², Joseli Maria da Rocha Noqueira¹

Abstract

Staining techniques are a critical tool used in microbiology laboratories, serving as a primary method for the visualization and differentiation of microorganisms. The present article provides a narrative review, focusing on original and recent studies that identify the main staining methods used in bacteriology. It highlights their applicability in clinical analysis laboratories and/or in identifying microorganisms significant to One Health. This review emphasizes not only the concepts associated with these methods and their foundational principles but also their limitations. This approach encompasses the principles of Gram staining, Ziehl-Neelsen staining, Albert-Laybourn staining, Fontana-Tribondeau impregnation, negative staining, spore staining (including Schaeffer-Fulton, Wirtz-Conklin, Moeller, and Dorner methods), and flagella staining. According to our review, the first two are currently the most widely used techniques in laboratory routines.

Keywords: Gram-Negative Bacteria, Gram-Positive Bacteria, Silver Staining, Bacteria, Dyes, Microscopy.

Resumo

As técnicas de coloração consistem em uma importante ferramenta utilizada em laboratórios de microbiologia, sendo um recurso primário empregado na visualização e diferenciação de microrganismos. O presente artigo faz uma revisão narrativa, buscando artigos originais e atuais indicando os principais métodos de coloração utilizados em bacteriologia, apontando sua aplicabilidade em laboratórios de análises clínicas e/ou identificação de microrganismos de importância para Saúde Única, destacando não só os conceitos associados a esse tema e fundamentos dos métodos, mas também suas limitações. Tal abordagem incluiu os princípios dos métodos de coloração de Gram, Ziehl-Neelsen, Albert-Laybourn, impregnação de Fontana-Tribondeau, coloração negativa, coloração de esporos (Schaeffer-Fulton e Wirtz-Conklin, Moeller e Dorner) e coloração de flagelos. Sendo, de acordo com nossa revisão, as duas primeiras consideradas as técnicas mais empregadas atualmente em rotinas laboratoriais.

Palavras-chave: Bactérias Gram-Negativas. Bactérias Gram-Positivas. Coloração pela Prata. Bactérias. Corantes. Microscopia.

Correspondence Joseli Maria da Rocha Nogueira E-mail: joseli.maria@fiocruz.br

Received on Sep 25, 2024 | Approved on Oct 09, 2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400198.en

¹ Fundação Oswaldo Cruz, LabMicro – Departamento de Ciências Biológicas – Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

² Fundação Oswaldo Cruz, Setor de Campylobacter – Laboratório de Zoonoses - IOC – Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

INTRODUCTION

In microbiology, staining methods can be employed to aid in the identification of microorganisms, often enabling a presumptive and early diagnosis in their classification. These methods are based on cytomorphotintorial characteristics—that is, cellular composition, morphology, and affinity for stains—where structures can be visualized and differentiated with the aid of a microscope.⁽¹⁾

Bacteria, in particular, are naturally transparent and possess a refractive index similar to their surrounding medium, rendering them translucent when observed under a light microscope. Therefore, the use of stains is necessary to enhance the contrast between bacterial cells and the background, facilitating visualization. (2,3)

Some methods support the differentiation of microorganisms and bacterial structures based on structural and chemical characteristics, often proving essential for guiding clinical diagnosis as well as research activities associated with One Health and other fields. These standardized techniques not only facilitate rapid and accurate identification of pathogens in clinical samples but are also essential for studies exploring microbial morphology, distribution, and interactions.⁽⁴⁾

The staining processes used in bacteriology can be classified as simple and differential stains. (5)

The first category encompasses methodologies that employ a single stain as a contrast agent, such as methylene blue, crystal violet, and carbol-fuchsin, with the purpose of enhancing the visibility of cellular forms and arrangements. The use of a single stain can reveal internal structural differences depending on the bacterium, as exemplified by methylene blue, which can highlight volutin granules produced by *Corynebacterium diphtheriae*, allowing visualization of redstained metachromatic granules against the blue-stained bacillary body. Additionally, simple stains may also include specialized stains designed to highlight specific bacterial cell structures, such as spores, flagella, or capsules—aspects that will be addressed in greater detail throughout this article. (5,7)

Conversely, differential stains are more specialized techniques that employ multiple stains, mordants, and decolorizers to distinguish cellular structures based on their chemical properties, such as the Gram staining and Ziehl-Neelsen staining techniques, which are considered essential tools in the laboratory diagnosis of clinically significant microorganisms,⁽⁷⁻⁹⁾ and are also applicable in One Health research.

Although numerous phenotypic and genotypic tests for microorganism identification are currently available, advancements in diagnostics do not replace classic methods, as these remain valuable, cost-effective tools that provide essential and foundational information for bacterial identification, and can, in certain cases, quickly substitute more complex examinations for diagnosis, as in cases of diphtheria, meningitis, tuberculosis, leprosy, and some sexually transmitted infections.⁽¹⁰⁻¹⁴⁾

OBJECTIVE

Given the importance of this subject, this article aims to conduct a narrative review illustrating the "state of the art" associated with the main staining techniques used in bacteriology, highlighting their practical applications and contributions to microorganism detection in various scientific and clinical contexts, as these subjects are considered foundational for understanding bacteriology practice and can provide pertinent information, particularly for students in the health field, serving as a comprehensive resource for academic study.

METHODOLOGY

According to Rother, (15) narrative review articles are broad publications suited for outlining and addressing the development or "state of the art" of a particular topic from a theoretical or contextual perspective. They do not require the disclosure of methodology for reference searches or criteria used in the evaluation and selection of works. They consist primarily of literature analysis published in books, printed and/or electronic journal articles, through the authors' personal interpretation and critical analysis. Nevertheless, we chose to specify our selection criteria, which was based on research conducted in microbiology books available at the Department of Biological Sciences – ENSP/FIOCRUZ, the Manguinhos/FIOCRUZ Library Collection, and scientific articles accessed on the World Wide Web, using the specified descriptors.

STAINING METHODS USED IN BACTERIOLOGY

Gram Staining Technique

Gram staining is the most widely used differential technique in routine clinical bacteriology. Its purpose is to classify microorganisms according to their staining properties,

size, shape, and cellular arrangement.⁽¹⁾ The Gram staining technique was developed by Danish physician Hans Christian Joachim Gram⁽²⁾ in 1884. The method involves subjecting a heat-fixed bacterial smear to a successive series of stains, allowing the differentiation of microorganisms based on the chemical composition and integrity of their cell walls⁽²⁾ into two major groups: Gram-positive and Gram-negative. The main component of the cell wall is peptidoglycan, also known as glycopeptide or murein, a biopolymer composed of alternating chains of N-acetylglucosamine (GlcNAc) and N-acetylmuramic acid (MurNAc), which confer rigidity to the bacterial cell.⁽⁷⁾

The Gram-positive cell has a cell wall primarily composed of peptidoglycan and teichoic acid, whereas the Gramnegative cell is somewhat more complex, featuring a thin layer of peptidoglycan and an outer portion composed of lipopolysaccharides and lipoproteins (Figure 1 and Figure 2).

In the classic Gram staining method, a thin, homogeneous, and dry smear from a bacterial culture or clinical material is treated with a primary stain (crystal violet with phenol) for 1 minute, which penetrates the cell wall and protoplasm. Following this, Lugol's solution (an iodine-iodide solution) is applied for 1 minute as a mordant, forming an insoluble stain-iodine complex in water, referred to as iodine-pararosaniline.

Up to this stage, both Gram-positive and Gram-negative bacteria absorb the primary stain and fixative identically, initially acquiring a violet color. Subsequently, an organic solvent (alcohol-acetone) is applied for 30 seconds as a decolorizer. After this step, the slide is rinsed with water (a mandatory step) to remove any residual stain, and then it is covered with a 1/10 diluted Ziehl fuchsin (secondary stain) for 30 seconds, acting as a counterstain. (2) After the entire process, the slide should be dried and examined under a light microscope with a 100X oil immersion objective. (7)

It is important to note that the decolorizing solution acts differently depending on the structural characteristics and varying degrees of permeability of the cell wall. In Grampositive bacteria, this solvent promotes the contraction of the peptidoglycan pores, retaining the primary stain and maintaining a purple color (Figure 3a). However, in Gram-negative bacteria, the solvent dissolves the lipid portion (lipopolysaccharides and lipoproteins) of the outer membrane, removing the crystal violet-iodine complex and adopting the color of the secondary stain (fuchsin or safranin), thus revealing a red color (Figure 3b). (9,7) The overall difference in observed tones arises from differences in the physical and chemical properties of bacterial cell walls, such as composition, thickness, density, porosity, and integrity. (7,16,17)

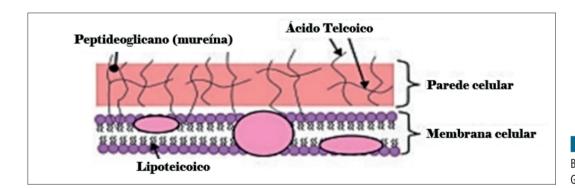


Figure 1

Basic structure of the Gram-positive cell wall⁽⁵⁾

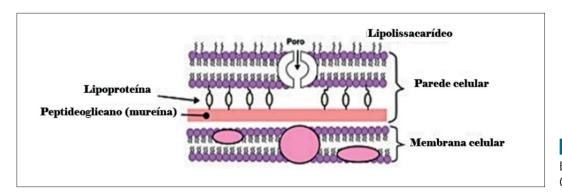
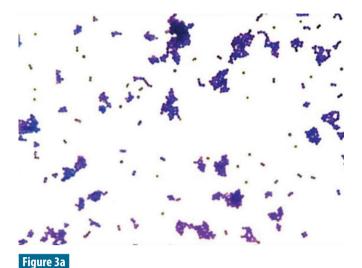
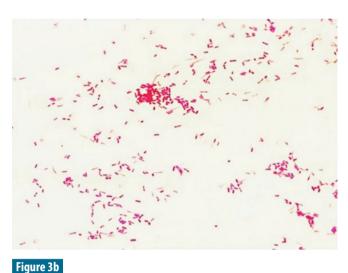


Figure 2
Basic structure of the
Gram-negative cell wall⁽⁵⁾



Staining characteristic of Gram-positive (DCB, FIOCRUZ, 2024)



Staining characteristic of Gram-negative (DCB, FIOCRUZ, 2024)

In the literature, some studies suggest alternative methods, indicating modifications and adaptations to the technique. Some variations involve changes in stain concentrations, reagent substitutions, and adjustments in stain exposure times. This was initially based on the work of Lellis and colleagues (2019),⁽¹⁸⁾ who highlighted the potential toxicity, carcinogenicity, and environmental impact of stains and the risks to human health due to improper disposal after laboratory use.⁽¹⁹⁾

In laboratory practice, Reine and colleagues⁽¹⁹⁾ supported replacing the classic Gram and Wirtz-Conklin methods (on slide surfaces) with immersion staining, demonstrating its applicability for staining many slides simultaneously without compromising result reliability, avoiding solution saturation after multiple slide passes, reducing stain waste, and consequently lowering costs for technique application.

Currently, replacing crystal violet with methyl violet is recommended, based on its chemical composition that acts as a fixative, eliminating the need for flame fixing the smear—a practice now obsolete and contraindicated. Another adjustment is the substitution of the alcohol-acetone solution used by Hurk with 99.5° ethyl alcohol, considered safer and less toxic for the handler, preventing over-decolorization of the slide and making the technique more reproducible. However, the most significant modification was the replacement of phenol-fuchsin as the secondary stain with safranin. This change was based on studies regarding color spectrum, showing that safranin provides greater distinction and clarity between Gram-negative and Gram-positive bacteria, as it contrasts more distinctly with the primary stain compared to fuchsin, resulting in Gram-negative bacteria appearing light red and Gram-positive bacteria violet. (7,20)

GRAM STAINING TECHNIQUE

| | CLASSIC METHOD | MODIFIED METHOD |
|--------------------------|---|--|
| SMEAR PREPARATION | Prepare a thin and homogeneous smear on a previously cleaned and degreased slide; allow it to air dry, and then fix it by passing it three times over the flame of a Bunsen burner. | Prepare a thin and homogeneous smear on a previously cleaned and degreased slide, and allow it to air dry. In the modified method, fixation does not occur through heat but rather through the use of methyl violet, which acts as a chemical fixative. |
| SLIDE STAINING PROCEDURE | Cover the slide with crystal violet and let it sit for 1 minute. Drain the stain and rinse with a gentle stream of running water (this step is optional but enhances visualization). Cover the slide with Lugol's solution and allow it to act for approximately 1 minute. Remove excess stain and rinse with a gentle stream of running water (this step is also optional). Apply alcohol-acetone for decolorization, allowing it to act for approximately 30 seconds. Rinse with a gentle stream of water (mandatory step). Cover the slide with diluted Ziehl-Neelsen fuchsin stain (1/10 dilution) and let it act for approximately 30 seconds. | Cover the smear with methyl violet and let it sit for approximately 15 seconds. Add an equal amount of water over the slide covered with methyl violet and allow it to act for an additional 45 seconds. Drain the stain and rinse with a gentle stream of running water. Cover the slide with diluted Lugol's solution (1/20) and let it act for approximately 1 minute. Drain the Lugol's solution and rinse with a gentle stream of running water. Apply ethyl alcohol (99.5% GL) over the slide for decolorization, continuing until no more stain is released. Rinse with a gentle stream of running water. |
| | Rinse with a gentle stream of water (mandatory step). | Cover the slide with safranin and let it act for approximately 30 seconds. Rinse with a gentle stream of running water. |
| SLIDE OBSERVATION | Allow the slide to air dry naturally. Then, place it under the microscope and, using immersion oil, observe with the immersion objective (100X). | |

Source: Nogueira and Souza $^{(5)}$; Brasil $^{(7)}$

MAIN MODIFICATIONS IN THE GRAM METHOD (7,20)

| CLASSIC METHOD | MODIFIED METHOD | JUSTIFICATION |
|-----------------|-----------------------|---|
| Crystal violet | Methyl violet | Methyl violet has fixative properties, eliminating the need for heat fixation with a Bunsen burner, which can cause abrupt dehydration of cellular components |
| Lugol | Step removed | |
| Alcohol-acetone | 99.5°GL ethyl alcohol | The 99.5°GL ethyl alcohol solution has lower toxicity potential and reduces hyper-decolorization effects on the slide |
| Phenol fuchsin | Safranin | In the color spectrum, safranin is further from the primary stain compared to fuchsin, allowing for greater differentiation and clarity between Gram-positive and Gram-negative bacteria. |

Source: Brasil⁽⁷⁾; Pinto and Ribeiro⁽²⁰⁾

It is important to note that certain bacterial groups do not stain using the Gram method, as they possess specific characteristics that require specialized techniques. For example, spirilla have an exceedingly thin cell body, making visualization difficult with classic methods; and the genus *Mycobacterium*,

due to its unique cell wall composition, $^{(3)}$ requires a specialized staining approach. Additionally, bacteria that lack a cell wall, such as mycoplasmas, should also be considered. These bacteria measure only about 0.2 μ m and can be observed only through electron microscopy or fluorescence microscopy.

ZIEHL-NEELSEN STAINING TECHNIQUE

The Ziehl-Neelsen technique is an essential methodology and remains one of the most commonly used methods in contemporary clinical bacteriology. Developed by bacteriologist Franz Ziehl and later modified by German pathologist Friedrich Carl Adolf Neelsen in the late 19th century, this method emerged from efforts to visualize *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis, which could not be effectively stained by traditional methods due to its unique and distinctive cell wall.⁽³⁾

In addition to enabling the staining of the *Mycobacterium* genus, this technique serves as a differential method for identifying all acid-fast bacilli (AFB), including the genus *Nocardia*. The acid-fast characteristic of these bacteria is attributed to the high content of structural lipids in their cell wall, which promotes a hydrophobic condition that interferes with the permeability and action of aqueous stains, thereby conferring resistance to acid-alcohol reagents.^(12,21)

Among the primary bacterial groups detected in clinical laboratories using this technique are the *M. tuberculosis* complex and *Mycobacterium leprae*, recognized by the World Health Organization (WHO) as agents of significant public health concern for clinical medicine. (11-13,22)

The M. tuberculosis complex currently comprises 11 distinct species associated with both human and animal tuberculosis. Among them, M. tuberculosis stands out as the primary cause of tuberculosis in humans due to its high level of adaptation, making it the most significant species in the complex from a public health perspective. (23) Tuberculosis is a transmissible infectious disease that primarily affects the lungs (pulmonary form) but can also involve other organs and/or systems. (22) Thus, the Ziehl-Neelsen staining technique is employed to detect AFB in a variety of clinical specimens, including urine, cerebrospinal fluid, biopsy samples, and pulmonary specimens such as bronchial lavage, gastric lavage, and laryngeal swabs. However, sputum smear microscopy is recognized by the Ministry of Health as the most critical method for both diagnosing and monitoring the treatment of pulmonary tuberculosis in the country. (12,22)

Due to its distinctive cell wall, which slows nutrient absorption, M. tuberculosis may take over a month to form visible colonies on isolation media. (9) In such cases, the detection of AFB in clinical specimens may serve as the first evidence of disease, enabling early diagnosis and providing a basis for the initiation of therapeutic treatment, while awaiting laboratory confirmation of a positive culture. (22)

Conversely, *M. leprae* is the etiological agent of leprosy, a disease characterized by peripheral nerve impairment and the formation of lesions and spots on skin areas, with altered thermal (heat and cold), motor, and/or anatomical sensitivity.^(11,13,24)

The diagnosis of leprosy is primarily based on clinical and epidemiological criteria, as *M. leprae* is an unculturable microorganism *in vitro*. In this context, bacilloscopy remains among the essential primary tests for detecting bacteria in affected areas.⁽¹¹⁾

The Ziehl-Neelsen technique is an easy-to-perform, rapid, and cost-effective method that detects the presence of AFB.⁽¹²⁾ When properly executed, from sample collection and processing to bacilloscopy, it provides diagnostic efficacy in 80% of cases.⁽²²⁾

In laboratory routine, M. tuberculosis detection is usually performed with spontaneous sputum, using the purulent portion, which is placed and spread directly onto the slide (direct bacilloscopy). Purulent secretions and pus, due to their physical characteristics, can also be spread directly onto the slide. However, to increase bacilloscopy sensitivity, all clinical samples, whenever possible and necessary, may undergo treatment before smear preparation. This treatment can include crushing, digestion with chemical agents such as sodium hydroxide (NaOH) or NaCl, concentration, sedimentation, flotation, or filtration. (12) The Ministry of Health recommends specific methodologies for sputum decontamination and treatment prior to bacilloscopy, including the modified Petroff method, the N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) method, the swab-Ogawa-Kudoh method, and the oxalic acid method.(12)

Although *M. tuberculosis* is a highly hazardous microorganism transmitted through airborne transmission (Class III), the processing of clinical material for bacilloscopy follows Biosafety Level 2 (BSL-2) recommendations, with emphasis on careful handling of biological material during smear preparation. (12) According to the Laboratory Diagnosis Manual for Tuberculosis, (12) clinical material should be deposited in fluid form on the slide using sterile wooden sticks, Pasteur pipette, and/or platinum loop, as prescribed by preparation methods. Heating the slide during smear preparation is not recommended, not only due to the risk of aerosol formation in the laboratory environment but also to prevent granular precipitates that impair staining and bacillus detection. In this case, smear fixation should only be performed once the samples are completely dry. (12)

In the Ziehl-Neelsen staining technique, Ziehl's fuchsin solution (carbol-fuchsin) is used as the primary stain (which is 10 times more concentrated than the fuchsin used in the Gram method). At this stage, heat treatment is necessary to facilitate dye penetration and binding within the mycobacterial cell wall. Therefore, after covering the slide with Ziehl's fuchsin, it should be left to act for 5 to 10 minutes, warming it gently (avoiding boiling) until vapors form. Subsequently, the slide is briefly rinsed and decolorized with a 1% hydrochloric acid-alcohol solution. The slide is then counterstained with methylene blue for approximately 30 seconds, followed by rinsing, drying, and examination under oil immersion microscopy (100x).⁽¹²⁾

The distinctive characteristic of the mycobacterial cell wall lies in its peptidoglycan layer composition, consisting of N-glycolylmuramic acid and mycolic acids, which are long-chain fatty acids (lipids) that form a barrier and impede dye penetration. The lipids strongly bound to the mycolic acid structure promote hydrophobicity, preventing the penetration of aqueous dyes, mordants, and differentiating agents, a characteristic not present in other bacterial genera. The principle of the Ziehl-Neelsen technique is based on the fact that heating causes dilation, enabling carbol-fuchsin to penetrate the cell and remain trapped upon cooling, persisting even after decolorization with an acid-alcohol agent.⁽¹²⁾

During the staining process, Ziehl's phenicated fuchsin (carbol-fuchsin) stains all cellular elements red. However, following acid-alcohol decolorization, only acid-fast bacilli (AFB) retain this coloration and become distinguishable from other microorganisms lacking this property. The decolorized cellular components subsequently absorb the background stain, methylene blue (counterstain), as illustrated in Figure 4.^(5,12)



Figure 4

Mycobacterium tuberculosis stained by the Ziehl-Neelsen technique. (12)

According to the Ministry of Health, (12) the reading and interpretation of bacilloscopy results follow the criteria below:

Reading and interpretation of bacilloscopy results from sputum samples:(12)

| READING | RESULT |
|---|--------------------------------------|
| No AFB detected in 100 observed fields | NEGATIVE |
| 1 to 9 AFB in 100 observed fields | Report the quantity of bacilli found |
| 10 to 99 AFB in 100 observed fields | POSITIVE + |
| 1 to 10 AFB in 50 observed fields | POSITIVE ++ |
| More than 10 AFB per field, on average, in 20 observed fields | POSITIVE +++ |

Reading and interpreting the results of bacilloscopy of other clinical samples: (12)

| READING | RESULT |
|--|----------|
| No AFB detected in 100 observed fields | NEGATIVE |
| No AFB detected in 100 observed fields | POSITIVE |

FONTANA-TRIBONDEAU METHOD

This method was devised by Alfonso Fontana and Louis Tribondeau⁽²⁵⁾ in 1920. While it is considered a laboratory staining practice, this characterization is somewhat misleading. It is, in fact, a silver impregnation technique employed for visualizing extremely thin spiral bacteria that do not stain adequately with the conventional Gram staining method, such as treponemes and leptospires. In this technique, spirochetes are treated with ammoniacal silver, allowing them to stand out against a light background. As a result, they become visible in dark brown or black against a yellow-brown or light brown background.^(5,9,25)

The methodology entails depositing several drops of Ruge's solution (glacial acetic acid, 40% formalin, and distilled water) onto the dry smear and allowing it to act for 30 seconds (repeated three times). This step serves to fix the smear onto the slide. This is crucial because, for these specimens, heat fixation, as performed in other methodologies, is not advisable; heating may adversely affect the morphology of the spirochetes. (5,9,25)

Following this step, the smear is covered with the mordant solution (composed of tannic acid and phenol) and subjected to heating until vapors are emitted for 30 seconds. Following this step, the smear is covered with the mordant solution (composed of tannic acid and phenol) and subjected to heating until vapors are emitted for 30 seconds.

As illustrated in Figure 5, the silver is then reduced to metallic silver, depositing onto the spirochetes, which can be observed under a microscope with a brown coloration. (5,9)

One of the primary applications of this technique is its significance for the diagnosis of syphilis. From clinical material, it is possible to achieve direct visualization of *Treponema pallidum*, which cannot be cultured *in vitro*. (26)

ALBERT-LAYBOURN STAINING

This staining method was first proposed in 1920 by Henry Albert and later modified by Ross Laybourn⁽²⁸⁾ in 1924. This technique has been employed for detecting corynebacteria in the presumptive diagnosis of diphtheria and is based on the presence of cytoplasmic granules located at the poles of these bacteria, known as metachromatic granules or Babes-Ernst granules. These structures are composed of polyphosphates that accumulate within the cell when nutrients other than phosphate become scarce, particularly when sulfate is in limited supply. Under these conditions, nucleic acid synthesis is halted, and volutin accumulates in anticipation of its use for this synthesis. This polyphosphate-rich material stains intensely with strong Lugol's solution, giving the impression of being larger than the bacillary body itself and acquiring a brown hue, which can be observed in contrast to the bacillary body that stains blue-green with Laybourn's solution. (5)

The Albert-Laybourn staining method is considered the "gold standard" for screening *Corynebacterium diphtheriae*

from direct examinations of nasal and oropharyngeal smears. This microorganism, responsible for a transmissible infectious condition, can progress to the formation of typical pseudomembranous plaques that lodge in the tonsils, larynx, pharynx, nose, and even in the conjunctiva and skin. (9,21,24) Although it is preventable through immunization and currently treated with antitoxin therapy, rapid diagnosis is a critical factor for a favorable outcome when an infection occurs.

Diagnosis of the disease is based on the assessment of clinical symptoms, which, when combined with optical microscopy as a complementary test, may reveal the presence of metachromatic bacilli in the collected clinical material, presumptively indicating diphtheria. However, the WHO recommends that the collection of clinical material and the performance of bacterial culture be conducted simultaneously to isolate *Corynebacterium sp.* in specific media for confirmation of the diagnosis. (21,24)

The Albert-Laybourn method involves covering the smear with Albert-Laybourn solution (composed of toluidine blue, malachite green, glacial acetic acid, 95% ethanol, and distilled water) for 3 to 5 minutes. The solution is then drained without washing, and the smear is covered with strong Lugol's solution (comprising metallic iodine, potassium iodide, and distilled water), allowing it to act for approximately 2 minutes. After this process, the smear is washed, dried, and examined under a microscope using an immersion objective. ⁽⁵⁾The metachromatic granules will appear brown, as shown in Figure 6.

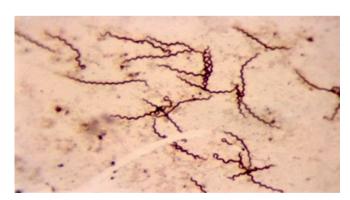


Figure 5

Treponema pallidum stained using the Fontana-Tribondeau method. (27)

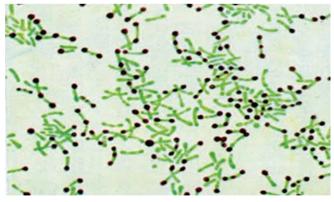


Figure 6

Metachromatic granules stained using the Albert-Laybourn method. (9)

SPORE STAINING

Certain bacterial groups, such as the *Bacillus* and *Clostridium* genera, are capable of forming resistant structures known as endospores. This phenomenon typically occurs when microorganisms encounter unfavorable conditions, such as nutrient scarcity, inadequate humidity, and improper temperature. Under these conditions, microorganisms enter a sporulation phase, producing within themselves a resistant spherical or ovoid structure, characterized by high calcium content associated with dipicolinic acid, which is linked to dehydration and enhanced resistance, including thermal resistance. Each cell forms a single spore, which is released into the external environment after cell death. These structures can remain in a dormant or resting state in the environment for years until they encounter an optimal condition to become viable again. (16)

One of the primary functions of endospores is their protection against physical and chemical agents used in sterilization/disinfection processes, as they can only be destroyed by autoclaving at 120°C for 30 minutes.^(5,7)

Despite the importance of their detection, visualizing spores under a light microscope can be challenging due to the refractile nature of these structures, which makes them resistant to various stains that cannot penetrate the endospore wall. In common staining procedures, the bacterial body is stained, while the endospore remains colorless.⁽⁷⁾

The Schaeffer-Fulton stain, developed by A.B. Schaeffer and M.D. Fulton⁽²⁹⁾ in 1933, is a notable spore staining technique for staining bacterial endospores associated with clinically significant human infections, such as tetanus and botulism, which are of great relevance to Public Health.⁽²⁴⁾ Another bacteriological staining method for spore detection is the Wirtz-Conklin stain,⁽³⁰⁾ described in 1837, which enables the visualization of these structures under a microscope. Currently, this methodology remains the standard for examining environmental and clinical samples, specifically for diagnosing diseases such as anthrax.⁽⁵⁾

To perform spore staining, a pure culture of the suspected strain is required. It is recommended to subject this culture to extreme temperatures for 24 hours to stimulate sporulation. For this purpose, the culture can be placed in an oven at 44°C or in a refrigerator (8°C) for 24 to 48 hours. It is important

to note that if these temperatures are maintained for an extended period, only exospores will be observed, as all endospores will have exited the bacillus. At the end of this stage, a few drops of sterile saline solution are added to the slide and mixed with the prepared culture.⁽⁷⁾

The principle of both techniques is to use malachite green as the primary stain and safranin as the counterstain. In the Wirtz-Conklin technique, a homogeneous, thin, and fixed smear is first prepared and then covered with malachite green stain. In a beaker, water is heated until it begins to emit vapor, and the slide is placed above it, maintaining the stain heated for 5 minutes. Alternatively, the slide can be brought near a gentle flame until vapor is released, without allowing the stain to boil. This heating step is repeated every 1 to 2 minutes, for 3 to 4 cycles. Heat assists the stain's penetration through the thick layer formed by the cortex. After this process, the slide is gently rinsed to remove excess stain, avoiding thermal shock and potential slide breakage. Safranin is then added to the smear as a counterstain, allowed to act for 30 seconds.

In the Schaeffer-Fulton method, the procedure is similar, respecting the time and using the same stains; however, it does not include a heating step. In both techniques, endospores appear green within red or pink cells when the smear is properly prepared. As shown in Figure 7, this allows the endospores to be visualized. Due to their high refractivity, endospores can be detected under a light microscope when unstained, but they cannot be distinguished from storage inclusions without specific staining. (5,7)

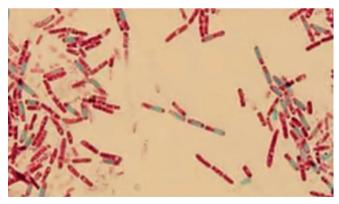


Figure 7

Spore staining using the Wirtz-Conklin technique^(27,30)

Other, less common spore staining techniques are described in the literature, such as the Moeller stain, the Dorner stain, and the modified Dorner stain.⁽³¹⁾

The Moeller technique involves using chromic acid and fuchsin as the initial stain, with methylene blue as a counterstain. In this method, spores will appear red against a blue background. This technique involves covering a preprepared smear with alcohol, which is then flamed until it extinguishes naturally. Subsequently, the slide is covered with 5% chromic acid, left to act for 5 minutes. After sensitization, the slide is washed and phenol-fuchsin solution is applied for 10 minutes, with heating to the emission of vapor. The decolorization step follows, initially using either 5% sulfuric acid or 10% nitric acid, then finishing with absolute alcohol. The smear is then washed, counterstained with 1% methylene blue for 3 minutes, followed by washing and drying of the slide. Upon immersion microscopy, spores are observed as red, with the bacterial body stained blue.

In the Dorner staining method for spores, fuchsin and nigrosin are used to sensitize and stain the spore. Nigrosin functions to extract all stain from cellular structures, except the spores, which take on a distinct (red) color compared to the bacterial body. In the Dorner technique, a concentrated suspension of sporulated microorganisms is prepared in distilled water, and an equal volume of filtered Kinyoun fuchsin (phenol-fuchsin) is then added. The tube is then placed in a boiling water bath for 5 to 10 minutes. On a clean slide, a drop of the suspension is mixed with a drop of 10% aqueous nigrosin solution, which has been boiled and filtered. This is spread and quickly dried with mild heat. Examination is done with a 100X oil immersion objective. In this technique, spores appear red, and the bacterial cells are nearly colorless against a dark gray background.⁽³¹⁾

In the Dorner modified technique, a smear of a fixed sporulated microorganism suspension is prepared, then covered with a strip of filter paper and phenol-fuchsin is added. The slide is then heated for 5 to 7 minutes until vapor is released. Afterward, the paper is removed, and the slide is washed and dried with absorbent paper. The smear is then covered with a thin layer of 10% nigrosin solution, spread with the help of a second slide. Under microscopic observation, the spores can be visualized with the same color as noted in the previous technique.⁽³¹⁾

Spore staining can be applied across various sectors. These include clinical, food industry, and environmental fields. (7,32-34)

In clinical settings, spore detection is crucial for identifying *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus. ⁽⁷⁾ This disease

is caused by toxins released by the bacterium, which can form spherical terminal endospores with a characteristic "drumstick" appearance, easily observed through staining techniques. (24)

In the context of One Health, controlling endospores in food production poses a major challenge, as these structures are highly resistant and pose risks related to food spoilage and foodborne diseases, such as botulism. (24) Botulism is a rare bacterial disease caused by Clostridium botulinum and is often associated with the consumption of contaminated foods, particularly canned foods and those lacking proper preservation.(24,32) In quality control processes during food production, staining techniques are essential, as they allow for the rapid detection and quantification of spores. (33) Another application involves the examination of bacterial endospores in environmental samples, particularly in studies on the monitoring and efficiency of Water Treatment Plants (WTP), including raw water analysis at the intake and effluent from filtration units at the Wastewater Treatment Plant (WWTP), as stipulated by GM/MS Ordinance No. 888, dated May 4,2021. (34)

Still within the scope of bacterial staining techniques, it is important to highlight simpler methodologies that, although seldom used in routine laboratory procedures, hold significant value in research activities involving the study of specific bacterial cellular structures. These include capsule staining (negative staining or India ink, India ink staining with diluted fuchsin, Hiss staining) and flagella staining.^(5,7)

NEGATIVE STAINING

The negative stain is so named because it stains the background rather than the bacterial body itself. It can be performed using a single stain (simple staining)⁽⁵⁾, as in the case of India ink for capsule observation, or combined with other stains, such as in the Gins method.⁽³⁵⁾

This technique is widely used to visualize capsules, which are structures present in certain microorganisms that, among many functions, protect the cell against phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes and contribute to bacterial adhesion to cells and surfaces. This adhesion is essential for many organisms to establish infections in suitable hosts or to maintain the bacterial cell on a specific environmental surface. The capsular material is typically composed of polysaccharides and phosphates with antigenic properties, which are often detected through serological tests. Among capsule-producing pathogenic bacteria, we can cite *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis*, known

for their pathogenic potential and involvement in various clinically significant infections affecting human health. (36)

Capsule staining is a technique that aids in identifying encapsulated microorganisms and often contributes presumptively to diagnosis. The method involves treating the cell with specific stains that do not penetrate the capsule, which varies according to the technique used but generally contrasts the capsular structure against the bacterial cell.^(7,37)

This approach was previously highlighted in the work of Lima and Teles, (38) who described the capsule's composition, functionality, importance for classification, and correlation with capsular forms across different microorganisms. They also provided a historical and comparative discussion on various capsule staining techniques and their adaptations over time. In this article, the authors examine techniques developed by Rosenow (39) (1911) and Muir (40) (1915), which involved the use of gentian violet and eosin, as well as Smith, (38) who advocated for the use of these stains followed by methylene blue. With both theoretical and technical backing, Lima and Teles (1942) emphasized the difficulties of performing certain techniques at the time, associating these challenges with the low sensitivity of diagnostic methods.

The authors also referenced techniques described by Hiss⁽⁴¹⁾ (1901) and Anthony⁽⁴²⁾ (1931) in their studies on methods for evaluating capsules produced by *Klebsiella pneumoniae*. Hiss⁽⁴¹⁾ (1901) devised two distinct processes: the first proposed the use of gentian violet diluted to double its volume with distilled water, followed by rinsing with a 0.25% aqueous potassium carbonate solution; the second suggested staining with a heated aqueous solution of gentian violet or fuchsin, then washing with a copper sulfate solution. In Anthony's technique⁽⁴²⁾ (1931), heat fixation was omitted, applying a 1% crystal violet solution as the initial stain for two minutes, followed by copper sulfate as a decolorizer, similar to Hiss's method. Comparative studies by Lima and Teles⁽³⁸⁾ (1942) concluded that Anthony's technique yielded better results, with larger and more visible capsules observed.

Currently, these older techniques are no longer in use. Among the main capsule detection methods described in the literature is negative staining, also known as the India ink method. This straightforward technique allows for the visualization of encapsulated bacteria without the need to stain them directly. (5,7,16) In bright-field microscopy, negative staining is typically performed using a black-pigmented fluid (acidic stain) like nigrosin or India ink, which cannot penetrate the cell, thus coloring the background and leaving the cells unstained. In this method, microorganisms are grown in a

nutrient-rich medium, such as BHI (Brain Heart Infusion), to stimulate capsule production. The procedure involves placing 1 or 2 drops of this culture on a slide, followed by a drop of India ink (or nigrosin) adjacent to the culture. The slide is then covered with a coverslip and pressed between filter paper sheets to remove excess fluid, achieving a thin layer of stain and material. Observation under a microscope is carried out at magnifications of 4X, 10X, 40X, and 100X, respectively. (37) It is worth noting that, since live cells are used, biosafety measures must be strictly followed, including the use of PPE (personal protective equipment) when handling cultures and proper disposal of pipettes/tips and filter paper in a container designated for autoclaving. (5,7,16)

Another method described in the literature is a variation of the India ink method, using an additional stain, diluted fuchsin. In this approach, the initial steps are maintained, but a smear is prepared from the culture and India ink mixture, which, after drying, is stained with diluted fuchsin for two minutes. After this period, the slide is gently rinsed with water, dried, and examined under an optical microscope with an immersion objective. (5.7,16)

FLAGELLA STAINING

Flagella are locomotion structures formed by thin appendages made of protein (flagellin) and are found in motile bacteria. Each flagellum consists of thousands of polymerized monomers of this protein, arranged to form a single flagellum. (5,16)

Several challenges arise when attempting to visualize this type of organelle under optical microscopy, as bacterial flagella production is not continuous and depends on various factors, such as the culture medium, temperature, and growth stage. [5,16] Flagella are fragile and delicate structures that can easily detach from the cell body during abrupt pipetting and homogenization processes. Another critical factor causing detachment is their tendency to depolymerize readily, dissociating into flagellin monomers at temperatures above 60°C, acidic pH (around pH 4.0), and in the presence of organic solvents, alkalis, and urea. Given these characteristics, specialized staining is required for flagella visualization, aiming to increase the flagellum diameter.

The principle of flagella staining relies on the use of tannic acid, which binds to the flagellum, increasing its diameter and thereby facilitating observation. Despite this enhancement, flagella still appear faint on the slide, making it challenging to capture clear images with light microscopy. (5,16)

The technique begins with a culture in a rich medium (typically BHI, as previously described for capsule staining) or on tryptic soy agar (with or without blood). A small aliquot of this culture is delicately transferred using a platinum loop into a tube containing approximately 3 mL of distilled water and inverted once, avoiding any abrupt movements to homogenize the suspension. Using a pipette, an aliquot is then carefully drawn by capillary action and allowed to flow naturally over the surface of a slide inclined at 45°, which is then left to air-dry. After this process, the slide should be covered with a staining mixture containing fuchsin and tannic acid, allowing it to act for 5 minutes until a greenish metallic sheen covers about half of the area. Subsequently, the stain is rinsed off with water before it dries on the slide, air-dried, and then observed under an optical microscope with an immersion objective (100X).(5,16)

IMPORTANCE OF LEARNING THESE METHODOLOGIES

As previously mentioned, despite significant advances in bacteriology in recent decades, including the development of molecular methods and automation that expedite clinical diagnostics and One Health research, the initial step of bacteriological analysis—microscopic examination of clinical material—remains a crucial stage.

As postgraduate instructors and experienced advisors, the authors have observed the difficulty students face in understanding the importance of microscopy, the principles of bacterial staining, and their relationship with the identification of agents, whether definitive or presumptive.

