



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**



**OS CONSENSOS PARA PESQUISA DE AUTOANTICORPOS EM CÉLULAS HEp-2  
(FAN HEp-2): IMPLANTAÇÃO DAS DIRETRIZES NOS LABORATÓRIOS CLÍNICOS  
BRASILEIROS**

**GLAUCIELEN GOMES DA SILVA**

Goiânia

2017

GLAUCIELEN GOMES DA SILVA

OS CONSENSOS PARA PESQUISA DE AUTOANTICORPOS EM CÉLULAS HEp-2  
(FAN HEp-2): IMPLANTAÇÃO DAS DIRETRIZES NOS LABORATÓRIOS CLÍNICOS  
BRASILEIROS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais e Saúde da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

Linha de pesquisa: Sociedade, Ambiente e Saúde

Orientador: Dr. Wilson de Melo Cruvinel

Goiânia

2017

S586o

Silva, Glaucielen Gomes da

Os consensos para pesquisa de anticorpos em células HEp-2(FAN HEp\_2)[ manuscrito]: implantação das diretrizes nos laboratórios clínicos brasileiros/ Glaucielen Gomes da Silva.-- 2017.

75 f.; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais e Saúde, Goiânia, 2017

Inclui referências f.47-66


1. Doenças autoimunes. 2. Imunodeficiência. 3. Testes imunológicos. 4. Autoanticorpos. I.Cruvinel, Wilson Melo. II.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. III. Título.

CDU: 577.27(043)




DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE  
DEFENDIDA EM 08 DE MARÇO DE 2017 E CONSIDERADA  
APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA:

1)

  
Prof. Dr. Wilson de Melo Cruvinel / PUC Goiás (Presidente)

2)

  
Profa. Dra. Jozélia Rêgo / UFG (Membro Externo)

3)

  
Prof. Dr. Clayson Moura Gomes / PUC Goiás (Membro)

4)

Prof. Dra. Graziela Tôrres Blanch / PUC Goiás (Suplente)

## DEDICATÓRIA

*À Deus, que com sua imensa bondade e misericórdia tem me sustentado todos os dias.*

*Aos meus pais, Derson e Antonilde, que cuidaram do meu crescimento pessoal e profissional, me indicando o melhor caminho e me acompanhando por toda trajetória.*

*Ao meu esposo, Marcos Arnon, que nos momentos mais difíceis do curso, esteve me auxiliando e dando forças para concluir.*

*Aos meus irmãos, Glaucia e Kallebe, que sempre presenciaram e compartilharam conquistas.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao Profº Wilson de Melo Cruvinel meu orientador, por todo o tempo em que se dedicou ao meu trabalho. Meus profundos agradecimentos.*

*Aos Conselhos Regionais e Federal de Biomedicina, pelo auxílio na divulgação da pesquisa.*

*Aos membros do Consenso, em especial Profº Paulo Luiz Carvalho Francescantonio, pela oportunidade em participar do V Consenso, que com toda certeza foi um momento de muito aprendizado.*

*À Controllab, por sua dedicação em nos ajudar na divulgação da pesquisa.*

*Ao meu querido amigo, Willian Lunardi, por seu trabalho na formação dos banners de convites para pesquisa.*

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.*

*(José de Alencar)*

## RESUMO

A pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 tem auxiliado no diagnóstico na investigação de doenças autoimunes especialmente as reumáticas. Tal metodologia, ao longo dos últimos anos, passou por um intenso processo de aperfeiçoamento e padronização com a realização do Consenso Brasileiro. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, 16 anos após a realização do I Consenso Brasileiro de FAN em Células HEp-2, a implantação das recomendações nos laboratórios clínicos que realizam a metodologia. Foi realizada uma pesquisa direcionada aos laboratórios entre fevereiro e outubro de 2016. Os laboratórios foram convidados a responder um questionário sobre as diretrizes do Consenso, abordando aspectos técnicos, controle de qualidade, leitura das lâminas, emissão de laudos e programas educativos. O estudo contou com a participação de 53 laboratórios que, em conjunto, realizam uma estimativa de 300.000 FAN/mês. Foi identificada uma heterogeneidade em especialidades médicas solicitantes do teste e profissionais responsáveis pelo procedimento técnico e leitura das lâminas de fluorescência. As recomendações do Consenso estão sendo seguidas em sua totalidade por 58,5% dos laboratórios. Em relação ao procedimento técnico, 83,1% dos participantes fazem triagem com diluição 1:80 e o esgotamento de título, recomendado pelo Consenso, está sendo adotado por todos os participantes. Evidenciou-se que 39,6% dos participantes utilizam mais de uma marca de *kit* e que 22,6% realiza a titulação do conjugado a cada nova *kit*, e diferentes potências de lâmpadas são utilizadas nos laboratórios com predomínio das de 100 Watts. Em relação à leitura das lâminas, 94,3% afirmam observar os quatro compartimentos celulares, 92,5% afirmam classificar a placa metafásica cromossômica em negativa ou positiva e 32,1% dos participantes não afirmaram observar as células em todas as fases do ciclo celular. Na emissão de laudos, 13,2% dos laboratórios admitiram relatar somente o nome do padrão seguido pelo título, não apresentando o laudo descritivo e 24,5% dos participantes não utilizam programas de educação e controle de qualidade. A maioria dos laboratórios foi capaz de identificar imagens representativas de grupos de padrões. Os resultados aqui apresentados demonstram consistentes avanços a partir da implantação do Consenso de FAN no Brasil, porém, evidenciam também a necessidade de ações para implementação dos programas de educação continuada.



