UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

KAROLINE ALBUQUERQUE FARIAS

AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA *in vitro* DA LIPEMIA EM ENSAIOS DE VDRL (*VENERAL DIASEASE RESEARCH LABORATORY)*

Juazeiro do Norte – CE
2018

KAROLINE ALBUQUERQUE FARIAS

AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA *in vitro* DA LIPEMIA EM ENSAIOS DE VDRL (*VENEREAL DIASEASE RESEARCH LABORATORY)*

Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Esp. Cícero Roberto Nascimento Saraiva

Juazeiro do Norte – CE
2018

KAROLINE ALBUQUERQUE FARIAS

AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA *in vitro* DA LIPEMIA EM ENSAIOS DE VDRL (*VENEREAL DIASEASE RESEARCH LABORATORY)*

Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Esp. Cícero Roberto Nascimento Saraiva

Data de aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Esp. Cícero Roberto Nascimento Saraiva
Orientador

_____

Prof. Esp. Wenderson Pinheiro de Lima
Examinador 1

_____

Prof. Esp. Francisco Yhan Pinto Bezerra
Examinador 2

AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA *in vitro* DA LIPEMIA EM ENSAIOS DE VDRL (*VENEREAL DIASEASE RESEARCH LABORATORY)*

Karoline Albuquerque Farias[1]; Cícero Roberto Nascimento Saraiva[2]

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo analisar a interferência *in vitro* da lipemia em ensaios de VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory),* para isso realizou-se uma pesquisa experimental quantitativa, na qual vinte e cinco amostras de soro, não reagentes para imunoensaios de VDRL e com valores normais para triglicerídeos, foram submetidas a indução de lipemia utilizando-se o reagente padrão do kit de triglicerídeos na proporção 1:4, ou seja, diluiu-se 30µl da amostra em 120µl do reagente padrão. Todas as amostras foram submetidas novamente a dosagem de triglicerídeos, seguindo instruções do fabricante, e as determinações imunológicas do VDRL, como preconizado pelo Ministério da Saúde. As análises foram executadas no Laboratório multidisciplinar do Centro Universitário Leão Sampaio e os dados obtidos foram tabulados e analisados através dos programas *Microsoft Office Excel 2010* e STATA Data Analysis 12.0. As amostras mostraram-se reagentes em 32% das amostras analisadas. A positividade foi observada a partir da concentração de triglicerídeos de 754mg/dL com titulação de 1:1. As maiores titulações foram observadas nas concentrações de 901mg/dL e 928mg/dL apresentando-se 1:2048 e 1:4096, respectivamente. A partir desses resultados conclui-se que o VDRL é passivo a resultados falso-positivos em concentrações elevadas de triglicerídeos, ressaltando assim, a importância da adequada preparação do paciente que deve ser instruído sob a necessidade de jejum para a coleta sanguínea. Fica evidente também a indispensável execução de testes confirmatórios da doença como o *Fluorescence Treponemal Antibody-absorption* (FTA-ABS), para evitar maiores danos aos pacientes que poderão iniciar uma terapêutica sem necessidade.
Palavras-chaves: Diagnóstico. Lipemia. Sífilis.

EVALUATION OF in vitro INTERFERENCE OF LIPEMIA IN THE VDRL TESTS (VENEREAL DIASEASE RESEARCH LABORATORY)

ABSTRACT

The present study aimed to analyze the *in vitro* interference of lipemia in the VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*), for which a quantitative experimental study was carried out, in which twenty-five serum samples, non-reagent for immunoassays of VDRL and with normal values for triglycerides, were submitted to lipemia induction using the standard reagent of the triglyceride kit in ratio 1: 4, that is, 30 µl of the sample was diluted in 120 µl of the standard reagent. All the samples were again submitted to triglyceride dosing, following manufacturer's instructions, and the VDRL immunological determinations, as recommended by the Ministry of Health. The analyzes were performed in the Multidisciplinary Laboratory of the University Center Leão Sampaio and the data obtained were tabulated and analyzed through the programs Microsoft Office Excel 2010 and STATA Data Analysis 12.0. Samples were reacted in 32% of samples analyzed. The positivity was observed from the concentration of triglycerides of 754 mg / dL with titration of 1: 1. The highest titers were observed at