Therefore, we conceived this article as an opportunity to reinforce these topics, providing a historical perspective, state-of-the-art overview, practical applications, and the importance of understanding commonly used methods in research and laboratory routines. We believe this knowledge will add practical value for students in the health field, especially those directly involved in bacterial identification through various approaches.

MAIN LIMITATIONS AND QUALITY CONTROL IN STAINING TECHNIQUES

Quality control encompasses a set of measures, procedures, and tools applied during process execution to ensure proper performance. Therefore, the following

recommendations should serve as mandatory requirements in daily routine activities:

- 1 When performing any staining technique, control strains, such as those from the American Type Culture Collection (ATCC), should be used both to verify stain quality and to confirm proper methodology execution. Using cytomorphologically well-characterized strains is crucial for comparative sample recognition, enabling verification of similarities and/or differences in staining and morphological characteristics.
- 2 Stains should be prepared according to recommended protocols and stored in amber bottles to protect them from light exposure, which can cause various alterations. Bottles should be well-sealed to prevent evaporation and stains should be routinely filtered to remove crystals that precipitate at the bottom. During staining procedures, avoid homogenizing the stain to prevent resuspension of any preformed crystals.
- 3 Slides should be new, pre-washed, and degreased before use.
- 4 Perform regular preventive maintenance and cleaning of microscopes and objectives after each session.
- 5 The decolorization step is critical, as prolonged solvent exposure may result in complete stain removal, leading to unreliable results. The retention or removal of the primary stain depends on the physical and chemical properties of bacterial cell walls, including thickness, density, porosity, and integrity.

CONCLUSION

Despite all the current methodologies for bacterial detection and identification, basic staining techniques in microbiology still play a fundamental role in diagnosis, differentiation, and the study of microorganisms. The knowledge and proper application of these techniques are essential for microbiology professionals in different clinical and laboratory contexts. Each technique presents specific principles that allow for the visualization of distinct bacterial structures and has contributed to significant advances in medicine and biomedical research. Even in light of the undeniable importance of these techniques, the authors emphasize the need for more current studies aimed at developing methodologies that not only reduce the use of stains based on reagent costs but also seek to minimize the use of toxic substances, which will also contribute to more sustainable processes and environmental preservation.

REFERENCES

- Freitas V, Picoli S. A Coloração de Gram e as Variações na sua Execução. Newslab. Novo Hamburgo. 2007; v.82 p124-128.
- 2. Gram HCJ, Friedlaender C. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten: in Schnitt-und Trockenpräparaten. Berlin: Theodor Fischer's medicinischer Buchhandlung; 1884. (Fortschritte der Medicin; Bd. 2, 1884).
- 3. Ziehl F. Zur Färbung des Tuberkelbacillus. Dtsch Med Wochenschr. 1882: 8:451-451.
- Kanaan S. Laboratório com interpretações clínicas. 2ª ed. Editora Atheneu; 2021.
- Nogueira JMR, Souza LF. Bacteriologia. In: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. EPSJV - Fiocruz; 2009. p 221-397.
- Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Prescott's Microbiology. 8th. Ed McGraw-Hill; 2014.
- LeVeque RM, Martin N, Alst AJV, DiRita VJ. Microbiology. Microscopy and Staining: Gram, Capsule, and Endospore Staining. Em Cambridge, MA: JoVE Journal; Michigan State University; 2023.
- McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 24 RD. Ed St. Louis, MO E-Book. Elsevier Health Sciences; 2021.ISBN: 9780323673204.
- Trento A. Colorações usadas em microbiologia [Internet]. [São José do Rio Preto – São Paulo]: Academia da Ciência e Tecnologia; 2018. Available at: http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/ Artigos_cientificos/3-Coloracao_microbiologia.pdf. Accessed: August 23, 2024
- Teixeira AB, Cavalcante JCDV, Moreno ÍC, Soares IDA, Holanda FODA. Bacterial meningitis: an update. Rev Bras Análises Clínicas; 2018. 50 (4): 327-329. Available at: https://www.rbac.org.br/artigos/meningite-bacteriana-uma-atualizacao/. Accessed: September 02, 2024.
- BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Ministério da saúde; 2022. 152p.
- 12. BRASIL. Manual de Recomendações para o Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose e Micobactérias não Tuberculosas de Interesse em Saúde Pública no Brasil. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis Ministério da Saúde; 2022. 492 p.
- BRASIL. Hanseníase. Agência Fiocruz de Notícias. Lab de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz. Fiocruz. Ministério da Saúde; 2024. Available at: https://portal.fiocruz.br/doença/hanseniase. Accessed: August 20, 2024.
- Morales PS. O M. tuberculosis, a coloração de Ziehl-Neelsen e a interpretação do BAAR [Internet]. Portal Afya. Available at: https:// portal.afya.com.br/saude/o-mycobacterium-tuberculosis-e-a-classicacoloracao-de-ziehl-neelsen. Accessed: September 02, 2024.
- Rother ET. Revisão Sistemática x Revisão Narrativa. Editorial, Acta paul. enferm. 2007. 20 (2). Available at: https://www.scielo.br/j/ape/a/ z7zZ4Z4GwYV6FR7S9FHTByr/ Accessed: September 02, 2024.
- Moreira JLB, Carvalho CBM, Frota CC. Visualização bacteriana e colorações.
 Ed. Imprensa Universitária Universidade Federal do Ceará, CE; 2023. 68p
- 17. BRASIL. Técnica de Coloração de Gram. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 1997. 63p.
- 18. Lellis B, Fávaro-Polonio CZ, Pamphile JA, Polonio JC. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. Biotechnol Res Innov. 2019;3(2):275-90.
- Reine FU, Souza LABD, Menezes JLD, Gomes RFCC, Souza ACRD, Mota CA, et al. Método alternativo e sustentável para a realização de coloração bacteriana de Gram e Wirtz-Conklin: Relevância ambiental e econômica no ensino prático da microbiologia. Res Soc Dev. 22 de julho de 2021;10(9):e9510917585.

- Pinto AC, Ribeiro KTS. Guia prático de orientações básicas de microbiologia [Internet]. 10 ed. Editora Itacaiúnas; 2022. Available at: https://editoraitacaiunas.com.br/produto/guia-pratico-de-orientacoesbasicas-de-microbiologia/. Accessed: September 20, 2024.
- Bush LM. Nocardiosis. MSD Manual, Charles E Schmidt Coll Med Florida Atlantic University. 2023. Available at: https://www.msdmanuals. com/home/infections/bacterial-infections-gram-positive-bacteria/ nocardiosis. Accessed: September 23, 2024.
- BRASIL. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília, DF: Secretaria da Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Ministério da Saúde; 2019. 364p.
- 23. Silva-Pereira TT, Soler-Camargo NC, Guimarães AMS. Diversification of gene content in the *Mycobacterium tuberculosis* complex is determined by phylogenetic and ecological signatures. Jun SR, organizador. Microbiol Spectr. 2024;12(2):e02289-23.
- 24. BRASIL. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília, DF: Secretaria da Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Ações Estratégicas e Epidemiologia e Vigilância em Saúde e Ambiente. Ministério da Saúde; 2024. 6ed. rev.v.3.
- 25. Fontana A, Tribondeau P. Silver staining of spirochetes. Journal of Infectious Diseases. 1907.
- Morris SR. Sífilis. Manual MSD versão para profissionais de Saúde;2023.
 Available at: https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/doenças-infecciosas/infecções-sexualmente-transmissíveis/sífilis. Accessed: September 23, 2024.
- INML. Métodos de Coloração em Microbiologia [Internet]. Instituto Nacional de Medicina Laboratorial. 2023 [citado 16 de agosto de 2024]. Available at: https://inml.com.br/metodos-de-coloracao-emmicrobiologia/. Accessed: September 23, 2024.
- 28. Albert L, Laybourn A. A New staining method for the demonstration of volutin granules. Journal of Pathology and Bacteriology; 1934.
- Schaeffer AB, Fulton MD. A simplified method of staining endospores.
 Science. 17 de fevereiro de 1933;77(1990):194. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17741261/. Accessed: September 05, 2024.
- 30. Wirtz R, Conklin R. A new method for ataining bacterial spores. Stain Technology; 1937.
- Hayama M, Oana K, Kozakai T, Umeda S, Fujimoto J, Ota H, et al. Proposal
 of a simplified technique for staining bacterial spores without applying
 heat Successful modification of Moeller's Method. Eur J Med Res. 2007.
- Martin BXB, Carraro DC, Souza DCR, Duarte EMPD, Ribeiro, SM, Gomes AB. Tipos de Botulismo: Uma revisão bibliográfica. Brazilian Journal Surgery and Clinical Research; 2019. Vol 26, N2, p 43-48.
- Silva ND, Junqueira VCA, Silveira NFDA. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água [Internet]. 60 ed. Blucher; 2021. Available at: https://www.blucher.com.br/livro/detalhes/manual-de-metodos-de-analise-microbiologica-de-alimentos-e-agua-1847. Accessed: September 20, 2024.
- 34. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS no 888, de 04 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS no 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Of União. 2021;(85):127-127.
- 35. UFGRS. Manual virtual de aulas práticas do DEMIP/ICBS/UFRGS [Internet]. Departamentos de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (Instituto de Ciências Básicas da Saúde) e Interdisciplinar (Campus Litoral Norte) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2024. Available at: https://www.ufrgs.br/aulaspraticasdemip/?page_id=845. Accessed: August 20, 2024.
- 36. Cunha AMG. Análises clínicas. 2ª ed. Vol. (Coleção Manuais de Farmácia, v.5). Salvador: Editora Sanar SA; 2021. 416 p.
- 37. Barbosa FHF, Barbosa LPJL. Alternativas metodológicas em Microbiologia viabilizando atividades práticas. Revista de Biologia e Ciências de terra. Campina Grande. 2010; v10, n2, p 134-143.

- 38. Lima JPDEC, Teles LQ. Demonstração de cápsulas bacterianas. Instituto Adolpho Lutz. 1942; 21p. Available at: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/40/rial-22_1942/b36.pdf. Accessed: September 17, 2024.
- 39. Rosenow EC. A New Stain for Bacterial Capsules with Special Reference to Pneumococci. J Infect Dis. 10 de julho de 1911;9(1):1-8. Available at: https://academic.oup.com/jid/article-abstract/9/1/1/821027. Accessed: September 10, 2024.
- 40. Muir R. Staining of bacterial capsules in films and sections. J Pathol Bacteriol. 10 de janeiro de 1915;20(2):257-9. Available at: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.1700200203. Accessed: September 20, 2024.
- 41. Hiss PH. A Contribution to the physiological differentiation of *Pneumococcus* and *Streptococcus*, and to methods of staining capsules. J Exp Med. 10 de fevereiro de 1905;6(4-6):317-45. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19866975/. Accessed: September 20, 2024.
- 42. Anthony EE. A Note on Capsule Staining. Science. 1931;73(1890):319-20. Available at: https://www.science.org/doi/10.1126/science.73.1890.319. Accessed: September 20, 2024.

Reference Change Value: Uma ferramenta do laboratório para interpretar resultados de exames

Reference Change Value: A laboratory tool for interpreting test results

Flávia Martinello¹, Alice Berlanda Seidler², Mauren Isfer Anghebem³

- ¹ Farmacêutica, Pós-doutora em Análises Clínicas, Professora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.
- ² Estudante, Graduanda em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.
- ³ Farmacêutica, Doutora em Ciências Farmacêuticas/Análises Clínicas, Professora Adjunta da Escola de Medicina e Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica e Professora Adjunta do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná/UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi destacar a importância de cada uma das fases de um exame laboratorial para a interpretação dos resultados quantitativos. Na fase pós-analítica, a interpretação dos resultados dos exames é feita por comparação com intervalos de referência obtidos de populações saudáveis, sendo essas comparações transversais ou longitudinais. As comparações longitudinais, que comparam resultados recentes com anteriores de um mesmopaciente, são fundamentais para monitorar a evolução da saúde, e a introdução do conceito de referência individualizada melhora a precisão dessa avaliação. Os ritmos fisiológicos, como ultradianos e circadianos, a fetam os resultados laboratoriais, exigindo padronização no processo pré-analítico. A lém por constante de la constantedisso, a variação biológica, classificada em intrapessoal e interindividual, é crucial para entender as oscilações nos resultados. O índice de individualidade (II) é outro fator relevante, pois determina a utilidade dos intervalos de referência populacionais, que podem ser inadequados para parâmetros com alta individualidade. Por fim, o conceito de "reference change value" (RCV) e um exemplo prático são apresentados como uma ferramenta importante para avaliar a significância de mudanças nos resultados laboratoriais, especialmente em exames consecutivos. O RCV é definido como a diferença estatisticamente significativa existente entre dois resultados do mesmo indivíduo, levando em consideração o erro de medida. Essa diferença é chamada de diferenca crítica. São apresentadas as fórmulas disponíveis para cálculo do RCV, com o destaque para o conhecimento da imprecisão analítica, obtido pelo coeficiente de variação dos resultados de controle interno da qualidade. A revisão também destaca as limitações e desafios na aplicação do RCV, sugerindo a adoção de intervalos de referência personalizados para maior precisão na interpretação dos resultados.

Palavras-chave: Reference change value, Variação biológica, Imprecisão, Fase pós-analítica, Resultados laboratoriais, Intervalo de referência personalizado.

Abstract

This narrative review aimed to highlight the importance of each phase of a laboratory test in interpreting quantitative results. In the post-analytical phase, test result interpretation is achieved through comparisons with reference intervals derived from healthy populations, with these comparisons being either cross-sectional or longitudinal. Longitudinal comparisons, which contrast recent results with previous ones from the same patient, are essential for monitoring health progression, and the introduction of individualized reference concepts enhances the precision of this assessment. Physiological rhythms, such as ultradian and circadian rhythms, influence laboratory results, necessitating standardization in the pre-analytical process. Additionally, biological variation, classified as within-subject and between-subject, is crucial for understanding fluctuations in results. The index of individuality (II) is another relevant factor, as it determines the usefulness of population-based reference intervals, which may be unsuitable for parameters with high individuality. Lastly, the concept of "reference change value" (RCV) and a practical example are presented as important tools to assess the significance of changes in laboratory results, particularly in sequential tests. The RCV is defined as the statistically significant difference between two results from the same individual, taking measurement error into account. This difference is referred to as the critical difference. Available formulas for calculating the RCV are presented, emphasizing the knowledge of analytical imprecision, obtained through the coefficient of variation from internal quality control results. The review also highlights the limitations and challenges in applying RCV, suggesting the adoption of personalized reference intervals for enhanced accuracy in result interpretation.

Keywords: Reference change value, Biological variation, Imprecision, Post-analytical phase, Laboratory results, Personalized reference interval.

Correspondência Flávia Martinello

E-mail: flavia.martinello@ufsc.br

Recebido em 03/10/2024 | Aprovado em 06/10/2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400200.pt

INTRODUÇÃO

As etapas de um exame laboratorial são agrupadas em fases, como mostra a Figura 1, nesta ordem: Fase pré-pré-analítica, que corresponde à requisição do exame, a orientação e o preparo do paciente, ou seja, acontece fora do laboratório; Fase pré-analítica, que inclui a recepção e identificação do paciente, a coleta, o armazenamento, o transporte e o preparo da amostra; Fase analítica, que abrange a realização do exame com o respectivo controle da qualidade; Fase pós-analítica, que compreende a elaboração do laudo com respectivo comentário interpretativo que se fizer necessário, a liberação do resultado e a comunicação de valores críticos;

e a Fase pós-pós-analítica, que compreende a interpretação do resultado e a tomada de decisão baseada no resultado. (1,2)

Os resultados quantitativos de exames laboratoriais são interpretados por comparação com valores ou intervalos de referência obtidos de uma população cujo estado de saúde é conhecido. Essas comparações podem ser transversais ou longitudinais. A comparação transversal é a comparação do resultado de um analito de um paciente com a faixa de valores desse analito obtida de um grupo de indivíduos aparentemente saudáveis. Esse tipo é conhecido como intervalos de referência "baseados na população" e é usado para diagnóstico ou rastreamento de doenças. A Figura 2 ilustra o processo de obtenção dos intervalos de referência.

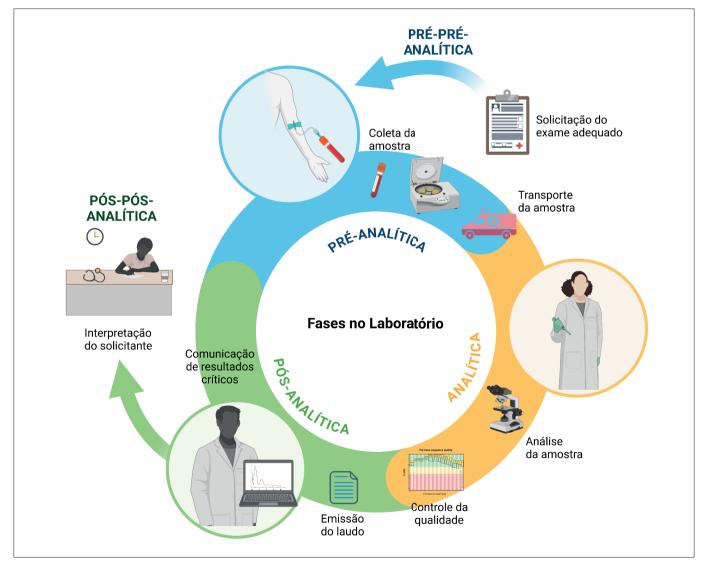


Figura 1

Etapas do processo de exame laboratorial.

Fonte: Autoras.



Figura 2

Processo de obtenção de intervalos de referência.

Fonte: Autoras.

Os intervalos de referência convencionais baseados na população, independentemente de serem gerados por um laboratório individual ou harmonizados, são de utilidade muito limitada na avaliação dos resultados de um indivíduo na triagem ou diagnóstico, uma vez que muitos indivíduos terão valores que são altamente incomuns para eles, mas ainda estão dentro dos intervalos de referência.⁽³⁾

As comparações longitudinais são aquelas em que um valor recente de um paciente é comparado aos valores anteriores para o mesmo analito. Essa comparação pode ajudar a detectar uma alteração do estado de saúde, ou seja, é utilizada para monitoramento de pacientes. A Figura 3 ilustra, na forma de lista e gráfica, os resultados anteriores de um paciente para o analito X.

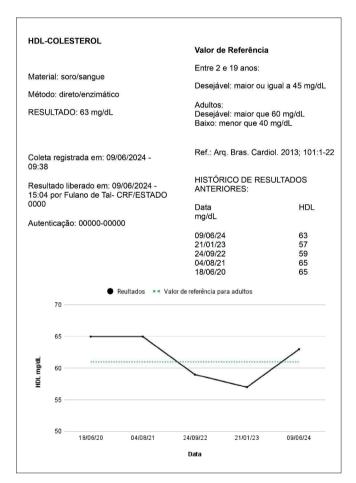


Figura 3

Parte de um laudo laboratorial apresentando o resultado atual e os resultados anteriores de um paciente na forma de lista e gráfica.

Fonte: Autoras

A informação dos resultados anteriores do paciente no próprio laudo agrega qualidade na fase pós-analítica, pois permite que o profissional de saúde e o próprio paciente relembre o resultado anterior e conheça a evolução do marcador laboratorial. Desta forma, o laboratório está tratando o paciente como próprio indivíduo de referência e não como população (de referência). Os resultados dos exames de um paciente devem ser comparados preferencialmente com seus próprios valores de referência individualizados, ou seja, um valor de referência personalizado.⁽⁴⁾

Nesse contexto, vários fatores podem influenciar na variação entre resultados sequenciais de um indivíduo. Um resultado diferente do anterior pode resultar de variação pré-analítica, de variação analítica e de variação biológica. É preciso ponderar sobre os três tipos de variação para poder afirmar que a modificação de um resultado, em relação a um anterior, é significativa. (3)

Dependendo da forma de estudo, a variação biológica pode ser classificada em variação biológica intrapessoal, quando se estuda a variação de resultados de um analito em um único indivíduo em situação de equilíbrio homeostático; variação biológica intraindividual, quando se estuda a variação intrapessoal de resultados de um analito em vários indivíduos em situação de equilíbrio homeostático; e variação biológica interindividual, ou variação biológica de um grupo, quando se estuda a variação de resultados de um analito entre vários indivíduos em situação de equilíbrio homeostático. (5)

A variação biológica intrapessoal, ou dentro do sujeito, que é a variação do analito em torno do ponto de ajuste homeostático do indivíduo, também é chamada variação biológica aleatória e não pode ser prevista, mas pode ser estimada por estatística apropriada. (5) A diferença entre variação biológica intrapessoal e intraindividual é a fonte dos dados usados para calcular esses parâmetros. A variação biológica intraindividual é calculada usando os resultados das variações intrapessoais de um grupo de indivíduos (população) e, portanto, não é específica para o indivíduo, enquanto variação biológica intrapessoal é obtida usando os resultados das medições repetidas do indivíduo e, portanto, é específica para o indivíduo. (5) Nos últimos anos, houve um grande progresso na metodologia de derivação, cálculo, estimativa e relato de dados de variação biológica e parâmetros derivados.(6)

A variação biológica intraindividual aleatória dos analitos não é sinônimo de ritmo fisiológico. Os ritmos fisiológicos são variações sistemáticas parcialmente previsíveis e podem ser classificadas, com base na frequência, como ultradiana (<24 horas), circadiana (aproximadamente 24 horas) e infradiana (>24 horas).⁽⁵⁾

Devido aos ritmos ultradianos dos analitos, a comparação de um resultado de exame laboratorial atual não pode ser feita em relação a um resultado anterior obtido de amostra coletada em momento diferente do dia, por exemplo, a coleta anterior foi no período da tarde e a atual pela manhã. Para comparações confiáveis, a fase pré-analítica deve ser padronizada, ou seja, muito semelhante, considerando horário de coleta, tempo de jejum, preparo para a coleta, procedimento de coleta, estilo de vida e outras variáveis pré-analíticas que possam afetar o resultado do exame. Além disso, em alguns casos, a amostragem no mesmo horário por dias consecutivos pode não ser suficiente para eliminar variações infradianas, como lipídios, vitamina D, cálcio etc., especialmente se o intervalo de tempo entre medições consecutivas se aproximar dos períodos infradianos do exame.

A Figura 4 ilustra a variação biológica intrapessoal, intraindividual e interindividual de um analito bioquímico.

A Federação Europeia de Medicina Laboratorial (EFLM) disponibiliza esses dados de variação biológica (%) em indivíduos saudáveis, após avaliação da qualidade dos estudos, gratuitamente, para usuários em todo o mundo.⁽⁶⁾

Além disso, também há estudos que relatam a variação biológica (%) de alguns analitos em indivíduos em certos estados de doença. No entanto, para uma série de analitos, não há dados ou são limitados. (8,9)

A informação da variação biológica interindividual é utilizada indiretamente para interpretar resultados de exames laboratoriais, pois é utilizada para calcular o índice de individualidade de um analito. A razão entre a variação biológica intraindividual (CVI) e a interindividual (CVG) é chamada de índice de individualidade (II). (6) Na maioria dos indivíduos, a variação da concentração de um analito ao longo do tempo é menor que a dispersão do intervalo de referência, ou seja, a variação biológica intraindividual é geralmente menor que a variação biológica interindividual, o que gera um II menor que um (1,0). (10)

Se o II for abaixo de 0,6, o analito apresenta alta individualidade, e isto significa que a variação entre os resultados do indivíduo é pequena em relação à faixa do intervalo de referência, tornando este último pouco útil para a interpretação dos resultados, pois a variação do indivíduo não é visível na faixa do intervalo de referência populacional. Nesses casos, existe o risco de se considerar o resultado do indivíduo como uma variação fisiológica normal, quando os valores do analito estão significativamente longe de seu

ponto de ajuste homeostático, mas ainda incluídos no intervalo de referência. (11,12) Por outro lado, se o II for acima de 1,4, o analito apresenta baixa individualidade e a dispersão de valor em cada indivíduo cobre a maior parte da dispersão entre os indivíduos que são representados pelo intervalo de referência, tornando-o uma ferramenta útil para a interpretação do teste. Em termos gerais, a utilidade do intervalo de referência populacional para monitorar pacientes é limitada quando o II for inferior a 0,6 e aceitável quando o II for maior que 1,4. Para um analito com II entre 0,6 e 1,4, a utilização dos intervalos de referência populacionais fica a critério clínico. (13)

Por exemplo, a hemoglobina glicada é um analito que possui uma individualidade alta (II = 0,16), ou seja, o intervalo de referência (IR) é pouco útil, pois a variação do indivíduo não é visível na faixa do IR. Por outro lado, o pH sanguíneo é um parâmetro com pouca individualidade (1,75), ou seja, o intervalo de referência (IR) é bastante útil, pois uma pequena variação do indivíduo se torna visível na faixa do IR.

Por fim, a variação analítica do método escolhido para medida do analito também é uma variável que pode influenciar na interpretação de resultados laboratoriais consecutivos, e é uma informação que só o laboratório possui. A variação analítica, também chamada de precisão analítica, representa a dispersão dos resultados da amostra controle no controle interno da qualidade do exame laboratorial. A precisão do método é calculada pelo desvio padrão da média dos resultados e expresso em termos percentuais como coeficiente de variação (CV) da média.

Considerando que as informações sobre o desempenho analítico dos métodos (precisão) são informações exclusivas dos laboratórios, os profissionais de laboratório podem participar ativamente de estratégias para melhorar a experiência do paciente em cuidados de saúde, desenvolvendo e contribuindo para informações de alta qualidade para permitir a comunicação e interpretação oportunas e significativas dos resultados dos testes. (14)

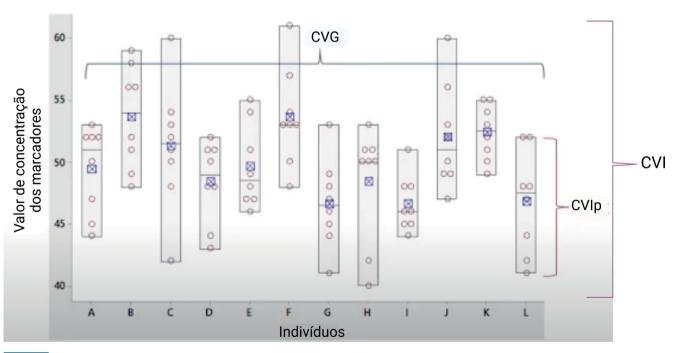


Figura 4

Os componentes da variação biológica de um analito: variação biológica intrapessoal, intraindividual e interindividual.

Legenda CVIp: Coeficiente de variação biológica intrapessoal. CVI: Coeficiente de variação biológica intraindividual. CVG: Coeficiente de variação biológica interindividual (do grupo). Fonte: Adaptado de Johnson, 2020.^[7]

RCV - REFERENCE CHANGE VALUE

Considerando o uso dos intervalos de referência tradicionais, os resultados de um analito de um indivíduo podem mudar de dentro do intervalo para fora (e vice-versa) sem significância, provavelmente estimulando alguma atividade clínica desnecessária, mesmo que seja apenas a solicitação de repetição do teste.

Uma maneira muito melhor de monitorar indivíduos é usar o RCV, do inglês *reference change value*, traduzido para o português como diferença crítica ou valor de referência para alteração ou valor de referência mudança. (3) O RCV foi introduzido por Harris e Yasaka (15) em 1983 e é definido como a diferença estatisticamente significativa existente entre dois resultados do mesmo indivíduo, levando em consideração o erro de medida. Assim, o RCV é uma ferramenta para avaliação da significância da diferença entre resultados seriados de um indivíduo. (16) Para concluir que a diferença entre dois resultados seguidos é significativa e pode ser biologicamente relevante (alteração do estado de saúde), a diferença deve ser maior que o RCV, por isso chamada de diferença crítica. (10)

A fórmula para definição do RCV de cada analito, dependente da variação analítica do método laboratorial em uso e do CVI, segundo Fraser e Harris (1989)⁽¹⁷⁾ é:

$$RCV = 2^{1/2}x Z x (CVA^2 + CVI^2)^{1/2}$$

onde CVA é o coeficiente de variação analítica do método de medida do analito em questão, CVI é o coeficiente de variação biológica intraindividual, e Z=1,65 para p < 0,1 ou 1,96 para p < 0,05 ou 2,33 para p < 0,01.

Considerando que o cálculo do RCV foi inicialmente proposto para medidas com distribuição simétrica ou gaussiana (também chamada normal), ao longo dos anos, outros autores defenderam que a abordagem de conversão do RCV em logaritmo natural (ln-RCV) deveria ser usada principalmente quando os valores medidos são considerados normalmente distribuídos quando estes são transformados em ln. Assim, outros modos de calcular o RCV surgiram para medidas com distribuição assimétrica. (11,18)

Com o enfoque assimétrico, o desvio (σ) da distribuição log-normal do coeficiente de variação total (CVT) é calculado pela fórmula:

$$\sigma = [ln((CVT/100)^2 + 1)]^{1/2}$$
 onde CVT=[(CVI² + CVA²)]^{1/2}

Esta abordagem resulta em limites de RCV assimétricos. O limite assimétrico da diferença crítica para aumento (RCV positivo) e para o declínio (RCV negativo) de resultado laboratorial é determinado pelas fórmulas, respectivamente:

RCV pos =
$$[\exp(1,96 \times 2^{1/2} \times \sigma) - 1] \times 100$$

RCV neg = $[\exp(-1,96 \times 2^{1/2} \times \sigma) - 1] \times 100$

Na prática, a diferença é que o resultado do RCV simétrico gera apenas um valor como diferença crítica e o do RCV assimétrico gera dois, um que deve ser superado quando há um aumento do resultado e outro quando há uma diminuição do resultado paciente. Quando os CVT são < 5-10% as fórmulas simétricas e assimétricas apresentarão resultados semelhantes, como ilustrado no exemplo prático adiante.

Independentemente da fórmula escolhida, utiliza-se o coeficiente de variação biológica intraindividual do banco de dados do EFLM (https://biologicalvariation.eu/), quando não se conhece o coeficiente de variação biológica intrapessoal.

Contudo, o próprio banco de dados do EFLM funciona inicialmente com a busca pelo analito (que deve ser inserido em língua inglesa), em seguida são mostrados os dados de variação biológica do analito e a opção para selecionar o cálculo do RCV (Figura 5). Para o cálculo você deve inserir o CVA do analito do seu laboratório e automaticamente o RCV assimétrico será apresentado.

Além disso, é importante perceber que, embora o CVI possa ser assumido como constante, pois não muda com frequência, o CVA (imprecisão analítica) varia de laboratório para laboratório e de método para método. A Tabela 1 mostra que o RCV depende do CVA e que a relação não é linear, com exemplo para a glicemia capilar, considerando um CVI hipotético de 3,8% e intervalo de confiança de 95% (z = 1,65).

Além disso, alguns estudos apresentam o RCV utilizado no laboratório como diferença crítica para liberação automática, ou não, de resultados de pacientes com base em resultados anteriores, também chamado de delta-check. (19,20) Contudo, cabe lembrar que cada laboratório tem seu RCV de cada analito, pois depende da variação analítica laboratorial. Como ilustração, a influência da variação analítica é apresentada na Tabela 2, (12) que mostra a probabilidade de uma modificação de 15% no resultado de colesterol total (CVI 6%), em relação a um resultado anterior, ser significativa dependendo do CVA.

Na prática, ainda, muitas vezes mais de dois resultados sequenciais estão disponíveis para um indivíduo e é possível calcular a significância das mudanças entre cada uma das duas medições consecutivas. (21)

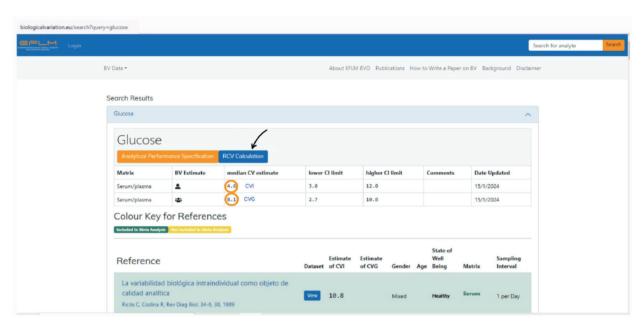


Figura 5

Site da base de dados de variação biológica da Federação Europeia de Medicina Laboratorial (EFLM).

Legenda: Os círculos alaranjados indicam o CVI e o CVG do analito pesquisado. A seta preta indica o local para acesso ao cálculo do RCV do analito considerando o CVA do próprio laboratório.

Fonte: https://biologicalvariation.eu/search?query=glucose

Tabela 1

RCV para glicemia capilar, considerando um coeficiente de variação biológica intraindividual (CVI) hipotético de 3,8% em diferentes níveis de imprecisão analítica (p<0,05).

| Imprecisão (CVA, %) | RCV (%) |
|---------------------|---------|
| 1,0 | 9,2 |
| 2,0 | 10,0 |
| 3,0 | 11,3 |
| 4,0 | 12,9 |
| 5,0 | 14,7 |
| 6,0 | 16,6 |

Tabela 2

Probabilidade de uma modificação de 15% no resultado de colesterol total ser significativa em diferentes níveis de imprecisão analítica.

| Imprecisão (CVA, %) | Probabilidade de mudança significativa (%) |
|---------------------|--|
| 2,0 | 95 |
| 4,0 | 93 |
| 6,0 | 90 |
| 8,0 | 86 |
| 10 | 82 |

CVA: coeficiente de variação analítica.

Fonte: Fraser, 2012.12

EXEMPLO PRÁTICO

Considerando um CVA hipotético para a análise de glicemia de 4% e um CVI hipotético de glicemia capilar de 3,8%, o RCV simétrico seria calculado como sendo:

Diferença crítica com 90% de confiança: $RCV = 2^{1/2}x Z x (CVA^2 + CVI^2)^{1/2}$ $RCV = 1,414 x 1,65 x (4^2 + 3,8^2)^{1/2}$ RCV = 12,9%

Diferença crítica com 95% de confiança: $RCV = 2^{1/2}x Z x (CVA^2 + CVI^2)^{1/2}$ $RCV = 1,414 x 1,96 x (4^2 + 3,8^2)^{1/2}$ RCV = 15.3%

Diferença crítica com 99% de confiança: $RCV = 2^{1/2}x Z x (CVA^2 + CVI^2)^{1/2}$ $RCV = 1,414 x 2,58 x (4^2 + 3,8^2)^{1/2}$ RCV = 20,1%

As diferentes probabilidades (Z) na confiança da diferença crítica significam que quanto mais o profissional de saúde quer confiar no RCV, maior ele será.

Para o cálculo do RCV assimétrico deve-se calcular o CVT, em valores decimais:

CVT= $[(CVI^2 + CVA^2)]^{1/2}$ CVT= $[(3,8^2 + 4^2)]^{1/2}$ CVT= $[(14,44 + 16)]^{1/2}$ CVT= $[30,44]^{1/2}$ CVT=5.517%

E o desvio do CVT deve ser calculado como:

$$\begin{split} \sigma &= [\ln((CVT/100)^2 + 1)]^{1/2} \\ \sigma &= [\ln(0,0552^2 + 1)]^{1/2} \\ \sigma &= [\ln(0,0552^2 + 1)]^{1/2} \\ \sigma &= [\ln(0,003 + 1)]^{1/2} \\ \sigma &= [\ln(1,003)]^{1/2} \\ \sigma &= [0,00299]^{1/2} \\ \sigma &= 0,0547 \end{split}$$

O RCV assimétrico, ou seja, a diferença considerada crítica para aumento no resultado deve ser calculado como sendo:

RCV pos = $[\exp(1,96 \times 2^{1/2} \times \sigma) - 1] \times 100$ RCV pos = $[\exp(1,96 \times 1,414 \times 0,0547) - 1] \times 100$ RCV pos = $[\exp(0,1516) - 1] \times 100$ RCV pos = $[1,1636 - 1] \times 100$ RCV pos = $[0,1636] \times 100$ RCV pos = 16,36%

E a diferença considerada crítica para redução do resultado como:

RCV neg = $[\exp(-1.96 \times 2^{1/2} \times \sigma) - 1] \times 100$ RCV neg = $[\exp(-1.96 \times 1.414 \times 0.0547) - 1] \times 100$ RCV neg = $[\exp(-0.1516) - 1] \times 100$ RCV neg = $[0.8593 - 1] \times 100$ RCV neg = $[-0.1406] \times 100$ RCV neg = -14.06%

Perante uma situação hipotética de um paciente que há 3 meses apresentou glicemia de 152mg/dL e iniciou tratamento hipoglicemiante oral com dose diária de 2,5mg de glibenclamida e retornou para realização de novo exame e apresentou resultado de 133mg/dL (redução de 12,5%), questiona-se: essa redução é significativa? Considerando o RCV calculado, simétrico e assimétrico, a redução não é significativa, pois a diferença deve ser maior que 15,3% ou 14,06%. Ou seja, inicialmente deve-se avaliar a adesão do paciente ao tratamento medicamentoso. Se observada a adesão, o tratamento medicamentoso deve ser complementado com tratamento não medicamentoso, com introdução de atividade física e/ou dieta, ou deve ser modificada a dose diária do medicamento.

Desta forma tem-se uma interpretação personalizada dos resultados do paciente, com base em dados da variação biológica intraindividual e dados do laboratório, como resultado anterior e coeficiente de variação analítica.

PERSPECTIVAS

O intervalo de referência baseado no modelo homeostático pode ser calculado usando os resultados de exames anteriores de um indivíduo obtidos em uma situação de estado clínico de equilíbrio, ou seja, conhecendo-se a variação biológica intrapessoal. Com o desenvolvimento da tecnologia da informação, os laboratórios possuem os dados de milhões de pacientes, permitindo a implementação do diagnóstico laboratorial personalizado. (4) Aplicativos para o cálculo do próprio intervalo de referência, com base em resultados anteriores do indivíduo, já estão sendo desenvolvidos por alguns grupos de pesquisa. (6) A aplicação do intervalo de referência próprio para cálculo do RCV personalizado pode

ser considerada o elemento essencial da medicina laboratorial preditiva, preventiva e particularmente personalizada. Com a disseminação do conhecimento, os laboratórios poderão apresentar o RCV personalizado no laudo do paciente.

LIMITAÇÕES

Fraser (2012)⁽¹²⁾ relata algumas desvantagens no uso do RCV como a possibilidade de que a) as informações estatísticas sobrecarreguem os profissionais, b) o uso do escore Z obscurece o julgamento clínico, c) o RCV pode depender da frequência do exame, d) alguma variação biológica pode depender do estado de saúde, e) a aplicação adequada requer um sofisticado sistema de gerenciamento de informações laboratoriais, f) é necessária educação da equipe de laboratório e clínicos, e g) a terminologia pode ser confusa.

Outros autores relatam que é necessário cautela no uso do RCV de marcadores tumorais para orientar decisões médicas. (9,22) Rossum e colaboradores (2022)(22) alegam que os estudos de variação biológica são realizados em voluntários saudáveis, normalmente apenas na idade adulta, e mesmo aqueles realizados em estado de doença, nos casos de câncer, sofrem interferência da dinâmica do marcador tumoral que é altamente dependente do tipo de tumor, estágio do tumor, tratamento utilizado, meia-vida do biomarcador etc. Além disso, outra limitação do uso do RCV para marcadores tumorais é que a mudança significativa, baseada em probabilidade estatística (Z), não é de interesse do clínico, que precisa de níveis de decisão médica baseada na probabilidade de um paciente ter uma resposta, ou não, ao tratamento, probabilidade de recorrência do câncer após tratamento curativo ou probabilidade de resistência ao tratamento após resposta inicial.(22)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta revisão, resumimos a aplicação da variação biológica para uso do RCV e a utilização do RCV como apoio na interpretação de resultados laboratoriais consecutivos. Cada indivíduo possui um intervalo "próprio" de valores que abrange apenas uma parte do intervalo de referência comum. Consequentemente, os indivíduos podem ter alterações significativas nos seus resultados e não serem percebidas, pois serão consideradas normais quando avaliadas pelo valor de referência comum. O conhecimento e o uso do RCV auxiliam nesta problemática. No entanto, os dados de variação biológica têm limitações baseadas nas características da população que foi estudada, o que sugere a abordagem do intervalo de referência próprio.