Palavras-chave: Autoimunidade; Doenças autoimunes; FAN; HEp-2; Imunofluorescência.

## **ABSTRACT**

The search for autoantibodies in HEp-2 cells represents a relevant tool for diagnostic assistance in the investigation of autoimmune diseases, especially rheumatic diseases. This methodology, over the last years, underwent by intense process of improvement and standardization with the accomplishment of the Brazilian Consensus. The objective of this study was to evaluate the implantation of recommendations in the clinical laboratories that perform the methodology, 16 years after the accomplishment of the I Brazilian Consensus on ANA in HEp-2 cells. A research was conducted for the laboratories between February and October 2016. The laboratories were invited to answer questions that dealt with the guidelines of the Consensus, addressing technical aspects, quality control, reading of the slides, issuance of reports and educational programs. The study counted on the participation of 53 laboratories that jointly realize an estimate of 300,000 ANA by month. It has been identified that several medical specialties request the examination, and different professionals are responsible for the technical procedure and reading of the fluorescence slides. Consensus recommendations are being followed by all laboratories, in absolute by 58.5% of the laboratories. Regarding the technical procedure, 83.1% of the participants are screening at a 1:80 dilution and the title depletion, recommended by consensus, is being adopted by all participants. It was evidenced that 39.6% of the participants use more than one brand of kit and that 22.6% performs titration of the conjugate to each new kit and different lamp powers are used in laboratories with a predominance of 100 Watts. Regarding the reading of the slides, 94.3% stated that they observed the four cell compartments, 92.5% said to classify the chromosome metaphase plate negative or positive and 32.1% of the participants did not affirm to observe the cells in all phases of the cycle. In the issue of reports, 13.2% of the laboratories admitted to reporting only the name of the standard followed by the title, not presenting the descriptive report and 24.5% of the participants do not use education and quality control programs. Most laboratories were able to identify representative images of sets of patterns. The results presented here demonstrate consistent advances from the implementation of the ANA Consensus in Brazil, but also evidence the need for actions to implement continuing education programs.

Keywords: Autoimmunity; Rheumatology; ANA/HEp-2.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Célula de Lúpus Eritematoso (Célula LE)

Figura 2. Linha do tempo. Descoberta das Células LE em 1940, critério para diagnóstico de LES pelo CAR (Colégio Americano de Reumatologia) até 1997. Início da utilização da IFI para pesquisa de autoanticorpos em *imprint* de fígado de roedores em 1950. Surgimento das Células HEp-2 como substrato para pesquisa de autoanticorpos por IFI em 1980.

Figura 3. Árvore de classificação dos Padrões Nucleares/Nucleolares conforme o V Consenso Brasileiro de FAN, 2016.

Figura 4. Árvore de classificação dos Padrões Citoplasmáticos conforme o V Consenso Brasileiro de FAN, 2016.

Figura 5. Árvore de classificação dos Padrões de Aparelho Mitótico conforme o V Consenso Brasileiro de FAN, 2016.

Figura 6. Árvore de classificação dos Padrões Mistos conforme o V Consenso Brasileiro de FAN, 2016.

Figura 7. Mapa do Brasil. Destaque para os estados dos laboratórios que realizam o teste FAN/Hep-2 participantes no estudo.

Figura 1 - Resumo das Recomendações das cinco edições do Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em Células HEp-2.

Figura 2 - Distribuição dos laboratórios brasileiros participantes de acordo com a média mensal de testes FAN/HEp-2 estimada, entre fevereiro e outubro de 2016.

Figura 3 - Relação entre diluição de triagem e potência da lâmpada do microscópio utilizado para leitura das lâminas de fluorescência nos laboratórios brasileiros participantes. NI: Não souberam informar a potência da lâmpada. W: Watts.