[1] Discente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, Juazeiro do Norte - CE
[2] Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, Juazeiro do Norte - CE

concentrations of 901 mg / dL and 928 mg / dL, respectively, with 1: 2048 and 1: 4096. From these results it is concluded that VDRL is passive to false-positive results in high concentrations of triglycerides, thus highlighting the importance of adequate preparation of the patient who should be instructed under the necessity of fasting for blood collection. It is also evident the indispensable execution of confirmatory tests of the disease as the Fluorescence Treponemal Antibody-absorption (FTA-ABS), to avoid greater damages to the patients who can initiate a therapy without necessity.
Key-words: Diagnosis. Lipemia. Syphilis.

1 INTRODUÇÃO

A sífilis é uma doença infecciosa provocada pela bactéria *Treponema pallidum*, que pode ser adquirida por via sexual, congênita ou por transfusão e materiais perfuro cortantes. A doença representa um grave problema de saúde pública por ter uma distribuição mundial e por ser uma doença multifacetada (RODRIGUES; GUIMARÃES, 2004).

A trepanomatose é classificada em fases de acordo com o estágio clínico que o paciente apresenta, já que a doença engloba um amplo espectro de manifestações. Desta forma, evidenciam-se fases sintomatológicas, como a sífilis primária, sífilis secundária e a sífilis terciária, além de fases assintomáticas que são conhecidas como período de latência. (OLIVEIRA; SILVEIRA; NERY, 2012; SONDA et al., 2013).

O diagnóstico da doença envolve provas diretas e testes sorológicos. O *Veneral Disease Research Laboratory* (VDRL) e o *Rapid Plasma Reagin* (RPR) são testes sorológicos não treponêmicos, semiquantitativos e altamente sensíveis. Os testes treponêmicos *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA), *Fluorescence Treponemal Antibody-absorption* (FTA-ABS) e *Treponema Pallidum Hemaglutination* (TPHA) detectam anticorpos antitreponêmicos e possuem alta especificidade, sendo, portanto, utilizados para a exclusão de resultados falso-positivos. Dentre as provas diretas, a microscopia de campo escuro é a técnica mais utilizada, pois permite a visualização de *Treponema pallidum* vivo, sendo o método mais indicado na fase primária da doença (JUNIOR; SHIRATSU; PINTO, 2009; MILANEZ; AMARAL, 2008).

O VDRL é um teste de floculação que detecta anticorpos inespecíficos (reagininas) e que se torna reagente entre quatro e oito semanas após a infecção. O teste possui como antígenos a lecitina, o colesterol e a cardiolipina, que compõem as membranas celulares de *T. pallidum* e de mamíferos, a união desses compostos acontece ao acaso e dá origem a estruturas arredondadas chamadas de micelas. Na presença de anticorpos não treponêmicos na

amostra, ocorre a ligação entre eles e às cardiolipinas das micelas, e quando essa ligação ocorre várias vezes, há o fenômeno de floculação (BRASIL, 2010; GENÇ; LEDGER, 2000).

Resultados falso-positivos para imunoensaios de VDRL podem ocorrer em determinadas circunstâncias, que podem ser situações patológicas como doenças autoimunes, viroses, malária, tuberculose, hanseníase, linfogranuloma venéreo, doença hepática, mononucleose infecciosa, mieloma múltiplo e condições fisiológicas como idade avançada e gravidez, além da utilização de drogas, devido à elevada produção, nessas situações, de antígenos lipídicos que levam à produção de reagininas pelo organismo (LABTEST, 2011).