O uso do RCV deve ser tão utilizado quanto os intervalos de referência de base populacional em laboratórios clínicos. O RCV deve estar disponível como uma ferramenta para a tomada de decisão clínica, especialmente no monitoramento de indivíduos.

REFERÊNCIAS

- Tate JR, Johnson R, Barth J, Panteghini M. Harmonization of laboratory testing – Current achievements and future strategies. Clinica Chimica Acta. 2014 May;432:4-7. doi: 10.1016/j.cca.2013.08.021.
- Tan JG, Omar A, Lee WB, Wong MS. Considerations for Group Testing: A Practical Approach for the Clinical Laboratory. The Clinical Biochemist Reviews. 2020 Dec;41(3):79-92. doi: 10.33176/AACB-20-00007.
- Fraser CG. Valores de mudança de referência: o caminho a seguir no monitoramento. Annals of Clinical Biochemistry. 2009 Mar 5;46(3):264-265. doi: 10.1258/acb.2009.009006.
- Coskun A, Sandberg S, Unsal I, Serteser M, Aarsand AK. Personalized reference intervals: from theory to practice. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2022 May 17;1-16. doi: 10.1080/10408363.2022.2070905.
- Coskun A, Zarepour A, Zarrabi A. Physiological Rhythms and Biological Variation of Biomolecules: The Road to Personalized Laboratory Medicine. International Journal of Molecular Sciences. [Internet]. 2023 Mar 27 [cited 2023 Nov 8];24(7):6275. https://doi.org/10.3390/ijms24076275.
- Sandberg S, Carobene A, Bartlett B, Coskun A, Fernandez-Calle P, Jonker N et al.. Biological variation: recent development and future challenges. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2022 Dec 20;61(5):741-50. doi: 10.1515/cclm-2022-1255.
- Johnson P. Setting Analytical Quality Goals with Biological Variation Data. Pearls of Laboratory Medicine. Clinical Chemistry Contents. American Association of Clinical Chemistry: Better health through laboratory medicine. doi: 10.15428/CCTC.2019.310276 Disponível em: https:// www.youtube.com/watch?v=MjlbHq6pMCl. Acesso em: 13/03/2024.
- Ricós C, Álvarez V, Perich C, Fernández-Calle P, Minchinela J, Cava F, Biosca C et al.. Rationale for using data on biological variation. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2015 [cited 2024 Sep 16];53(6).
- Dittadi R, Fabricio A, Gion M. Biological variation and reference change value as decision criteria in clinical use of tumor biomarkers. Are they really useful? Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2022 Mar;60(6)e136-e137.
- Badrick T. Biological variation: Understanding why it is so important? Practical Laboratory Medicine.2021 Jan 4;23:e00199. doi: 10.1016/j.plabm.2020.e00199.
- Fraser CG. Making better use of differences in serial laboratory results.
 Annals of Clinical Biochemistry. 2012 Jan;49(Pt 1):1-3. doi: 10.1258/acb.2011.011203.
- Fraser C. Reference change values. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2012 May;50(5): 807-812. doi: 10.1515/cclm.2011.733
- Braga F, Panteghini M. Generation of data on within-subject biological variation in laboratory medicine: an update. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2016 Mar;53(5):313-25. doi: 10.3109/10408363.2016.1150252

- Klatt EC. Cognitive factors impacting patient understanding of laboratory test information. Journal of Pathology Informatics. 2024 Dec 1;15:100349. doi: 10.1016/j.jpi.2023.100349.
- 15. Harris EK, Yasaka T. On the calculation of a "reference change" for comparing two consecutive measurements. Clinical Chemistry, v. 29, n. 1, p. 25-30, 1983 Jan.
- Åsberg A, Lian IA, Odsæter IH, Mikkelsen G. Testing the limits: the diagnostic accuracy of reference change values. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. 2021 Mar;81(4):318-323. doi: 10.1080/00365513.2021.1904517.
- Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 1989 Jan;27(5):409-37. doi: 10.3109/10408368909106595.
- Fokkema MR, Herrmann Z, Muskiet FA, Moecks J. Reference change values for brain natriuretic peptides revisited. Clinical Chemistry. 2006 Aug;52(8):1602-3. doi: 10.1373/clinchem.2006.069369.
- 19. Feitosa MS, Bücker DH, Santos SME, Vasconcellos LS. Implementation of criteria for automatic release of clinical chemistry test results in a laboratory at an academic public hospital / Implantação de critérios de liberação automática de resultados de bioquímica em um laboratório de hospital público universitário. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2016 May;52(3): 149-156.
- Fernandez DC, Avinash SS, Malathi M, Shivashankara AR, Kumar A, Fernandez PA. Establishing the reference change values (RCVs) and validating the delta check auto-verification in a clinical biochemistry laboratory. Muller Journal of Medical Sciences and Research. 2017 Jan-Jun;8(1):p 42-46, doi: 10.4103/0975-9727.199363.
- Jones GR, Chung JZ. Cálculo de valores de mudança de referência usando mais de dois resultados é uma tarefa difícil: uma resposta. Annals of Clinical Biochemistry. 2017 May;54(3):414-415. doi: 10.1177/0004563217690177.
- Rossum H, Meng Q, Ramanathan L, Holdenrieder S. A word of caution on using tumor biomarker reference change values to guide medical decisions and the need for alternatives. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2021 Oct;60(4): 553-555. doi: 10.1515/cclm-2021-0933.

Reference Change Value: A laboratory tool for interpreting test results

Reference Change Value: Uma ferramenta do laboratório para interpretar resultados de exames

Flávia Martinello¹, Alice Berlanda Seidler², Mauren Isfer Anghebem³

- ¹ Farmacêutica, Pós-doutora em Análises Clínicas, Professora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.
- ² Estudante, Graduanda em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.
- ³ Farmacêutica, Doutora em Ciências Farmacêuticas/Análises Clínicas, Professora Adjunta da Escola de Medicina e Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica e Professora Adjunta do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná/UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

Abstract

This narrative review aimed to highlight the importance of each phase of a laboratory test in interpreting quantitative results. In the post-analytical phase, test result interpretation is achieved through comparisons with reference intervals derived from healthy populations, with these comparisons being either cross-sectional or longitudinal. Longitudinal comparisons, which contrast recent results with previous ones from the same patient, are essential for monitoring health progression, and the introduction of individualized reference concepts enhances the precision of this assessment. Physiological rhythms, such as ultradian and circadian rhythms, influence laboratory results, necessitating standardization in the pre-analytical process. Additionally, biological variation, classified as within-subject and between-subject, is crucial for understanding fluctuations in results. The index of individuality (II) is another relevant factor, as it determines the usefulness of population-based reference intervals, which may be unsuitable for parameters with high individuality. Lastly, the concept of "reference change value" (RCV) and a practical example are presented as important tools to assess the significance of changes in laboratory results, particularly in sequential tests. The RCV is defined as the statistically significant difference between two results from the same individual, taking measurement error into account. This difference is referred to as the critical difference. Available formulas for calculating the RCV are presented, emphasizing the knowledge of analytical imprecision, obtained through the coefficient of variation from internal quality control results. The review also highlights the limitations and challenges in applying RCV, suggesting the adoption of personalized reference intervals for enhanced accuracy in result interpretation.

Keywords: Reference change value, Biological variation, Imprecision, Post-analytical phase, Laboratory results, Personalized reference interval.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi destacar a importância de cada uma das fases de um exame laboratorial para a interpretação dos resultados quantitativos. Na fase pós-analítica, a interpretação dos resultados dos exames é feita por comparação com intervalos de referência obtidos de populações saudáveis, sendo essas comparações transversais ou longitudinais. As comparações longitudinais, que comparam resultados recentes com anteriores de um mesmo paciente, são fundamentais para monitorar a evolução da saúde, e a introdução do conceito de referência individualizada melhora a precisão dessa avaliação. Os ritmos fisiológicos, como ultradianos e circadianos, afetam os resultados laboratoriais, exigindo padronização no processo pré-analítico. Além disso, a variação biológica, classificada em intrapessoal e interindividual, é crucial para entender as oscilações nos resultados. O índice de individualidade (II) é outro fator relevante, pois determina a utilidade dos intervalos de referência populacionais, que podem ser inadequados para parâmetros com alta individualidade. Por fim, o conceito de "reference change value" (RCV) e um exemplo prático são apresentados como uma ferramenta importante para avaliar a significância de mudanças nos resultados laboratoriais, especialmente em exames consecutivos. O RCV é definido como a diferença estatisticamente significativa existente entre dois resultados do mesmo indivíduo, levando em consideração o erro de medida. Essa diferença é chamada de diferença crítica. São apresentadas as fórmulas disponíveis para cálculo do RCV, com o destaque para o conhecimento da imprecisão analítica, obtido pelo coeficiente de variação dos resultados de controle interno da qualidade. A revisão também destaca as limitações e desafios na aplicação do RCV, sugerindo a adoção de intervalos de referência personalizados para maior precisão na interpretação dos resultados.

Palavras-chave: Reference change value, Variação biológica, Imprecisão, Fase pós-analítica, Resultados laboratoriais, Intervalo de referência personalizado.

Correspondence Flávia Martinello

E-mail: flavia.martinello@ufsc.br

Received on Oct 03, 2024 | Approved on Oct 06, 2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400200.en

INTRODUCTION

The stages of a laboratory examination are grouped into phases, as shown in Figure 1, in the following order: Pre-pre-analytical phase, which involves the examination request, patient guidance, and preparation, occurring outside the laboratory; Pre-analytical phase, which includes patient reception and identification, sample collection, storage, transport, and preparation; Analytical phase, which encompasses the examination process along with quality control; Post-analytical phase, which involves preparing the report with any necessary interpretative comments, releasing

the result, and communicating critical values; and the Postpost-analytical phase, which entails interpreting the result and making decisions based on it.^(1,2)

Quantitative laboratory test results are interpreted by comparison with reference values or intervals obtained from a population with a known health status. These comparisons may be cross-sectional or longitudinal. Cross-sectional comparison involves comparing a patient's analyte result with the range of values for that analyte obtained from a group of apparently healthy individuals. This type is known as "population-based" reference intervals and is used for disease diagnosis or screening. Figure 2 illustrates the process of obtaining reference intervals.

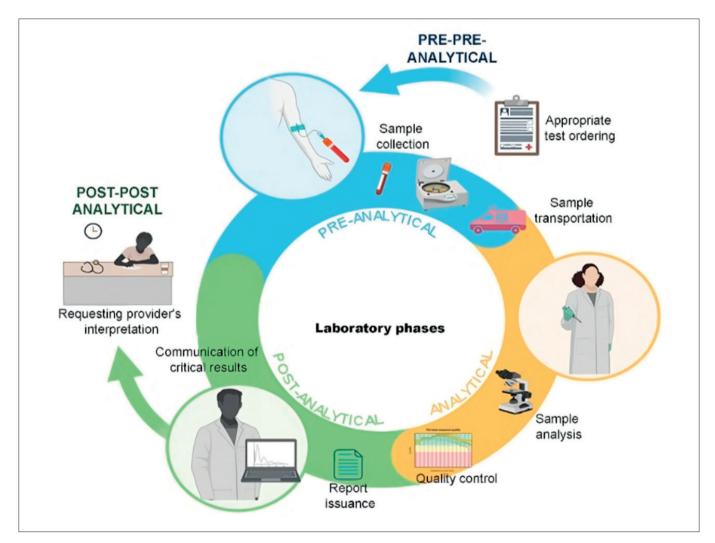


Figure 1

Stages of the laboratory examination process.

Source: Authors

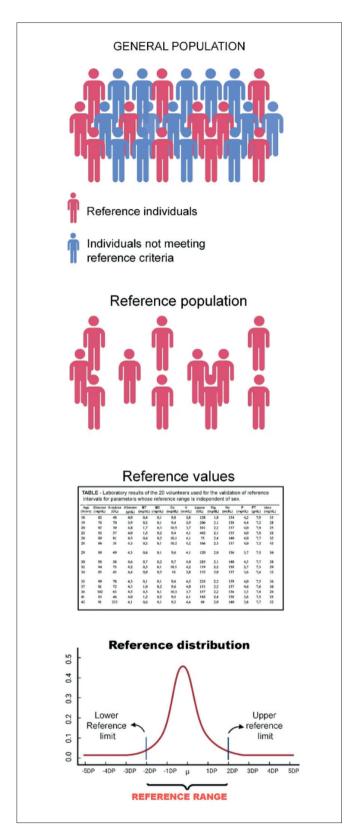


Figure 2

Process of obtaining reference intervals.

Source: Authors.

Conventional population-based reference intervals, whether generated by an individual laboratory or harmonized, are of very limited utility in evaluating an individual's results for screening or diagnosis, as many individuals will have values that are highly atypical for them but still fall within the reference intervals.⁽³⁾

Longitudinal comparisons involve comparing a patient's recent value with previous values for the same analyte. This comparison can help detect a change in health status and is therefore used for patient monitoring. Figure 3 illustrates, in both list and graph form, a patient's past results for analyte X.

Including previous patient results directly in the report enhances quality in the post-analytical phase, as it allows both healthcare professionals and patients to recall prior results and understand the progression of the laboratory marker. In this way, the laboratory treats the patient as their own reference rather than as part of a reference population. Ideally, a patient's test results should be compared to their own individualized reference values—a personalized reference value.⁽⁴⁾

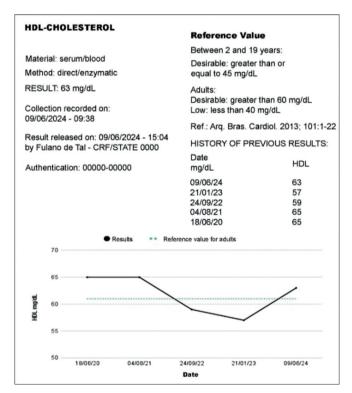


Figure 3

Section of a laboratory report presenting the current result and previous results of a patient in both list and graph form.

Source: Authors

In this context, several factors may influence variations between sequential results for an individual. A result differing from the previous one can stem from pre-analytical, analytical, or biological variation. (5) These three types of variation must be considered to determine whether a change in a result relative to a prior one is significant. (3)

Depending on the study design, biological variation can be classified as intrapersonal biological variation, when studying the variation of an analyte's results in a single individual under a homeostatic equilibrium condition; within-subject biological variation, when studying within-subject variation of an analyte's results across multiple individuals under homeostatic equilibrium conditions; and between-subject biological variation, or biological variation of a group, when studying the variation of an analyte's results among multiple individuals under homeostatic equilibrium conditions. (5)

Intrapersonal biological variation, or within-subject variation, is the variation of an analyte around the individual's homeostatic set point. Also referred to as random biological variation, it cannot be predicted but can be estimated with appropriate statistical methods. The difference between intrapersonal and within-subject biological variation lies in the data sources used to calculate these parameters. Within-subject biological variation is calculated using intrapersonal variations across a group (population), so it is not specific to an individual, while intrapersonal biological variation is obtained from repeated measurements of the same individual and is thus specific to that individual. In recent years, significant progress has been made in deriving, calculating, estimating, and reporting biological variation data and derived parameters.

Random within-subject biological variation of analytes is not synonymous with physiological rhythm. Physiological rhythms are systematic, partially predictable variations and can be classified, based on frequency, as ultradian (<24 hours), circadian (approximately 24 hours), and infradian (>24 hours).⁽⁵⁾

Due to the ultradian rhythms of analytes, the comparison of a current laboratory test result cannot be made against a previous result obtained from a sample collected at a different time of day; for example, if the previous sample was collected in the afternoon and the current one in the morning. For reliable comparisons, the pre-analytical phase must be standardized, meaning it should be very similar, considering factors such as collection time, fasting duration, preparation for collection, collection procedure, lifestyle, and other pre-analytical variables that may affect the test result. Additionally, in some cases, sampling at the same time on consecutive days may not be sufficient to eliminate infradian variations, such as those related to lipids, vitamin D, calcium, etc., especially if the interval between consecutive measurements approaches the infradian periods of the analyte being tested.⁽⁵⁾

Figure 4 illustrates intrapersonal, within-subject and between-subject biological variation of a biochemical analyte.

The European Federation of Laboratory Medicine (EFLM) provides data on biological variation (%) in healthy individuals, following an assessment of study quality, free of charge for users worldwide.⁽⁶⁾

Additionally, there are studies that report the biological variation (%) of certain analytes in individuals with specific disease states. However, for a range of analytes, data is either unavailable or limited. (8,9)

Information on interindividual biological variation is indirectly used to interpret laboratory test results, as it is employed to calculate the individuality index of an analyte. The ratio between within-subject biological variation (CVI) and between-subject biological variation (CVG) is known the individuality index (II). (6) For most individuals, the fluctuation in analyte concentration over time is less than the dispersion of the reference interval; that is, intraindividual biological variation is generally lower than interindividual biological variation, resulting in an II of less than one (1.0). (10)

If the II is below 0.6, the analyte exhibits high individuality, which means that the variation between the individual's results is small relative to the reference interval range, rendering the latter less useful for interpreting the results, as the individual variation is not visible within the population reference interval. In such cases, there is a risk of considering the individual's result as a normal physiological variation when the analyte values are significantly far from their homeostatic set point but still fall within the reference interval. (11,12) Conversely, if the II is above 1.4, the analyte shows low individuality, and the value dispersion in each

individual covers most of the dispersion among individuals represented by the reference interval, making it a useful tool for test interpretation. Generally speaking, the utility of the population reference interval for monitoring patients is limited when the II is below 0.6 and acceptable when the II is above 1.4. For an analyte with an II between 0.6 and 1.4, the use of population reference intervals is at the clinician's discretion.⁽¹³⁾

For example, glycated hemoglobin is an analyte that exhibits high individuality (II = 0.16), meaning that the reference interval (RI) is of limited usefulness, as the individual's variation is not visible within the RI range. On the other hand, blood pH is a parameter with low individuality (1.75), indicating that the reference interval (RI) is quite useful, as even a small variation in the individual becomes apparent within the RI range.

Finally, the analytical variation of the method chosen for measuring the analyte is another variable that can influence the interpretation of consecutive laboratory results, and this information is available only to the laboratory. Analytical variation, also known as analytical precision, represents the dispersion of results from the control sample in the internal quality control of the laboratory test. The precision of the method is calculated using the standard deviation of the mean of the results and is expressed as a percentage in terms of the coefficient of variation (CV) of the mean.

Considering that information on the analytical performance of methods (precision) is proprietary to laboratories, laboratory professionals can actively engage in strategies to enhance the patient experience in healthcare by developing and contributing high-quality data to facilitate timely and meaningful communication and interpretation of test results.⁽¹⁴⁾

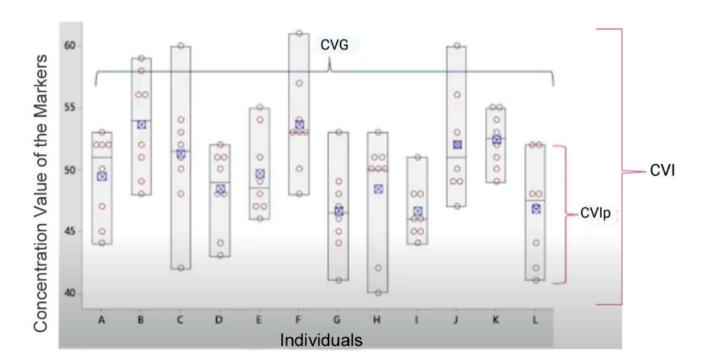


Figure 4

Components of the biological variation of an analyte: intrapersonal, within-subject and between-subject biological variation.

Legend: CVIp: Intrapersonal biological variation coefficient. CVI: within-subject biological variation. CVG: between-subject biological variation.

Source: Adapted from Johnson, 2020.⁽⁷⁾

RCV - REFERENCE CHANGE VALUE

When using traditional reference intervals, an individual's analyte results may shift from within the interval to outside it (and vice versa) without clinical significance, likely prompting unnecessary clinical actions, such as repeat test requests.

A much better way to monitor individuals is by using the RCV, or reference change value, translated into Portuguese as "diferença crítica," "valor de referência para alteração," or "valor de referência mudança." (3) The RCV was introduced by Harris and Yasaka (15) in 1983 and is defined as the statistically significant difference between two results from the same individual, taking measurement error into account. Thus, the RCV serves as a tool for evaluating the significance of differences in serial results for an individual. (16) To conclude that the difference between two consecutive results is significant and may be biologically relevant (indicating a change in health status), the difference must exceed the RCV, hence its designation as the critical difference." (10)

The formula for defining the RCV of each analyte, which depends on the analytical variation of the laboratory method used and the CVI, according to Fraser and Harris (1989)⁽¹⁷⁾, is:

$$RCV = 2^{1/2}x Z x (CVA^2 + CVI^2)^{1/2}$$

where CVA is the analytical variation coefficient of the measurement method for the specific analyte, CVI is the within-subject biological variation coefficient, and Z=1.65 for p<0.1, 1.96 for p<0.05, or 2.33 for p<0.01.

Considering that the calculation of the RCV was initially proposed for measurements with a symmetrical or Gaussian (also known as normal) distribution, over the years, other authors have advocated that the approach of converting the RCV to a natural logarithm (In-RCV) should be primarily used when measured values are considered normally distributed after In transformation. Consequently, other methods for calculating the RCV have emerged for asymmetrically distributed measurements. (11,18)

With the asymmetrical approach, the deviation (σ) of the log-normal distribution of the total variation coefficient (CVT) is calculated using the formula:

$$\sigma = [ln((CVT/100)^2 + 1)]^{1/2}$$
 where CVT=[(CVI² + CVA²)]^{1/2}

This approach results in asymmetrical RCV limits. The asymmetrical critical difference limit for an increase (positive

RCV) and for a decrease (negative RCV) in laboratory results is determined by the following formulas, respectively:

RCV pos =
$$[\exp(1.96 \times 2^{1/2} \times \sigma) - 1] \times 100$$

RCV neg =
$$[\exp(-1.96 \times 2^{1/2} \times \sigma) - 1] \times 100$$

In practice, the difference is that the symmetrical RCV yields a single value as the critical difference, whereas the asymmetrical RCV yields two: one to be exceeded when there is an increase in the result and another for a decrease in the patient's result. When the CVT is < 5–10%, the symmetrical and asymmetrical formulas will yield similar results, as illustrated in the practical example below.

Regardless of the chosen formula, the within-subject biological variation coefficient from the EFLM database (https://biologicalvariation.eu/) is used when the intrapersonal biological variation coefficient is unknown.

The EFLM database itself operates by initially requiring a search for the analyte (which must be entered in English). Next, the biological variation data for the analyte is displayed, along with an option to select the RCV calculation (Figure 5). For the calculation, you must enter the analyte's CVA from your laboratory, and the asymmetrical RCV will automatically be presented.

Additionally, it is important to note that, although the CVI can be assumed constant as it does not frequently change, the CVA (analytical imprecision) varies across laboratories and methods. Table 1 shows that the RCV depends on the CVA and that this relationship is non-linear, using an example for capillary glucose with a hypothetical CVI of 3.8% and a 95% confidence interval (z=1.65).

Additionally, some studies present the RCV used in the laboratory as a critical difference for the automatic release of patient results based on previous results, also referred to as a delta-check. (19,20) However, it is important to note that each laboratory has its specific RCV for each analyte, as it depends on the laboratory's analytical variation. As an illustration, the influence of analytical variation is shown in Table 2, (12) which presents the probability of a 15% change in total cholesterol results (CVI 6%) relative to a previous result being significant, depending on the CVA.

In practice, there are often more than two sequential results available for an individual, allowing for the calculation of the significance of changes between each pair of consecutive measurements.⁽²¹⁾

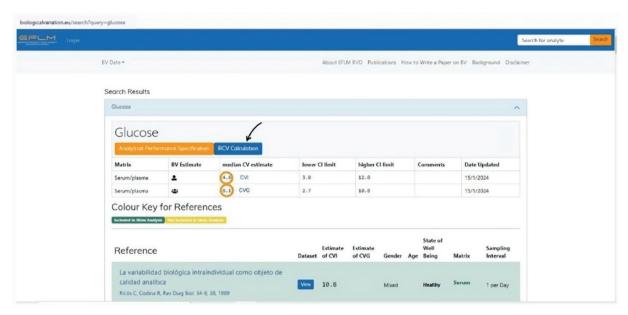


Figure 5

Biological variation database website of the European Federation of Laboratory Medicine (EFLM).

Legend: The orange circles indicate the CVI and CVG of the queried analyte. The black arrow indicates where to access the RCV calculation for the analyte, taking into account the laboratory's CVA.

Source: https://biologicalvariation.eu/search?query=glucose

Table 1

RCV for capillary glucose, considering a hypothetical within-subject biological variation coefficient (CVI) of 3.8% at different levels of analytical imprecision (p<0.05).

| Imprecision (CVA, %) | RCV (%) |
|----------------------|---------|
| 1.0 | 9.2 |
| 2.0 | 10.0 |
| 3.0 | 11.3 |
| 4.0 | 12.9 |
| 5.0 | 14.7 |
| 6.0 | 16.6 |

Table 2

Probability of a 15% change in total cholesterol results being significant at different levels of analytical imprecision.

| Imprecision (CVA, %) | Probability of Significant Change(%) |
|----------------------|--------------------------------------|
| 2.0 | 95 |
| 4,0 | 93 |
| 6.0 | 90 |
| 8.0 | 86 |
| 10 | 82 |

CVA: analytical coefficient of variation. Source: Fraser, 2012. (12)

PRACTICAL EXAMPLE

Considering a hypothetical CVA for glucose analysis of 4% and a hypothetical CVI for capillary glucose of 3.8%, the symmetrical RCV would be calculated as follows:

Critical difference with 90% confidence:

RCV =
$$2^{1/2}$$
x Z x (CVA² + CVI²)^{1/2}
RCV = 1.414 x 1.65 x (4² + 3.8²)^{1/2}
RCV = 12.9%

Critical difference with 95% confidence:

RCV =
$$2^{1/2}x$$
 Z x (CVA² + CVI²)^{1/2}
RCV = 1.414 x 1.96 x (4² + 3.8²)^{1/2}
RCV = 15.3%

Critical difference with 99% confidence:

RCV =
$$2^{1/2}$$
x Z x (CVA² + CVI²)^{1/2}
RCV = 1.414 x 2.58 x (4² + 3.8²)^{1/2}
RCV = 20.1%

The different probabilities (Z) in the confidence of the critical difference mean that the more the healthcare professional wants to trust the RCV, the greater it will be.

To calculate the asymmetrical RCV, the total coefficient of variation (CVT) must be calculated in decimal values:

And the standard deviation of the CVT must be calculated as:

$$\begin{split} \sigma &= [ln((CVT/100)^2 + 1)]^{1/2} \\ \sigma &= [ln(0.0552^2 + 1)]^{1/2} \\ \sigma &= [ln(0.0552^2 + 1)]^{1/2} \\ \sigma &= [ln(0.003 + 1)]^{1/2} \\ \sigma &= [ln(1.003)]^{1/2} \\ \sigma &= [0.00299]^{1/2} \\ \sigma &= 0.0547 \end{split}$$

The asymmetric RCV, or the difference considered critical for an increase in the result, should be calculated as:

RCV pos =
$$[\exp(1.96 \times 2^{1/2} \times \sigma) - 1] \times 100$$

RCV pos = $[\exp(1.96 \times 1.414 \times 0.0547) - 1] \times 100$
RCV pos = $[\exp(0.1516) - 1] \times 100$

RCV pos =
$$[1.1636 - 1] \times 100$$

RCV pos = $[0.1636] \times 100$
RCV pos = 16.36%

And the difference considered critical for a decrease in the result as:

RCV neg =
$$[\exp(-1.96 \times \sqrt{2} \times \sigma) - 1] \times 100$$

RCV neg = $[\exp(-1.96 \times 1.414 \times 0.0547) - 1] \times 100$
RCV neg = $[\exp(-0.1516) - 1] \times 100$
RCV neg = $[0.8593 - 1] \times 100$
RCV neg = $[-0.1406] \times 100$
RCV neg = -14.06%

In a hypothetical situation where a patient, who had a blood glucose level of 152 mg/dL three months ago, started oral hypoglycemic treatment with a daily dose of 2.5 mg of glibenclamide and subsequently returned for a follow-up test showing a result of 133 mg/dL (a reduction of 12.5%), the question arises: is this reduction significant? Considering both symmetric and asymmetric calculated RCV, the reduction is not significant, as the difference should exceed 15.3% or 14.06%. Thus, it is first necessary to assess the patient's adherence to the medication regimen. If adherence is confirmed, the treatment should be complemented with non-pharmacological approaches, such as introducing physical activity and/or dietary modifications, or adjusting the daily medication dose.

This approach enables a personalized interpretation of the patient's results, based on within-subject biological variation data and laboratory information, including the previous result and the analytical coefficient of variation.

PERSPECTIVES

The reference interval based on the homeostatic model can be calculated using an individual's previous test results obtained under a clinical steady-state condition, that is, by understanding the individual's intrapersonal biological variation. With advancements in information technology, laboratories now have data from millions of patients, enabling the implementation of personalized laboratory diagnostics. ⁽⁴⁾ Applications for calculating individualized reference intervals, based on an individual's previous results, are already being developed by some research groups. ⁽⁶⁾The use of personalized reference intervals for calculating customized RCV can be considered a fundamental element of predictive, preventive,

and particularly personalized laboratory medicine. With the dissemination of this knowledge, laboratories may be able to present personalized RCV in patient reports.

LIMITATIONS

Fraser (2012)⁽¹²⁾ reports several disadvantages in the use of RCV, including the possibility that a) statistical information may overwhelm professionals, b) the use of the Z-score could obscure clinical judgment, c) RCV may depend on test frequency, d) some biological variation might depend on health status, e) proper application requires a sophisticated laboratory information management system, f) laboratory staff and clinicians need further education, and g) terminology can be confusing.

Other authors indicate that caution is necessary when using RCV for tumor markers to guide medical decisions. ^(9,22) Rossum and colleagues (2022)⁽²²⁾ argue that studies on biological variation are conducted in healthy volunteers, typically only in adulthood, and even those conducted in disease states, such as cancer cases, are affected by the dynamics of the tumor marker, which is highly dependent on the tumor type, stage, treatment used, biomarker half-life, etc. Furthermore, another limitation of using RCV for tumor markers is that the significant change, based on statistical probability (Z), is not necessarily of interest to the clinician, who needs medical decision levels based on the probability of a patient responding to treatment, the likelihood of cancer recurrence after curative treatment, or the probability of resistance to treatment after an initial response. ⁽²²⁾

FINAL CONSIDERATIONS

In this review, we summarize the application of biological variation in using RCV and the role of RCV in supporting the interpretation of consecutive laboratory results. Each individual has a "personal" range of values that encompasses only a portion of the common reference interval. Consequently, individuals may experience significant changes in their results that go unnoticed, as these changes are considered normal when evaluated against the common reference interval. Knowledge and use of RCV assist in addressing this issue. However, biological variation data have limitations based on the characteristics of the studied population, which suggests the approach of a personalized reference interval.

The use of RCV should be as prevalent as population-based reference intervals in clinical laboratories. RCV should be available as a tool for clinical decision-making, especially in the monitoring of individual patients.

REFERENCES

- Tate JR, Johnson R, Barth J, Panteghini M. Harmonization of laboratory testing – Current achievements and future strategies. Clinica Chimica Acta. 2014 May;432:4-7. DOI: 10.1016/j.cca.2013.08.021.
- Tan JG, Omar A, Lee WB, Wong MS. Considerations for Group Testing: A Practical Approach for the Clinical Laboratory. The Clinical Biochemist Reviews. 2020 Dec;41(3):79-92. DOI: 10.33176/AACB-20-00007.
- Fraser CG. Valores de mudança de referência: o caminho a seguir no monitoramento. Annals of Clinical Biochemistry. 2009 Mar 5;46(3):264-265. DOI: 10.1258/acb.2009.009006.
- Coskun A, Sandberg S, Unsal I, Serteser M, Aarsand AK. Personalized reference intervals: from theory to practice. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2022 May 17;1-16. DOI: 10.1080/10408363.2022.2070905.
- Coskun A, Zarepour A, Zarrabi A. Physiological Rhythms and Biological Variation of Biomolecules: The Road to Personalized Laboratory Medicine. International Journal of Molecular Sciences. [Internet]. 2023 Mar 27 [Cited Nov. 8, 2023];24(7):6275. DOI: 10.3390/ijms24076275.
- Sandberg S, Carobene A, Bartlett B, Coskun A, Fernandez-Calle P, Jonker N et al.. Biological variation: recent development and future challenges. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2022 Dec 20;61(5):741-50. DOI: 10.1515/cclm-2022-1255.
- Johnson P. Setting Analytical Quality Goals with Biological Variation Data. Pearls of Laboratory Medicine. Clinical Chemistry Contents. American Association of Clinical Chemistry: Better health through laboratory medicine. DOI: 10.15428/CCTC.2019.310276 Available at: https://www. youtube.com/watch?v=MjlbHq6pMCI. Accessed: March 13, 2024.
- Ricós C, Álvarez V, Perich C, Fernández-Calle P, Minchinela J, Cava F, Biosca C et al.. Rationale for using data on biological variation. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2015 [Cited Sep. 16, 2024];53(6).
- Dittadi R, Fabricio A, Gion M. Biological variation and reference change value as decision criteria in clinical use of tumor biomarkers. Are they really useful? Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2022 Mar;60(6)e136-e137.
- Badrick T. Biological variation: Understanding why it is so important? Practical Laboratory Medicine.2021 Jan 4;23:e00199. DOI: 10.1016/j. plabm.2020.e00199.
- Fraser CG. Making better use of differences in serial laboratory results. Annals of Clinical Biochemistry. 2012 Jan;49(Pt 1):1-3. DOI: 10.1258/acb.2011.011203.
- Fraser C. Reference change values. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2012 May;50(5): 807-812. DOI: 10.1515/cclm.2011.733
- Braga F, Panteghini M. Generation of data on within-subject biological variation in laboratory medicine: an update. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2016 Mar;53(5):313-25. DOI: 10.3109/10408363.2016.1150252
- Klatt EC. Cognitive factors impacting patient understanding of laboratory test information. Journal of Pathology Informatics. 2024 Dec 1;15:100349. DOI: 10.1016/j.jpi.2023.100349.
- Harris EK, Yasaka T. On the calculation of a "reference change" for comparing two consecutive measurements. Clinical Chemistry, v. 29, n. 1, p. 25-30, 1983 Jan.

- Åsberg A, Lian IA, Odsæter IH, Mikkelsen G. Testing the limits: the diagnostic accuracy of reference change values. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. 2021 Mar;81(4):318-323. DOI: 10.1080/00365513.2021.1904517.
- Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 1989 Jan;27(5):409-37. DOI: 10.3109/10408368909106595.
- Fokkema MR, Herrmann Z, Muskiet FA, Moecks J. Reference change values for brain natriuretic peptides revisited. Clinical Chemistry. 2006 Aug;52(8):1602-3. DOI: 10.1373/clinchem.2006.069369.
- 19. Feitosa MS, Bücker DH, Santos SME, Vasconcellos LS. Implementation of criteria for automatic release of clinical chemistry test results in a laboratory at an academic public hospital / Implantação de critérios de liberação automática de resultados de bioquímica em um laboratório de hospital público universitário. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2016 May;52(3): 149-156.
- Fernandez DC, Avinash SS, Malathi M, Shivashankara AR, Kumar A, Fernandez PA. Establishing the reference change values (RCVs) and validating the delta check auto-verification in a clinical biochemistry laboratory. Muller Journal of Medical Sciences and Research. 2017 Jan-Jun;8(1):p. 42-46, DOI: 10.4103/0975-9727.199363.
- Jones GR, Chung JZ. Cálculo de valores de mudança de referência usando mais de dois resultados é uma tarefa difícil: uma resposta. Annals of Clinical Biochemistry. 2017 May;54(3):414-415. DOI: 10.1177/0004563217690177.
- 22. Rossum H, Meng Q, Ramanathan L, Holdenrieder S. A word of caution on using tumor biomarker reference change values to guide medical decisions and the need for alternatives. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2021 Oct;60(4): 553-555. DOI: 10.1515/cclm-2021-0933.

Estimativas de incerteza de medição associada ao Laboratório Clínico e suas implicações na prática clínica

Estimates of measurement uncertainty associated with Clinical Laboratories and their implications for clinical practice

José Robson Venturim¹, Luiza Valli Vieira²

- 1 Grupo Tommasi Laboratórios, Diretor Técnico, Farmacêutico-Bioquímico; Especialista em Análises Clínicas e Mestre em Patologia Geral das Doencas
- ² Grupo Tommasi Laboratórios, Coordenadora/Responsável Técnica Cromatografia, Doutora em Química.

Resumo

A incerteza de medição pode ser caracterizada como um intervalo de valores que, dentro de um intervalo de confiança, abrange o valor verdadeiro do mensurando. A estimativa dessa incerteza requer uma série de cálculos matemáticos e estatísticos, fundamentados na validação e verificação dos métodos analíticos empregados no laboratório. Uma avaliação adequada da incerteza de medição em análises clínicas é um dos fatores mais importantes para uma interpretação confiável dos resultados. Diversas diretrizes indicam a necessidade de uma avaliação adequada da incerteza dos resultados de medição na prática laboratorial de rotina. Os documentos disponíveis geralmente recomendam a participação nos programas de proficiência/controle externo da qualidade, bem como a realização de controle interno da qualidade, a fim de verificar sobretudo o desempenho da qualidade do método. Embora todos os documentos atendam aos requisitos da Norma Internacional, ISO 15189, a norma em si não define claramente o método pelo qual os resultados de medição precisam ser avaliados e não há harmonização na prática em relação a isso. Além disso, a incerteza de medição de um resultado é um dado que compõe o conjunto das variações relacionadas ao próprio resultado medido, de forma que todos os fatores que influenciam a interpretação do valor medido utilizado para diagnóstico e monitoramento do tratamento do paciente possam ser levados em consideração. Portanto, em análises clínicas, uma avaliação adequada da incerteza dos resultados de medição deve ter o objetivo final de reduzir a incerteza diagnóstica.

Palavras-chave: Incerteza de medição. Estudo de Validação. Controle de Qualidade. Exames Laboratoriais. Laboratório Clínico. Abordagem bottom-up. Abordagem top-down.

Abstract

Measurement uncertainty can be characterized as an interval of values that, within a confidence interval, encompasses the true value of the measurand. Estimating this uncertainty requires a series of mathematical and statistical calculations, based on the validation and verification of the analytical methods employed in the laboratory. An adequate assessment of measurement uncertainty in clinical analyses is one of the most important factors for the reliable interpretation of results. Various guidelines highlight the necessity of properly evaluating the uncertainty of measurement results in routine laboratory practice. Available documents generally recommend participation in proficiency testing/external quality control programs, as well as the implementation of internal quality control, primarily to verify the quality performance of the method. Although all documents comply with the requirements of the International Standard ISO 15189, the standard itself does not clearly define the method by which measurement results should be assessed, and there is no harmonization in practice regarding this matter. Furthermore, the measurement uncertainty of a result constitutes part of the set of variations related to the measured value itself, ensuring that all factors influencing the interpretation of the measured value used for diagnosis and treatment monitoring are considered. Therefore, in clinical analyses, a proper evaluation of measurement uncertainty should ultimately aim to reduce diagnostic uncertainty.