Figura 4 - A: Apresentação de respostas quanto à realização de procedimentos técnicos que influenciam diretamente na qualidade do teste pelos laboratórios brasileiros participantes. B: Apresentação de respostas quanto à utilização de recomendações do Consenso para leitura das lâminas de fluorescência nos laboratórios brasileiros participantes.

Figura 5 A-E. Padrões apresentados aos participantes do estudo para classificação conforme o Consenso Brasileiro. A: Padrão Nuclear Homogêneo. B: Padrão Citoplasmático em Anéis e Bastões AC-23. C: Padrão Aparelho Mitótico do tipo

Centríolo AC-24. D: Padrão Nucleolar Homogêneo AC-8. E: Padrão Nuclear Pontilhado Fino Denso AC-2.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Padrões de Imunofluorescência em *imprint* de fígado de camundongos, antígenos envolvidos e associações clínicas.

## LISTA DE SIGLAS

- AC-1 – Padrão Nuclear Homogêneo
- AC-2 – Padrão Nuclear Pontilhado Fino Denso
- AC-4 – Padrão Nuclear Pontilhado Fino
- AC-4+Nu – Padrão Nuclear Pontilhado Fino associado à Nucleolar
- AC-8 – Padrão Nucleolar Homogêneo
- AC-8+NP – Padrão Nucleolar Homogêneo associado à Nuclear Pontilhado
- AC-9 – Padrão Nucleolar Aglomerado
- AC-10 – Padrão Nucleolar Pontilhado
- AC-22 – Padrão Citoplasmático Polar
- AC-23 – Padrão Citoplasmático em Anéis e Bastões
- AC-24 – Padrão de Aparelho Mitótico tipo Centríolo
- AC-25/26 – Padrão de Aparelho Mitótico tipo NUMA
- AM – Padrão de Aparelho Mitótico
- ANA – Anticorpos Antinúcleo
- ANA-IFI – Pesquisa de autoanticorpos por imunofluorescência indireta
- AR – Artrite reumatoide
- CAR – Colégio Americano de Reumatologia
- CBP – Cirrose biliar primária
- Células LE – Células de Lúpus Eritematoso
- DM/PM – Dermatomiosite/Polimiosite
- DMTC – Doença Mista do Tecido Conjuntivo
- ES – Esclerose Sistêmica
- FAN – Fator Antinúcleo
- FAN/HEp-2 – Pesquisa de Fator Antinúcleo em Células HEp-2
- FM+CP – Padrão Misto Fuso Mitótico associado à Citoplasmático Pontilhado
- HCV – Vírus da Hepatite C
- HEp-2 – *American Type Culture Collection CCL-23*
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- ICAP – *International Consensus on Antinuclear Antibody Pattern*
- IFI – Imunofluorescência Indireta
- LB – Linfócitos B
- LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico

LT – Linfócito T

NP – Padrão Nuclear Pontilhado

NQH – Padrão Nuclear *quasi*-homogêneo

Nu – Padrão Nucleolar

PAAC – Pesquisa de Anticorpos contra Antígenos Celulares

PMC – Placa Metafásica Cromossômica

PMC+ - Placa Metafásica Cromossômica Positiva

PMN – Polimorfonucleares

SS – Síndrome de Sjögren

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. A Pesquisa de Autoanticorpos .....	16
1.2. O Consenso Brasileiro Pesquisa de Autoanticorpos em Células HEP-2. 21	
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivos Gerais.....	28
3.2. Objetivos Específicos .....	28
4. METODOLOGIA .....	29
5. PUBLICAÇÃO.....	31
5.1. Artigo.....	31
RESUMO .....	32
ABSTRACT.....	33
INTRODUÇÃO.....	34
OBJETIVOS.....	37
MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
RESULTADOS .....	38
DISCUSSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
6. CONCLUSÕES.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
8. ANEXO A – TEXTO INTRODUTÓRIO ENVIADO PARA CONVITE DOS LABORATÓRIOS .....	60
9. ANEXO B – QUESTIONÁRIO APLICADO AOS LABORATÓRIOS PARTICIPANTES.....	62
10. ANEXO C – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DO JORNAL BRASILEIRO E PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL .....	69



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A Pesquisa de Autoanticorpos

Autoimunidade é um processo patológico gerado pela ativação de Linfócitos T (LT) e Linfócitos B (LB) na ausência de infecção ou causa discernível, este processo ocasionará doença autoimune, caracterizada como uma síndrome clínica originada por defeitos gerais na homeostase ou nos processos de seleção e tolerância dos linfócitos (DAVIDSON; DIAMOND, 2001).