Perturbações endógenas, como por exemplo, a lipemia, podem ser uma fonte de erros nesses ensaios laboratoriais. Na rotina laboratorial o paciente deve ser instruído sob condições que podem eventualmente ser necessárias, como por exemplo, jejum. A prevalência de amostras lipêmicas é inferior a outras amostras que por algum motivo também podem causar interferências, como por exemplo, amostras sanguíneas hemolisadas. Porém, ainda ocorre em aproximadamente 1% dos casos e é reconhecida quando as concentrações de triglicerídeos estão maiores de 300 mg/dL (LIPPI et al., 2011; PIYOPHIRAPONG; WONGTIRAPORN; SRIBHEN, 2010).

Portanto, como as lipemias provocam alterações em diversos testes e o número de casos de pessoas portadoras de distúrbios lipêmicos tem aumentado bruscamente nos últimos anos, assim como os casos de sífilis, é importante que um estudo da relação entre essas duas condições seja realizado. A possibilidade de eliminar um possível interferente do teste de VDRL se expande, tornando-o mais específico frente a adequada preparação do paciente e do analista, minimizando a liberação de resultados falso-positivos e elucidando o comportamento desse exame nessas amostras, favorecendo assim um diagnóstico confiável.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a interferência *in vitro* da lipemia em ensaios de VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory).*

2 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa experimental com caráter quantitativo executada no laboratório multidisciplinar do Centro Universitário Leão Sampaio, durante os meses de setembro e outubro de 2018. Os testes foram realizados com vinte e cinco amostras de soro fornecidas por um Laboratório Escola de Análises Clínicas da cidade de Juazeiro do Norte – CE, o material biológico foi coletado em tubo com gel separador e armazenado em geladeira (entre 2º e 8ºC) até o momento da realização dos testes.

Os critérios de inclusão dessas amostras foram os valores de referência normais para triglicerídeos e não reagentes para imunoensaios de VDRL, além disso, todas as amostras foram de pacientes do sexo masculino para evitar possível interferência da grande atividade hormonal presente nas mulheres. Já como fatores de exclusão, teve-se amostras hemolisadas ou aquelas que eram oriundas de pacientes que apresentavam algum tipo de doença que pudesse aumentar os anticorpos fosfolipídicos no organismo.

A solução utilizada para induzir a lipemia nas amostras foi o reagente padrão do kit de triglicerídeos, cuja concentração é de 200 mg/dL. Cada amostra foi diluída no reagente padrão na proporção 1:4, ou seja, foram adicionados 30µl do soro em 120µl do reagente padrão para se obter 150µl da solução teste.

Em seguida, todas as amostras foram submetidas a nova dosagem de triglicerídeos, seguindo as instruções do fabricante. E as determinações imunológicas do VDRL, como preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010), foram feitas diluições da solução teste com solução salina até a proporção 1:8 ou até a diluição subsequente do resultado reagente. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os dados obtidos foram tabulados e analisados através do programa *Microsoft Office Excel 2010*.

O estudo foi submetido à Plataforma Brasil para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e as informações dos pacientes foram mantidas em sigilo para preservação da integridade dos mesmos, em conformidade com as normas estabelecidas pela resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O VDRL é propenso a resultados falso-positivos, pois os anticorpos fosfolipídicos que são detectados por esse teste, tendem a se elevar de forma inespecífica em alguns casos (SÁEZ-ALQUÉZAR et al., 2007). A Tabela 1 apresenta a média dos resultados das dosagens de triglicerídeos e do teste de VDRL obtidos das vinte e cinco amostras, após a diluição.

TABELA 1: Dosagem de triglicerídeos e resultado do VDRL após a indução de lipemia

AMOSTRA	TRIGLICE-RÍDEOS (mg/dL)	VDRL	AMOSTRA	TRIGLICE-RÍDEOS (mg/dL)	VDRL
1	522,0	Não reagente	**14**	718,0	Não reagente
2	550,4	Não reagente	**15**	718,0	Não reagente
3	556,0	Não reagente	**16**	738,2	Não reagente
4	562,0	Não reagente	**17**	740,1	Não reagente
5	603,0	Não reagente	**18**	754,0	Reagente 1:1
6	614,7	Não reagente	**19**	768,1	Reagente 1:4
7	620,1	Não reagente	**20**	791,9	Reagente 1:32
8	626,4	Não reagente	**21**	793,0	Reagente 1:64
9	628,0	Não reagente	**22**	845,0	Reagente 1:128
10	630,5	Não reagente	**23**	857,0	Reagente 1:256
11	631,0	Não reagente	**24**	901,0	Reagente 1:2048
12	661,5	Não reagente	**25**	928,0	Reagente 1:4096
13	711,0	Não reagente			