Keywords: Measurement uncertainty. Validation study. Quality control. Laboratory tests. Clinical laboratory. Bottom-Up approach. Top-down approach.

Correspondência José Robson Venturim E-mail: jrventurim@tommasi.com.br

Recebido em 01/11/2024 | Aprovado em 15/11/2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400216.pt

INTRODUÇÃO

Uma medição é um ato de estabelecer um valor numérico a uma grandeza específica, através de algum processo de experimentação. (1) Nesse processo, o valor encontrado (ou seja, o resultado) é dado com base em uma comparação com um padrão conhecido, sendo, portanto, uma estimativa. Entretanto, é preciso entender que toda medição apresenta um componente denominado "incerteza de medição", que é parte integrante do valor apresentado como resultado da medição. É importante ressaltar que incerteza de medição é diferente de erro de medição (EM), definido como a "diferença entre o valor obtido e o valor verdadeiro, quando este for disponível".(1)

A incerteza de medição (MU, do inglês *measurement uncertainty*) é um parâmetro que quantifica a dúvida associada ao resultado de uma medição. Por definição, o VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia) define a incerteza de medição como "o parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas". Em outras palavras, a MU indica a faixa dentro da qual o valor verdadeiro da medição provavelmente se encontra, uma vez que, como não se trata de um parâmetro negativo ou nulo, sempre haverá um conjunto de incertezas (Incerteza expandida, designada por "U") associada ao valor quantitativo do mensurando. A MU é uma estimativa que quantifica a confiabilidade dos resultados de uma medição, de forma que quanto maior a incerteza, menor a confiabilidade do resultado.

A informação obtida através do processo de medição permite atribuir ao mensurando apenas um "intervalo de valores razoáveis". Informações adicionais relevantes podem reduzir a amplitude desse intervalo (diminuindo a incerteza) que pode ser atribuído ao mensurando. No entanto, mesmo a medição mais precisa não é capaz de reduzir o intervalo a um único valor, em razão da quantidade finita de detalhes na definição do mensurando.⁽¹⁾

O resultado de uma medição é composto pelo resultado-base (RB) e a faixa (*range*) formada pela MU, para mais e para menos. O valor verdadeiro está contido dentro desta faixa, sendo, idealmente, o mais próximo possível do ponto central, onde está o RB, ou seja, quanto menor for a MU mais próximos estarão o valor verdadeiro e o RB.⁽¹⁾

A Figura 1 ilustra a disposição de um resultado obtido em uma medição (resultado-base, ou RB), o valor verdadeiro

e a amplitude de possíveis valores em torno do RB, considerando a MU.

A incerteza é um conceito estatístico que reflete os efeitos de diversos fatores que surgem durante os processos de medição, impactando os resultados obtidos. (5) Segundo a Diretriz CLSI EP29-A (Clinical and Laboratory Standards Institute) (5), a incerteza define um intervalo no qual se espera que o valor real da medição esteja com um nível de confiança especificado. Na prática dos processos de medição e avaliação do desempenho analítico existem três tipos principais de incerteza: padrão, combinada e expandida. (5)

A incerteza padrão refere-se à imprecisão determinada em laboratório, ao passo que a incerteza combinada associa outras possíveis fontes e a incerteza expandida leva em consideração o intervalo de confiança desejado para a aplicação da medição. Avaliar a incerteza de medição dos resultados laboratoriais é crucial para verificar o desempenho do sistema de medição. A incerteza proporciona aos profissionais de laboratório uma compreensão mais profunda do desempenho e das limitações de seus métodos, permitindo a identificação de etapas técnicas nas quais a incerteza pode ser potencialmente reduzida. Para a segurança dos pacientes, é essencial que a maioria dos exames laboratoriais esteja dentro da meta analítica de seu uso clínico, pois isso pode influenciar significativamente a capacidade do clínico de avaliar corretamente os pacientes.⁽⁵⁾

A incerteza pode surgir de várias fontes, como de instrumentos de medição, envolvendo suas limitações e precisão dos dispositivos utilizados, nível de automatização dos equipamentos e padronização de métodos analíticos comerciais em contraposição a metodologias desenvolvidas e validadas no próprio laboratório; condições ambientais, como variações de temperatura, umidade etc.; métodos de medição, como os procedimentos, metodologias, protocolos e técnicas; diferenças individuais do operador, como habilidade e experiência da pessoa que realiza a medição, sobretudo em metodologias não automatizadas.⁽⁶⁾

Compreender e especificar a incerteza é crucial para garantir a confiabilidade e a comparabilidade dos resultados, especialmente em áreas como laboratórios clínicos, onde decisões importantes são baseadas nesses dados. A Figura 2 fornece uma visão em formato de diagrama de causa e efeito, do tipo "espinha de peixe", exemplificando uma situação hipotética na qual as fontes de incertezas, de uma medição laboratorial, fossem estudadas.

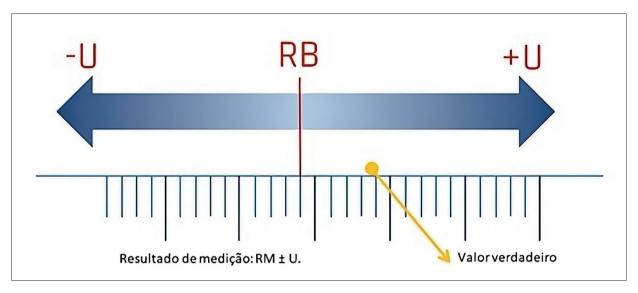


Figura 1

Demonstração da distribuição dos componentes de uma medição.

 $\textit{Legenda}: \texttt{RB, resultado-base}; \texttt{U, incerteza expandida}; \texttt{RM, resultado da medi} \\ \texttt{\'e} \\ \texttt{o.} \textit{Fonte}: \texttt{ACC, 2024}. \\ \texttt{\cite{ACC, 2024}} \\ \texttt{\cite{ACC, 2024}}. \\ \texttt{\cite$

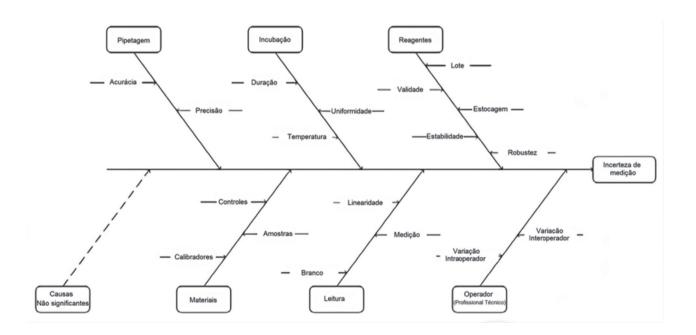


Figura 2

Demonstração esquemática da identificação das fontes de incertezas visando a determinação da incerteza de medição (MU) de um exame laboratorial.

Fonte: Pereira, 2016.(6)

Estimar e quantificar a incerteza nas medições é crucial para os laboratórios clínicos por várias razões, sendo as principais as características de precisão e confiabilidade. A incerteza ajuda a determinar a precisão e a confiabilidade dos resultados dos exames laboratoriais, sendo essencial, portanto, para garantir que os diagnósticos e tratamentos baseados nesses resultados sejam corretos, pelas inferências clínicas atribuídas a esses resultados laboratoriais, influenciando diretamente em tomadas de decisão clínica.⁽⁷⁾ Além disso, outro requisito importante, uma vez determinadas as incertezas de medição e apresentadas junto aos resultados, é a comparabilidade, pois permite a comparação de resultados entre diferentes laboratórios e métodos analíticos. Sem uma estimativa de incerteza, seria difícil saber se as diferenças nos resultados são significativas ou apenas variações normais. Para adequação aos padrões de qualidade para atendimento de normas e legislações, a especificação da incerteza é um requisito de normas internacionais, como a ISO 15189-2012, ou mesmo normas nacionais como a 8ª edição do Manual do Sistema Nacional de Acreditação do Departamento de Inspeção e Credenciamento da Qualidade (SNA/DICQ) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC), em seu item 5.5.1.4, sendo que cumprir esses padrões é fundamental para a acreditação e reconhecimento dos laboratórios clínicos. (7)

A história do controle da qualidade em análises clínicas, especialmente na bioquímica clínica, é extensa e rica. Fundamentalmente, existem dois aspectos principais que são monitorados de forma rotineira: imprecisão, também conhecida como erro aleatório, e a inexatidão, também chamado viés, bias ou erro sistemático dos resultados. A sistemática de controle interno da qualidade (CIQ) é essencialmente voltada para avaliar a imprecisão, enquanto o controle externo da qualidade (CEQ), sobretudo os ensaios de proficiência (EP), tem como objetivo avaliar a inexatidão. A origem dos conceitos e aplicabilidade do CEQ remonta ao final da década de 1940, a partir da publicação de Belk e Sunderman.⁽⁸⁾ Por outro lado, o CIQ evoluiu gradualmente ao longo dos anos, especialmente a partir da década de 1970, quando Westgard, Groth e de Verdier introduziram simulações como uma ferramenta científica para avaliar e projetar regras de controle. (6)

O desempenho de um laboratório pode ser descrito de maneira satisfatória em termos de erros aleatórios e sistemáticos. A métrica conhecida como "erro total" (TE, do inglês *total error*), definida como o "efeito líquido do viés e da imprecisão do método", incorpora ambos os tipos de erro. ⁽⁹⁾ No entanto, uma objeção comum ao TE é que, se um viés conhecido está incluído, por que mantê-lo? Além disso, o viés

possui um sinal, enquanto a imprecisão é uma característica de uma distribuição. Portanto, as quantidades incluídas no TE não são realmente comparáveis.⁽¹⁰⁾

DETERMINAÇÃO DAS INCERTEZAS DE MEDIÇÃO

Planejamento da determinação da incerteza de medição

Tal qual a validação de métodos laboratoriais, antes de sua aplicação na prática laboratorial, a determinação da estimativa da incerteza de medição também requer um planejamento e uma sequência de avaliações. (6) Métodos desenvolvidos em laboratórios de pesquisa e desenvolvimento (P&D), "in house" ou modificações muito extensas de métodos já validados necessitam de um processo de validação mais amplo e pormenorizado, diferentemente de métodos comerciais, validados por fabricantes e registrados em órgãos reguladores (ANVISA, FDA etc.).

No bojo do processo de validação analítica, vários dos processos necessários para a obtenção de dados utilizados na determinação da MU já serão realizados, sobretudo se a abordagem utilizada for a do tipo "bottom-up", preconizada pelo guia para a expressão de incerteza de medição (GUM). No âmbito dos laboratórios clínicos, nos quais a maioria dos métodos utilizados já são padronizados, registrados e validados por fabricantes na forma de kits ou sistemas analíticos, as abordagens do tipo "top-down" têm sido mais aplicáveis, sobretudo considerando as limitações de informações a respeito do desenvolvimento dos métodos, por questão de patentes e restrições de segredo industrial, mas também pela dificuldade de obtenção de material de referência certificado (MRC) ou padrões de referência certificados (SRC). (11)

Uma vez escolhida a estratégia e considerando as características do mensurando e do sistema analítico, o planejamento da determinação da MU consiste em:

- Descrição do mensurando, faixa (range) de medição, valor limite de MU.
- Identificar e quantificar os componentes de incertezas (Quantificar o componente de incerteza padrão para a reprodutibilidade intralaboratorial (u_{Rw}); Quantificar o componente de incerteza associado ao método e viés do laboratório (u_{bia})).
- Converter as diferentes incertezas para valores de desvio-padrão do mensurando, por meio de suas variâncias.
- Determinar a incerteza padrão combinada (u_c), pela soma quadrática das incertezas padrão individuais.
- Calcular a incerteza expandida (U) considerando o fator estatístico de abrangência (k).

O fator k pode variar devido a alguns fatores, um dos principais é a precisão do item em mensuração, pois se o item não apresentar boa repetibilidade maior será a interferência no intervalo de confiança, aumentando o valor de k, o qual varia conforme os graus de liberdade efetivos adotados, conforme ilustrado na Figura 3.

O fator de abrangência k multiplica a incerteza padrão combinada para chegarmos a um nível de confiança de até

99,73% de abrangência, mas o mais utilizado é de 95,45%, ou seja, \pm 2 DP, conforme ilustra a Figura 4, resultando na incerteza expandida (U) que corresponde à incerteza de medição (MU) aplicada ao valor obtido para o mensurando. (6) Valores mais elevados de k implicam níveis de confiança mais elevados, entretanto também implicam a incorporação de valores com amplitude mais elevada e dados mais heterogêneos, com curvas mais achatadas e mais abertas, como ilustrado na Figura 5.

| Fatores de abrangência k para diferentes graus de liberdade veff | | | | | | | | | | | |
|--|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Veff | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 10 | 20 | ∞ |
| k | 13,97 | 4,53 | 3,31 | 2,87 | 2,65 | 2,52 | 2,43 | 2,37 | 2,28 | 2,05 | 2,00 |

Figura 3

Valores de k correspondentes aos graus de liberdade efetivos (Veff).

Fonte: ACC, 2024. (4)

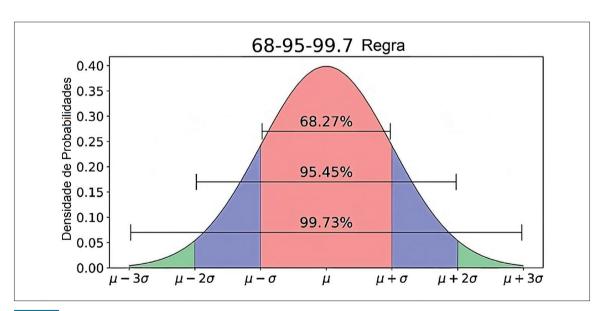


Figura 4

Distribuição estatística normal (binomial) "Gaussiana" descreve a função densidade de probabilidade, na qual a maior parte dos mensurandos em exames de laboratórios clínicos se distribui na faixa entre ±2 DP.

Fonte: Adaptado de https://towardsdatascience.com/understanding-the-68-95-99-7-rule-for-a-normal-distribution-b7b7cbf760c2. (12)

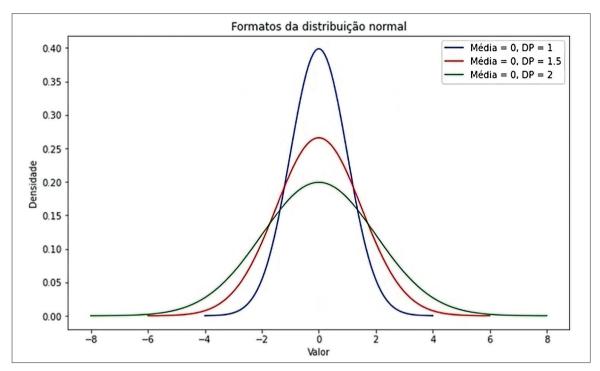


Figura 5

Ilustração da influência no aumento da variabilidade em relação ao valor de k. A linha mais elevada (azul) representa k = 2. As demais linhas representam valores acima de 2 para k.

Rastreabilidade metrológica

A rastreabilidade metrológica é definida como a "propriedade de um resultado de medição pela qual o resultado pode ser relacionado a uma referência por meio de uma cadeia ininterrupta documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza da medição".(1) Desta forma, a incerteza de medição deve ser metrologicamente rastreável, garantindo a comparabilidade dos resultados dentro de uma cadeia de rastreabilidade metrológica. (6) Esta cadeia é definida como a "sequência de padrões de medição e calibrações utilizadas para relacionar um resultado de medição a uma referência."(1) A Figura 6 ilustra um exemplo de cadeia metrológica para um exame de laboratório clínico. As incertezas e os vieses de medição são determinados conforme a cadeia de rastreabilidade metrológica. A precisão, o nível de acreditação do laboratório, a instabilidade e o custo por material aumentam significativamente dos laboratórios clínicos até o topo da hierarquia. (6) De forma oposta, a incerteza de medição, o viés e a disponibilidade de materiais diminuem de baixo para cima. Embora seja devidamente implementado na metrologia geral, não é amplamente empregado na maioria dos exames de laboratório clínico em razão da indisponibilidade de materiais de referência e métodos de referência. Além disso, a "rastreabilidade clínica" é difícil de ser alcançada visto a "complexidade físico-química" das amostras humanas, causada sobretudo pela variação biológica intraindividual e interindividual. (14)

Abordagem top-down para cálculo da incerteza de medição

Ao longo do tempo em que a incerteza de medição foi estudada e suas implicações analíticas observadas, surgiram diferentes abordagens para determinação da incerteza de medição. A abordagem, conhecida atualmente como top-down, ou seja, de "cima pra baixo" busca a determinação da incerteza a partir de estimativas de precisão baseadas em estudos interlaboratoriais de avaliação do desempenho de métodos que possam representar a incerteza como um todo do processo de medição e foi proposta por Wernimont em sua publicação nos anos 1980. (15) Esta abordagem foi retomada

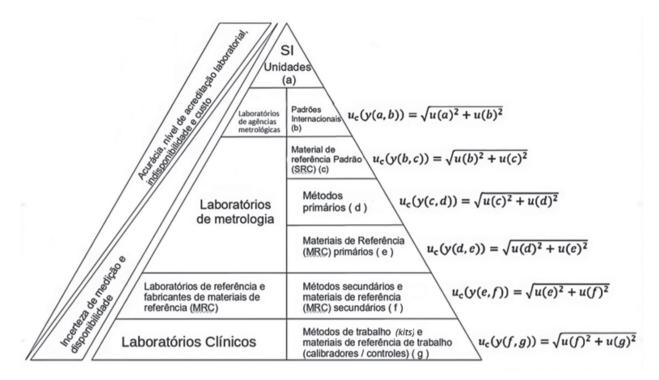


Figura 6

Cadeia de rastreabilidade metrológica envolvida na mensuração de resultados em exames de laboratórios clínicos.

Fonte: Adaptado de Pereira, 2016. (6)

tempos depois, em 1995, pelo Comitê de Métodos Analíticos (AMC) da Sociedade Real de Química⁽¹⁶⁾ e pelo Comitê Nórdico para Análises de Alimentos (NMKL), que também sugeriu uma estratégia similar, mas tendo como base apenas dados provenientes de avaliações intralaboratoriais. (10,14) Estas recomendações surgiram pelo fato que na abordagem Top-down, a maior parte dos dados necessários para a determinação da incerteza de medição, já estão disponíveis a partir dos resultados obtidos quando o método é validado, conforme as preconizações exigidas⁽¹⁷⁾, em contrapondo com a abordagem descrita e padronizada pelo GUM (Guide to the expression of Uncertainty in Measurement)(3), publicada em 1993 pela ISO (International Standard Organizations), do tipo bottom-up, que necessita da identificação e quantificação das fontes de incerteza individuais que contribuem para a incerteza de medição, o que nem sempre é possível em laboratórios clínicos. Desta forma, na prática, a aplicação do modelo GUM não é diretamente possível em um significativo número de situações nos laboratórios clínicos.(11)

Em laboratórios clínicos as ferramentas mais conhecidas de estatísticas relacionadas ao desempenho analítico são os

resultados de imprecisão, avaliados em programas de CIQ ou de inexatidão, através de ferramentas de avaliação em relação às análises de amostras controle com valores preestabelecidos ou com médias de consenso como os ensaios de proficiência (EP), estes últimos responsáveis por nos apresentar o que conhecemos como "bias", entre as estratégias de avaliação da qualidade. (10) Rigo-Bonnin e colaboradores (18) apresentaram, em 2018, um estudo em que compararam três estratégias diferentes, todas consideradas do tipo "top-down", para estimar a MU de um método de UHPLC-MS/MS para quantificação de tacrolimus, um imunossupressor bastante utilizado na prática clínica. Foram utilizados como estratégias: 1. Dados de validação individual do laboratório, relativos à imprecisão, e dados de bias baseados na utilização de material de referência certificado (MRC) e adicionando a incerteza associada aos calibradores utilizados nos ensaios; 2. Dados relacionados à participação em programa de CIQ, com utilização de material de controle comercial (Liquicheck™Whole Blood Immunosuppressant) e comparação de resultados em grupos interlaboratoriais (UNITY™Interlaboratory Program); 3. Dados relacionados à participação em programa de CEQ do tipo EP "bias" (IPTS: Immunosuppressant Proficiency Testing Schemes – CITAC – Cyclosporin and Tacrolimus (LGC™ Standards)). As três estratégias obtiveram como valores de estimativa de MU 11,8%, 13,2% e 13,0%, respectivamente. [18] Frenkel e colaboradores propuseram, em 2019, um algoritmo visando equalizar a utilização de "bias" de forma que se possa obter a incerteza padrão do "bias", que como um erro observável em valores preestabelecidos pode incorporar também os erros randômicos e, desta forma, ser incorporadas na MU. [19]

Outro exemplo da aplicação deste tipo da abordagem foi descrito por Eren e Oguz, em 2022, sobre a estimativa da incerteza de medição de uma análise disponível comercialmente para medida da hemoglobina glicada A1c no sistema analítico validado, Atellica (Siemens Healthineers, Alemanha). Neste exemplo, utilizaram resultados de CIQ e CEQ, obtidos em um período de 6 meses, para calcular a MU, de acordo com o documento CLSI EP29-A(5), utilizando a seguinte fórmula geral:

$$u_c = \sqrt{(u_{Rw}^2 + u_{bias}^2)},$$

$$U = k \times u_c,$$

onde U é a incerteza expandida e k é o fator de abrangência (para nível de confiança [IC] de 95%, k = 2,0), u_{Rw} é a incerteza padrão relativa devido à imprecisão intralaboratorial, associada a possíveis erros aleatórios e obtida pelo cálculo do coeficiente de variação (CV%) de dois níveis de materiais de controle de qualidade interno (CV $_1$ % e CV $_2$ %), obtida na seguinte fórmula:

$$u_{RW} = \sqrt{[(CV_1^2 + CV_2^2)/2]}.$$

Os resultados do controle de qualidade externo, de 6 meses, obtidos do programa controle externo da qualidade, EQAS da Bio-Rad * , foram usados para calcular a incerteza do bias (u_{bias}) que aponta possíveis erros sistemáticos. O valor médio quadrático dos resultados mensais do bias do laboratório (RMS $_{bias}$) e a incerteza do valor de referência do programa EQAS (u_{cref}) foram calculados. Em seguida, a u_{bias} padrão foi calculada de acordo com a fórmula:

$$u_{bias} = \sqrt{[(RMS_{bias})^2 + (u_{cref})^2]}$$

Considerando que

$$RMS_{bias} = \sqrt{[(\Sigma_{bias}(CEQ)^2/n]]}$$

na qual "n" é o número de rodadas no CEQ,

$$u_{cref} = (sR/\sqrt{n}),$$

onde sR é o CV% médio do resultado do controle externo da qualidade e n é o número de grupos de pares que participam do programa EQAS.

A incerteza padrão combinada, $u_{c'}$ foi quantificada na forma a seguir:

$$u_c = \sqrt{(u_{RW}^2 + u_{bias}^2)}$$
.

Por fim, considerando IC de 95%, temos que:

$$U = 2.0 \times u_c$$

No estudo em questão, os valores de CV médios em dois níveis foram $CV_1\% = 3,16 e CV_2\% = 2,79$, que foram avaliados em relação à especificação da qualidade exigida pelo NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program), que preconiza imprecisão ≤4%. Consequentemente, a u_{Rw}% foi de 2,98. Os parâmetros relacionados ao bias apresentaram como valor RMS_{bias}% = 1,17 e u_{cref} % = 0,07. Desta forma, aplicando-se as fórmulas acima, temos que a incerteza combinada (u) foi de 3,2% e a incerteza expandida (U) foi de 6,4%. O valor de decisão, utilizado como critério diagnóstico de Diabetes mellitus (DM), é de 6,5% de HbA1c no total de HbA e aplicando-se a incerteza de medição expandida (U) obtida no cálculo, temos que: $6.5 \times 0.064 = 0.416\% \sim 0.4\%$. Desta forma, a expressão do resultado, considerando que o reporte da expressão dos resultados devem incluir a MU de forma clara⁽²¹⁾, preferencialmente na forma de "Resultado do exame ± MU" (seja como valor numérico na mesma unidade do mensurando, porcentagem ou range(22,23) no ponto de decisão clínica seria:

Considerando o limite aceito de especificações da qualidade analítica para HbA1c como $\pm 0,5\%$, (24) temos que a U obtida está em conformidade analítica. Portanto, o valor do resultado do mensurando é o valor médio dentro da faixa (*range*) das probabilidades de conter o valor verdadeiro.

Abordagem *bottom-up* (recomendada pelo GUM) para cálculo da incerteza de medição

A abordagem muito conhecida, e utilizada, sobretudo em processos de validação no desenvolvimento de métodos, em especial dos métodos "in house", é a bottom-up, particularmente adotada pelo EURACHEM a partir dos anos 1990 como referência de uso na química analítica.⁽³⁾

Na abordagem *bottom-up* a incerteza de medição é calculada através de uma série de passos que envolvem a identificação e quantificação das fontes de incerteza:

 Identificação das Fontes de Incerteza: Identificar todas as possíveis fontes de incerteza que podem afetar a medição. Isso pode incluir fatores como a precisão do instrumento de medição, as condições ambientais, o método de medição, entre outros.

- 2. Tipos de Incerteza: Existem dois tipos de incertezas, as do Tipo A e do Tipo B. As incertezas são de tipos diferentes porque são calculadas por procedimentos distintos, mas ambos são baseados em distribuição de probabilidade e os componentes de incerteza resultantes de cada tipo são quantificados por variância ou desvios padrão. (3,6,11)
- 2.1 Incertezas do Tipo A: As incertezas de Tipo A são encontradas por meios estatísticos, sendo calculadas por meio do desvio padrão de várias medidas obtidas por meio de repetição. Visto que a melhor estimativa para o valor esperado é a média dos dados obtidos no processo, a incerteza será o desvio padrão da média. Além disso, é necessário avaliar quantos graus de liberdade devem ser indicados Também é importante ressaltar que, quando apropriado e uma vez identificadas, covariâncias também devem ser indicadas. (6,11) Por exemplo, imagine um resultado médio de 31,7mg/ dL de HDL-Colesterol, obtido após um conjunto de 10 determinações com coeficiente de variação igual a 2,9. Neste caso, o desvio padrão da média é aproximadamente 0,92. Esse dado reflete a incerteza do Tipo A associada a essas medidas, sendo um dos componentes da incerteza combinada.
- **2.2 Incertezas do Tipo B:** As incertezas do Tipo B são encontradas de outras formas, já que não são calculadas por meios estatísticos, o que exige uma série de conhecimentos relacionados aos instrumentos e materiais envolvidos no processo. Essas informações são as especificações do fabricante, os certificados de calibração e outras especificidades e as incertezas que constam em manuais e outras referências. (6,11)
- 3. Quantificação das Fontes de Incerteza: A quantificação de cada fonte de incerteza pode ser feita através de métodos estatísticos, como a análise de repetibilidade e reprodutibilidade, ou através de informações fornecidas pelos fabricantes dos instrumentos. Converter os valores de componentes de incerteza em valores de desvios padrão (DP) relativos ao mensurando. (6,11)
- **3.1 Combinação das Incertezas**: As incertezas individuais devem ser combinadas para obter a incerteza total. Isso geralmente é feito utilizando a fórmula da raiz quadrada da soma dos quadrados (RSS), que é uma forma de combinar incertezas independentes. Onde (u_c) é a incerteza combinada e (u₁², u₂², ..., u_n²) são as incertezas individuais. A relação geral entre a incerteza

padrão combinada $u_c(y)$ de um valor y e a incerteza dos parâmetros independentes X_1 , X_2 , ... X_n dos quais depende é:^(6,11)

$$u_{c}(y) = (y(x_{1}, x_{2},...)) = \sqrt{\sum_{i=1,n} c_{i}^{2} u(x_{i})^{2}} = \sqrt{\sum_{i=1,n} u(y, x_{i})^{2}}$$

3.2 Expansão da Incerteza: Da mesma forma que na abordagem *top-down*, em muitos casos a incerteza combinada é multiplicada por um fator de abrangência (k) para obter a incerteza expandida, que fornece um intervalo de confiança maior. O valor de (k) é geralmente escolhido com base no nível de confiança desejado, por exemplo k = 2, para um nível de confiança de 95% (95% IC).

$$U = k \times u_c$$

Onde ("U") é a incerteza expandida.

Esses passos ajudam a garantir que a incerteza de medição seja bem compreendida e quantificada, permitindo uma melhor interpretação dos resultados de medição. (6,11)

Influência da incerteza de medição na prática laboratorial e clínica

A MU pode ter impactos significativos nos resultados práticos, influenciando a interpretação e a confiabilidade dos dados obtidos, sobretudo se não for levada em consideração ou se os profissionais responsáveis pelas interpretações dos resultados dos exames laboratoriais não estiverem devidamente familiarizados com este conceito. (6) Especialmente importante é o conhecimento sobre as estimativas de MU quando um valor de mensurando estiver próximo a uma linha de corte definida por diretriz ou consenso médico, para tomada de decisão clínica, como estabelecer um diagnóstico de uma condição de saúde ou doença. O exemplo abordado anteriormente, do valor de 6,5% de HbA1c como critério de decisão para diagnóstico de DM(24) ilustra bem a questão. Um hipotético resultado de HbA1c que esteja ligeiramente acima do valor definido como mínimo para estabelecer o diagnóstico de DM, como 6,7% por exemplo, tendo a MU do método utilizado sido estimada em ±0,4%, efetivamente seria de 6,7%±0,4%. Este resultado, portanto, não reúne condições estatísticas e metrológicas necessárias para embasar a tomada de decisão clínica satisfatoriamente, considerando que o valor verdadeiro da medição pode estar abaixo de 6,5%, (24) de forma que para o diagnóstico de DM sejam levados em consideração os resultados de outros exames laboratoriais e a sintomatologia envolvida.

Neste contexto, o suplemento 6 do GUM, traduzido pelo INMETRO em 2022 e denominado "Avaliação de dados de medição – O papel da incerteza de medição na avaliação da conformidade" (25), fornece uma série de critérios e subsídios referentes à avaliação de conformidade de um resultado frente ao seu propósito esperado, como limites e intervalos de tolerância, probabilidade de conformidade, intervalos de aceitação, riscos ao consumidor/cliente. Também o documento CLSI EP29-4 estabelece critérios e diretrizes para a MU e sua expressão nos resultados de laboratórios clínicos. (5)

As informações necessárias para relatar o resultado de uma medição variam conforme o uso pretendido. Em um laboratório clínico, o consumidor final é o paciente ou um doador de sangue, que não é responsável pelo seu próprio diagnóstico ou monitoramento. O principal cliente, neste caso, é o médico ou outro profissional responsável pela ação técnica, como triagem, diagnóstico ou acompanhamento. (6) O profissional que toma decisões com base nos resultados laboratoriais deve compreender o propósito e o valor da MU para o julgamento. Caso contrário, os relatórios de incerteza de medição podem gerar dúvidas que comprometam a decisão clínica. Essas habilidades são raras entre médicos e outros profissionais de saúde, que geralmente não solicitam essa informação por não entenderem seu conceito e, por este motivo, a maioria dos laboratórios clínicos, sobretudo os hospitalares, não relata a incerteza de medição, pois ela pode não agregar valor à maioria das decisões clínicas e pode atrapalhar ao causar indecisão na interpretação, sobretudo em resultados de exames de urgência. (6)

Em resumo, a MU é um fator crítico que deve ser gerenciado cuidadosamente para garantir que os resultados sejam confiáveis e úteis para a aplicação prática desejada, pois afeta diretamente a confiabilidade e a validade dos resultados obtidos. (7) A MU fornece uma indicação quantitativa da qualidade dos resultados, uma vez que são características inversamente proporcionais. (25) A ausência desta informação dificulta avaliar a precisão e a exatidão dos resultados, embora existam legislações e programas de qualidade a serem seguidos pelos laboratórios clínicos. Consequentemente, muitos médicos acabam avaliando a qualidade dos resultados de forma empírica e subjetiva, muitas vezes sem base em evidências ou estatísticas por desconhecerem estes conceitos. Ignorar ou subestimar a incerteza de medição pode levar a erros significativos, afetando a qualidade do processo de medição e, consequentemente, a segurança do paciente.(7)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estimativa e a quantificação da incerteza de medição são fundamentais na prática laboratorial e clínica, pois garantem a precisão e a confiabilidade dos resultados dos exames diagnósticos. Compreender a incerteza é essencial para a interpretação adequada dos resultados, especialmente em contextos críticos como o diagnóstico de doenças, em que pequenos desvios podem levar a decisões clínicas erradas. As abordagens top-down e bottom-up fornecem estratégias complementares para a determinação da incerteza, cada uma com suas aplicações específicas no ambiente clínico. Apesar das diretrizes e normas que regulam a prática laboratorial, a falta de familiaridade dos profissionais de saúde com o conceito de incerteza pode comprometer a eficácia do diagnóstico e o manejo do paciente. Os laboratórios clínicos podem efetuar as estimativas de MU por meio de planilhas eletrônicas utilizando abordagens variadas, conforme descrito neste artigo, inclusive adotando mais de uma abordagem de forma complementar, como análise da reprodutibilidade e "bias" em conjunto, através de um conjunto de dados de CIQ e CEQ, como a participação em EP. Porém, a incorporação de softwares e programas de controle da qualidade interlaboratoriais, que permitam automatizar o processo de estimativa da MU (como Bio-Rad UNITY™, (26) Randox Acusera 24/7^{™(27)} e Controllab CI ONLINE^{™(28)}), pode contribuir, de forma decisiva, para a incorporação deste conceito na prática laboratorial e clínica. Portanto, é imperativo que a comunidade médica reconheça a importância da incerteza de medição e trabalhe para integrá-la nas decisões clínicas, promovendo assim um atendimento mais seguro e eficaz. O futuro da medicina laboratorial dependerá de uma abordagem mais holística, em que a qualidade dos resultados, incluindo suas incertezas, seja considerada uma prioridade na prestação de cuidados de saúde.

REFERÊNCIAS

- INMETRO. Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). Duque de Caxias, RJ. 2012. 94p. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/ inovacao/publicacoes/vim_2012.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2024.
- Ćelap I, et al. Measurement uncertainty estimation recommendations. Biochemia medica (Zagreb) 2017;27(3):030502. Disponível em: https://doi.org/10.11613/BM.2017.030502. Acesso em: 14 ago. 2024.
- EUROCHEM / CITAC (2012). Quantifying uncertainty in analytical measurement – QUAM:2012.P1, Guide CG4, 3nd ed. 2012. Disponível em: https://eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2024.

- Imagem. ACC Engenharia de medição. Processo de medição: entenda seu impacto nos processos e produtos! Disponível em: https://accmetrologia.com.br/backup-plim/processo-de-medicao-entenda-seu-impacto-nos-processos-e-produtos/. Acesso em: 18 ago. 2024.
- CLSI EP29-A Expression of Measurement Uncertainty in Laboratory Medicine; Approved Guideline. Vol. 32, No 4, 2012. Disponível em: https://clsi.org/standards/products/method-evaluation/documents/ep29/. Acesso em: 21 ago. 2024.
- Pereira P. Uncertainty of Measurement in Medical Laboratories. DOI: 10.5772/62437. In book: New Trends and Developments in Metrology (pp.51-80). Publisher: InTech, Editors: Luigi Cocco, (2016). Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/303289783_Uncertainty_of_Measurement_in_Medical_Laboratories. Acesso em: 18 ago. 2024.
- Fernandes JLN, Wollinger W, Garrido BC. Rastreabilidade em medicina laboratorial: um estímulo global para resultados exatos no cuidado com o paciente. Jornal brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 55, n. 4, p. 402–411, 2019. Disponível em: https://www.scielo.br/j/jbpml/a/5DrKpSwPrM93mcmNNp7Fkqw/. Acesso em: 20 ago. 2024.
- Belk WP, Sunderman FW. A survey of the accuracy of chemical analyses in clinical laboratories. American Journal of Clinical Pathology, v. 17, n. 11, p. 853–861, 1947. Disponível em: https://academic.oup.com/ajcp/article-abstract/17/11/853/1761299?redirectedFrom=fulltext. Acesso em: 20 ago. 2024.
- Ricós C, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, v. 59, n. 7, p. 491–500, 1999. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10667686/. Acesso em: 21 ago. 2024.
- Kallner A. Estimation of uncertainty in measurements in the clinical laboratory. Clinical chemistry and laboratory medicine 2013; 51(12): 2249–2251. DOI 10.1515/cclm-2013-0749. Disponível em: https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2013-0749/html. Acesso em: 18 ago. 2024.
- Milinkovic, et al.: Uncertainty of measurement in laboratory medicine. Journal of Medical Biochemistry 2018; 37 (3). DOI: 10.2478/jomb-2018-0002. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30584397/. Acesso em: 18 ago. 2024.
- Imagem. Disponível em: https://towardsdatascience.com/understanding-the-68-95-99-7-rule-for-a-normal-distribution-b7b7cbf760c2. Acesso em: 10 ago. 2024.
- 13. Junior E. Desvendando o Teorema Central do Limite. Disponível em: https://medium.com/data-hackers/desvendando-o-teorema-central-do-limite-17cbb13beb1a. Acesso em: 19 set. 2024.
- Milinković N, Jovičić S, Ignjatović S. Measurement uncertainty as a universal concept: can it be universally applicable in routine laboratory practice? Critical reviews in clinical laboratory sciences, v. 58, n. 2, p. 101–112, 2021. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32672116/>. Acesso em: 21 ago. 2024.
- Wernimont GT. Use of statistics to develop and evaluate analytical methods, AOAC: Arlington, 1985.
- Royal Society of Chemistry / Analytical Methods Committee. Uncertainty of measurement: implications of its use in analytical science Analyst 1995, v. 120, p. 2303-2308.