A autoimunidade pode estar envolvida no desenvolvimento de mais de 60 doenças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Lerner *et al.*, apresenta em seu estudo que aumento dos percentuais anuais para doenças autoimunes reumáticas, endocrinológicas, gastrointestinais e neurológicas foram de 7,1%, 6,3%, 6,2% e 3,7%, respectivamente (LERNER et al., 2015). É estimado que uma em 12 mulheres e um em 20 homens apresentarão uma patologia de natureza autoimune (CROWSON et al., 2011). Se avaliadas em conjunto, as doenças autoimunes podem corresponder à uma prevalência de 3 a 5% na população mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Estão entre as principais doenças reumáticas autoimunes o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), a Síndrome de Sjögren (SS), a Esclerose Sistêmica (ES), a Doença Mista do Tecido Conjuntivo (DMTC), a Dermatomiosite/Polimiosite (DM/PM) e a Artrite Reumatoide (AR) (SOLOMON et al., 2002; BRITO et al., 2013).

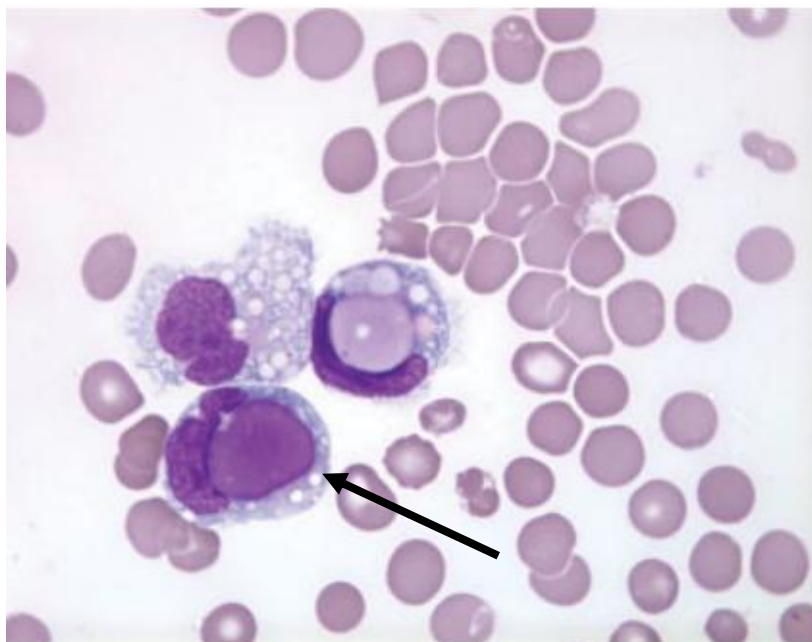
Inicialmente, o diagnóstico das doenças autoimunes baseava-se simples e exclusivamente na clínica e histórico do paciente, o que dificultava um diagnóstico preciso do quadro patológico apresentado (DELLAVANCE, et al., 2007b). No decorrer dos anos, os testes para diagnóstico das doenças autoimunes sofreram grandes alterações e melhorias (DELLAVANCE; ANDRADE, 2007; DELLAVANCE, et al., 2007b). Inicialmente realizava-se a pesquisa de células do Lúpus Eritematoso (Células LE), um teste altamente complexo e de difícil interpretação, que passou a ser substituída por técnicas para pesquisa de auto-anticorpos específicos (DELLAVANCE; ANDRADE, 2008).

Em 1948, os hematologistas americanos Malcolm Hargraves e Robert Morton visualizaram células que continham material nuclear fagocitado em amostra sanguínea de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), e a denominaram

como célula do Lúpus Eritematoso - Células LE (HEPBURN, 2001; SOLOMON et al., 2002). As células LE são polimorfonucleares (PMN) que visualizados em microscópio ótico apresentam massas homogêneas derivadas de material nuclear fagocitado localizadas no centro do citoplasma e núcleos íntegros do PMN nas laterais (**Figura 1**). A fagocitose de corpos apoptóticos ocorre por meio da atuação de anticorpos antinucleares que, por sua vez, promovem uma opsonização do antígeno nuclear e conseqüentemente desencadeiam a fagocitose desempenhada por PMN (SCHMIDT-ACEVEDO et al., 2000).