As amostras submetidas ao teste de VDRL, após a indução da lipemia, mostraram-se reagentes em 32% (8/25) das amostras analisadas. A floculação das partículas foi observada apenas a partir da concentração de triglicerídeos de 754 mg/dL, apresentando uma titulação de 1:1. As maiores titulações foram observadas nas concentrações lipêmicas de 901mg/dL e 928mg/dL, apresentando titulações de 1:2048 e 1:4096 respectivamente.

As causas em que mais ocorre lipemia são jejum feito de forma incorreta, ingestão de álcool, diabetes, hipertrigliceridemia, insuficiência renal, hipotireoidismo, pancreatite, mieloma múltiplo, cirrose biliar, lúpus, nutrição parenteral total e uso de medicamentos, como inibidores de protease, estrogênio e anticoncepcionais orais (CALMARZA; CORDERO, 2011).

Já existe relatos na literatura da interferência da lipemia em exames laboratoriais, como: glicemia, dosagem de fósforo, bilirrubina total, ácido úrico e proteínas totais, no qual está relacionado à turbidez que o aumento de triglicerídeos provoca na amostra, influenciando de forma direta no resultado do teste (KROLL; ELIN, 1994; SAIBABA et al., 1998; PIYOPHIRAPONG; WONGTIRAPORN; SRIBHEN, 2010).

Segundo Brooks et al. (2014) cerca de cem antígenos proteicos foram reconhecidos na bactéria *Treponema pallidum*, sendo a cardiolipina (partícula presente no teste de VDRL) um dos mais importantes.

Wang; Liu; Yang (2010) afirmam que a cardiolipina se enquadra como um fosfolipídio tetra-acil único que está presente na membrana interna da mitocôndria humana, sendo indispensável na estabilização da mesma, funcionamento da cadeia respiratória e formação de supercomplexos protéicos. Além disso, se faz presente em maior quantidade em doenças como insuficiência cardíaca e diabetes. A Diabetes tipo II geralmente está relacionada com um quadro de dislipidemia e o aumento da cardiolipina nos pacientes diabéticos pode ser explicado com base nesse fato, o que gera uma observação importante, pois, levando em consideração que resultados reagentes foram obtidos em casos de lipemia, pacientes portadores de diabetes tipo II estão susceptíveis a apresentarem resultados falso-positivos.

Além disso, segundo Saldaña (2016) o uso de inibidores de protease (nos casos de infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana – HIV) pode ocasionar quadros de lipemia. Sendo assim, um VDRL falso-positivo em portadores de HIV pode provocar grande confusão diagnóstica, pois há relatos literários de que a sífilis é capaz de facilitar a infecção por tal vírus, sendo assim, um VDRL reagente em um paciente acometido pelo HIV geralmente desperta menos desconfiança médica de um resultado falso-positivo.

Com isso, a fixação da necessidade de jejum para exames laboratoriais é de extrema importância para impedir os riscos potenciais e melhorar a segurança do paciente, otimizando o resultado do teste realizado. Dessa forma, os laboratórios atuariam de forma efetiva na padronização da fase pré-analítica, que é o processo em que ocorre a maior parte de erros, no que se refere à exames laboratoriais (GUIDI et al., 2015).

4 CONCLUSÃO

Portanto, o teste *Venereal Disease Research Laboratory* é passivo a resultados falso-positivos em concentrações elevadas de triglicerídeos, a partir de 754 mg/dL, ressaltando assim, a importância da adequada preparação do paciente, que deve ser instruído sob a necessidade de jejum para a coleta sanguínea.