- 17. de Oliveira EC, de Aguiar PF. Comparação de diferentes abordagens para avaliação da incerteza Química nova, v. 32, n. 6, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600051. Acesso em: 18 ago. 2024.
- Rigo-Bonnin R, et al. Different top-down approaches to estimate measurement uncertainty of Whole blood tracolimus mass concentration values. Clinical biochemistry 57 (2018) 56-61. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.05.005>. Acesso em: 21 ago. 2024.
- Frenkel R, Farrance I, Badrick T. Bias in analytical chemistry: A review of selected procedures for incorporating uncorrected bias into the expanded uncertainty of analytical measurements and a graphical method for evaluating the concordance of reference and test procedures. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, v. 495, p. 129–138, 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898119317383?via%3Dihub. Acesso em: 21 ago. 2024.
- Eren F, Oguz, EF. The estimation of measurement uncertainty of glycated hemoglobin at atellica solutions. International Journal of Medical Biochemistry, 2021.. DOI: 10.14744/ijmb.2021.84755. Disponível em: https://internationalbiochemistry.com/jvi.aspx?un=IJMB-84755&volume=>>. Acesso em: 21 ago. 2024.
- 21. ISO 15189-2012 Medical laboratories Requirements for quality and competence. International Organization for Standardization, 2012.
- Coskun A, Berçik İnal B, Serdar M. Measurement uncertainty in laboratory medicine: the bridge between medical and industrial metrology. Turkish journal of biochemistry, v. 44, n. 2, p. 121–125, 2019. Disponível em: https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/tjb-2019-0170/ html>. Acesso em: 20 ago. 2024.
- 23. Plebani M, et al. What information on measurement uncertainty should be communicated to clinicians, and how? Clinical biochemistry, v. 57, p. 18–22, 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009912017311803?via%3Dihub. Acesso em: 18 ago. 2024.
- 24. Galindo-Méndez M, Sánchez-López A, Cruz-Fuentes L. The estimation of uncertainty of measurement of glycated hemoglobin as an analytical performance specification and in the interpretation of its results. Clinical biochemistry, v. 63, p. 92–96, 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009912018309263?via%3Dihub>. Acesso em: 20 ago. 2024.
- 25. INMETRO JCGM 106:2012. Avaliação de dados de medição Suplemento 6 do "Guia para a expressão de incerteza de medição" O papel da incerteza de medição na avaliação da conformidade. Duque de Caxias, RJ: INMETRO/CICMA/SEPIN, 2022.
- 26. Bio-Rad UNITY Quality control data management. Disponível em: https://www.bio-rad.com/pt-br/applications/quality-management/data-management-systems. Acesso em: 18 set. 2024.
- 27. Randox Acusera 24/7 Measurement Uncertainty Vs Total Error. Disponível em: https://www.randox.com/mu-vs-te/>. Acesso em: 18 set. 2024.
- 28. Controllab CI ONLINE. Disponível em: https://controllab.com/solucoes/controle-interno/. Acesso em: 18 set. 2024.

Estimates of measurement uncertainty associated with Clinical Laboratories and their implications for clinical practice

Estimativas de incerteza de medição associada ao Laboratório Clínico e suas implicações na prática clínica

José Robson Venturim¹, Luiza Valli Vieira²

- 1 Grupo Tommasi Laboratórios, Diretor Técnico, Farmacêutico-Bioquímico; Especialista em Análises Clínicas e Mestre em Patologia Geral das Doencas
- ² Grupo Tommasi Laboratórios, Coordenadora/Responsável Técnica Cromatografia, Doutora em Química.

Abstract

Measurement uncertainty can be characterized as an interval of values that, within a confidence interval, encompasses the true value of the measurand. Estimating this uncertainty requires a series of mathematical and statistical calculations, based on the validation and verification of the analytical methods employed in the laboratory. An adequate assessment of measurement uncertainty in clinical analyses is one of the most important factors for the reliable interpretation of results. Various guidelines highlight the necessity of properly evaluating the uncertainty of measurement results in routine laboratory practice. Available documents generally recommend participation in proficiency testing/external quality control programs, as well as the implementation of internal quality control, primarily to verify the quality performance of the method. Although all documents comply with the requirements of the International Standard ISO 15189, the standard itself does not clearly define the method by which measurement results should be assessed, and there is no harmonization in practice regarding this matter. Furthermore, the measurement uncertainty of a result constitutes part of the set of variations related to the measured value itself, ensuring that all factors influencing the interpretation of the measured value used for diagnosis and treatment monitoring are considered. Therefore, in clinical analyses, a proper evaluation of measurement uncertainty should ultimately aim to reduce diagnostic uncertainty.

Keywords: Measurement uncertainty, Validation study, Quality control, Laboratory tests, Clinical laboratory, Bottom-Up approach, Top-down approach,

A incerteza de medição pode ser caracterizada como um intervalo de valores que, dentro de um intervalo de confiança, abrange o valor verdadeiro do mensurando. A estimativa dessa incerteza requer uma série de cálculos matemáticos e estatísticos, fundamentados na validação e verificação dos métodos analíticos empregados no laboratório. Uma avaliação adequada da incerteza de medição em análises clínicas é um dos fatores mais importantes para uma interpretação confiável dos resultados. Diversas diretrizes indicam a necessidade de uma avaliação adequada da incerteza dos resultados de medição na prática laboratorial de rotina. Os documentos disponíveis geralmente recomendam a participação nos programas de proficiência/controle externo da qualidade, bem como a realização de controle interno da qualidade, a fim de verificar sobretudo o desempenho da qualidade do método. Embora todos os documentos atendam aos requisitos da Norma Internacional, ISO 15189, a norma em si não define claramente o método pelo qual os resultados de medição precisam ser avaliados e não há harmonização na prática em relação a isso. Além disso, a incerteza de medição de um resultado é um dado que compõe o conjunto das variações relacionadas ao próprio resultado medido, de forma que todos os fatores que influenciam a interpretação do valor medido utilizado para diagnóstico e monitoramento do tratamento do paciente possam ser levados em consideração. Portanto, em análises clínicas, uma avaliação adequada da incerteza dos resultados de medição deve ter o objetivo final de reduzir a incerteza diagnóstica.

Palavras-chave: Incerteza de medição. Estudo de Validação. Controle de Qualidade. Exames Laboratoriais. Laboratório Clínico. Abordagem bottom-up. Abordagem top-down.

Correspondence José Robson Venturim E-mail: jrventurim@tommasi.com.br

Received on Nov 01, 2024 | Approved on Nov 15, 2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400216.en

INTRODUCTION

A measurement is the act of assigning a numerical value to a specific quantity through an experimental process. (1) In this process, the value obtained (i.e., the result) is determined based on a comparison with a known standard, thus representing an estimate. However, it is crucial to understand that every measurement includes a component known as "measurement uncertainty," which is an integral part of the reported measurement result. It is important to emphasize that measurement uncertainty differs from measurement error (ME), defined as the "difference between the obtained value and the true value, when the latter is available."(1)

Measurement uncertainty (MU) is a parameter that quantifies the doubt associated with the result of a measurement. By definition, the International Vocabulary of Metrology (VIM) describes measurement uncertainty as "a non-negative parameter characterizing the dispersion of the values attributed to a measurand, based on the information used." (1) In other words, MU indicates the range within which the true value of the measurement is likely to lie. Since it is neither a negative nor a null parameter, there will always be a set of uncertainties (Expanded Uncertainty, designated as "U") associated with the quantitative value of the measurand. (2) MU serves as an estimate that quantifies the reliability of measurement results, where greater uncertainty corresponds to lower reliability of the result. (3)

The information obtained through the measurement process allows the measurand to be assigned only a "range of reasonable values." Relevant additional information can reduce the amplitude of this range (decreasing the uncertainty) that can be attributed to the measurand. However, even the most precise measurement cannot reduce the range to a single value due to the finite amount of detail in the definition of the measurand.⁽¹⁾

The result of a measurement comprises the base result (BR) and the range formed by the MU, both above and below the value. The true value is contained within this range, ideally as close as possible to the central point, where the BR is located. In other words, the smaller the MU, the closer the true value will be to the BR.⁽¹⁾

Figure 1 illustrates the arrangement of a result obtained from a measurement (base result, or BR), the true value, and

the range of possible values around the BR, considering the MU.

Uncertainty is a statistical concept that reflects the effects of various factors arising during the measurement processes, impacting the obtained results. (5) According to the CLSI EP29-A guideline (Clinical and Laboratory Standards Institute) (5), uncertainty defines an interval within which the true value of the measurement is expected to lie, with a specified level of confidence. In the practice of measurement processes and analytical performance assessment, there are three main types of uncertainty: standard, combined, and expanded. (5)

Standard uncertainty refers to the imprecision determined in the laboratory, while combined uncertainty associates other potential sources, and expanded uncertainty takes into account the desired confidence interval for the application of the measurement. Assessing the measurement uncertainty of laboratory results is crucial for verifying the performance of the measurement system. Uncertainty provides laboratory professionals with a deeper understanding of the performance and limitations of their methods, enabling the identification of technical steps where uncertainty can potentially be reduced. For patient safety, it is essential that most laboratory tests fall within the analytical target for their clinical use, as this can significantly influence the clinician's ability to accurately assess patients. (5)

Uncertainty can arise from various sources, such as measurement instruments, involving the limitations and precision of the devices used, the level of automation of the equipment, and the standardization of commercial analytical methods as opposed to methodologies developed and validated within the laboratory; environmental conditions, such as variations in temperature, humidity, etc.; measurement methods, including procedures, methodologies, protocols, and techniques; and individual differences of the operator, such as the skill and experience of the person performing the measurement, especially in non-automated methodologies.⁽⁶⁾

Understanding and specifying uncertainty is crucial to ensure the reliability and comparability of results, particularly in areas such as clinical laboratories, where important decisions are based on this data. ⁽⁵⁾ Figure 2 provides a cause-and-effect diagram, in a "fishbone" format, illustrating a hypothetical situation in which the sources of uncertainties in a laboratory measurement are studied.

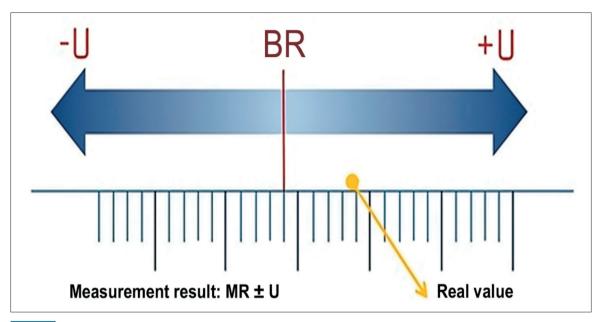


Figure 1

Demonstration of the distribution of measurement components.

Legend: BR, base result; U, expanded uncertainty; MR, measurement result. Source: ACC, 2024. (4)

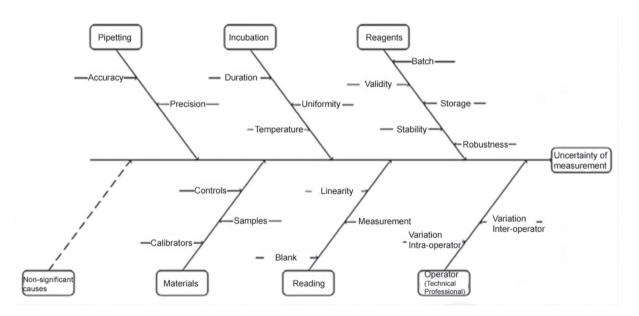


Figure 2

Schematic demonstration of identifying sources of uncertainties for determining the measurement uncertainty (MU) of a laboratory test.

Source: Pereira, 2016. (6)

Estimating and quantifying uncertainty in measurements is crucial for clinical laboratories for various reasons, with the main ones being precision and reliability characteristics. Uncertainty helps determine the accuracy and reliability of laboratory test results and is therefore essential to ensure that diagnoses and treatments based on these results are correct, due to the clinical inferences attributed to these laboratory results, directly influencing clinical decisionmaking. (7) Additionally, another important requirement, once measurement uncertainties are determined and presented alongside results, is comparability, as it allows for the comparison of results between different laboratories and analytical methods. Without an uncertainty estimate, it would be difficult to determine whether differences in results are significant or merely normal variations. For compliance with quality standards to meet norms and legislation, the specification of uncertainty is a requirement of international standards, such as ISO 15189-2012, or even national standards such as the 8th edition of the National Accreditation System Manual of the Department of Inspection and Quality Accreditation (SNA/DICQ) of the Brazilian Society of Clinical Analysis (SBAC) in item 5.5.1.4, where compliance with these standards is fundamental for the accreditation and recognition of clinical laboratories.(7)

The history of quality control in clinical analysis, particularly in clinical biochemistry, is extensive and rich. Fundamentally, there are two main aspects that are routinely monitored: imprecision, also known as random error, and inaccuracy, also called bias or systematic error of results. The internal quality control (IQC) system is primarily aimed at assessing imprecision, while external quality control (EQC), especially proficiency testing (PT), aims to evaluate inaccuracy. The origins of the concepts and applicability of EQC date back to the late 1940s, following the publication by Belk and Sunderman. (8) In contrast, IQC gradually evolved over the years, particularly from the 1970s onwards, when Westgard, Groth, and de Verdier introduced simulations as a scientific tool to assess and design control rules. (6)

A laboratory's performance can be satisfactorily described in terms of random and systematic errors. The metric known as "total error" (TE) is defined as the "net effect of method bias and imprecision" and incorporates both types of error. (9) However, a common objection to TE is that if a known bias is included, why retain it? Additionally, bias has a sign, whereas imprecision is a characteristic of a distribution. Therefore, the quantities included in TE are not truly comparable. (10)

DETERMINATION OF MEASUREMENT UNCERTAINTIES

Planning for the determination of measurement uncertainty

Just like the validation of laboratory methods, the estimation of measurement uncertainty also requires planning and a sequence of evaluations before its application in laboratory practice. (6) Methods developed in research and development (R&D) laboratories, "in-house", or extensive modifications of already validated methods, require a more comprehensive and detailed validation process, unlike commercial methods that are validated by manufacturers and registered with regulatory bodies (ANVISA, FDA, etc.).

Within the process of analytical validation, many of the procedures needed to obtain data for the determination of MU will already have been conducted, especially if the approach used is of the "bottom-up" type, as recommended by the guide for the expression of measurement uncertainty (GUM).⁽³⁾ In the context of clinical laboratories, where most methods used are standardized, registered, and validated by manufacturers in the form of kits or analytical systems, "top-down" approaches have been more applicable, particularly considering the limitations of information regarding method development due to patents and industrial secrecy, as well as the difficulty in obtaining certified reference materials (CRM) or certified reference standards (CRS).⁽¹¹⁾

Once the strategy is chosen and considering the characteristics of the measurand and the analytical system, the planning for determining MU consists of:

- Description of the measurand, measurement range, and limit value of MU.
- Identifying and quantifying the uncertainty components (Quantifying the standard uncertainty component for intralaboratory reproducibility (u_{Rw}); Quantifying the uncertainty component associated with the method and laboratory bias (u_{hia}).
- Converting the different uncertainties to standard deviation values of the measurand, through their variances.
 Determining the combined standard uncertainty (u_c), by the quadratic sum of the individual standard uncertainties.
- Calculating the expanded uncertainty (U) considering the coverage factor (k).

The factor k can vary due to several factors, with one of the main ones being the precision of the item being measured.

If the item does not have good repeatability, it will have a greater impact on the confidence interval, increasing the value of k, which varies according to the effective degrees of freedom adopted, as illustrated in Figure 3.

The coverage factor k multiplies the combined standard uncertainty to achieve a confidence level of up to 99.73% coverage, with the most commonly used being 95.45%, i.e.,

±2 SD, as illustrated in Figure 4. This results in the expanded uncertainty (U), which corresponds to the measurement uncertainty (MU) applied to the value obtained for the measurand. (6) Higher values of k imply higher confidence levels; however, they also involve incorporating values with a larger range and more heterogeneous data, with flatter and more open curves, as illustrated in Figure 5.

| K coverage factor to effective degrees of freedom (Veff) | | | | | | | | | | | |
|--|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Veff | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 10 | 20 | 00 |
| k | 13.97 | 4.53 | 3.31 | 2.87 | 2.65 | 2.52 | 2.43 | 2.37 | 2.28 | 2.05 | 2.00 |

Figure 3

'k' values corresponding to effective degrees of freedom (Veff).

Source: ACC, 2024. (4)

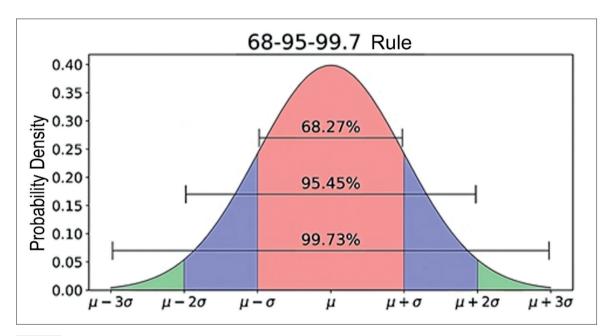


Figure 4

The normal (binomial) "Gaussian" statistical distribution describes the probability density function, in which most measurands in clinical laboratory tests are distributed within the range of ± 2 SD.

Source: Adapted from https://towardsdatascience.com/understanding-the-68-95-99-7-rule-for-a-normal-distribution-b7b7cbf760c2. (12)

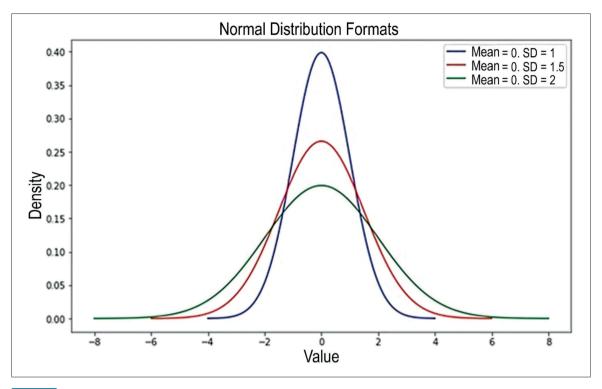


Figure 5

Illustration of the influence on increased variability relative to the value of k. The highest line (blue) represents k=2. The other lines represent values above 2 for k.

Source: Adapted from https://medium.com/data-hackers/desvendando-o-teorema-central-do-limite-17cbb13beb1a. (13)

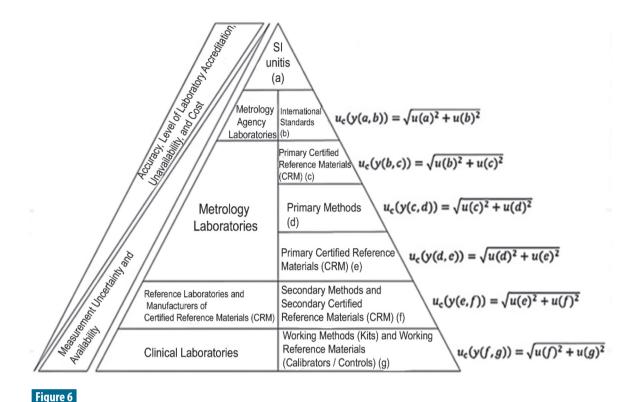
Metrological Traceability

Metrological traceability is defined as the "property of a measurement result by which the result can be related to a reference through an uninterrupted, documented chain of calibrations, each contributing to the measurement uncertainty".(1) Thus, measurement uncertainty must be metrologically traceable, ensuring the comparability of results within a metrological traceability chain. (6) This chain is defined as the "sequence of measurement standards and calibrations used to relate a measurement result to a reference".(1) Figure 6 illustrates an example of a metrological chain for a clinical laboratory test. Measurement uncertainties and biases are determined according to the metrological traceability chain. The precision, laboratory accreditation level, instability, and material costs increase significantly from clinical laboratories to the top of the hierarchy. (6) Conversely, measurement uncertainty, bias, and material availability decrease from bottom to top.

Although it is well implemented in general metrology, it is not widely applied in most clinical laboratory tests due to the unavailability of reference materials and reference methods. Additionally, "clinical traceability" is challenging to achieve due to the "physicochemical complexity" of human samples, primarily caused by intraindividual and interindividual biological variation. (14)

Top-Down approach for measurement uncertainty calculation

Over time, various approaches have emerged for determining measurement uncertainty, each with its analytical implications. The approach now known as top-down aims to determine uncertainty from precision estimates based on interlaboratory performance assessment studies that can represent the overall uncertainty of the measurement process. This approach was first proposed by Wernimont in his 1980s publication.⁽¹⁵⁾ It was revisited in 1995 by the



Metrological traceability chain involved in the measurement of results in clinical laboratory tests.

Source: Adapted from Pereira, 2016. (6)

Analytical Methods Committee (AMC) of the Royal Society of Chemistry⁽¹⁶⁾ and the Nordic Committee on Food Analysis (NMKL), which also suggested a similar strategy based solely on intralaboratory evaluation data. (10,14) These recommendations arose because, in the top-down approach, most of the data needed for determining measurement uncertainty are already available from the results obtained when the method is validated, according to required standards. (17) This contrasts with the bottom-up approach described and standardized by the GUM (Guide to the expression of Uncertainty in Measurement), (3) published in 1993 by the International Organization for Standardization (ISO), which is a bottom-up approach. This approach requires the identification and quantification of individual sources of uncertainty that contribute to measurement uncertainty, which is not always possible in clinical laboratories. Therefore, in practice, the application of the GUM model is not directly feasible in a significant number of situations in clinical laboratories. (11)

In clinical laboratories, the most recognized statistical tools related to analytical performance are imprecision

results, assessed through IQC programs, or inaccuracy results, evaluated via tools analyzing control samples with preestablished values or consensus means, such as proficiency testing (PT). These latter evaluations provide what is known as "bias", one of the strategies for quality assessment. (10) In 2018, Rigo-Bonnin et al. (18) presented a study comparing three different strategies, all considered "top-down" approaches, to estimate the MU of a UHPLC-MS/MS method for quantifying tacrolimus, an immunosuppressant widely used in clinical practice. The strategies employed were: 1. Validation data specific to the laboratory, related to imprecision, and bias data based on the use of certified reference materials (CRM), while incorporating the uncertainty associated with calibrators used in the assays; 2. Data from participation in an IQC program, using commercial control materials (Liquicheck™ Whole Blood Immunosuppressant) and interlaboratory result comparisons (UNITY™ Interlaboratory Program); 3. Data from participation in an EQC program, specifically PT bias (IPTS: Immunosuppressant Proficiency Testing Schemes - CITAC - Cyclosporin and Tacrolimus (LGC™ Standards)). The three strategies yielded MU estimates of 11.8%, 13.2%, and 13.0%, respectively.⁽¹⁸⁾ In 2019, Frenkel et al. proposed an algorithm aiming to standardize the use of "bias" by allowing the calculation of the standard uncertainty of "bias". As an observable error in pre-established values, this bias may also incorporate random errors and, therefore, be included in the MU.⁽¹⁹⁾

Another example of the application of this type of approach was described by Eren and Oguz⁽²⁰⁾ in 2022, regarding the estimation of measurement uncertainty (MU) for a commercially available analysis for measuring glycated hemoglobin A1c in the validated analytical system, Atellica (Siemens Healthineers, Germany).⁽²⁰⁾ In this example, IQC and EQC results obtained over a 6-month period were used to calculate the MU, following the CLSI EP29-A document⁽⁵⁾, using the following general formula:

$$u_c = \sqrt{(u_{Rw}^2 + u_{bias}^2)},$$

$$U = k \times u_{.},$$

where U is the expanded uncertainty, and k is the coverage factor (for a 95% confidence interval [CI], k=2.0); u_{Rw} is the standard relative uncertainty due to intralaboratory imprecision, associated with potential random errors and obtained by calculating the coefficient of variation (CV%) from two levels of internal quality control (CV $_1$ % e CV $_2$ %), using the following formula:

$$u_{pw} = \sqrt{[(CV_1^2 + CV_2^2)/2]}.$$

The external quality control results over 6 months, obtained from the EQAS program by Bio-Rad®, were used to calculate the bias uncertainty (u_{bias}), which indicates possible systematic errors. The root mean square (RMS) of the monthly laboratory bias results (RMS $_{bias}$) and the reference value uncertainty of the EQAS program (u_{cref}) were calculated. Subsequently, the standard u_{bias} was calculated using the following formula:

$$u_{bias} = \sqrt{[(RMS_{bias})^2 + (u_{cref})^2]}$$

Where:

$$RMS_{bias} = \sqrt{[(\Sigma_{bias}(CEQ)^2/n]},$$

with "n" being the number of rounds in the EQC program, and:

$$u_{cref} = (sR/\sqrt{n}),$$

where sR is the average CV% of the external quality control result, and n is the number of pairs of groups participating in the EQAS program.

The combined standard uncertainty u_c was quantified as follows:

$$u_c = \sqrt{(u_{Rw}^2 + u_{bias}^2)}$$
.

Finally, considering a 95% CI:

$$U = 2.0 \times u_c$$

In the study in question, the average CV values at two levels were $CV_1\% = 3.16$ and $CV_2\% = 2.79$, evaluated against the quality specification required by the NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program), which recommends an imprecision of ≤4%. Consequently, the u_{bu}% was 2.98. Parameters related to bias showed an RMS_{hias}%=1.17 and u_{cref} % =0.07. Applying the above formulas, the combined uncertainty (u₂) was calculated as 3.2%, and the expanded uncertainty (U) was 6.4%. The decision value used as a diagnostic criterion for Diabetes Mellitus (DM) is 6.5% HbA1c of total HbA, and applying the expanded measurement uncertainty (U) obtained in the calculation: $6.5 \times 0.064 = 0.416\% \sim 0.4\%$. Therefore, the expression of the result, considering that the reporting of results should include the MU clearly, preferably in the form of "Test result **± MU"** (whether as a numerical value in the same unit of measurement, percentage, or range)(22,23) for the clinical decision point would be:

Considering the accepted analytical quality specification limit for HbA1c as $\pm 0.5\%$, (24) the obtained U is analytically compliant. Therefore, the reported test value is the mean value within the probability range of containing the true value.

Bottom-up approach (recommended by the GUM) for measurement uncertainty calculation

The well-known and widely used approach, particularly in method validation processes, especially for "in-house" methods, is the bottom-up approach, which was adopted as a reference in analytical chemistry by EURACHEM starting in the 1990s. (3)

In the bottom-up approach, measurement uncertainty is calculated through a series of steps involving the identification and quantification of sources of uncertainty:

Identification of Sources of Uncertainty: Identify all
potential sources of uncertainty that may affect the measurement. This can include factors such as the precision
of the measuring instrument, environmental conditions,
the measurement method, among others.

- **2. Types of Uncertainty:** There are two types of uncertainty, Type A and Type B. These types of uncertainty differ because they are calculated using distinct procedures, but both are based on probability distributions, and the resulting uncertainty components for each type are quantified using variance or standard deviation.
- **2.1 Type A Uncertainties:** Type A uncertainties are determined through statistical means and are calculated using the standard deviation of multiple measurements obtained through repetition. Since the best estimate for the expected value is the average of the data obtained in the process, the uncertainty will be the standard deviation of the mean. Additionally, it is necessary to assess how many degrees of freedom should be indicated. It is also important to emphasize that when appropriate and once identified, covariances should also be indicated. For example, consider an average result of 31.7 mg/dL of HDL-Cholesterol obtained after a set of 10 determinations with a coefficient of variation equal to 2.9. In this case, the standard deviation of the mean is approximately 0.92. This value reflects the Type A uncertainty associated with these measurements, being one of the components of the combined uncertainty.
- **2.2 Type B Uncertainties:** Type B uncertainties are determined through other means, as they are not calculated using statistical methods, which requires a range of knowledge related to the instruments and materials involved in the process. This information includes manufacturer specifications, calibration certificates, and other specifics, as well as uncertainties found in manuals and other references.
- **3. Quantification of Sources of Uncertainty:** The quantification of each source of uncertainty can be performed using statistical methods, such as repeatability and reproducibility analysis, or through information provided by the instrument manufacturers. Convert the values of uncertainty components into standard deviation (SD) values relative to the measurand. (6,11)
- **3.1 Combination of Uncertainties:** Individual uncertainties should be combined to obtain the total uncertainty. This is typically done using the root sum of squares (RSS) formula, which is a method for combining independent uncertainties. Where (u_c) represents the combined uncertainty and (u₁², u₂², ..., u_n²) are the individual uncertainties. The general relationship between the combined standard uncertainty u_c (y) of a value y and the uncertainty

of the independent parameters X_1 , X_2 , ... X_n on which it depends is:^(6,11)

$$u_{c}(y) = (y(x_{1}, x_{2},...)) = \sqrt{\sum_{i=1,n} c_{i}^{2} u(x_{i})^{2}} = \sqrt{\sum_{i=1,n} u(y, x_{i})^{2}}$$

3.2 Expansion of Uncertainty: Similarly to the top-down approach, in many cases, the combined uncertainty is multiplied by an coverage factor (k) to obtain the expanded uncertainty, which provides a wider confidence interval. The value of (k) is typically chosen based on the desired confidence level, for example, k = 2, for a 95% confidence level (CI 95%).

$$U = k \times u_c$$

Where ("U") represents the expanded uncertainty.

These steps help ensure that the measurement uncertainty is well understood and quantified, allowing for better interpretation of measurement results.^(6,11)

Influence of measurement uncertainty in laboratory and clinical practice

MU can have significant impacts on practical results, influencing the interpretation and reliability of obtained data, especially if not taken into account or if professionals responsible for interpreting laboratory test results are not adequately familiar with this concept. (6) Knowledge of MU estimates is particularly important when a measured value is close to a cutoff point defined by guidelines or medical consensus for clinical decision-making, such as establishing a diagnosis of a health condition or disease. The previously discussed example of 6.5% HbA1c as a decision criterion for DM diagnosis illustrates this point well. A hypothetical HbA1c result that is slightly above the threshold for diagnosing DM, such as 6.7%, with the MU of the method estimated at ±0.4%, would effectively be reported as 6.7%±0.4%. This result, therefore, does not meet the statistical and metrological conditions necessary to support clinical decisionmaking satisfactorily, considering that the true value of the measurement could be below 6.5%. (24) Hence, when diagnosing DM, the results of other laboratory tests and associated symptoms should be considered.

In this context, Supplement 6 of the GUM, translated by INMETRO in 2022 and titled "Evaluation of Measurement Data – The Role of Measurement Uncertainty in Conformity Assessment" (25), provides a series of criteria and guidelines

related to the conformity assessment of a result in relation to its intended purpose, such as limits and tolerance intervals, probability of conformity, acceptance intervals, and risks to the consumer/client. Additionally, the CLSI EP29-4 document establishes criteria and guidelines for MU and its expression in clinical laboratory results.⁽⁵⁾

The information required to report the result of a measurement varies according to its intended use. In a clinical laboratory, the end consumer is the patient or blood donor, who is not responsible for their own diagnosis or monitoring. The primary client, in this case, is the physician or other professional responsible for the technical action, such as screening, diagnosis, or follow-up. (6) The professional making decisions based on laboratory results must understand the purpose and value of MU for judgment. Otherwise, measurement uncertainty reports can raise doubts that compromise clinical decision-making. These skills are rare among physicians and other healthcare professionals, who typically do not request this information due to a lack of understanding of its concept. For this reason, most clinical laboratories, particularly hospital laboratories, do not report measurement uncertainty, as it may not add value to most clinical decisions and may hinder interpretation by causing indecision, especially in urgent test results. (6)

In summary, MU is a critical factor that must be carefully managed to ensure that the results are reliable and useful for the intended practical application, as it directly affects the reliability and validity of the obtained results. (7) MU provides a quantitative indication of result quality, as these characteristics are inversely proportional. (25) The absence of this information makes it difficult to assess the precision and accuracy of the results, even though there are regulations and quality programs that clinical laboratories must follow. Consequently, many physicians end up evaluating the quality of results empirically and subjectively, often without a basis in evidence or statistics due to unfamiliarity with these concepts. Ignoring or underestimating measurement uncertainty can lead to significant errors, affecting the quality of the measurement process and, consequently, patient safety. (7)

FINAL CONSIDERATIONS

The estimation and quantification of measurement uncertainty are fundamental in laboratory and clinical practice, as they ensure the precision and reliability of diagnostic test results. Understanding uncertainty is essential for the appropriate interpretation of results, especially in

critical contexts such as disease diagnosis, where small deviations can lead to incorrect clinical decisions. The topdown and bottom-up approaches provide complementary strategies for determining uncertainty, each with specific applications in the clinical setting. Despite the guidelines and standards that regulate laboratory practice, the lack of familiarity among healthcare professionals with the concept of uncertainty can compromise the effectiveness of diagnosis and patient management. Clinical laboratories can perform MU estimations using electronic spreadsheets with various approaches, as described in this article, including adopting more than one approach complementarily, such as analyzing reproducibility and bias together, using a set of IQC and EQC data, such as participation in PT. However, the incorporation of software and interlaboratory quality control programs that allow the automation of the MU estimation process (e.g., Bio-Rad UNITY™, (26) Randox Acusera 24/7™ (27) and Controllab CI ONLINE™ (28) can significantly contribute to integrating this concept into laboratory and clinical practice. Therefore, it is imperative that the medical community acknowledges the importance of measurement uncertainty and works to incorporate it into clinical decision-making, promoting safer and more effective patient care. The future of laboratory medicine will depend on a more holistic approach, in which the quality of results, including their uncertainties, is considered a priority in healthcare delivery.

REFERENCES

- INMETRO. Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). Duque de Caxias, RJ. 2012. 94p. Available at: http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/vim_2012.pdf>. Accessed on: August 14, 2024.
- Ćelap I, et al. Measurement uncertainty estimation recommendations. Biochemia medica (Zagreb) 2017;27(3):030502. Available at: https://doi.org/10.11613/BM.2017.030502>. Accessed on: August 14, 2024.
- EUROCHEM / CITAC (2012). Quantifying uncertainty in analytical measurement – QUAM:2012.P1, Guide CG4, 3nd ed. 2012. Available at: https://eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf. Accessed on: August 21, 2024.
- Imagem. ACC Engenharia de medição. Processo de medição: entenda seu impacto nos processos e produtos! Available at: https://accmetrologia.com.br/backup-plim/processo-de-medicao-entenda-seu-impacto-nos-processos-e-produtos/>. Accessed on: August 18, 2024.
- CLSI EP29-A Expression of Measurement Uncertainty in Laboratory Medicine; Approved Guideline. Vol. 32, N° 4, 2012. Available at: https://clsi.org/standards/products/method-evaluation/documents/ep29/. Accessed on: August 21, 2024.
- Pereira P. Uncertainty of Measurement in Medical Laboratories. DOI: 10.5772/62437. In book: New Trends and Developments in Metrology (pp.51-80). Publisher: InTech, Editors: Luigi Cocco, (2016). Available at: https://www.researchgate.net/publication/303289783_Uncertainty_of_Measurement_in_Medical_Laboratories>. Accessed on: August 18, 2024.

- Fernandes JLN, Wollinger W, Garrido BC. Rastreabilidade em medicina laboratorial: um estímulo global para resultados exatos no cuidado com o paciente. Jornal brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 55, n. 4, p. 402–411, 2019. Available at: https://www.scielo.br/j/jbpml/a/5DrKpSwPrM93mcmNNp7Fkqw/>. Accessed on: August 20, 2024.
- Belk WP, Sunderman FW. A survey of the accuracy of chemical analyses in clinical laboratories. American Journal of Clinical Pathology, v. 17, n. 11, p. 853–861, 1947. Available at: https://academic.oup.com/ajcp/article-abstract/17/11/853/1761299?redirectedFrom=fulltext. Accessed on: August 20, 2024.
- 9. Ricós C, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, v. 59, n. 7, p. 491–500, 1999. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10667686/. Accessed on: August 21, 2024.
- Kallner A. Estimation of uncertainty in measurements in the clinical laboratory. Clinical chemistry and laboratory medicine 2013; 51(12): 2249–2251. DOI 10.1515/cclm-2013-0749. Available at: https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2013-0749/html. Accessed on: August 18, 2024.
- Milinkovic, et al.: Uncertainty of measurement in laboratory medicine. Journal of Medical Biochemistry 2018; 37 (3). DOI: 10.2478/jomb-2018-0002. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30584397/. Accessed on: August 18, 2024.
- Imagem. Available at: https://towardsdatascience.com/understanding-the-68-95-99-7-rule-for-a-normal-distribution-b7b7cbf760c2. Accessed on: August 10, 2024.
- Junior E. Desvendando o Teorema Central do Limite. Available at: https:// medium.com/data-hackers/desvendando-o-teorema-central-do-limite-17cbb13beb1a>. Accessed on: September 19, 2024.
- 14. Milinković N, Jovičić S, Ignjatović S. Measurement uncertainty as a universal concept: can it be universally applicable in routine laboratory practice? Critical reviews in clinical laboratory sciences, v. 58, n. 2, p. 101–112, 2021. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32672116/. Accessed on: August 21, 2024.
- Wernimont GT. Use of statistics to develop and evaluate analytical methods, AOAC: Arlington, 1985.
- Royal Society of Chemistry / Analytical Methods Committee. Uncertainty of measurement: implications of its use in analytical science Analyst 1995, v. 120, p. 2303-2308.
- de Oliveira EC, de Aguiar PF. Comparação de diferentes abordagens para avaliação da incerteza Química nova, v. 32, n. 6, 2009. Available at: https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600051>. Accessed on: August 18, 2024.

- 18. Rigo-Bonnin R, et al. Different top-down approaches to estimate measurement uncertainty of Whole blood tracolimus mass concentration values. Clinical biochemistry 57 (2018) 56-61. Available at: https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.05.005>. Accessed on: August 21, 2024.
- Frenkel R, Farrance I, Badrick T. Bias in analytical chemistry: A review of selected procedures for incorporating uncorrected bias into the expanded uncertainty of analytical measurements and a graphical method for evaluating the concordance of reference and test procedures. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, v. 495, p. 129–138, 2019. Available at: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898119317383?via%3Dihub. Accessed on: August 21, 2024.
- Eren F, Oguz, EF. The estimation of measurement uncertainty of glycated hemoglobin at atellica solutions. International Journal of Medical Biochemistry, 2021.. DOI: 10.14744/ijmb.2021.84755. Available at: https://internationalbiochemistry.com/jvi.aspx?un=IJMB-84755&volume=>. Accessed on: August 21, 2024.
- 21. ISO 15189-2012 Medical laboratories Requirements for quality and competence. International Organization for Standardization, 2012.
- Coskun A, Berçik İnal B, Serdar M. Measurement uncertainty in laboratory medicine: the bridge between medical and industrial metrology. Turkish journal of biochemistry, v. 44, n. 2, p. 121–125, 2019. Available at: https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/tjb-2019-0170/html. Accessed on: August 20, 2024.
- Plebani M, et al. What information on measurement uncertainty should be communicated to clinicians, and how? Clinical biochemistry, v. 57, p. 18–22, 2018. Available at: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009912017311803?via%3Dihub. Accessed on: August 18, 2024.
- 24. Galindo-Méndez M, Sánchez-López A, Cruz-Fuentes L. The estimation of uncertainty of measurement of glycated hemoglobin as an analytical performance specification and in the interpretation of its results. Clinical biochemistry, v. 63, p. 92–96, 2019. Available at: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009912018309263?via%3Dihub. Accessed on: August 20, 2024.
- 25. INMETRO JCGM 106:2012. Avaliação de dados de medição Suplemento 6 do "Guia para a expressão de incerteza de medição" O papel da incerteza de medição na avaliação da conformidade. Duque de Caxias, RJ: INMETRO/CICMA/SEPIN, 2022.
- Bio-Rad UNITY Quality control data management. Available at: https://www.bio-rad.com/pt-br/applications/quality-management/data-management-systems. Accessed on: September 18, 2024.
- Randox Acusera 24/7 Measurement Uncertainty VsTotal Error. Available at: https://www.randox.com/mu-vs-te/. Accessed on: September 18, 2024.
- Controllab CI ONLINE. Available at: https://controllab.com/solucoes/controle-interno/. Accessed on: September 18, 2024.