As células LE podem ser encontradas em vários fluidos corpóreos, como sangue, líquido sinovial, pleural, pericárdio e cefalorraquidiano (ALTIT et al., 2012; CARRILLO-ESPER et al., 2012). Por várias décadas a pesquisa de células LE foi utilizada como método de diagnóstico de LES. Esta pesquisa possui uma alta complexidade e é de difícil interpretação, possuindo baixa sensibilidade e pouca reprodutibilidade (DELLAVANCE; ANDRADE, 2007). O Colégio Americano de Reumatologia - CAR considerou a pesquisa de células LE como um dos critérios para diagnóstico do LES até o ano de 1997 (FELETAR et al., 2003).

**Figura 1. Célula de Lúpus Eritematoso (Célula LE)**



Células LE: PMN com massas homogêneas derivadas de material nuclear fagocitado localizadas no centro do citoplasma e núcleos íntegros nas laterais. Fonte: PARK et al., 2007

Em 1949, (HASEHICK; BORTZ, 1949) pesquisadores depositaram o plasma, livre de células, de indivíduos diagnosticados com LES, em células da medula óssea de indivíduos saudáveis. Verificaram que o material da medula óssea destes indivíduos saudáveis, passou a apresentar as células LE logo após serem tratadas com o plasma de pacientes com LES. Os pesquisadores sugeriram que havia um fator no plasma dos indivíduos diagnosticados com LES, que desencadeava o aparecimento de células LE. No decorrer dos anos, foi descoberto que o fator citado por Hasehick e Bortz em 1949 tratava-se de auto-anticorpos que possuíam afinidade por histonas (HEPBURN, 2001).

Na década de 1950, pesquisadores relataram uma metodologia utilizada na pesquisa de anticorpos, que utilizaria anticorpos anti-imunoglobulina G humana marcados com fluoresceína, que poderiam ser visualizados no microscópio de fluorescência, caracterizando a metodologia e imunofluorescência indireta - IFI (COONS; KAPLAN, 1950). Esta metodologia passou a ser utilizada na pesquisa dos anticorpos antinúcleo (ANA) que são importantes no desenvolvimento das doenças autoimunes. A pesquisa de ANA-IFI foi inicialmente realizada em *imprint* de fígado de camundongos (DELLAVANCE; ANDRADE, 2007). A pesquisa deixou de ser específica para LES, pois com os cinco padrões de fluorescência apresentados nesta metodologia (Tabela 1), outras doenças autoimunes passaram a ser diagnosticadas (DELLAVANCE, et al., 2007b).

Com o advento da pesquisa de ANA-IFI, também comumente chamado de pesquisa de FAN (Fator Antinúcleo), houve um aumento na sensibilidade do teste, o que resultou em laudos positivos de ANA-IFI em indivíduos hígidos, ou seja, aqueles não possuem evidência clínica de doença autoimune (DELLAVANCE; ANDRADE, 2008). Em contrapartida, obteve-se uma diminuição na especificidade do teste, e conseqüentemente melhorias no diagnóstico de LES, assim como, de esclerose sistêmica, síndrome de Sjögren, entre outras (BRITO et al., 2013).

Um dos dados mais importantes encontrados nos testes de ANA-IFI em *imprint* de fígado de camundongos, é a apresentação de padrões de fluorescência (DELLAVANCE, et al., 2007b). Cinco padrões são apresentados nesta técnica, que mostram a especificidade do auto-anticorpo ao antígeno nuclear (**Tabela 1**). O padrão pode oferecer indicações prévias sobre quais anticorpos estão envolvidos na reação, necessitando de testes confirmatórios para detecção dos auto-anticorpos

específicos (DELLAVANCE; ANDRADE, 2008). A pesquisa de autoanticorpos por IFI (Imunofluorescência Indireta) passou a compor os critérios do CAR para classificação e diagnóstico de LES (HOCHBERG, 1997).

**Tabela 1. Padrões de Imunofluorescência em *imprint* de fígado de camundongos, antígenos envolvidos e associações clínicas.**

Padrão ANA-IFI	Possível antígeno envolvido	Possível associação clínica
<i>Periférico e Homogêneo</i>	DNA nativo	LES, LES induzido por drogas, artrite juvenil idiopática, síndrome de Felty, esclerose sistêmica, CBP, hepatite auto-imune.
<i>Homogêneo</i>	DNA nativo	LES, LES induzido por drogas, artrite juvenil idiopática, síndrome de Felty, esclerose sistêmica, cirrose biliar primária, hepatite auto-imune.
<i>Pontilhado fino</i>	SS-A/Ro e/ou SS-B/La	Síndrome de Sjögren, LES, LES neonatal, LES cutâneo, AR, miosite e esclerose sistêmica, polimiosite.
<i>Pontilhado grosso</i>	Sm e/ou RNP	LES, DMTC, esclerose sistêmica.
<i>Nucleolar</i>	Antígenos nucleolares	Esclerose sistêmica, polimiosite/ES, polimiosite/dermatomiosite.