Fica evidente também a indispensável execução de testes confirmatórios da doença como o *Fluorescence Treponemal Antibody-absorption* (FTA-ABS), para evitar maiores danos aos pacientes que ao se deparar com um resultado falso-positivo poderão iniciar uma terapêutica sem necessidade, além de serem submetidos a um constrangimento desnecessário.

REFERÊNCIAS

BRASIL, Ministério da Saúde - **Sífilis: Estratégias para Diagnóstico no Brasil.** Coordenação de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Série Telelab: Brasília, 2010.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE**. Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012. Diretrizes e Normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos**. Brasília: Diário da União, 2012.

BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia Médica: De Jawetz, Melnick e Adelberg,** 26ª Ed. Porto Alegre: AMGH, 2014 BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia Médica: De Jawetz, Melnick e Adelberg,** 26ª Ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

CALMARZA, P.; CORDERO, J. Lipemia interferences in routine clinical biochemical tests. **Biochemical Medicine.** v. 21, n. 2, 2011.

GENÇ, M.; LEDGER, W. J. Spyphilis in pregnancy. **Sexually Transmitted Infections**. v. 76, 2000.

GUIDI, G. C. et al. To avoid fasting time, more risk than benefits. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.** v. 53, n. 10, 2015.

JUNIOR, W. B; SHIRATSU, R.; PINTO, V. Abordagem nas doenças sexualmente transmissíveis. **Anais Brasileiros de Dermatologia,** v. 84, n. 2, 2009.

KROLL, M. H.; ELIN, R. J. Interference with clinical laboratory analyses. **Clinical Chemistry.** v. 40, n. 11, 1994.

LABTEST. **VDRL:** instruções de uso. Lagoa Santa: Labtest Diagnóstica S.A., 2011.

LIPPI, G. et al. Preanalytical quality improvement: from dream to reality. **Clinical Chemistry and Laborator Medicine,** v. 49, n. 7, 2011.

MILANEZ, H.; AMARAL, E. Por que ainda não conseguimos controlar o problema da sífilis em gestantes e recém-nascidos? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.** v. 30, n. 7, 2008.

OLIVEIRA, F. L.; SILVEIRA, L. K. C. B.; NERY, J. A. C. As diversas apresentações da sífilis secundária. Relato de casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica.** v. 10, n. 6, 2012.

PIYOPHIRAPONG, S.; WONGTIRAPORN, W.; SRIBHEN, K. Factitious Results in Clinical Chemistry Tests Caused by Common Endogenous Interferents. **Siriraj Medical Journal,** v. 62, n. 4, 2010.

RODRIGUES C. S.; GUIMARÃES M. D. C.; Grupo Nacional de Estudo sobre Sífilis Congênita. Positividade para sífilis em puérperas: ainda um desafio para o Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública.** v. 16, n. 3, 2004.

SÁEZ-ALQUÉZAR, A. et al. Desempenho de testes sorológicos para sífilis, treponêmicos (ELISA) e não treponêmicos (VDRL e RPR), na triagem sorológica para doadores de sangue – confirmação dos resultados por meio de três testes treponêmicos (FTA ABS, WB e TPHA). **Revista de Patologia Tropical.** v. 36, n. 3, 2007.

SAIBABA, K. S. S. et al. Interferences in clinical chemistry analysis. **Indian Journal of Clinical Biochemistry.** v. 13, n. 2, 1998.

SALDAÑA, I. M. Interferência en las determinaclones de 24 constituyentes bloquímicos en el autoanalizador ADVIA 1800, causada por adición in vitro de emulsión comercial de nutrición parenteral a um pool de sueros**. Anales de la Facultad de Medicina.** v. 77, n. 2, 2016.

SONDA, E. C. Sífilis Congênita: uma revisão de literatura. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção.** v. 3, n. 1, 2013.

WANG, F.; LIU, Y.; YANG, J. A cardiolipina é o alvo da cardiotoxicidade dos anestésicos locais. **Revista Brasileira de Anestesiologia.** v. 60, n. 4, 2010.