Exames laboratoriais para o diagnóstico do diabetes com ênfase nos testes de sobrecarga

Laboratory tests for diabetes diagnosis with an emphasis on glucose load testing

Mauren Isfer Anghebem^{1,2}, Clara Helena Zonatto², Jaqueline Souza Chaves Taniquchi Leite², Victor Melgarejo Marques², Alceu de Oliveira Toledo Júnior³, Fabiane Gomes de Moraes Rego^{1,4}, Geraldo Picheth⁴

- ¹ Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná/UFPR, Curitiba, PR, Brasil.
- ² Escola de Medicina e Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.
- ³ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa; Diretor Técnico do Laboratório do Hospital Vicentino, Ponta Grossa, PR, Brasil.
- ⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná/UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

Resumo

O Diabetes mellitus é uma das mais comuns doenças crônicas no mundo e o diagnóstico é frequentemente laboratorial. O monitoramento constante e o controle glicêmico reduzem as complicações micro/macrovasculares e os impactos do diabetes. Portanto, compreender o que há de mais atual em relação ao diagnóstico do diabetes é fundamental. Esta revisão narrativa, baseada na busca de literatura na base de dados PubMED utilizando os descritores, em inglês e português, "diabetes", "diabetes mellitus", "diabetes gestacional", "diagnóstico do diabetes", "teste de sobrecarga de glicose", "TTGO" e "curva glicêmica", tem por objetivo abordar os critérios atuais para o diagnóstico do diabetes, incluindo o diabetes gestacional, e destacar os ensaios laboratoriais utilizados no diabetes, com ênfase nos testes de sobrecarga de glicose.

Palavras-chave: Diabetes; Diabetes gestacional; Diagnóstico do Diabetes; Teste de Sobrecarga de Glicose.

Diabetes mellitus is one of the most common chronic diseases worldwide, and its diagnosis is often laboratory-based. Continuous monitoring and glycemic control reduce micro/macrovascular complications and the overall impact of diabetes. Therefore, understanding the latest advances in diabetes diagnosis is essential. This narrative review, based on a literature search on the PubMed database using the descriptors in both English and Portuguese, "diabetes", "diabetes mellitus", "gestational diabetes", "diabetes diagnosis", "glucose overload tolerance", "OGTT" and "glycemic curve", aims to discuss current criteria for diabetes diagnosis, including gestational diabetes, and to highlight the laboratory assays used in diabetes, with an emphasis on glucose load tests.

Keywords: Diabetes; Gestational Diabetes; Diabetes Diagnosis; Glucose Load Test.

Correspondência Mauren Isfer Anghebem E-mail: mauren.isfer@ufpr.br

Recebido em 02/11/2024 | Aprovado em 16/11/2024 | DOI: 10.21877/2448-3877.202400217.pt

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é o nome dado a um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos decorrentes da falta e/ou incapacidade da insulina em exercer adequadamente seus efeitos, resultando em hiperglicemia crônica.⁽¹⁾

O diabetes apresenta um longo período subclínico definido por hiperglicemia e pode permanecer sem diagnóstico, caso não seja realizada uma triagem ou outros mecanismos de identificação precoce. Em todos os tipos de diabetes, o alvo primário para minimizar as consequências da hiperglicemia crônica é o controle glicêmico. (2) Por esta razão, o laboratório de análises clínicas é essencial para o diagnóstico e monitoramento desta condição.

Três exames laboratoriais são utilizados para fins diagnósticos: a glicemia, de jejum (GJ) e ao acaso ou randômica (GR), o teste de tolerância à glicose via oral (TTGO) e a hemoglobina glicada fração A1c (HbA1c).⁽³⁾

A determinação da glicemia após 8 horas em jejum informa a concentração glicêmica no momento da coleta, visto que reflete a regulação da glicose no estado pós-absortivo, em que se espera um aumento da razão dos hormônios glucagon/insulina no plasma. A HbA1c reflete a glicemia média dos últimos 2 a 3 meses, avaliando o *status* glicêmico de longo prazo. E o TTGO reflete o metabolismo da glicose e a resposta da liberação de insulina após uma sobrecarga controlada de glicose.⁽⁴⁾ Cada um dos exames apresenta vantagens e desvantagens que devem ser ponderadas.

Esta revisão narrativa, baseada na busca de literatura na base de dados PubMED utilizando os descritores, em inglês e português, "diabetes", "diabetes mellitus", "diabetes gestacional", "diagnóstico do diabetes", "teste de sobrecarga de glicose", "TTGO" e "curva glicêmica", tem como objetivo informar sobre os critérios atuais para o diagnóstico do diabetes, incluindo o diabetes gestacional, e destacar ensaios laboratoriais utilizados no diabetes, com ênfase nos testes de sobrecarga de glicose, destacando suas diferenças, finalidades e limitações.

CRITÉRIOS ATUAIS PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO DIABETES

Em março de 2024, o posicionamento da Federação Internacional de Diabetes (IDF, International Diabetes Federation)

reuniu evidências de que a glicemia determinada 1 hora após a sobrecarga de glicose via oral (TTGO-1h) é mais eficaz na classificação do estado glicêmico quando comparada com dosagens isoladas de GJ ou HbA1c, além de permitir a detecção precoce de pessoas com risco aumentado para progressão para *Diabetes mellitus* do tipo 2 (DM2), característica também conhecida como pré-diabetes.

Diversos estudos fundamentaram a recomendação da TTGO-1h para o diagnóstico de diabetes e pré-diabetes, por ser um preditor mais sensível de DM2, doença cardiovascular, microangiopatia e mortalidade em comparação com os critérios usados até então, (5-9) com destaque para uma metanálise de 15 estudos totalizando 35.551 participantes representando etnias caucasianas e não caucasianas (46,2%), incluindo ameríndios, japoneses, mexicanos americanos e sul-asiáticos. Este estudo identificou que o valor de corte de TTGO-1h de 209mg/dL apresentou boa sensibilidade e especificidade para detectar o DM2. Ao valor de corte de 209mg/dL (IC 95% 10,6, 12,6) foi associado uma sensibilidade de 0,92 (0,87, 0,95), especificidade de 0,91 (0,88, 0,93), com área sob a curva (AUC) de 0,939 (região de confiança de 95% para sensibilidade, 0,904, 0,946) e um valor preditivo positivo de 45%.(10)

Com base nestas premissas, o posicionamento recomenda o uso de glicemia no TTGO-1h com pontos de corte validados de 155mg/dL (8,6 mmol/L) para hiperglicemia intermediária e ≥209mg/dL (11,6 mmol/L) para caracterizar o DM2. A hiperglicemia intermediária, ou "pré-diabetes", é um estado que abrange a região entre uma glicemia "normal" e aquela que caracteriza o diabetes, e inclui os quadros de glicemia de jejum alterada e tolerância diminuída à glicose.⁽¹¹⁾

Assim, no Brasil, os critérios laboratoriais atuais para o diagnóstico de diabetes e pré-diabetes consideram este novo ponto de corte e são assim definidos: glicemia de jejum acima de ou igual a 126mg/dL, HbA1c maior ou igual a 6,5%, glicemia no TTGO-1h acima de ou igual a 209mg/dL ou glicemia no TTGO-2h acima de ou igual a 200mg/dL. Se somente um exame estiver alterado, este deverá ser repetido para confirmação. Na presença de sintomas típicos de hiperglicemia (poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso rápida ou cetoacidose), é recomendado que o diagnóstico seja estabelecido com a glicemia plasmática obtida ao acaso, quando esta for acima de ou igual a 200mg/dL (Tabela 1).⁽⁴⁾

Tabela 1

Critérios laboratoriais para o diagnóstico de diabetes e pré-diabetes

| Critérios | Normal | Pré-diabetes | Diabetes |
|------------------------------|------------|--------------|-----------------|
| Glicemia de jejum* | < 100mg/dL | 100-125mg/dL | \geq 126mg/dL |
| Glicemia ao acaso** | - | - | \geq 200mg/dL |
| Glicemia de 1 hora no TTGO# | < 155mg/dL | 155-208mg/dL | \geq 209mg/dL |
| Glicemia de 2 horas no TTGO# | < 140mg/dL | 140-199mg/dL | \geq 200mg/dL |
| HbA1c | < 5,7 % | 5,7-6,4% | ≥ 6,5 % |

Legenda: TTGO: teste de tolerância à glicose via oral; HbA1c: hemoglobina glicada. * Associada a sintomas clássicos de diabetes. ** Considera-se como jejum a cessação de ingesta calórica de 8 a 12 horas. # Carga oral equivalente a 75g de glicose anidra diluída em água.

Fonte: Adaptado de Rodacki et al., 2024. (4)

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO DIABETES GESTACIONAL

O *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) é definido como uma intolerância aos carboidratos a qual se inicia durante a gestação, porém não preenche critérios diagnósticos de DM fora da gestação.⁽¹²⁾

O diagnóstico de DMG também tem evoluído ao longo dos anos para identificar a hiperglicemia detectada pela primeira vez na gestação. Duas categorias podem ser evidenciadas durante a gestação: diabetes manifesto que foi evidenciado apenas na gestação (do inglês, *overt diabetes*) ou DMG.⁽¹²⁾

Em 1979, o Grupo Nacional de Dados de Diabetes (National Diabetes Data Group – NDDG) recomendou a realização de um teste de desafio com a administração de 50g de glicose e dosagem de glicemia após 1 hora, na primeira consulta pré-natal de mulheres grávidas com fatores de risco, conhecido como teste de O'Sullivan. Este exame tinha por objetivo o diagnóstico de DMG antes de 24 a 28 semanas de gestação, o diabetes gestacional de início precoce. No caso de resultado positivo, seria realizado um TTGO de 3 horas com sobrecarga de 100g de glicose.⁽¹³⁾

Em 2010, a Associação Internacional de Grupos de Estudo sobre Diabetes e Gravidez (International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups – IADPSG) desenvolveu novos critérios diagnósticos de DMG com base nos resultados do estudo prospectivo Hiperglicemia e Resultado Adverso na Gravidez - HAPO, do inglês Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome. O critério da IADPSG propôs usar um valor de GJ de 92 a 126mg/dL durante as primeiras 24 semanas

de gestação para definir DMG de início precoce. Este limite é idêntico ao usado após 24 semanas de gravidez. (14)

Em 2011, a Associação Americana de Diabetes (American Diabetes Association – ADA) e, em 2013, a Organização Mundial de Saúde – OMS acataram os critérios do IADPSG para o diagnóstico de DMG.⁽¹⁵⁾ Entretanto, a OMS destacou que, caso a glicemia após sobrecarga seja ≥ 200mg/dL seria definida a presença de DM diagnosticado na gestação (*overt diabetes*), e não de DMG.⁽¹²⁾

Em 2017, a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) juntamente com a Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO), a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) e o Ministério da Saúde do Brasil definiram uma proposta conjunta de padronização do rastreamento e diagnóstico do DMG no país. Os critérios brasileiros foram adaptados dos critérios da OMS, (16) conforme fluxograma da Figura 1.

Na primeira consulta pré-natal de gestantes sem conhecimento do diagnóstico prévio de DM, é recomendado solicitar GJ com o objetivo de detectar diabetes manifesto (*overt diabetes*) e DMG precoce. O diagnóstico de DMG deve ser considerado nas gestantes com GJ entre 92mg/dL e 125mg/dL em qualquer momento da gestação. Para todas as gestantes sem diagnóstico prévio de DM, independentemente da presença de fatores de risco, é recomendado que a investigação diagnóstica do DMG seja feita entre a 24ª e 28ª semana de gestação, através da realização de TTGO, com dosagem da glicose plasmática em jejum, 1 e 2 horas após a ingestão de 75g de glicose anidra. No rastreamento do DMG, após a 24ª semana, quando o valor da glicemia de 2 horas no TTGO com 75g estiver ≥ 200mg/dL deve ser considerada a presença de DM diagnosticado na gestação (*overt diabetes*; diabetes manifesto) e não de DMG.⁽¹⁶⁾

Outras estratégias são recomendadas por entidades internacionais, como é o caso do Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas (American College of Obstetricians and Gynecologists - ACOG), que endossou uma abordagem em duas etapas, conhecido como estratégia de dois passos ou *two-step*.⁽¹⁷⁾ Ou seja, o diagnóstico do DMG pode ser realizado com qualquer uma das duas estratégias: 1. One-step ou estratégia de um passo: que é o TTGO de 75g derivado dos critérios do IADPSG, já mencionado anteriormente, ou 2. *Two-step* ou estratégia de dois passos: que é uma abordagem mais antiga de "duas etapas" com uma triagem de 50g, sem jejum, seguida por um TTGO de 100g para aqueles com triagem positiva. Esta estratégia se baseia nos critérios de O'Sullivan e Mahan.⁽³⁾

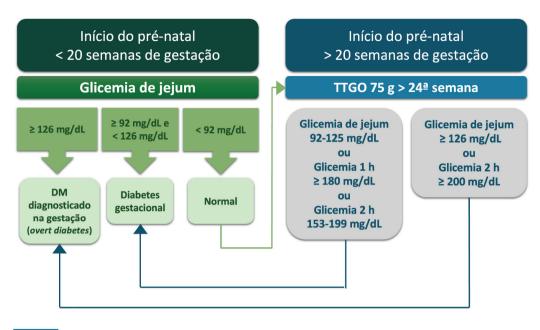


Figura 1

Classificação da hiperglicemia em gestantes sem DM previamente diagnosticado.

Legenda: DM: Diabetes mellitus; TTGO: teste de tolerância à glicose via oral.

Fonte: Adaptado de Zajdenverg et al., 2024. (16)

Na estratégia one-step, o TTGO é realizado com 75g de glicose e o diagnóstico de DMG é feito guando gualquer um dos seguintes valores de glicose plasmática é atingido ou excedido: glicose plasmática ³ 92mg/dL, glicose plasmática de 1 hora ³ 180mg/dL, glicose plasmática de 2 horas ³ 153mg/dL. Na estratégia two-step, se a glicose plasmática de 1 hora após a carga com 50g de glicose, sem jejum, realizada entre a 24ª e 28ª semanas de gestação em indivíduos sem diagnóstico prévio de diabetes for 3 130, 135 ou 140mg/dL, é realizado um segundo passo; o TTGO com 100g de glicose, após jejum. Neste caso, o diagnóstico de DMG é feito quando pelo menos dois dos seguintes quatro valores de glicose plasmática (medidos em jejum, 1, 2 e 3 horas durante o TTGO) são atingidos ou excedidos: glicemia plasmática em jejum: 95mg/dL, glicose plasmática de 1 hora ³ 180mg/dL, glicose plasmática de 2 horas: 155 mg/dL, glicose plasmática de 3 horas: 140mg/dL.

Uma vez que diferentes critérios diagnósticos identificarão diferentes graus de hiperglicemia materna e risco materno/ fetal, existe grande discordância entre especialistas sobre qual é a melhor estratégias para o diagnóstico de DMG. (18-20)

EXAMES LABORATORIAIS NO CONTEXTO DO DIABETES

Cada um dos exames laboratoriais recomendados para o diagnóstico do diabetes tem vantagens e limitações, resumidas na Tabela 2.

A GJ apresenta boa reprodutibilidade, é amplamente disponibilizada em serviços de saúde e os métodos analíticos para sua determinação já estão bem estabelecidos. No entanto, sua análise requer jejum e seus valores podem ser afetados por condições agudas e quadros de estresse, por exemplo, comuns durante coletas pediátricas. Além disso, em amostras coletadas sem inibidores de glicólise, como o fluoreto ou iodoacetato, a glicose pode reduzir de 5% a 7% por hora, podendo afetar a interpretação do ensaio. (22) Os laboratórios clínicos utilizam primariamente métodos enzimáticos, sendo a glicose oxidase e hexoquinase-UV os predominantes para a quantificação da glicose plasmática, os quais são bem estabelecidos e reprodutíveis. Para evitar erros de classificação de indivíduos, a dosagem da glicose deve minimizar o erro analítico total e os métodos devem

ser isentos de vieses mensuráveis. Com base na variação biológica, a medição da glicose deve ter imprecisão analítica £ 2,4%, bias £ 2,1% e erro total £ 6,1%. $^{(21)}$

A HbA1c apresenta como características relevantes não necessitar de jejum e indicar a glicemia média pregressa entre 2 a 3 meses. Entre as desvantagens deste exame estão o custo expressivamente maior quando comparado ao da GJ e sua disponibilidade limitada em alguns países em desenvolvimento. Além disso, por ser uma medida indireta da glicemia, pode sofrer influência de alguns fatores não glicêmicos, como variantes de hemoglobina, medicamentos (hidroxiureia, vitamina C, aspirina etc.), raça, idade, função renal, entre outros.

(22) O método utilizado para a determinação da HbA1c deve ser certificado pelo Programa Nacional de Padronização de Glicohemoglobina (National Glycohemoglobin Standardization Program – NGSP, www.ngsp.org) e padronizado ou rastreável ao ensaio de referência do Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). Só assim os resultados de HbA1c de diferentes laboratórios são harmonizados e comparáveis com os reportados no DCCT.(3)

Alguns estudos sugerem que a GJ é mais precisa que a HbA1c no diagnóstico de diabetes; enquanto a HbA1c se mostra mais específica, porém menos sensível quando comparada à GJ e ao TTGO. (23,24)

Tabela 2

Vantagens e limitações dos exames laboratoriais de rotina para o diabetes

| Ensaio | Vantagem | Limitação |
|--------|--|---|
| GJ | Quantificação automatizada simples Baixo custo Amostra única Disponível em todos os locais Critérios estabelecidos | Necessita jejum ≥ 8 horas Variabilidade biológica grande Variação diurna Amostra não é estável ("glicólise") Vários fatores afetam a concentração da glicose (estresse, doença aguda) A concentração varia com a fonte da amostra (venosa, capilar ou arterial) Concentração no sangue total diferente do plasma A GJ tem menor associação com as complicações do DM (comparado à HbA1c) Reflete a homeostase da glicose em um único momento no tempo |
| TTGO | Indicador sensível do risco para desenvolver diabetes Marcador precoce de comprometimento da homeostase da glicose | Baixa reprodutibilidade Preparo longo do paciente Teste demorado e inconveniente para o paciente Dose oral de glicose pode ser impalatável Maior custo Influenciado por vários medicamentos Sujeito às mesmas limitações da GJ, como amostra não estável Necessidade de realizar o teste pela manhã |
| НЬА1с | Paciente não necessita de jejum Amostra pode ser obtida em qualquer horário do dia Pequena variação biológica Amostra estável Não afetado por fatores agudos como estresse e exercício Reflete a concentração de glicose em longo período anterior à coleta Dosagem padronizada (NGSP) Amostra única de sangue total A concentração prediz o desenvolvimento de complicações microvasculares do DM Aplicação na orientação do tratamento. | Pode ser alterada por outros fatores além da glicose, como alteração no tempo de vida dos eritrócitos, etnicidade A presença de hemoglobinopatias interfere no resultado Pode não estar disponível em todos os laboratórios Custo maior |

Legenda: GJ: glicemia de jejum; TTGO: teste de tolerância à glicose via oral; HbA1c: hemoglobina glicada; NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program (Programa Nacional de Padronização de Glico-hemoglobina).

Fonte: Adaptado de Sacks et al., 2023.^{[21)}

A GJ e a HbA1c são os exames laboratoriais recomendados e amplamente utilizados em razão da sua relativa conveniência e reprodutibilidade em comparação com o TTGO. O TTGO apresenta a melhor sensibilidade entre os três exames e é considerado padrão ouro para a detecção de pessoas sob risco aumentado para o desenvolvimento de diabetes, classificadas como pré-diabetes ou hiperglicemia intermediária. A HbA1c tem baixa sensibilidade (47% a 67%) e alta especificidade (98% a 99%) para o diagnóstico de DM, em relação à glicemia determinada 2 horas após a sobrecarga de glicose via oral com dose de 75g de glicose (TTGO-2h).⁽⁴⁾

O TTGO-2h apresenta elevada variabilidade (16,7%) quando comparado à GJ (5,7%) e à HbA1c (3,6%).⁽²⁵⁾ Logo, entre as desvantagens do TTGO estão a baixa reprodutibilidade, o tempo prolongado para a realização do exame e a possibilidade de desconforto (náusea e vômitos) após a ingesta da sobrecarga de glicose.⁽²²⁾

A acurácia e a aplicabilidade dos exames laboratoriais para fins de diagnóstico da hiperglicemia são analisadas através de estudos clínicos, e diferentes estratégias e valores de corte vêm sendo propostos no decorrer do tempo. Há 30 anos, por exemplo, valores de glicemia de jejum acima de ou iguais a 140mg/dL eram usados para diagnosticar diabetes, e não existia a categoria de risco aumentado para diabetes, hoje denominada "pré-diabetes". (26) Os critérios diagnósticos para diabetes também evoluíram ao longo do tempo para incorporar a HbA1c a partir de 2010, previamente utilizada apenas para o monitoramento.

Testes de Sobrecarga de Glicose

A tolerância à glicose avalia a capacidade do organismo responder a uma carga de glicose. (29) Todo exame em que há ingesta oral de quantidade conhecida de glicose anidra diluída em água, com posterior determinação da glicemia plasmática em tempo pré-definido, é chamado de teste de sobrecarga de glicose. No Brasil, o teste de tolerância à glicose via oral (TTGO), com dosagem da glicose plasmática em jejum, seguida de determinação da glicemia 1h e 2h após a sobrecarga é, genericamente, denominado de teste de sobrecarga de glicose. Entretanto, a dosagem de glicemia de jejum, seguida de 5 ou 6 determinações de glicemia em tempos definidos, após sobrecarga de glicose, como por exemplo os tempos 0 (jejum), seguidos de coletas aos 30, 60, 90, 120 e 180 minutos, conhecida como curva glicêmica, também é um teste de sobrecarga de glicose. (30) Este exame é frequentemente solicitado pelos clínicos, embora não

existam intervalos de referência e critérios de corte definidos ou recomendados na literatura atual.

TTGO-1h e TTGO-2h

O TTGO foi proposto há mais de 100 anos como uma dosagem capaz de avaliar a resposta do organismo a uma carga suprafisiológica de glicose. (31) Seu uso como ferramenta no contexto do diagnóstico do diabetes evoluiu consideravelmente ao longo do último século. (32)

O TTGO é o método de referência para a avaliação da tolerância à glicose, apesar da reprodutibilidade reconhecidamente baixa e de apresentar um elevado coeficiente de variação no TTGO-2h. (33,34) As evidências reforçam que o TTGO-1h é mais eficaz na classificação do estado glicêmico quando comparado a dosagens isoladas de GJ ou HbA1c. Indivíduos com hiperglicemia intermediária (pré-diabetes) e DM2 apresentaram maior adiposidade, pressão arterial, ácido úrico, pior perfil lipídico e inflamatório e redução progressiva de sensibilidade à insulina, quando comparados com indivíduos normoglicêmicos. O TTGO-1h consegue identificar indivíduos com este perfil de risco cardiometabólico desfavorável. (35)

Deve ser destacado que o TTGO é o ensaio de referência para o diagnóstico de DMG, em que as concentrações plasmáticas de glicose em jejum apresentam sensibilidade diagnóstica reduzida. Relevante apontar que, em gestantes sem diagnóstico prévio de DM, um TTGO alterado pode ser fator de risco independente para hiperglicemia pós-parto. (17,36)

Curva glicêmica

A determinação seriada de glicemia após sobrecarga com glicose permite a observação de uma curva glicêmica, definida pelo padrão de aumento e queda das concentrações de glicose após a sobrecarga de glicose. A forma da curva reflete, portanto, a função das células beta pancreáticas e o risco metabólico. (29) Diferenças no formato da curva glicêmica são documentadas desde a década de 1950, porém só recentemente pesquisadores consideraram usar as características da curva de glicose como uma ferramenta preditiva. (37)

Estudos têm evidenciado que o formato da curva de glicose pode ser utilizado para predizer a intolerância à glicose e o risco de progressão para DM2. (30,38) O perfil da curva glicêmica é definido como monofásico, bifásico ou trifásico, ou não classificado, conforme representado na Figura 2. Uma curva monofásica pode ser definida como um aumento na glicemia entre 30 e 90 minutos seguido por um declínio entre 90 e 120 minutos. Uma curva de resposta bifásica pode ser

definida como uma diminuição da glicose após um aumento inicial, seguida por um segundo aumento. (39) O padrão bifásico é encontrado em 20% a 30% dos adultos sem diabetes. (38)

Indivíduos com uma curva monofásica apresentam menor sensibilidade à insulina e diminuição da função das células em comparação com indivíduos com uma curva bifásica. (40,41) Um perfil de resposta glicêmica bifásica ou trifásica (não classificada), caracterizado por aumento, queda e subseguente aumento de glicose após a sobrecarga glicêmica, tem sido associado a melhor função das células beta e concentrações mais baixas de glicose em comparação com um padrão monofásico. (37,41-43) Uma coorte multiétnica de adultos com diagnóstico recente de DM2 comparou as diferenças no formato da curva glicêmica, considerando sexo, raça, índice de massa corporal e diferenças metabólicas entre os dois formatos de curva mais comuns, monofásico e de aumento contínuo (apenas elevação da concentração de glicose no período do exame). O grupo estudado que apresentou curva com aumento contínuo da glicose foi associado com maior disfunção de células beta e valores de HbA1c mais elevados em comparação ao grupo com curva de padrão monofásico.

Estes dados sugerem que a forma da curva pode também servir como um biomarcador para diabetes. (29)

FATORES QUE INFLUENCIAM O TESTE DE SOBRECARGA DE GLICOSE

A performance do TTGO é diretamente afetada por fatores pré-analíticos e analíticos, além daqueles relacionados à dosagem laboratorial da glicemia. A reprodutibilidade do TTGO tem sido questionada por décadas, mas este exame continua sendo considerado "padrão ouro" para o diagnóstico de DM2 e DMG. (44-46)

Fatores pré-analíticos, como a variação biológica ou intraindividual, o esvaziamento gástrico, a solução de glicose para a sobrecarga de diferentes fabricantes, a liberação de hormônios hiperglicemiantes como o cortisol e a adrenalina, a idade e o sexo podem afetar a reprodutibilidade do TTGO; (47) assim como fatores analíticos, como a calibração do analisador, o método e os reagentes utilizados na determinação da glicemia plasmática. (47,48) Estas variáveis fazem com que o TTGO apresente reprodutibilidade de 64% a 80%. (47,49)

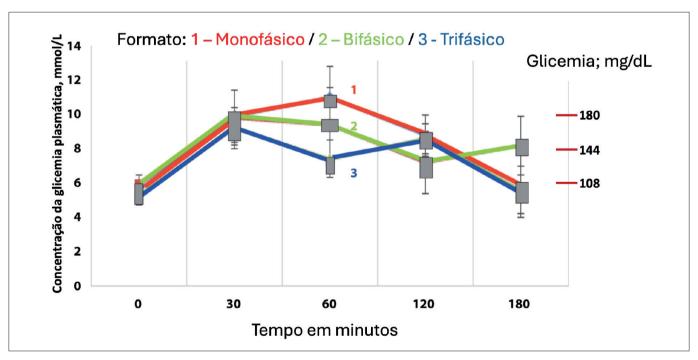


Figura 2

Padrões de formato da curva glicêmica.

Legenda: O eixo das ordenadas, numerado de O a 14, representa a concentração de glicose plasmática, em mmol/L. O eixo das abscissas, numerado de O a 180, representa o tempo, em minutos. A linha azul representa uma curva glicêmica de padrão monofásico. A linha vermelha representa uma curva glicêmica de padrão bifásico. A linha vermelha representa uma curva glicêmica de padrão trifásico.

Fonte: Adaptado de Cheng et al., 2019. (37)

Na sequência, apresentamos e discutimos alguns fatores que influenciam este exame.

Dieta

O preparo adequado para a realização do TTGO é fundamental para evitar resultados falsamente elevados em razão da baixa ingesta de carboidratos nos dias que antecedem o exame. Os mecanismos pelo qual dietas com baixo teor de carboidratos afetam o metabolismo da glicose são complexos e não estão totalmente compreendidos. Alguns propõem que o mecanismo se deve em parte à perda da primeira fase de liberação de insulina, resultando na redução da captação periférica e hepática de glicose e na supressão incompleta da produção hepática de glicose. A baixa ingesta de carboidratos também afeta a sensibilidade à insulina, além de estar associada a um aumento nos ácidos graxos livres no plasma, o que pode reduzir a secreção de insulina.⁽⁵⁰⁾

Alguns estudos mostraram que uma dieta com baixa ingesta de carboidratos não afetaria o resultado do TTGO e que manter a dieta usual antes de se submeter ao exame refletiria melhor a capacidade do indivíduo de metabolizar a glicose. (51,52) Contudo, para manter uma abordagem padronizada e aumentar a reprodutibilidade do método, o TTGO deve ser precedido por dieta sem restrição de carboidratos e com ingesta mínima diária de 150g de carboidratos durante os 3 dias que antecedem o exame, o qual deve ser realizado após jejum de 8 a 10 horas. (3,53)

Exercícios físicos

A prática de exercícios físicos pode alterar resultados de exames laboratoriais. Apesar dos dados contraditórios da literatura sobre a duração e intensidade do exercício que afetaria o resultado de exames, a atividade física influencia a forma como o organismo processa os nutrientes, como a glicose. (54-56)

No início da atividade física, ocorre uma inibição da secreção de insulina e, consequentemente, hiperglicemia. Este mecanismo ocorre para fornecer energia para o organismo. Elevação na glicemia plasmática pode ser observada 4 horas após exercícios extenuantes como uma maratona, retornando ao basal dentro de 24 horas.⁽⁵⁷⁾

Após esta fase inicial de hiperglicemia, a glicose é utilizada pelas células musculares de forma independente da insulina, provavelmente por aumento no número de transportadores de membrana ativos, ocasionando hipoglicemia. A redução

prolongada da concentração de glicose é influenciada pela adrenalina – antagonista da insulina – que deixa de ser liberada após esforço físico exaustivo, fazendo com que o efeito da insulina se torne predominante e potencialize a hipoglicemia por, aproximadamente, 2 horas após o término da atividade física. Portanto, é recomendado que nas 24 horas que antecedem a realização do TTGO, exercícios físicos extenuantes sejam evitados.

Fumo

Outro fator interferente do TTGO é o tabaco. O fumo prejudica de forma aguda a tolerância à glicose e a sensibilidade insulínica; logo, não é permitido fumar durante a realização do TTGO.⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾

Solução de glicose

A composição da solução de glicose a ser administrada de forma oral, incluindo os excipientes adicionados para melhorar o paladar e o olfato, pode impactar na secreção endógena de insulina e, consequentemente, na concentração de glicose plasmática, (48) razão pela qual é interessante padronizar e validar a solução de glicose.

A maioria das instituições que realizam TTGO utilizam como fonte de sobrecarga oral de glicose uma solução líquida comercial contendo 75g de D-Glicose pura dissolvidas em 300mL de água, pela praticidade, padrão de qualidade do preparo comercial e possibilidade de oferecer opções aromatizadas para minimizar o desconforto. A percepção humana do sabor doce pode ser alterada pela temperatura, o que motiva a recomendação de oferecer a solução de glicose em temperatura fria em vez de temperatura ambiente, para reduzir náusea, especialmente em gestantes. (62)

Se o estabelecimento for preparar a solução de glicose (*in house*), deve cumprir as boas práticas laboratoriais para garantir que a solução final esteja na concentração padronizada. A água com gás parece melhorar os efeitos colaterais desagradáveis da solução de glicose, mas afeta o resultado do TTGO ao promover um nível glicêmico pós-carga de 1 hora mais alto do que os testes realizados com água sem gás. Assim, a água com gás não deve ser usada. (62)

No caso de TTGO em crianças ou pessoas com baixo peso, se recomenda administrar 1,75g de glicose por kg, até o máximo de 75g. Para uma criança de 12kg, por exemplo, devem ser ingeridos 84mL da solução de glicose a 75g, conforme exemplificado na Figura 3.

300 mL. (solução comercial) – 75g de glicose
 X mL – 1,75g de glicose
 X = 7mL

Deve ser administrado 1,75g de glicose para cada kg de peso da criança ou (pessoa de baixo peso). Em cada 7mL tem 1,75g de glicose.

Logo, se a criança pesa 12kg, o volume da solução de glicose comercial a ser ingerido é 84mL:

12 kg x 7 mL = 84 mL

Figura 3

Cálculo do volume de solução de glicose para crianças e pessoas de baixo peso.

Fonte: Autores.

Esvaziamento gástrico

O comportamento de absorção da solução de glicose apresenta variação intra/interindividual, impactando também na variabilidade das concentrações de glicose no TTGO.(1) Isso porque a taxa de esvaziamento gástrico tem alta variabilidade individual e é um fator que afeta a concentração de glicose plasmática. A sobrecarga de glicose administrada durante o TTGO só consegue passar para o compartimento sanguíneo após ser esvaziada do estômago, digerida em monossacarídeos e transportada através do epitélio intestinal. A capacidade de transporte do intestino delgado e grosso excede os 75g de glicose oferecidos durante o TTGO, portanto, uma etapa limitante da taxa de absorção de glicose é a taxa de esvaziamento gástrico. (63) Ou seja, o esvaziamento gástrico é um dos principais fatores que influenciam a resposta glicêmica na primeira hora após o TTGO ou após uma refeição e é responsável por 30% a 35% da variabilidade na glicemia pós-prandial. (63)

Para minimizar o impacto do esvaziamento gástrico no resultado do TTGO a ingestão do volume total da solução de glicose deve ocorrer, preferencialmente, dentro de 5 minutos.⁽¹⁾

Êmese

A intolerância gástrica à solução de glicose tem sido relacionada à alta osmolaridade da solução, causada pela alta concentração de glicose, o que também retarda o esvaziamento gástrico. (64) A êmese é o principal motivo de falha na realização do TTGO; então é possível sugerir que o indivíduo faça uso de antiemético antes da realização do TTGO. (64)

Em caso de êmese, o exame deve ser interrompido e reagendado. No entanto, se o indivíduo vomitou após 30 minutos da ingesta do líquido, alguns laboratórios seguem com o TTGO informando na observação do laudo que a(o) paciente vomitou, quantas vezes vomitou e em quantos minutos após a ingesta ocorreu a êmese.

Há de se considerar que a hiperêmese gravídica causa alterações no metabolismo materno no primeiro trimestre da gravidez devido à ingesta limitada de calorias e ao jejum. Isso pode reduzir o valor preditivo positivo do rastreamento do DMG no primeiro trimestre por meio do TTGO, com aumento de resultados falsos positivos. Nestes casos é interessante avaliar o uso de outras estratégias de rastreamento e diagnóstico. (66,67)

Interferência de medicamentos

A interpretação do TTGO pode se tornar desafiadora no caso de pessoas utilizando altas doses de medicamentos que sabidamente podem induzir hiperglicemia, como glicocorticoides, antagonistas dos canais de cálcio, contraceptivos orais, inibidores da protease, interferon, betabloqueadores, diuréticos, entre outros. (68)

Tipo de amostra

A glicemia pode ser quantificada no sangue total, soro ou plasma, mas o plasma é o tipo de amostra recomendada para o diagnóstico. Deve ser considerado que a quantidade de água no plasma é aproximadamente 11% maior quando comparada à do sangue total, o que faz com que a glicemia no plasma seja aproximadamente 11% mais elevada comparada à glicemia no sangue total de pessoas com hematócrito normal. (63)

As concentrações de glicose durante um TTGO no sangue capilar de punção digital são significativamente maiores do que aquelas no sangue venoso (média de 30mg/dL, equivalente a 20% a 25%), provavelmente em razão do consumo de glicose nos tecidos. Por outro lado, a diferença média nas amostras em jejum é de apenas 2mg/dL. Isto é, as concentrações de glicemia plasmática e capilar são comparáveis no estado de jejum, mas a glicemia capilar pós-carga é significativamente mais elevada em comparação com a amostra venosa. (69)

Embora existam estudos sobre a viabilidade de autocoleta de sangue capilar em dispositivo específico para a realização de TTGO,⁽⁷⁰⁻⁷²⁾ a amostra de sangue venoso tem sido a recomendada.⁽⁷³⁾

Tubo de coleta

A velocidade de consumo/redução da glicose na amostra é de 5% a 7% por hora, fazendo com que a glicólise *in vitro* seja uma interferência pré-analítica com potencial para alterar a interpretação do TTGO. Para minimizar o efeito da glicólise, duas estratégias podem ser utilizadas pelo laboratório: 1. Coleta de sangue em tubo sem inibidor glicolítico e centrifugação da amostra e separação do soro das células sanguíneas, imediatamente ou dentro de 30 minutos após a coleta; 2. Coleta de sangue em tubos contendo um inibidor glicolítico. (21,69,74)

Logo, em locais onde o processamento imediato da amostra não é possível, se recomenda o uso de inibidores da glicólise, como o fluoreto de sódio (NaF; 2,5mg de fluoreto/mL de sangue). No entanto, o NaF por si só não é um inibidor de ação rápida da glicólise. (21) O mecanismo de ação do fluoreto se baseia na inibição da enzima enolase, que atua tardiamente na via glicolítica. Como tal, a atividade das enzimas glicolíticas localizadas a montante da enolase não é significativamente afetada e estas enzimas permanecem ativas, metabolizando a glucose. Isto explica por que o efeito completo do fluoreto na inibição da glicólise pode demorar de 30 minutos a 4 horas, período durante o qual a concentração de glicose no tubo de coleta pode diminuir consideravelmente, sobretudo quando a amostra é armazenada em temperatura ambiente. (75) Após 4 horas, a concentração de glicose é estável no sangue total por 72 horas em temperatura ambiente na presença de fluoreto. (21,74)

Para melhorar a ação glicolítica, o NaF pode ser usado em associação com anticoagulantes como oxalato de potássio, EDTA, citrato ou heparina de lítio. Vários estudos demonstraram a eficácia de tubos contendo citrato/fluoreto/EDTA (CFE) na inibição da glicólise, (76-78) e atualmente o uso de tubos de coleta tamponados com citrato é recomendado para a determinação de glicemia, especialmente se o processamento da amostra provavelmente demorar mais de 30 minutos após a coleta. (21)

Importante considerar, também, que, em amostras com elevada contagem de leucócitos, a glicólise aumenta mesmo na presença de fluoreto.⁽²¹⁾

Dosagem da glicemia

A dosagem da glicemia é o fator analítico central do TTGO. Uma medição imprecisa da glicose impactará em erro diagnóstico, manejo incorreto do paciente, desfechos desfavoráveis e aumento com os custos de saúde. A glicemia dosada a partir de plasma heparinizado, por exemplo, é aproximadamente 5% menor quando comparada com a glicemia

dosada em soro, possivelmente devido ao desvio de fluido dos eritrócitos para o plasma decorrente do anticoagulante. (69)

Os métodos para medir a glicose devem ser calibrados (rastreáveis) aos métodos de referência. Atualmente, existem dois métodos de referência para medição de glicemia plasmática recomendados pelo Comitê Conjunto para Rastreabilidade em Medicina Laboratorial (Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine): espectrometria de massa por diluição isotópica (IDMS) e enzimático Hexoquinase/Glicose-6-Fosfato Desidrogenase. O desvio máximo permitido entre o método do laboratório e o método de referência é de 4%. No ambiente laboratorial, a glicose é comumente determinada com um dos seguintes métodos enzimáticos: hexoquinase, glicose desidrogenase ou glicose oxidase em reações que são acopladas a um cromóforo, absorção no ultravioleta ou geram uma corrente elétrica. (63)

As metodologias empregando glicose oxidase/peroxidase (colorimétrica) e hexoquinase UV (ultravioleta) apresentam resultados similares e não afetam a caracterização do DM.⁽⁷⁹⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diabetes é uma síndrome multifatorial crônica e silenciosa, que acomete aproximadamente 10% da população global. Não tendo cura, é fundamental que o diagnóstico do DM seja precoce a fim de minimizar as complicações vasculares crônicas.