*LES: lúpus eritematoso sistêmico; AR: artrite reumatóide; DMTC: doença mista do tecido conectivo; CBP: cirrose biliar primária.*

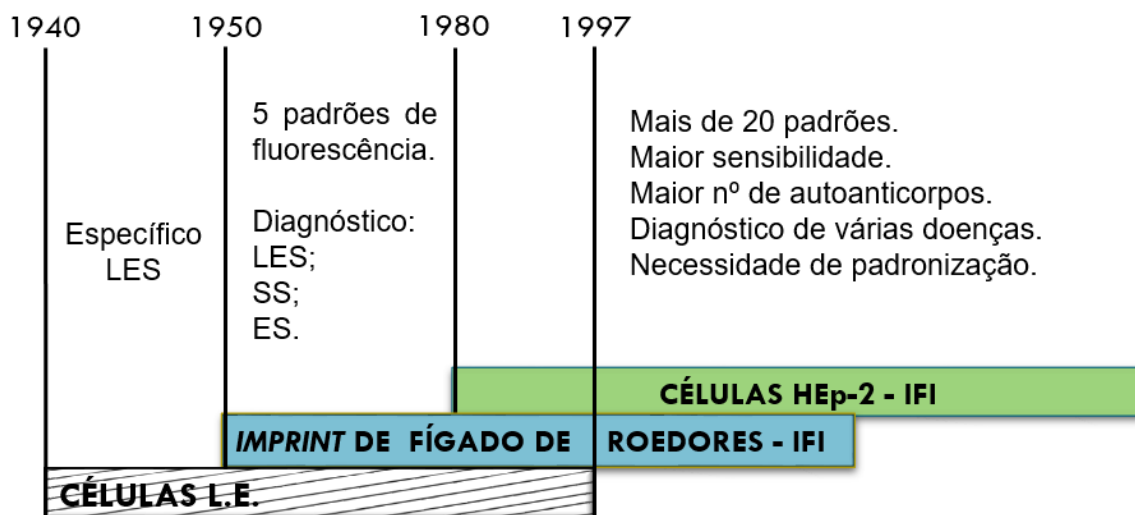
Fonte: (DELLAVANCE; ANDRADE, 2007).

Por muito tempo utilizou-se como substrato, para a pesquisa de autoanticorpos, hepatócitos de roedores. Em meados de 1980 outra linhagem de célula passou a ser usada como substrato, era então a célula HEp-2 (*American Type Culture Collection CCL-23*), uma linhagem de células tumorais provenientes de carcinoma de laringe humana (DELLAVANCE, et al., 2007b) que são cultivadas sobre lâminas em monocamadas (DELLAVANCE; ANDRADE, 2008).

Há vários motivos para a utilização de células HEp-2 como substrato para a pesquisa de autoanticorpos, pois apresentam antígenos humanos específicos em maior quantidade, facilitando a identificação de autoanticorpos não identificados em hepatócitos de roedores. Estas células, por serem tumorais, apresentam uma alta velocidade na divisão celular, e, em decorrência deste fator, durante a realização do teste há uma visualização de todas as fases do crescimento celular, como a

interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. Células HEp-2 também apresentam uma melhor relação núcleo/citoplasma, assim como melhor definição de nucléolos e citoplasma, o que facilita a leitura da lâmina (DELLAVANCE et al., 2001). O histórico do diagnóstico das doenças autoimunes está exposto na **Figura 2**.

**Figura 2. Linha do tempo. Descoberta das Células LE em 1940, critério para diagnóstico de LES pelo CAR (Colégio Americano de Reumatologia) até 1997. Início da utilização da IFI para pesquisa de autoanticorpos em *imprint* de fígado de roedores em 1950. Utilização das Células HEp-2 como substrato para pesquisa de autoanticorpos por IFI em 1980.**



LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico; Células LE: Células do Lúpus Eritematoso; SS: Síndrome de Sjögren; ES: Esclerose Sistêmica; IFI: Imunofluorescência Indireta. Histórico da evolução no diagnóstico das doenças autoimunes.

Com todos esses avanços, a pesquisa de autoanticorpos passou a apresentar maior sensibilidade, porém menor especificidade, sendo possível a visualização de mais de 20 padrões específicos para diferentes autoanticorpos e conseqüentemente a possibilidade em auxiliar o diagnóstico de outras doenças autoimunes (DELLAVANCE, et al., 2007a). No mês de agosto do ano 2000, pesquisadores de várias capitais brasileiras se reuniram em Goiânia para a formação de um Consenso nacional para a pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 com o intuito de aprimorar o diagnóstico de doenças autoimunes no Brasil (DELLAVANCE et al., 2001).