O laboratório de análises clínicas desempenha papel central no rastreamento, diagnóstico e monitoramento do DM, através dos exames de glicemia plasmática, HbA1c e TTGO. Recentemente foi incorporado a glicemia determinada 1 hora após a sobrecarga de glicose via oral (TTGO-1h) entre os critérios para o diagnóstico de diabetes e pré-diabetes, por ser um preditor mais sensível e precoce de DM2, doença cardiovascular, microangiopatia e mortalidade em comparação com os critérios usados até então. Valores de TTGO-1h de 155mg/dL classificam hiperglicemia intermediária (pré-diabetes) e valores ³ 209mg/dL, diabetes.

Assim, o teste de sobrecarga de glicose passa a ter novo destaque. Há de se enfatizar que todo exame realizado após ingesta oral de quantidade conhecida de glicose, com posterior determinação da glicemia plasmática, é um teste de sobrecarga de glicose. No Brasil, a glicose plasmática em jejum, seguida de determinação da glicemia 1 hora e 2 horas após a ingesta de solução de glicose, é usualmente chamada de TTGO; e o teste de sobrecarga com dosagem de glicemia de jejum, seguida de 5 ou 6 determinações de glicemia a cada

30 minutos após a ingesta da solução de glicose é conhecido como curva glicêmica.

Para a realização de testes de sobrecarga de glicose, é recomendado evitar exercícios físicos intensos nas 24 horas que antecedem o exame. Não é permitido fumar durante o exame. O exame será realizado após jejum de 8 a 10 horas, e durante os 3 dias anteriores ao exame é recomendada dieta com ingesta diária de, no mínimo, 150g de carboidratos.

A solução de glicose deve conter 75g de glicose dissolvidas em 250 a 300mL de água, ou 1,75g de glicose por kg, até o máximo de 75g. A ingesta do volume total da solução de glicose deve ocorrer, preferencialmente, dentro de 5 minutos. Em caso de êmese, o teste deve ser interrompido e reagendado. Contudo, se o paciente vomitou após 30 minutos da ingesta do líquido, pode ser considerado seguir com o exame, reportando no laudo o ocorrido.

É preferível que a amostra utilizada no TTGO seja plasma coletado em tubo contendo citrato/fluoreto/EDTA, caso a centrifugação da amostra e separação do plasma das células sanguíneas não possam ser realizadas em até 30 minutos após a coleta.

A metodologia utilizada para a medida da glicemia deve ser rastreável aos métodos de referência; podendo ser empregados os métodos enzimáticos colorimétricos com glicose oxidase/peroxidase ou os métodos enzimáticos UV utilizando hexoquinase.

Finalmente, deve ser ressaltado que o TTGO e a curva glicêmica apresentam variabilidade elevada, que pode interferir na interpretação dos resultados. Este trabalho revisa observações sobre os testes de sobrecarga de glicose, além de destacar os novos critérios para diagnóstico de diabetes.

REFERÊNCIAS

- Pleus S, Tytko A, Landgraf R, Heinemann L, Werner C, Müller-Wieland D, et al. Definition, Classification, Diagnosis and Differential Diagnosis of Diabetes Mellitus: Update 2023. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes. 2024 Mar 20;132(03):112-24.
- Zhou B, Sheffer KE, Bennett JE, Gregg EW, Danaei G, Singleton RK, et al. Global variation in diabetes diagnosis and prevalence based on fasting glucose and hemoglobin A1c. Nat Med. 2023 Nov 9;29(11):2885-901.
- ElSayed NA, Aleppo G, Bannuru RR, Bruemmer D, Collins BS, Ekhlaspour L, et al. ADA. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2024. Diabetes Care. 2024 Jan 1;47(Supplement_1):S20-42.
- Rodacki M, Cobas RA, Zajdenverg L, Silva Júnior WS da, Giacaglia L, Calliari LE, et al. Diagnóstico de diabetes mellitus. In: Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes. Conectando Pessoas; 2024.
- Abdul-Ghani MA, Abdul-Ghani T, Ali N, DeFronzo RA. One-Hour Plasma Glucose Concentration and the Metabolic Syndrome Identify Subjects at High Risk for Future Type 2 Diabetes. Diabetes Care. 2008 Aug 1;31(8):1650-5.

- Ha J, Chung ST, Bogardus C, Jagannathan R, Bergman M, Sherman AS. One-hour glucose is an earlier marker of dysglycemia than two-hour glucose. Diabetes Res Clin Pract. 2023 Sep;203:110839.
- Alyass A, Almgren P, Akerlund M, Dushoff J, Isomaa B, Nilsson P, et al. Modelling of OGTT curve identifies 1 h plasma glucose level as a strong predictor of incident type 2 diabetes: results from two prospective cohorts. Diabetologia. 2015 Jan 8;58(1):87-97.
- Fiorentino TV, Marini MA, Andreozzi F, Arturi F, Succurro E, Perticone M, et al. One-Hour Postload Hyperglycemia Is a Stronger Predictor of Type 2 Diabetes Than Impaired Fasting Glucose. J Clin Endocrinol Metab. 2015 Oct 1;100(10):3744-51.
- Fiorentino TV, Marini MA, Succurro E, Andreozzi F, Perticone M, Hribal ML, et al. One-Hour Postload Hyperglycemia: Implications for Prediction and Prevention of Type 2 Diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2018 Sep 1;103(9):3131-43.
- Ahuja V, Aronen P, Pramodkumar TA, Looker H, Chetrit A, Bloigu AH, et al. Erratum. Accuracy of 1-Hour Plasma Glucose During the Oral Glucose Tolerance Test in Diagnosis of Type 2 Diabetes in Adults: A Meta-analysis. Diabetes Care 2021;44:1062–1069. Diabetes Care. 2021 Jun;44(6):1457-1457.
- 11. Bergman M, Manco M, Satman I, Chan J, Schmidt MI, Sesti G, et al. International Diabetes Federation Position Statement on the 1-hour postload plasma glucose for the diagnosis of intermediate hyperglycaemia and type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2024 Mar;209:111589.
- 12. Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy: A World Health Organization Guideline. Diabetes Res Clin Pract. 2014 Mar;103(3):341-63.
- 13. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance. Diabetes. 1979 Dec 1;28(12):1039-57.
- 14. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. Diabetes Care. 2010 Mar 1;33(3):676-82.
- González-González NL, González-Dávila E, Megía A, Pintado P, Vega B, Padrón E, et al. The NDDG criteria versus the IADPSG or the ADA criteria for diagnosing early-onset gestational diabetes mellitus or abnormal glucose tolerance. International Journal of Gynecology & Obstetrics. 2023 Mar 26;160(3):906-14.
- Zajdenverg L, Façanha CFS, Dualib PM, Golbert A, Moisés ECD, Calderon I de MP, et al. Rastreamento e diagnóstico da hiperglicemia na gestação. In: Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes. Conectando Pessoas: 2022.
- 17. Mi C, Liu H, Peng H, Cheng C, Wang M, Liu H, et al. Relationships Among Pre-Pregnancy BMI, Gestational, and Postpartum Oral Glucose Tolerance Results in Women With Gestational Diabetes Mellitus. Front Nutr. 2021 Dec 1;8.
- Brown FM, Wyckoff J. Application of One-Step IADPSG Versus Two-Step Diagnostic Criteria for Gestational Diabetes in the Real World: Impact on Health Services, Clinical Care, and Outcomes. Curr Diab Rep. 2017 Oct 10:17(10):85.
- Moon JH, Jang HC. Gestational Diabetes Mellitus: Diagnostic Approaches and Maternal-Offspring Complications. Diabetes Metab J. 2022 Jan 31:46(1):3-14.
- Ramezani Tehrani F, Sheidaei A, Rahmati M, Farzadfar F, Noroozzadeh M, Hosseinpanah F, et al. Various screening and diagnosis approaches for gestational diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes: a secondary analysis of a randomized non-inferiority field trial. BMJ Open Diabetes Res Care. 2023 Dec 12;11(6):e003510.
- Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Lernmark Å, et al. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2023 Oct 1;46(10):e151-99.

- 22. Garonzi C, Maguolo A, Maffeis C. Pros and Cons of Current Diagnostic Tools for Risk-Based Screening of Prediabetes and Type 2 Diabetes in Children and Adolescents with Overweight or Obesity. Horm Res Paediatr. 2023;96(4):356-65.
- Duong KNC, Tan CJ, Rattanasiri S, Thakkinstian A, Anothaisintawee T, Chaiyakunapruk N. Comparison of diagnostic accuracy for diabetes diagnosis: A systematic review and network meta-analysis. Front Med (Lausanne). 2023 Jan 24;10.
- 24. Kaur G, Lakshmi PVM, Rastogi A, Bhansali A, Jain S, Teerawattananon Y, et al. Diagnostic accuracy of tests for type 2 diabetes and prediabetes: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2020 Nov 20;15(11):e0242415.
- Selvin E, Crainiceanu CM, Brancati FL, Coresh J. Short-term Variability in Measures of Glycemia and Implications for the Classification of Diabetes. Arch Intern Med. 2007 Jul 23;167(14):1545.
- 26. Wareham NJ, O'Rahilly S. The changing classification and diagnosis of diabetes. BMJ. 1998 Aug 8;317(7155):359-60.
- 27. International Expert Committee Report on the Role of the A1C Assay in the Diagnosis of Diabetes. Diabetes Care. 2009 Jul 1;32(7):1327-34.
- 28. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2010 Jan 1;33(Supplement_1):S62-9.
- 29. Utzschneider KM, Younes N, Rasouli N, Barzilay JI, Banerji MA, Cohen RM, et al. Shape of the OGTT glucose response curve: relationship with β-cell function and differences by sex, race, and BMI in adults with early type 2 diabetes treated with metformin. BMJ Open Diabetes Res Care. 2021 Sep 16;9(1):e002264.
- Vejrazkova D, Vankova M, Lukasova P, Hill M, Vcelak J, Tura A, et al. The Glycemic Curve during the Oral Glucose Tolerance Test: Is It Only Indicative of Glycoregulation? Biomedicines. 2023 Apr 25;11(5):1278.
- 31. Barr RG, Nathan DM, Meigs JB, Singer DE. Tests of Glycemia for the Diagnosis of Type 2 Diabetes Mellitus. Ann Intern Med. 2002 Aug 20:137(4):263.
- Jagannathan R, Neves JS, Dorcely B, Chung ST, Tamura K, Rhee M, et al. The Oral Glucose Tolerance Test: 100 Years Later. Diabetes Metab Syndr Obes. 2020 Oct; Volume 13:3787-805.
- 33. Feskens E, Bowles C, Kromhout D. Intra- and interindividual variability of glucose tolerance in an elderly population. J Clin Epidemiol. 1991;44(9):947-53.
- 34. Chai JH, Ma S, Heng D, Yoong J, Lim WY, Toh SA, et al. Impact of analytical and biological variations on classification of diabetes using fasting plasma glucose, oral glucose tolerance test and HbA1c. Sci Rep. 2017 Oct 20;7(1):13721.
- Cefalo CMA, Riccio A, Fiorentino TV, Succurro E, Mannino GC, Perticone M, et al. Pathophysiological characteristics of subjects with intermediate hyperglycemia and type 2 diabetes identified by 1-hour plasma glucose during an oral glucose tolerance test. Diabetes Res Clin Pract. 2024 Nov;217:111856.
- 36. Song G, Wei Y, Juan J, Niu J, Yang H. The predictive ability of the triglyceride glucose index, fasting glucose and oral glucose tolerance test for postpartum hyperglycemia in women with a GDM history. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. 2024 Jan 2;37(1).
- 37. Cheng X, Yang N, Li Y, Sun Q, Qiu L, Xu L, et al. The shape of the glucose response curve during an oral glucose tolerance test heralds β –cell function in a large Chinese population. BMC Endocr Disord. 2019 Dec 5:19(1):119.
- 38. Abdul-Ghani MA, Lyssenko V, Tuomi T, DeFronzo RA, Groop L. The shape of plasma glucose concentration curve during OGTT predicts future risk of type 2 diabetes. Diabetes Metab Res Rev. 2010 May 20;26(4):280-6.
- 39. Ismail HM, Xu P, Libman IM, Becker DJ, Marks JB, Skyler JS, et al. The shape of the glucose concentration curve during an oral glucose tolerance test predicts risk for type 1 diabetes. Diabetologia. 2018 Jan 27;61(1):84-92.

- Tschritter O, Fritsche A, Shirkavand F, Machicao F, Haïring H, Stumvoll M. Assessing the Shape of the Glucose Curve During an Oral Glucose Tolerance Test. Diabetes Care. 2003 Apr 1;26(4):1026-33.
- 41. Kim JY, Michaliszyn SF, Nasr A, Lee S, Tfayli H, Hannon T, et al. The Shape of the Glucose Response Curve During an Oral Glucose Tolerance Test Heralds Biomarkers of Type 2 Diabetes Risk in Obese Youth. Diabetes Care. 2016 Aug 1;39(8):1431-9.
- 42. de Andrade Mesquita L, Pavan Antoniolli L, Cittolin-Santos GF, Gerchman F. Distinct metabolic profile according to the shape of the oral glucose tolerance test curve is related to whole glucose excursion: a cross-sectional study. BMC Endocr Disord. 2018 Dec 16;18(1):56.
- 43. Arslanian S, El ghormli L, Young Kim J, Bacha F, Chan C, Ismail HM, et al. The Shape of the Glucose Response Curve During an Oral Glucose Tolerance Test: Forerunner of Heightened Glycemic Failure Rates and Accelerated Decline in β-Cell Function in TODAY. Diabetes Care. 2019 Jan 1:42(1):164-72.
- 44. Lages M, Barros R, Moreira P, Guarino MP. Metabolic Effects of an Oral Glucose Tolerance Test Compared to the Mixed Meal Tolerance Tests: A Narrative Review. Nutrients. 2022 May 12;14(10):2032.
- 45. Kirke AB, Spry E, Atkinson D, Sinclair C, Marley J V. Oral glucose tolerance test—The imperfect gold standard for gestational diabetes screening: A qualitative study involving clinicians in regional, rural and remote areas of Western Australia. Health Promotion Journal of Australia. 2024 Jul 7.
- 46. Gomez P, Sanchez J. Type 1 Diabetes Screening and Diagnosis. Endocrinol Metab Clin North Am. 2024 Mar;53(1):17-26.
- Testa R, Lo Cascio C, Fabbietti P, Bonfigli AR. OGTT reproducibility in adults with impaired fasting glucose is nearly 65% with adoption of Italian SIBioC-SIPMeL recommendations. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2021 Jul 27;59(8):e341-3.
- 48. Heinemann L. Are all glucose solutions used for oGTT equal? Diabetic Medicine. 2022 May 7;39(5).
- Jagannathan R, DuBose CW, Mabundo LS, Chung ST, Ha J, Sherman A, et al. The OGTT is highly reproducible in Africans for the diagnosis of diabetes: Implications for treatment and protocol design. Diabetes Res Clin Pract. 2020 Dec;170:108523.
- Klein KR, Walker CP, McFerren AL, Huffman H, Frohlich F, Buse JB. Carbohydrate Intake Prior to Oral Glucose Tolerance Testing. J Endocr Soc. 2021 May 1;5(5).
- Secen El, Desdicioglu R, Ergun GT, Usta E, Ozgu-Erdinc AS. The Relationship between a High Carbohydrate Diet and Oral Glucose Tolerance Test in Pregnancy. Z Geburtshilfe Neonatol. 2024 Jun 17;228(03):255-9.
- 52. Buhling KJ, Elsner E, Wolf C, Harder T, Engel B, Wascher C, et al. No influence of high- and low-carbohydrate diet on the oral glucose tolerance test in pregnancy. Clin Biochem. 2004 Apr;37(4):323-7.
- Rosenberg EA, Seely EW, James K, Arenas J, Callahan MJ, Cayford M, et al. Relationship between carbohydrate intake and oral glucose tolerance test results among pregnant women. Diabetes Res Clin Pract. 2021 Jun;176:108869.
- 54. Romagnoli M, Alis R, Aloe R, Salvagno GL, Basterra J, Pareja-Galeano H, et al. Influence of training and a maximal exercise test in analytical variability of muscular, hepatic, and cardiovascular biochemical variables. Scand J Clin Lab Invest. 2014 Apr 31;74(3):192-8.
- 55. Sanchis-Gomar F, Lippi G. Physical activity an important preanalytical variable. Biochem Med (Zagreb). 2014;68-79.
- 56. Fragala MarenS, Bi C, Chaump M, Kaufman HW, Kroll MH. Associations of aerobic and strength exercise with clinical laboratory test values. PLoS One. 2017 Oct 23;12(10):e0180840.
- 57. Foran SE, Lewandrowski KB, Kratz A. Effects Of Exercise On Laboratory Test Results. Lab Med. 2003 Oct 1;34(10):736-42.
- 58. Hughes DC, Ellefsen S, Baar K. Adaptations to Endurance and Strength Training. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 Jun;8(6):a029769.

- Frati AC, Iniestra F, Ariza CR. Acute Effect of Cigarette Smoking on Glucose Tolerance and Other Cardiovascular Risk Factors. Diabetes Care. 1996 Feb 1:19(2):112-8.
- Harris KK, Zopey M, Friedman TC. Metabolic effects of smoking cessation. Nat Rev Endocrinol. 2016 May 4;12(5):299-308.
- 61. Grøndahl MF, Bagger JI, Lund A, Faurschou A, Rehfeld JF, Holst JJ, et al. Effects of Smoking Versus Nonsmoking on Postprandial Glucose Metabolism in Heavy Smokers Compared With Nonsmokers. Diabetes Care. 2018 Jun 1;41(6):1260-7.
- 62. Wang P, Chang PC, Wang CY, Wang LC, Shih CL. Comparing the effects of water temperature and additives in glucose solution on pregnant women's taste, side effects, and glycemic levels during an oral glucose tolerance test: a randomized controlled trial. Am J Obstet Gynecol MFM. 2023 Apr;5(4):100870.
- 63. Bogdanet D, O'Shea P, Lyons C, Shafat A, Dunne F. The Oral Glucose Tolerance Test—Is It Time for a Change?—A Literature Review with an Emphasis on Pregnancy. J Clin Med. 2020 Oct 27;9(11):3451.
- 64. Navarro-Martinez H, Flores-Le Roux JA, Llauradó G, Gortazar L, Payà A, Mañé L, et al. One abnormal value or vomiting after oral glucose tolerance test in pregnancy: incidence and impact on maternal-fetal outcomes. Gynecological Endocrinology. 2023 Dec 14;39(1).
- 65. Agarwal MM, Punnose J, Dhatt GS. Gestational diabetes: problems associated with the oral glucose tolerance test. Diabetes Res Clin Pract. 2004 Jan;63(1):73-4.
- 66. Madendag Y, Sahin E, Madendag Col I, Eraslan SM, Tayyar AT, Ozdemir F, et al. The effect of hyperemesis gravidarum on the 75 g oral glucose tolerance test screening and gestational diabetes mellitus. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. 2018 Aug 3;31(15):1989-92.
- Bayraktar B, Balıkoğlu M, Bayraktar MG, Kanmaz AG. The Effects of Hyperemesis Gravidarum on the Oral Glucose Tolerance Test Values and Gestational Diabetes. Prague Med Rep. 2021;122(4):285-93.
- Fathallah N, Slim R, Larif S, Hmouda H, Ben Salem C. Drug-Induced Hyperglycaemia and Diabetes. Drug Saf. 2015 Dec 14;38(12):1153-68.
- 69. Kuwa K, Nakayama T, Hoshino T, Tominaga M. Relationships of glucose concentrations in capillary whole blood, venous whole blood and venous plasma. Clinica Chimica Acta. 2001 May;307(1-2):187-92.

- Bethel MA, Price HC, Sourij H, White S, Coleman RL, Ring A, et al. Evaluation of a Self-Administered Oral Glucose Tolerance Test. Diabetes Care. 2013 Jun 1:36(6):1483-8.
- 71. Dunseath GJ, Bright D, Jones C, Dowrick S, Cheung W -Y., Luzio SD. Performance evaluation of a self-administered home oral glucose tolerance test kit in a controlled clinical research setting. Diabetic Medicine. 2019 Jul 26;36(7):862-7.
- Tan AYS, Tan MS, Wu A, Seah AC, Chong C, Koh E, et al. Self-administered oral glucose tolerance test with capillary glucose measurements for the screening of diabetes mellitus in high-risk adults: a feasibility study. BMJ Open Diabetes Res Care. 2021 Dec 24;9(2):e002556.
- 73. Larsson-Cohn U. Differences between capillary and venous blood glucose during oral glucose tolerance tests. Scand J Clin Lab Invest. 1976 Dec;36(8):805-8.
- 74. Jung J, Garnett E, Rector K, Jariwala P, Devaraj S. Effect of Collection Tube Type on Glucose Stability in Whole Blood. Ann Clin Lab Sci. 2020 Jul;50(4):557-9.
- 75. Lippi G, Nybo M, Cadamuro J, Guimaraes JT, van Dongen-Lases E, Simundic AM. Blood Glucose Determination: Effect of Tube Additives. In 2018. p. 101-23.
- Daly N, Flynn I, Carroll C, Stapleton M, O'Kelly R, Turner MJ. Comparison of Citrate-Fluoride-EDTA with Fluoride-EDTA Additives to Stabilize Plasma Glucose Measurements in Women Being Screened during Pregnancy with an Oral Glucose Tolerance Test: A Prospective Observational Study. Clin Chem. 2016 Jun 1;62(6):886-7.
- 77. Fobker M. Stability of glucose in plasma with different anticoagulants. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2014 Jan 1;52(7).
- 78. Pleus S, Beil A, Baumstark A, Haug C, Freckmann G. Plasma Glucose Concentrations in Different Sampling Tubes Measured on Different Glucose Analysers. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes. 2024 May 2;132(05):260-6.
- Miller WG, Myers GL, Ashwood ER, Killeen AA, Wang E, Ehlers GW, et al. State of the Art in Trueness and Interlaboratory Harmonization for 10 Analytes in General Clinical Chemistry. Arch Pathol Lab Med. 2008 May 1;132(5):838-46.

Laboratory tests for diabetes diagnosis with an emphasis on glucose load testing

Exames laboratoriais para o diagnóstico do diabetes com ênfase nos testes de sobrecarga

Mauren Isfer Anghebem^{1,2}, Clara Helena Zonatto², Jaqueline Souza Chaves Taniquchi Leite², Victor Melgarejo Marques², Alceu de Oliveira Toledo Júnior³, Fabiane Gomes de Moraes Rego^{1,4}, Geraldo Picheth⁴

- ¹ Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná/UFPR, Curitiba, PR, Brasil.
- ² Escola de Medicina e Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.
- ³ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa; Diretor Técnico do Laboratório do Hospital Vicentino, Ponta Grossa, PR, Brasil.
- ⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná/UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

Abstract

Diabetes mellitus is one of the most common chronic diseases worldwide, and its diagnosis is often laboratory-based. Continuous monitoring and glycemic control reduce micro/macrovascular complications and the overall impact of diabetes. Therefore, understanding the latest advances in diabetes diagnosis is essential. This narrative review, based on a literature search on the PubMed database using the descriptors in both English and Portuguese, "diabetes", "diabetes mellitus", "gestational diabetes", "diabetes diagnosis", "glucose overload tolerance", "OGTT" and "glycemic curve", aims to discuss current criteria for diabetes diagnosis, including gestational diabetes, and to highlight the laboratory assays used in diabetes, with an emphasis on glucose load tests.

Keywords: Diabetes; Gestational Diabetes; Diabetes Diagnosis; Glucose Load Test.

Resumo

O Diabetes mellitus é uma das mais comuns doenças crônicas no mundo e o diagnóstico é frequentemente laboratorial. O monitoramento constante e o controle glicêmico reduzem as complicações micro/macrovasculares e os impactos do diabetes. Portanto, compreender o que há de mais atual em relação ao diagnóstico do diabetes é fundamental. Esta revisão narrativa, baseada na busca de literatura na base de dados PubMED utilizando os descritores, em inglês e português, "diabetes", "diabetes mellitus", "diabetes gestacional", "diagnóstico do diabetes", "teste de sobrecarga de glicose", "TTGO" e "curva glicêmica", tem por objetivo abordar os critérios atuais para o diagnóstico do diabetes, incluindo o diabetes gestacional, e destacar os ensaios laboratoriais utilizados no diabetes, com ênfase nos testes de sobrecarga de glicose.

Palavras-chave: Diabetes; Diabetes gestacional; Diagnóstico do Diabetes; Teste de Sobrecarga de Glicose.

Correspondence Mauren Isfer Anghebem E-mail: mauren.isfer@ufpr.br

Received on Nov 02, 2024 Approved on Nov 16, 2024 DOI: 10.21877/2448-3877.202400217.en

INTRODUCTION

Diabetes mellitus refers to a heterogeneous group of metabolic disorders caused by insufficient and/or ineffective insulin action, leading to chronic hyperglycemia.⁽¹⁾

Diabetes is characterized by a prolonged subclinical phase defined by hyperglycemia, which may remain undiagnosed without screening or other early detection mechanisms. In all types of diabetes, the primary goal to minimize the consequences of chronic hyperglycemia is glycemic control. ⁽²⁾ For this reason, clinical laboratory testing is essential for the diagnosis and monitoring of this condition.

Three laboratory tests are used for diagnostic purposes: fasting glucose (FG), random glucose (RG), the oral glucose tolerance test (OGTT), and glycated hemoglobin A1c (HbA1c).⁽³⁾

The measurement of fasting plasma glucose after an 8-hour fasting period provides information on glycemic concentration at the time of collection, reflecting glucose regulation in the post-absorptive state, where an increased glucagon/insulin ratio is expected in the plasma. HbA1c reflects the average glycemia over the past 2 to 3 months, assessing long-term glycemic status. The OGTT, in turn, evaluates glucose metabolism and the insulin release response following a controlled glucose load. Each test has advantages and disadvantages that must be carefully considered.

This narrative review, based on a literature search on the PubMed database using descriptors in both English and Portuguese, such as "diabetes," "diabetes mellitus," "gestational diabetes," "diabetes diagnosis," "glucose tolerance test," "OGTT," and "glycemic curve," aims to provide information on current criteria for diabetes diagnosis, including gestational diabetes, and to highlight the laboratory assays used in diabetes, with an emphasis on glucose load tests, underscoring their differences, purposes, and limitations.

CURRENT CRITERIA FOR THE LABORATORY DIAGNOSIS OF DIABETES

In March 2024, the International Diabetes Federation (IDF) released a position statement consolidating evidence that plasma glucose levels measured one hour after an oral glucose load (OGTT-1h) are more effective for classifying glycemic status compared to isolated FG or HbA1c measurements. Moreover, OGTT-1h facilitates the early detection of individuals at increased risk of progressing to type 2 *Diabetes mellitus* (T2DM), a condition also known as prediabetes.

Several studies have supported the recommendation of OGTT-1h for the diagnosis of diabetes and prediabetes, as it serves as a more sensitive predictor of T2DM, cardiovascular disease, microangiopathy, and mortality compared to previously used criteria. (5-9) Of particular note is a meta-analysis of 15 studies involving a total of 35,551 participants, including both Caucasian and non-Caucasian ethnic groups (46.2%), such as Amerindians, Japanese, Mexican Americans, and South Asians. This study identified that an OGTT-1h threshold of 209 mg/dL demonstrated good sensitivity and specificity for detecting T2DM. At the cutoff value of 209 mg/dL (95% CI: 10.6, 12.6), a sensitivity of 0.92 (0.87, 0.95), specificity of 0.91 (0.88, 0.93), and an area under the curve (AUC) of 0.939 (95% confidence region for sensitivity, 0.904, 0.946) were observed, along with a positive predictive value of 45%. (10)

Based on these premises, the IDF position statement recommends using OGTT-1h glycemia with validated cutoff points of 155 mg/dL (8.6 mmol/L) for intermediate hyperglycemia and ≥209 mg/dL (11.6 mmol/L) to characterize T2DM. Intermediate hyperglycemia, or "prediabetes," represents a state between "normal" glycemia and levels diagnostic for diabetes. It encompasses impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance.⁽¹¹⁾

In Brazil, the current laboratory criteria for the diagnosis of diabetes and prediabetes take this new cutoff into account and are defined as follows: fasting plasma glucose of 126 mg/dL or higher, HbA1c of 6.5% or higher, OGTT-1h glucose of 209 mg/dL or higher, or OGTT-2h glucose of 200 mg/dL or higher. If only one test is abnormal, it should be repeated for confirmation. In the presence of typical hyperglycemia symptoms (polyuria, polydipsia, polyphagia, rapid weight loss, or ketoacidosis), it is recommended that the diagnosis be made with a random plasma glucose measurement of 200 mg/dL or higher (Table 1).⁽⁴⁾

 Table 1

 Laboratory criteria for the diagnosis of diabetes and prediabetes

| Criteria | Normal | Prediabetes | Diabetes |
|----------------------|------------|--------------|-----------------|
| Fasting Glucose * | < 100mg/dL | 100-125mg/dL | ≥ 126mg/dL |
| Random Glucose ** | - | - | \geq 200mg/dL |
| 1-hour OGTT Glucose# | < 155mg/dL | 155-208mg/dL | \geq 209mg/dL |
| 2-hour OGTT Glucose# | < 140mg/dL | 140-199mg/dL | \geq 200mg/dL |
| HbA1c | < 5.7 % | 5.7-6.4% | ≥ 6.5 % |

Legend: OGTT: oral glucose tolerance test; HbA1c: glycated hemoglobin A1c. *Associated with classic diabetes symptoms. **Fasting is defined as the cessation of caloric intake for 8 to 12 hours. Oral load equivalent to 75g of anhydrous glucose diluted in water.

Source: Adapted from Rodacki et al., 2024. (4)

LABORATORY DIAGNOSIS OF GESTATIONAL DIABETES

Gestational *Diabetes mellitus* (GDM) is defined as carbohydrate intolerance that begins during pregnancy but does not meet the diagnostic criteria for diabetes outside of pregnancy.⁽¹²⁾

The diagnosis of GDM has also evolved over the years to identify hyperglycemia first detected during pregnancy. Two categories can be distinguished during pregnancy; overt diabetes, which is only evident during pregnancy, or GDM.⁽¹²⁾

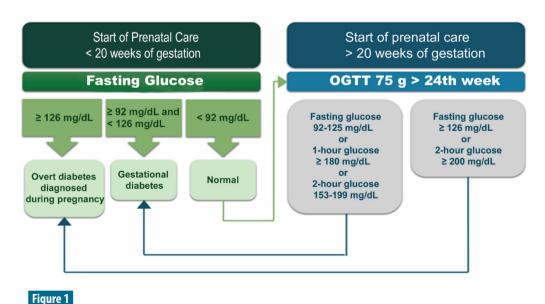
In 1979, the National Diabetes Data Group (NDDG) recommended conducting a challenge test involving the administration of 50g of glucose and measuring blood glucose after 1 hour during the first prenatal visit for pregnant women with risk factors, known as the O'Sullivan test. This test aimed to diagnose GDM before 24 to 28 weeks of gestation, identifying early-onset gestational diabetes. If the result was positive, a 3-hour OGTT with a 100g glucose load would be performed.⁽¹³⁾

In 2010, the International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) developed new diagnostic criteria for GDM based on the results of the prospective Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study. The IADPSG criteria proposed using a FG value of 92 to 126 mg/dL during the first 24 weeks of pregnancy to define early-onset GDM. This threshold is identical to the one used after 24 weeks of pregnancy. (14)

In 2011, the American Diabetes Association (ADA) and, in 2013, the World Health Organization (WHO) adopted the IADPSG criteria for the diagnosis of GDM. (15) However, WHO noted that if the post-load glucose is \geq 200 mg/dL, it would be defined as diabetes diagnosed in pregnancy (overt diabetes) rather than GDM. (12)

In 2017, the Brazilian Diabetes Society (SBD), together with the Brazilian Federation of Gynecology and Obstetrics Associations (FEBRASGO), the Pan American Health Organization (PAHO), and the Ministry of Health of Brazil, established a joint proposal for the standardization of GDM screening and diagnosis in the country. The Brazilian criteria were adapted from the WHO criteria, (16) as outlined in the flowchart in Figure 1.

In the first prenatal visit for pregnant women with no prior knowledge of a diabetes diagnosis, it is recommended to perform a FG test to detect overt diabetes and early-onset GDM. The diagnosis of GDM should be considered in pregnant women with FG levels between 92 mg/dL and 125 mg/dL at any point during pregnancy. For all pregnant women without a prior diabetes diagnosis, regardless of risk factors, it is recommended that GDM diagnostic testing be performed between the 24th and 28th weeks of gestation through an OGTT with plasma glucose measurements in fasting, 1 hour, and 2 hours after ingestion of 75g anhydrous glucose. During GDM screening after the 24th week, if the 2-hour glucose level in the 75g OGTT is ≥ 200 mg/dL, the presence of diabetes diagnosed in pregnancy (overt diabetes) should be considered rather than GDM. (16)



Classification of hyperglycemia in pregnant women without a previously diagnosed diabetes condition.

Legend: DM: Diabetes mellitus; OGTT: oral glucose tolerance test. Source: Adapted from Zajdenverg et al., 2024. (16)

Other strategies are recommended by international organizations, such as the American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), which endorsed a two-step approach, known as the two-step strategy. ⁽¹⁷⁾ In other words, the diagnosis of GDM can be performed using either of the two strategies: 1. One-step strategy: the 75g OGTT derived from the IADPSG criteria, mentioned earlier, or 2. Two-step strategy: an older "two-step" approach with a 50g screening test, without fasting, followed by a 100g OGTT for those with a positive screening result. This strategy is based on the criteria of O'Sullivan and Mahan. ⁽³⁾

In the one-step strategy, the OGTT is performed with 75g of glucose, and the diagnosis of GDM is made when any of the following plasma glucose values are met or exceeded: fasting plasma glucose ≥ 92mg/dL, 1-hour plasma glucose ≥ 180mg/dL, 2-hour plasma glucose ≥ 153mg/dL. In the two-step strategy, if the 1-hour plasma glucose after the 50g glucose load, without fasting, performed between the 24th and 28th weeks of gestation in individuals without a previous diabetes diagnosis is ≥ 130, 135, or 140mg/dL, a second step is performed; the 100g OGTT after fasting. In this case, the diagnosis of GDM is made when at least two of the following four plasma glucose values (measured fasting, 1, 2, and 3 hours during the OGTT) are met or exceeded: fasting plasma glucose ≥ 95mg/dL, 1-hour plasma glucose ≥ 180mg/dL, 2-hour plasma glucose ≥ 155mg/dL, 3-hour plasma glucose ≥ 140mg/dL.

Since different diagnostic criteria identify varying degrees of maternal hyperglycemia and maternal/fetal risk, there is significant disagreement among specialists regarding which strategy is best for diagnosing GDM.⁽¹⁸⁻²⁰⁾

LABORATORY TESTS IN THE CONTEXT OF DIABETES

Each of the laboratory tests recommended for diabetes diagnosis has specific advantages and limitations, as summarized in Table 2.

FG demonstrates good reproducibility, is widely available in healthcare services, and its analytical methods are well-established. However, its analysis requires fasting, and values may be influenced by acute conditions and stress, which are common during pediatric collections. Additionally, in samples collected without glycolysis inhibitors such as fluoride or iodoacetate, glucose levels may decrease by 5% to 7% per hour, potentially affecting assay interpretation. (22) Clinical laboratories primarily employ enzymatic methods, with glucose oxidase and hexokinase-UV being the predominant

techniques for plasma glucose quantification, both of which are well-established and reproducible. To prevent misclassification of individuals, glucose measurement must minimize total analytical error, and methods should be free of measurable biases. Based on biological variation, glucose measurement should have an analytical imprecision of \leq 2.4%, a bias of \leq 2.1%, and a total error of \leq 6.1%.⁽²¹⁾

HbA1c has notable characteristics, including not requiring fasting and reflecting average blood glucose over the past 2 to 3 months. Among the disadvantages of this test are its significantly higher cost compared to FG and limited availability in some developing countries. Additionally, as an indirect measure of blood glucose, it can be influenced by nonglycemic factors such as hemoglobin variants, medications (e.g., hydroxyurea, vitamin C, aspirin), race, age, renal function, and others. (22) The method used for HbA1c determination must be certified by the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP, www.ngsp.org) and standardized or traceable to the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) reference assay. Only in this way are HbA1c results from different laboratories harmonized and comparable to those reported in the DCCT. (3)

Some studies suggest that FG is more accurate than HbA1c for diabetes diagnosis, while HbA1c is more specific but less sensitive when compared to FG and OGTT.^(23,24)

FG and HbA1c are the recommended and widely used laboratory tests due to their relative convenience and reproducibility compared to OGTT. The OGTT has the highest sensitivity among the three tests and is considered the gold standard for detecting individuals at increased risk for diabetes development, classified as prediabetes or intermediate hyperglycemia. HbA1c has low sensitivity (47% to 67%) and high specificity (98% to 99%) for diagnosing diabetes, compared to glucose measurement 2 hours after a 75g oral glucose load (OGTT-2h).⁽⁴⁾

The OGTT-2h shows high variability (16.7%) when compared to FG (5.7%) and HbA1c (3.6%).⁽²⁵⁾Therefore, among the disadvantages of the OGTT are its low reproducibility, the prolonged time required for the test, and the potential for discomfort (nausea and vomiting) following the glucose load intake.⁽²²⁾

The accuracy and applicability of laboratory tests for diagnosing hyperglycemia are analyzed through clinical studies, and different strategies and cut-off values have been proposed over time. Thirty years ago, for example, fasting glucose levels of 140 mg/dL or higher were used to diagnose diabetes, and there was no category for increased risk of

diabetes, now termed "prediabetes". Diagnostic criteria for diabetes have also evolved over time to include HbA1c starting in 2010, which had previously only been used for monitoring purposes. (27,28)

Glucose Tolerance Tests

Glucose tolerance assesses the body's ability to respond to a glucose load. (29) Any test involving the oral intake of a known amount of anhydrous glucose dissolved in water, followed by the determination of plasma glucose at predefined time points, is referred to as a glucose tolerance test. In Brazil, the oral glucose tolerance test (OGTT), with measurement of fasting plasma glucose, followed by determination of glucose levels at 1 and 2 hours post-load, is commonly referred to as a glucose tolerance test. However,

the measurement of fasting glucose, followed by five or six additional determinations at defined intervals after glucose load, such as at 0 (fasting) followed by collections at 30, 60, 90, 120, and 180 minutes, known as the glucose curve, is also considered a glucose tolerance test. (30) This test is frequently requested by clinicians, although there are no established reference intervals or recommended cut-off criteria in current literature.

OGTT-1h and OGTT-2h

The OGTT was proposed over 100 years ago as a measurement capable of assessing the body's response to a supraphysiological glucose load. (31) Its use as a tool in the context of diabetes diagnosis has evolved significantly over the last century. (32)

Table 2

Advantages and limitations of routine laboratory tests for diabetes

| Test | Advantage | Limitation |
|-------|--|---|
| FG | Simple automated quantification Low cost Single sample requirement Widely available Established diagnostic criteria | Requires ≥ 8 hours of fasting High biological variability Diurnal variation Sample instability ("glycolysis") Multiple factors influence glucose concentration (stress, acute illness) Glucose concentration varies depending on the sample source (venous, capillary, or arterial) Whole blood glucose concentration differs from plasma levels FG has a weaker correlation with DM complications (compared to HbA1c) Reflects glucose homeostasis at a single point in time |
| OGTT | Sensitive indicator of diabetes risk Early marker of impaired glucose homeostasis | Low reproducibility Lengthy patient preparation Time-consuming and inconvenient for the patient Oral glucose dose may be unpalatable Higher cost Influenced by various medications Subject to the same limitations as FG, such as sample instability Must be performed in the morning |
| HbA1c | Does not require patient fasting Sample can be collected at any time of the day Low biological variation Stable sample Not affected by acute factors such as stress and exercise Reflects glucose concentration over a long period prior to collection Standardized assay (NGSP) Single whole blood sample required Concentration predicts the development of DM-related microvascular complications Applicable for guiding treatment decisions | Can be affected by factors other than glucose, such as alterations in erythrocyte lifespan and ethnicity Presence of hemoglobinopathies interferes with the result May not be available in all laboratories Higher cost |

Legend: FG: fasting plasma glucose; OGTT: oral glucose tolerance test; HbA1c: glycated hemoglobin A1c; NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program.

Source: Adapted from Sacks et al., 2023. (21)

The OGTT remains the reference method for evaluating glucose tolerance, despite its recognized low reproducibility and a high coefficient of variation at the 2-hour mark (OGTT-2h). Evidence supports that the OGTT-1h is more effective in classifying glycemic status compared to isolated measurements of fasting glucose or HbA1c. Individuals with intermediate hyperglycemia (prediabetes) and T2DM exhibited increased adiposity, higher blood pressure, elevated uric acid levels, a worse lipid and inflammatory profile, and a progressive reduction in insulin sensitivity compared to normoglycemic individuals. The OGTT-1h can identify individuals with this unfavorable cardiometabolic risk profile. (35)

It should be emphasized that the OGTT is the reference test for diagnosing GDM, where fasting plasma glucose concentrations have reduced diagnostic sensitivity. It is also important to note that, in pregnant women with no prior diagnosis of diabetes, an abnormal OGTT can be an independent risk factor for postpartum hyperglycemia. (17,36)

Glycemic Curve

Serial glucose measurements following a glucose load allow for the observation of a glycemic curve, defined by the pattern of rise and fall in glucose concentrations after the glucose load. The shape of the curve thus reflects pancreatic beta-cell function and metabolic risk. (29) Differences in the shape of the glycemic curve have been documented since the 1950s, but only recently have researchers considered using the characteristics of the glucose curve as a predictive tool. (37)

Studies have shown that the shape of the glucose curve can be used to predict glucose intolerance and the risk of progression to T2DM. The glycemic curve profile is defined as monophase, biphasic, or triphasic, or unclassified, as depicted in Figure 2. A monophase curve can be defined as an increase in glucose between 30 and 90 minutes, followed by a decline between 90 and 120 minutes. A biphasic response curve is characterized by a decrease after an initial increase, followed by a second increase. The biphasic pattern is found in 20% to 30% of adults without diabetes.

Individuals with a monophase curve have lower insulin sensitivity and decreased beta-cell function compared to those with a biphasic curve. A biphasic or triphasic (unclassified) glycemic response profile, characterized by an increase, a decrease, and a subsequent rise in glucose following the glucose load, has been associated with better beta-cell function and lower glucose concentrations compared to a monophase pattern. A multi-ethnic cohort of adults with recent diagnoses of T2DM compared differences in

the shape of the glycemic curve, considering sex, race, body mass index, and metabolic differences between the two most common curve types: monophase and continuous increase (where glucose concentration only rises during the test period). The group that showed a continuous increase in glucose was associated with greater beta-cell dysfunction and higher HbA1c values compared to the group with a monophase pattern. These data suggest that the shape of the curve could also serve as a biomarker for diabetes. (29)

FACTORS INFLUENCING THE ORAL GLUCOSE TOLERANCE TEST

The performance of the OGTT is directly affected by pre-analytical and analytical factors, as well as those related to laboratory glucose measurement. The reproducibility of the OGTT has been questioned for decades, but it continues to be considered the "gold standard" for the diagnosis of T2DM and GDM. (44-46)

Pre-analytical factors such as biological or intraindividual variation, gastric emptying, the glucose solution for the overload from different manufacturers, the release of hyperglycemic hormones like cortisol and adrenaline, age, and sex can affect the reproducibility of the OGTT;⁽⁴⁷⁾ as well as analytical factors such as analyzer calibration, the method, and the reagents used in the determination of plasma glucose.^(47,48) These variables contribute to the OGTT having a reproducibility of 64% to 80%.^(47,49)

Below, we present and discuss some factors that influence this test.

Diet

Proper preparation for the OGTT is essential to prevent falsely elevated results due to low carbohydrate intake in the days preceding the test. The mechanisms by which low-carbohydrate diets affect glucose metabolism are complex and not fully understood. Some propose that the mechanism is partly due to the loss of the first phase of insulin release, resulting in reduced peripheral and hepatic glucose uptake and incomplete suppression of hepatic glucose production. Low carbohydrate intake also impacts insulin sensitivity and is associated with an increase in free fatty acids in the plasma, which may reduce insulin secretion. [50]

Some studies have shown that a low-carbohydrate diet would not affect the outcome of the OGTT and that maintaining the usual diet before undergoing the test would better reflect an individual's ability to metabolize glucose. (51,52)

However, to maintain a standardized approach and enhance the reproducibility of the method, the OGTT should be preceded by a diet without carbohydrate restrictions, with a minimum daily intake of 150g of carbohydrates during the 3 days preceding the test, which should be performed after an 8 to 10-hour fast. (3,53)

Physical Exercise

Physical exercise can alter the results of laboratory tests. Despite contradictory data in the literature regarding the duration and intensity of exercise that would affect test outcomes, physical activity influences how the body processes nutrients, such as glucose. (54-56)

At the onset of physical activity, there is an inhibition of insulin secretion and, consequently, hyperglycemia. This mechanism occurs to provide energy for the body. An elevation in plasma glucose can be observed up to 4 hours after strenuous exercise, such as a marathon, returning to baseline within 24 hours. (57)

After this initial phase of hyperglycemia, glucose is taken up by muscle cells independently of insulin, likely due to an increase in the number of active membrane transporters, leading to hypoglycemia. The prolonged reduction in glucose concentration is influenced by adrenaline – an antagonist of insulin – which ceases to be released after exhaustive physical exertion, causing the effects of insulin to become predominant and amplifying hypoglycemia for approximately 2 hours after the physical activity ends. (58) Therefore, it is recommended that strenuous physical exercise be avoided in the 24 hours prior to performing the OGTT.

Smoking

Another interfering factor of the OGTT is tobacco use. Smoking acutely impairs glucose tolerance and insulin sensitivity; therefore, smoking is not permitted during the OGTT.⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾

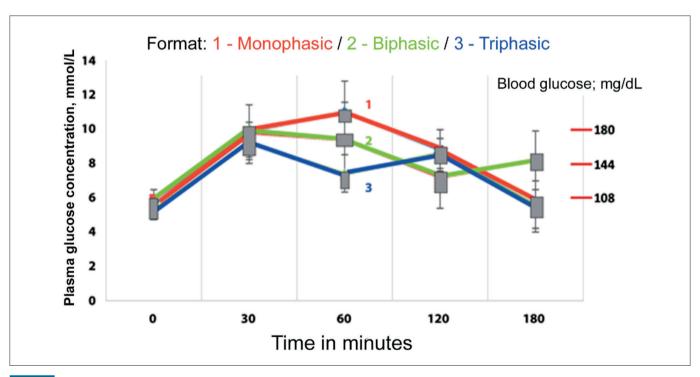


Figure 2

Patterns of glycemic curve shape.

Legend: The y-axis, numbered from 0 to 14, represents plasma glucose concentration in mmol/L. The x-axis, numbered from 0 to 180, represents time in minutes. The blue line represents a monophase glycemic curve pattern. The red line represents a biphasic glycemic curve pattern. The green line represents a triphasic glycemic curve pattern.

Source: Adapted from Cheng et al., 2019.(37)

Glucose Solution

The composition of the oral glucose solution, including added excipients to enhance taste and odor, can impact endogenous insulin secretion and, consequently, plasma glucose concentrations. (48) For this reason, standardizing and validating the glucose solution is advisable.

Most institutions conducting the OGTT use a commercially available liquid solution containing 75g of pure D-glucose dissolved in 300mL of water, due to its convenience, commercial preparation quality standards, and the availability of flavored options to minimize discomfort. Human perception of sweetness can be altered by temperature, which supports the recommendation to administer the glucose solution cold rather than at room temperature to reduce nausea, particularly in pregnant women. ⁽⁶²⁾

If the establishment is preparing the glucose solution in-house, it must follow good laboratory practices to ensure that the final solution is at the standardized concentration. Carbonated water appears to mitigate the unpleasant side effects of the glucose solution, but it affects OGTT results by promoting a higher post-load glucose level at 1 hour compared to tests conducted with non-carbonated water. Therefore, carbonated water should not be used. (62)

In the case of OGTT in children or individuals with low body weight, it is recommended to administer 1.75g of glucose per kg of body weight, up to a maximum of 75g. For example, a 12kg child should consume 84mL of the 75g glucose solution, as illustrated in Figure 3.

- 300mL (commercial solution) 75g of glucose X mL – 1.75g of glucose X = 7mL
- 1.75g of glucose should be administered per kg of body weight for children or individuals with low weight. Each 7mL contains 1.75g of glucose.

Therefore, if the child weighs 12kg, the volume of the commercial glucose solution to be consumed is 84mL:

$$12kg \times 7mL = 84mL$$

Figure 3

Calculation of the glucose solution volume for children and individuals with low body weight.

Source: Authors.

Gastric emptying

The absorption behavior of the glucose solution shows intra- and interindividual variability, also impacting the variability of glucose concentrations in the OGTT. (1) This is because the rate of gastric emptying has high individual variability and is a factor that affects plasma glucose concentration. The glucose load administered during the OGTT can only pass into the bloodstream after being emptied from the stomach, digested into monosaccharides, and transported through the intestinal epithelium. The transport capacity of the small and large intestines exceeds the 75g of glucose provided during the OGTT; therefore, a limiting step in the rate of glucose absorption is the gastric emptying rate. (63) In other words, gastric emptying is one of the main factors influencing the glycemic response in the first hour after the OGTT or a meal and is responsible for 30% to 35% of the variability in postprandial blood glucose.(63)

To minimize the impact of gastric emptying on the OGTT results, the total volume of the glucose solution should be consumed, preferably, within 5 minutes.⁽¹⁾

Emesis

Gastric intolerance to the glucose solution has been linked to the high osmolarity of the solution, caused by the high concentration of glucose, which also delays gastric emptying. Emesis is the primary reason for the failure to complete the OGTT;⁽⁶⁵⁾ therefore, it may be suggested that the individual take an antiemetic before undergoing the test.⁽⁶⁴⁾

In cases of emesis, the test should be interrupted and rescheduled. However, if the individual vomits after 30 minutes of ingesting the solution, some laboratories may proceed with the OGTT, noting in the report's observation that the patient vomited, how many times emesis occurred, and how many minutes after ingestion it happened.

It should be considered that hyperemesis gravidarum causes changes in maternal metabolism during the first trimester of pregnancy due to limited caloric intake and fasting. This can reduce the positive predictive value of gestational diabetes screening in the first trimester through the OGTT, leading to an increase in false-positive results. In such cases, it may be beneficial to consider other screening and diagnostic strategies. (66,67)

Medication interference

Interpreting the OGTT can become challenging for individuals taking high doses of medications known to induce hyperglycemia, such as glucocorticoids, calcium channel blockers, oral contraceptives, protease inhibitors, interferon, beta-blockers, diuretics, among others. (68)

Type of sample

Blood glucose can be quantified in whole blood, serum, or plasma, but plasma is the recommended sample type for diagnosis. It should be noted that the water content in plasma is approximately 11% higher compared to whole blood, which results in plasma glucose being approximately 11% higher than whole blood glucose in individuals with normal hematocrit.⁽⁶³⁾

Glucose concentrations during an OGTT in capillary blood from fingertip puncture are significantly higher than those in venous blood (an average of 30 mg/dL, equivalent to 20% to 25%), likely due to glucose consumption by tissues. In contrast, the average difference in fasting samples is only 2 mg/dL. That is, plasma and capillary glucose concentrations are comparable in the fasting state, but post-load capillary glucose is significantly higher than venous sample concentrations. ⁽⁶⁹⁾

Although there are studies on the feasibility of self-collecting capillary blood using specific devices for OGTTs,⁽⁷⁰⁻⁷²⁾ venous blood samples have been the recommended standard.⁽⁷³⁾

Collection Tube

The rate of glucose consumption/reduction in a sample is 5% to 7% per hour, making *in vitro* glycolysis a pre-analytical interference with the potential to alter the interpretation of the OGTT. To minimize the effect of glycolysis, two strategies can be employed by the laboratory: 1. Blood collection in a tube without a glycolytic inhibitor, followed by immediate or within 30 minutes after collection centrifugation and serum separation from blood cells; 2. Blood collection in tubes containing a glycolytic inhibitor.^(21,69,74)

Thus, in locations where immediate sample processing is not possible, the use of glycolysis inhibitors, such as sodium fluoride (NaF; 2.5 mg of fluoride/mL of blood), is recommended. However, NaF alone is not a rapid-acting glycolysis inhibitor. (21) The mechanism of action of fluoride is based on the inhibition of the enzyme enolase, which acts later in the glycolytic pathway. Consequently, the activity of glycolytic enzymes upstream of enolase is not significantly affected, and these

enzymes remain active, metabolizing glucose. This explains why the full effect of fluoride in inhibiting glycolysis may take between 30 minutes and 4 hours, during which the glucose concentration in the collection tube can decrease considerably, especially when the sample is stored at room temperature. After 4 hours, glucose concentration in whole blood remains stable for up to 72 hours at room temperature in the presence of fluoride. (21,74)

To enhance glycolytic action, NaF can be used in combination with anticoagulants such as potassium oxalate, EDTA, citrate, or lithium heparin. Several studies have demonstrated the efficacy of tubes containing citrate/fluoride/EDTA (CFE) in inhibiting glycolysis, (76-78) and currently, the use of citrate-buffered collection tubes is recommended for glucose determination, especially if sample processing is likely to take longer than 30 minutes after collection. (21)

It is also important to consider that, in samples with high white blood cell counts, glycolysis can increase even in the presence of fluoride.⁽²¹⁾

Glucose Measurement

The measurement of glucose is the central analytical factor in the OGTT. An inaccurate glucose measurement can lead to diagnostic errors, incorrect patient management, unfavorable outcomes, and increased healthcare costs. For instance, glucose measured from heparinized plasma is approximately 5% lower than glucose measured from serum, possibly due to the fluid shift from erythrocytes to plasma caused by the anticoagulant. ⁽⁶⁹⁾

Glucose measurement methods should be calibrated (traceable) to reference methods. Currently, there are two reference methods for measuring plasma glucose recommended by the Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine: isotope dilution mass spectrometry (IDMS) and the hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase enzymatic method. The maximum allowable deviation between the laboratory method and the reference method is 4%. In laboratory settings, glucose is commonly determined using one of the following enzymatic methods: hexokinase, glucose dehydrogenase, or glucose oxidase in reactions coupled to a chromophore, ultraviolet absorption, or generating an electrical current. (63)

Methodologies using glucose oxidase/peroxidase (colorimetric) and UV hexokinase (ultraviolet) show similar results and do not affect the characterization of *Diabetes mellitus*.⁽⁷⁹⁾

FINAL CONSIDERATIONS

Diabetes is a chronic, multifactorial, and silent syndrome affecting approximately 10% of the global population. Without a cure, it is crucial that DM diagnosis be early to minimize chronic vascular complications.

Clinical laboratories play a central role in the screening, diagnosis, and monitoring of DM through plasma glucose, HbA1c, and OGTT. Recently, glucose measurement 1 hour after oral glucose load (OGTT-1h) has been incorporated into the criteria for diagnosing diabetes and pre-diabetes, as it is a more sensitive and earlier predictor of T2DM, cardiovascular disease, microangiopathy, and mortality compared to previously used criteria. OGTT-1h values of 155 mg/dL indicate intermediate hyperglycemia (prediabetes), while values ≥ 209 mg/dL classify as diabetes.

Thus, the glucose load test gains new prominence. It is important to emphasize that any test performed after oral ingestion of a known amount of glucose, followed by plasma glucose measurement, constitutes a glucose load test. In Brazil, fasting plasma glucose measurement followed by glucose determination 1 hour and 2 hours after glucose solution ingestion is commonly referred to as OGTT. Meanwhile, the glucose load test involving fasting glucose determination followed by 5 or 6 glucose measurements every 30 minutes after glucose solution ingestion is known as the glucose curve.

For conducting glucose load tests, it is recommended to avoid intense physical exercise within 24 hours prior to the test. Smoking is not permitted during the procedure. The test is performed after an 8- to 10-hour fast, and during the three days preceding the test, a diet including at least 150 g of carbohydrates per day is recommended.

The glucose solution should contain 75 g of glucose dissolved in 250–300 mL of water, or 1.75 g of glucose per kilogram, up to a maximum of 75 g. The total volume of the glucose solution should ideally be ingested within 5 minutes. In case of emesis, the test must be interrupted and rescheduled. However, if the patient vomits after 30 minutes of ingestion, continuing the test may be considered, with the occurrence duly reported in the test report.

It is preferable to use plasma collected in tubes containing citrate/fluoride/EDTA for the OGTT if centrifugation and plasma separation from blood cells cannot be performed within 30 minutes of collection.

The methodology used for glucose measurement should be traceable to reference methods, with enzymatic colorimetric methods employing glucose oxidase/peroxidase

or UV enzymatic methods utilizing hexokinase being acceptable options.

Finally, it is important to emphasize that OGTT and the glucose curve exhibit significant variability, which may affect result interpretation. This study reviews observations on glucose load tests and highlights the new criteria for diabetes diagnosis.

REFERENCES

- Pleus S, Tytko A, Landgraf R, Heinemann L, Werner C, Müller-Wieland D, et al. Definition, Classification, Diagnosis and Differential Diagnosis of Diabetes Mellitus: Update 2023. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes. 2024 Mar 20;132(03):112-24.
- Zhou B, Sheffer KE, Bennett JE, Gregg EW, Danaei G, Singleton RK, et al. Global variation in diabetes diagnosis and prevalence based on fasting glucose and hemoglobin A1c. Nat Med. 2023 Nov 9;29(11):2885-901.
- ElSayed NA, Aleppo G, Bannuru RR, Bruemmer D, Collins BS, Ekhlaspour L, et al. ADA. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2024. Diabetes Care. 2024 Jan 1;47(Supplement_1):S20-42.
- Rodacki M, Cobas RA, Zajdenverg L, Silva Júnior WS da, Giacaglia L, Calliari LE, et al. Diagnóstico de diabetes mellitus. In: Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes. Conectando Pessoas; 2024.
- Abdul-Ghani MA, Abdul-Ghani T, Ali N, DeFronzo RA. One-Hour Plasma Glucose Concentration and the Metabolic Syndrome Identify Subjects at High Risk for Future Type 2 Diabetes. Diabetes Care. 2008 Aug 1;31(8):1650-5.
- Ha J, Chung ST, Bogardus C, Jagannathan R, Bergman M, Sherman AS. One-hour glucose is an earlier marker of dysglycemia than two-hour glucose. Diabetes Res Clin Pract. 2023 Sep;203:110839.
- Alyass A, Almgren P, Akerlund M, Dushoff J, Isomaa B, Nilsson P, et al. Modelling of OGTT curve identifies 1 h plasma glucose level as a strong predictor of incident type 2 diabetes: results from two prospective cohorts. Diabetologia. 2015 Jan 8;58(1):87-97.
- 8. Fiorentino TV, Marini MA, Andreozzi F, Arturi F, Succurro E, Perticone M, et al. One-Hour Postload Hyperglycemia Is a Stronger Predictor of Type 2 Diabetes Than Impaired Fasting Glucose. J Clin Endocrinol Metab. 2015 Oct 1;100(10):3744-51.
- 9. Fiorentino TV, Marini MA, Succurro E, Andreozzi F, Perticone M, Hribal ML, et al. One-Hour Postload Hyperglycemia: Implications for Prediction and Prevention of Type 2 Diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2018 Sep 1;103(9):3131-43.
- Ahuja V, Aronen P, Pramodkumar TA, Looker H, Chetrit A, Bloigu AH, et al. Erratum. Accuracy of 1-Hour Plasma Glucose During the Oral Glucose Tolerance Test in Diagnosis of Type 2 Diabetes in Adults: A Meta-analysis. Diabetes Care 2021;44:1062–1069. Diabetes Care. 2021 Jun;44(6):1457-1457.
- 11. Bergman M, Manco M, Satman I, Chan J, Schmidt MI, Sesti G, et al. International Diabetes Federation Position Statement on the 1-hour post-load plasma glucose for the diagnosis of intermediate hyperglycaemia and type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2024 Mar;209:111589.
- Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy: A World Health Organization Guideline. Diabetes Res Clin Pract. 2014 Mar;103(3):341-63.
- 13. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance. Diabetes. 1979 Dec 1;28(12):1039-57.
- 14. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. Diabetes Care. 2010 Mar 1;33(3):676-82.

- 15. González-González NL, González-Dávila E, Megía A, Pintado P, Vega B, Padrón E, et al. The NDDG criteria versus the IADPSG or the ADA criteria for diagnosing early-onset gestational diabetes mellitus or abnormal glucose tolerance. International Journal of Gynecology & Obstetrics. 2023 Mar 26;160(3):906-14.
- Zajdenverg L, Façanha CFS, Dualib PM, Golbert A, Moisés ECD, Calderon I de MP, et al. Rastreamento e diagnóstico da hiperglicemia na gestação. In: Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes. Conectando Pessoas; 2022.
- 17. Mi C, Liu H, Peng H, Cheng C, Wang M, Liu H, et al. Relationships Among Pre-Pregnancy BMI, Gestational, and Postpartum Oral Glucose Tolerance Results in Women With Gestational Diabetes Mellitus. Front Nutr. 2021 Dec 1;8.
- Brown FM, Wyckoff J. Application of One-Step IADPSG Versus Two-Step Diagnostic Criteria for Gestational Diabetes in the Real World: Impact on Health Services, Clinical Care, and Outcomes. Curr Diab Rep. 2017 Oct 10:17(10):85.
- Moon JH, Jang HC. Gestational Diabetes Mellitus: Diagnostic Approaches and Maternal-Offspring Complications. Diabetes Metab J. 2022 Jan 31:46(1):3-14.
- Ramezani Tehrani F, Sheidaei A, Rahmati M, Farzadfar F, Noroozzadeh M, Hosseinpanah F, et al. Various screening and diagnosis approaches for gestational diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes: a secondary analysis of a randomized non-inferiority field trial. BMJ Open Diabetes Res Care. 2023 Dec 12;11(6):e003510.
- Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Lernmark Å, et al. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2023 Oct 1:46(10):e151-99.
- 22. Garonzi C, Maguolo A, Maffeis C. Pros and Cons of Current Diagnostic Tools for Risk-Based Screening of Prediabetes and Type 2 Diabetes in Children and Adolescents with Overweight or Obesity. Horm Res Paediatr. 2023;96(4):356-65.
- 23. Duong KNC, Tan CJ, Rattanasiri S, Thakkinstian A, Anothaisintawee T, Chaiyakunapruk N. Comparison of diagnostic accuracy for diabetes diagnosis: A systematic review and network meta-analysis. Front Med (Lausanne). 2023 Jan 24;10.
- 24. Kaur G, Lakshmi PVM, Rastogi A, Bhansali A, Jain S, Teerawattananon Y, et al. Diagnostic accuracy of tests for type 2 diabetes and prediabetes: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2020 Nov 20;15(11):e0242415.
- Selvin E, Crainiceanu CM, Brancati FL, Coresh J. Short-term Variability in Measures of Glycemia and Implications for the Classification of Diabetes. Arch Intern Med. 2007 Jul 23;167(14):1545.
- 26. Wareham NJ, O'Rahilly S. The changing classification and diagnosis of diabetes. BMJ. 1998 Aug 8;317(7155):359-60.
- 27. International Expert Committee Report on the Role of the A1C Assay in the Diagnosis of Diabetes. Diabetes Care. 2009 Jul 1;32(7):1327-34.
- 28. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2010 Jan 1;33(Supplement_1):S62-9.
- 29. Utzschneider KM, Younes N, Rasouli N, Barzilay JI, Banerji MA, Cohen RM, et al. Shape of the OGTT glucose response curve: relationship with β-cell function and differences by sex, race, and BMI in adults with early type 2 diabetes treated with metformin. BMJ Open Diabetes Res Care. 2021 Sep 16;9(1):e002264.
- 30. Vejrazkova D, Vankova M, Lukasova P, Hill M, Vcelak J, Tura A, et al. The Glycemic Curve during the Oral Glucose Tolerance Test: Is It Only Indicative of Glycoregulation? Biomedicines. 2023 Apr 25;11(5):1278.
- 31. Barr RG, Nathan DM, Meigs JB, Singer DE. Tests of Glycemia for the Diagnosis of Type 2 Diabetes Mellitus. Ann Intern Med. 2002 Aug 20;137(4):263.
- Jagannathan R, Neves JS, Dorcely B, Chung ST, Tamura K, Rhee M, et al. The Oral Glucose Tolerance Test: 100 Years Later. Diabetes Metab Syndr Obes. 2020 Oct; Volume 13:3787-805.

- Feskens E, Bowles C, Kromhout D. Intra- and interindividual variability of glucose tolerance in an elderly population. J Clin Epidemiol. 1991:44(9):947-53.
- 34. Chai JH, Ma S, Heng D, Yoong J, Lim WY, Toh SA, et al. Impact of analytical and biological variations on classification of diabetes using fasting plasma glucose, oral glucose tolerance test and HbA1c. Sci Rep. 2017 Oct 20;7(1):13721.
- 35. Cefalo CMA, Riccio A, Fiorentino TV, Succurro E, Mannino GC, Perticone M, et al. Pathophysiological characteristics of subjects with intermediate hyperglycemia and type 2 diabetes identified by 1-hour plasma glucose during an oral glucose tolerance test. Diabetes Res Clin Pract. 2024 Nov;217:111856.
- 36. Song G, Wei Y, Juan J, Niu J, Yang H. The predictive ability of the triglyceride glucose index, fasting glucose and oral glucose tolerance test for postpartum hyperglycemia in women with a GDM history. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. 2024 Jan 2;37(1).
- 37. Cheng X, Yang N, Li Y, Sun Q, Qiu L, Xu L, et al. The shape of the glucose response curve during an oral glucose tolerance test heralds β -cell function in a large Chinese population. BMC Endocr Disord. 2019 Dec 5:19(1):119.
- 38. Abdul-Ghani MA, Lyssenko V, Tuomi T, DeFronzo RA, Groop L. The shape of plasma glucose concentration curve during OGTT predicts future risk of type 2 diabetes. Diabetes Metab Res Rev. 2010 May 20;26(4):280-6.
- Ismail HM, Xu P, Libman IM, Becker DJ, Marks JB, Skyler JS, et al. The shape of the glucose concentration curve during an oral glucose tolerance test predicts risk for type 1 diabetes. Diabetologia. 2018 Jan 27;61(1):84-92.
- Tschritter O, Fritsche A, Shirkavand F, Machicao F, Haring H, Stumvoll M. Assessing the Shape of the Glucose Curve During an Oral Glucose Tolerance Test. Diabetes Care. 2003 Apr 1;26(4):1026-33.
- 41. Kim JY, Michaliszyn SF, Nasr A, Lee S, Tfayli H, Hannon T, et al. The Shape of the Glucose Response Curve During an Oral Glucose Tolerance Test Heralds Biomarkers of Type 2 Diabetes Risk in Obese Youth. Diabetes Care. 2016 Aug 1;39(8):1431-9.
- 42. de Andrade Mesquita L, Pavan Antoniolli L, Cittolin-Santos GF, Gerchman F. Distinct metabolic profile according to the shape of the oral glucose tolerance test curve is related to whole glucose excursion: a cross-sectional study. BMC Endocr Disord. 2018 Dec 16;18(1):56.
- Arslanian S, El ghormli L, Young Kim J, Bacha F, Chan C, Ismail HM, et al. The Shape of the Glucose Response Curve During an Oral Glucose Tolerance Test: Forerunner of Heightened Glycemic Failure Rates and Accelerated Decline in β-Cell Function in TODAY. Diabetes Care. 2019 Jan 1;42(1):164-72.
- 44. Lages M, Barros R, Moreira P, Guarino MP. Metabolic Effects of an Oral Glucose Tolerance Test Compared to the Mixed Meal Tolerance Tests: A Narrative Review. Nutrients. 2022 May 12;14(10):2032.
- 45. Kirke AB, Spry E, Atkinson D, Sinclair C, Marley JV. Oral glucose tolerance test—The imperfect gold standard for gestational diabetes screening: A qualitative study involving clinicians in regional, rural and remote areas of Western Australia. Health Promotion Journal of Australia. 2024 Jul 7.
- 46. Gomez P, Sanchez J. Type 1 Diabetes Screening and Diagnosis. Endocrinol Metab Clin North Am. 2024 Mar;53(1):17-26.
- Testa R, Lo Cascio C, Fabbietti P, Bonfigli AR. OGTT reproducibility in adults with impaired fasting glucose is nearly 65% with adoption of Italian SIBioC-SIPMeL recommendations. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2021 Jul 27;59(8):e341-3.
- 48. Heinemann L. Are all glucose solutions used for oGTT equal? Diabetic Medicine. 2022 May 7;39(5).
- Jagannathan R, DuBose CW, Mabundo LS, Chung ST, Ha J, Sherman A, et al. The OGTT is highly reproducible in Africans for the diagnosis of diabetes: Implications for treatment and protocol design. Diabetes Res Clin Pract. 2020 Dec;170:108523.
- Klein KR, Walker CP, McFerren AL, Huffman H, Frohlich F, Buse JB. Carbohydrate Intake Prior to Oral Glucose Tolerance Testing. J Endocr Soc. 2021 May 1;5(5).

- 51. Secen El, Desdicioglu R, Ergun GT, Usta E, Ozgu-Erdinc AS. The Relationship between a High Carbohydrate Diet and Oral Glucose Tolerance Test in Pregnancy. Z Geburtshilfe Neonatol. 2024 Jun 17;228(03):255-9.
- 52. Buhling KJ, Elsner E, Wolf C, Harder T, Engel B, Wascher C, et al. No influence of high- and low-carbohydrate diet on the oral glucose tolerance test in pregnancy. Clin Biochem. 2004 Apr;37(4):323-7.
- Rosenberg EA, Seely EW, James K, Arenas J, Callahan MJ, Cayford M, et al. Relationship between carbohydrate intake and oral glucose tolerance test results among pregnant women. Diabetes Res Clin Pract. 2021 Jun:176:108869.
- 54. Romagnoli M, Alis R, Aloe R, Salvagno GL, Basterra J, Pareja-Galeano H, et al. Influence of training and a maximal exercise test in analytical variability of muscular, hepatic, and cardiovascular biochemical variables. Scand J Clin Lab Invest. 2014 Apr 31;74(3):192-8.
- 55. Sanchis-Gomar F, Lippi G. Physical activity an important preanalytical variable. Biochem Med (Zagreb). 2014;68-79.
- 56. Fragala MarenS, Bi C, Chaump M, Kaufman HW, Kroll MH. Associations of aerobic and strength exercise with clinical laboratory test values. PLoS One. 2017 Oct 23;12(10):e0180840.
- 57. Foran SE, Lewandrowski KB, Kratz A. Effects Of Exercise On Laboratory Test Results. Lab Med. 2003 Oct 1;34(10):736-42.
- 58. Hughes DC, Ellefsen S, Baar K. Adaptations to Endurance and Strength Training. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 Jun;8(6):a029769.
- 59. Frati AC, Iniestra F, Ariza CR. Acute Effect of Cigarette Smoking on Glucose Tolerance and Other Cardiovascular Risk Factors. Diabetes Care. 1996 Feb 1;19(2):112-8.
- 60. Harris KK, Zopey M, Friedman TC. Metabolic effects of smoking cessation. Nat Rev Endocrinol. 2016 May 4;12(5):299-308.
- Grøndahl MF, Bagger JI, Lund A, Faurschou A, Rehfeld JF, Holst JJ, et al. Effects of Smoking Versus Nonsmoking on Postprandial Glucose Metabolism in Heavy Smokers Compared With Nonsmokers. Diabetes Care. 2018 Jun 1;41(6):1260-7.
- 62. Wang P, Chang PC, Wang CY, Wang LC, Shih CL. Comparing the effects of water temperature and additives in glucose solution on pregnant women's taste, side effects, and glycemic levels during an oral glucose tolerance test: a randomized controlled trial. Am J Obstet Gynecol MFM. 2023 Apr;5(4):100870.
- Bogdanet D, O'Shea P, Lyons C, Shafat A, Dunne F. The Oral Glucose Tolerance Test—Is It Time for a Change?—A Literature Review with an Emphasis on Pregnancy. J Clin Med. 2020 Oct 27;9(11):3451.
- 64. Navarro-Martinez H, Flores-Le Roux JA, Llauradó G, Gortazar L, Payà A, Mañé L, et al. One abnormal value or vomiting after oral glucose tolerance test in pregnancy: incidence and impact on maternal-fetal outcomes. Gynecological Endocrinology. 2023 Dec 14;39(1).
- 65. Agarwal MM, Punnose J, Dhatt GS. Gestational diabetes: problems associated with the oral glucose tolerance test. Diabetes Res Clin Pract. 2004 Jan;63(1):73-4.

- 66. Madendag Y, Sahin E, Madendag Col I, Eraslan SM, Tayyar AT, Ozdemir F, et al. The effect of hyperemesis gravidarum on the 75 g oral glucose tolerance test screening and gestational diabetes mellitus. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. 2018 Aug 3;31(15):1989-92.
- 67. Bayraktar B, Balıkoğlu M, Bayraktar MG, Kanmaz AG. The Effects of Hyperemesis Gravidarum on the Oral Glucose Tolerance Test Values and Gestational Diabetes. Prague Med Rep. 2021;122(4):285-93.
- 68. Fathallah N, Slim R, Larif S, Hmouda H, Ben Salem C. Drug-Induced Hyperglycaemia and Diabetes. Drug Saf. 2015 Dec 14;38(12):1153-68.
- 69. Kuwa K, Nakayama T, Hoshino T, Tominaga M. Relationships of glucose concentrations in capillary whole blood, venous whole blood and venous plasma. Clinica Chimica Acta. 2001 May;307(1-2):187-92.
- Bethel MA, Price HC, Sourij H, White S, Coleman RL, Ring A, et al. Evaluation of a Self-Administered Oral Glucose Tolerance Test. Diabetes Care. 2013 Jun 1;36(6):1483-8.
- 71. Dunseath GJ, Bright D, Jones C, Dowrick S, Cheung W -Y., Luzio SD. Performance evaluation of a self-administered home oral glucose tolerance test kit in a controlled clinical research setting. Diabetic Medicine. 2019 Jul 26;36(7):862-7.
- 72. Tan AYS, Tan MS, Wu A, Seah AC, Chong C, Koh E, et al. Self-administered oral glucose tolerance test with capillary glucose measurements for the screening of diabetes mellitus in high-risk adults: a feasibility study. BMJ Open Diabetes Res Care. 2021 Dec 24;9(2):e002556.
- 73. Larsson-Cohn U. Differences between capillary and venous blood glucose during oral glucose tolerance tests. Scand J Clin Lab Invest. 1976 Dec;36(8):805-8.
- Jung J, Garnett E, Rector K, Jariwala P, Devaraj S. Effect of Collection Tube Type on Glucose Stability in Whole Blood. Ann Clin Lab Sci. 2020 Jul;50(4):557-9.
- 75. Lippi G, Nybo M, Cadamuro J, Guimaraes JT, van Dongen-Lases E, Simundic AM. Blood Glucose Determination: Effect of Tube Additives. In 2018. p. 101-23.
- Daly N, Flynn I, Carroll C, Stapleton M, O'Kelly R, Turner MJ. Comparison of Citrate-Fluoride-EDTA with Fluoride-EDTA Additives to Stabilize Plasma Glucose Measurements in Women Being Screened during Pregnancy with an Oral Glucose Tolerance Test: A Prospective Observational Study. Clin Chem. 2016 Jun 1;62(6):886-7.
- 77. Fobker M. Stability of glucose in plasma with different anticoagulants. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2014 Jan 1;52(7).
- Pleus S, Beil A, Baumstark A, Haug C, Freckmann G. Plasma Glucose Concentrations in Different Sampling Tubes Measured on Different Glucose Analysers. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes. 2024 May 2;132(05):260-6.
- Miller WG, Myers GL, Ashwood ER, Killeen AA, Wang E, Ehlers GW, et al. State of the Art in Trueness and Interlaboratory Harmonization for 10 Analytes in General Clinical Chemistry. Arch Pathol Lab Med. 2008 May 1;132(5):838-46.



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 formalmento 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 ICEPI 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 secão 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 pão 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 | Complete Title | | |
| Incluir versão em Inglês | Incluir versão em Português | | |
| Título Corrido | Running Title | | |
| Incluir versão em Inglês | Incluir versão em Português | | |
| Autores | Authors | | |
| Resumo | Abstract | | |
| Incluir versão em Inglês | Incluir versão em Português | | |
| Palavras-chave | Keywords | | |
| Incluir versão em Inglês | 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 cabecalho 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 seia possível converter para formato "tif", llustrações 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.icmie.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.
 Alquns 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 n\u00e3o possuir autoria, a refer\u00e9ncia dever\u00e1 ser iniciada por seu t\u00e9tulo;
- 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 iquais (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 Al, 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 Gelfree 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; secão 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: secão 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-14juj; 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:/ | |

N PRO-IN

Programa de Controle Interno da Qualidade do PNCQ

Confira algumas das amostras disponíveis:

IMUNO

- Anti-HBc, HBsAg
- Anti-HCV Anti-HIV 1/2, Anti-HTLV
- ASO
- BHCG
- Chagas
- Sífilis VDRL

- Rotavírus Zika vírus IgG Dengue IgG/IgM
- Fator reumatóide Proteína C Reativa (PCR)
- Toxoplasmose IgG/lgM
- COVID-19 anticorpos (IgG/IgM), antígeno (Ag)
- Leptospirose

BIOMOL

- HBV biologia molecular
- COVID-19 biologia molecular

TOXICOLOGIA

Toxicologia – voláteis em urina e metais em sangue total, soro e urina



Em diversos volumes e vários níveis!

Liofilizados, aumentando a sua estabilidade!

Acesse o site e faça seu pedido: pncq.org.br/grupo_produto/pro-in

HORMÔNIOS

- Hormônios
- Procalcitonina
- Vitamina D

BIOQUÍMICA

MARCADORES CARDÍACOS

HEMATO

- Hemoglobina glicada e Hemoglobina HEMOCUE
- Coombs direto e indireto
- Coagulograma
- Fatores da coagulação
- Gasometria
- Grupo sanguíneo
- e Fator RH D-dí<u>mero</u>

URINÁLISE E PARASITO

- Urinálise tira reagente, análise bioquímica e
- Microalbuminúria
- Sangue oculto



Pro-IN em Tempo Real:

Ferramenta **GRATUITA** para os laboratórios que adquirem amostras do **PRO-IN** e auxilia na elaboração e na avaliação de seu controle interno, com:

- Gráfico de Levey Jennings automático;
- Comparação com laboratórios que utilizam mesma metodologia;
- Composição de Valores próprios, com Média, DP e CV;
- Regras de Westgard personalizadas.





pncq@pncq.org.br



@PNCQoficial



@pncqoficial



/pncq-oficial