## 1.2. O Consenso Brasileiro Pesquisa de Autoanticorpos em Células HEp-2

O Consenso Brasileiro foram criados em resposta à necessidade de padronizar o teste FAN utilizado na triagem do autoanticorpos contra núcleo, nucléolo, citoplasma, placa metafásica cromossômica e aparelho mitótico, que utiliza células HEp-2 como substrato (DELLAVANCE, et al., 2007b).

O I Consenso partiu inicialmente delegando recomendações sobre diluição de triagem, lâmpadas dos microscópios e principalmente definição de leitura de lâmina (DELLAVANCE et al., 2001). Foi estabelecido um fluxograma que auxiliaria na leitura e definição dos padrões, chamada de árvore de classificação. A árvore de classificação foi aprimorada a cada edição do Consenso. As definições foram distribuídas em padrões nucleares, padrões nucleolares, padrões citoplasmáticos e padrões de aparelho mitótico. Em todos, seria avaliada a positividade ou negatividade de placa metafásica cromossômica (DELLAVANCE et al., 2001).

O II Consenso Brasileiro (2002) foi iniciado com o questionamento em relação ao nome do teste, que deixará de ser chamado de FAN pois em decorrência da grande evolução com células HEp-2, o teste passa a detectar não somente antígenos nucleares, tornando possível a detecção de antígenos nucleolares, citoplasmáticos e de aparelho mitótico, assim como proteínas de centríolo e placa metafásica cromossômica. Foi sugerida a mudança da nomenclatura para *Pesquisa de anticorpos contra antígenos celulares* (PAAC) e outros similares (DELLAVANCE et al., 2003).

O II Consenso possuiu como objetivos associar diferentes padrões e antígenos celulares e dessa forma estabelecer a relevância clínica de padrões mistos, assim como, relacionar autoanticorpos específicos com os padrões estabelecidos (DELLAVANCE et al., 2003). Este último, também fez parte dos objetivos apresentados no III Consenso, realizado em 2007, mostrando a preocupação com a relevância e associação clínica dos padrões (FRANCESANTONIO et al., 2009).

Devido à grande evolução do teste, aumento da sensibilidade e melhorias nos achados de autoanticorpos, houve um aumento expressivo no número de casos positivos em pacientes hígidos, que não possuem evidência clínica de autoimunidade (DELLAVANCE, et al., 2007a). Alguns estudos mostram que há uma

prevalência de 12,6% a 22,6% de testes FAN/HEp-2 positivos em indivíduos sem características de doenças autoimunes (SANTOS et al., 1997; FERNANDEZ et al., 2003; WATANABE et al., 2004; HILÁRIO et al., 2004). Estudos revelam os padrões que ocasionalmente estão relacionados à pacientes sem manifestações clínicas, são eles os padrões Nucleares Pontilhado Fino Denso, Pontilhado Fino e Pontilhado Grosso Reticulado (DELLAVANCE, et al., 2007a; DELLAVANCE; ANDRADE, 2007; DELLAVANCE, et al., 2007b).

É recomendado que a solicitação da pesquisa de autoanticorpos seja realizada somente na presença de sinais e sintomas relacionados à doenças autoimunes (DELLAVANCE, et al., 2007b; FRANCESCANTONIO et al., 2009). O aparecimento de alguns autoanticorpos pode estar relacionado à respostas do sistema imune, assim como infecções por vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), Epstein Barr, Citomegalovírus e vírus linfotróficos (DELLAVANCE; ANDRADE, 2008; FRANCESCANTONIO et al., 2009) ou podem surgir antes dos sintomas de doenças autoimunes (ARBUCKLE et al., 2003).

O III Consenso apresentou possíveis associações clínicas para cada padrão, melhorando o que já havia sido discutido no II Consenso (FRANCESCANTONIO et al., 2009). O Padrão Nuclear Homogêneo é apresentado na presença dos anticorpos anti-DNA nativo, anti-cromatina que são marcadores de LES (NOTMAN et al., 1975) e anti-histona, marcador de LES de origem idiopática, induzido por drogas e ainda artrite reumatoide (SOUZA et al., 2012). Os anticorpos Anti-Sm, possível marcador de LES e anticorpo Anti-RNP, relacionado à doenças de tecido conjuntivo, LES e esclerose sistêmica são apresentados no padrão Nuclear Pontilhado Grosso (NOTMAN et al., 1975).

O padrão Nuclear Pontilhado Fino está relacionado ao anticorpo Anti-SSA/Ro que, por sua vez, está presente na Síndrome de Sjögren primária, LES e Lúpus neonatal juntamente com o anticorpo Anti-SSB/La, este último, porém, também está relacionado à outras doenças como cirrose biliar primária e esclerose sistêmica (BARCELLOS et al., 2007). Da mesma forma, está presente no LES, o anticorpo Anti-PCNA (Anticorpo contra núcleo de células em proliferação) apresentado pelo padrão Nuclear Pontilhado Pleomórfico (FRANCESCANTONIO et al., 2009).

O III Consenso descreve que o padrão Nucleolar Homogêneo, é apresentado mediante a presença do anticorpo anti-To/Th, que está fortemente relacionado à

esclerose sistêmica (TARGOFF, 1992). O padrão Citoplasmático Pontilhado Fino, por sua vez, está relacionado à participação de anticorpo Jo1 (Anti-histidil t RNA sintetase), marcador de polimiosite no adulto (TARGOFF, 1992; GHIRARDELLO et al., 2013).

Ainda na ocasião do III Consenso, foram discutidas as metodologias para controle de qualidade a serem aplicadas pelos laboratórios para a realização do FAN/HEp-2. Uma reação de Imunofluorescência Indireta (IFI), depende de vários fatores para uma boa aplicação. Entre esses fatores estão o microscópio, a lâmpada, a concentração do conjugado, os soros controles e a habilidade do observador em identificar os padrões apresentados (DELLAVANCE, et al., 2007b; FRANCESCANTONIO et al., 2009, 2013). Pensando nisso, os membros do Consenso apresentaram medidas a serem tomadas para melhorias no controle da qualidade do teste.

O principal ponto discutido foi a titulação do conjugado, medida que facilita a visualização de padrões, pois o conjugado deverá diluído na concentração ideal para a lâmpada e o microscópio utilizado no laboratório (FRANCESCANTONIO et al., 2009). Também foi recomendado a manutenção de sorotecas de amostras controles com reatividade mínima de fluorescência, para a realização da titulação do conjugado na concentração ideal (FRANCESCANTONIO et al., 2013).

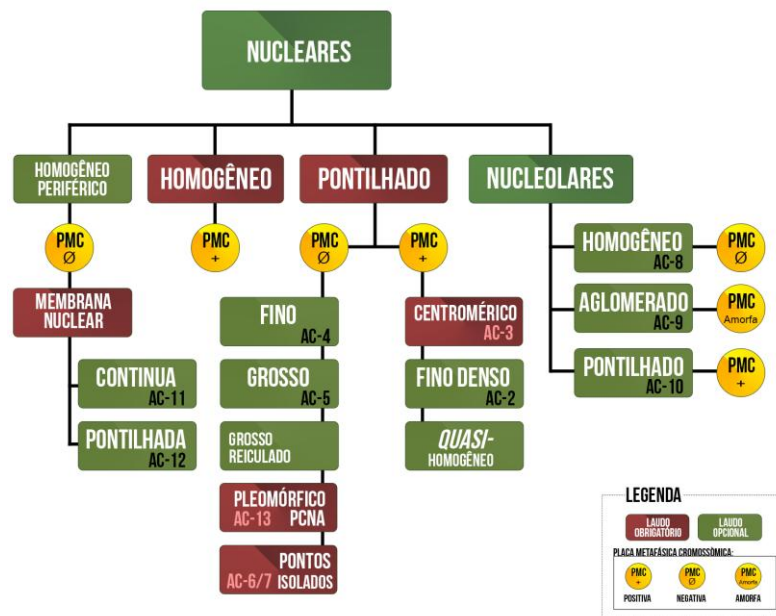
Na ocasião do IV Consenso (2012), foi inserido à árvore de classificação, os padrões Nuclear *quasi*-homogêneo e padrão Citoplasmático em Anéis e Bastões, além de novas recomendações sobre os processos de controle da qualidade, leitura das lâminas e na formulação e interpretação de laudos (FRANCESCANTONIO et al., 2013).

No mês de Agosto de 2016, em Brasília/DF, foi realizado o V Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em Células HEp-2 – FAN/HEp-2, que em decorrência do Consenso Internacional de FAN/HEp-2 (*International Consensus on ANA Patterns – ICAP*), foi necessária uma reestruturação da árvore de classificação dos padrões (**Figuras 3, 4, 5 e 6**) acrescentando, juntamente com os padrões classificados em ambos consensos, um código definido no ICAP para cada padrão que deverá ser apresentado no laudo. Também foi definido no V Consenso como nomenclatura única para o teste: *FAN – Pesquisa de autoanticorpos anti-célula* (V CONSENSO, 2016).



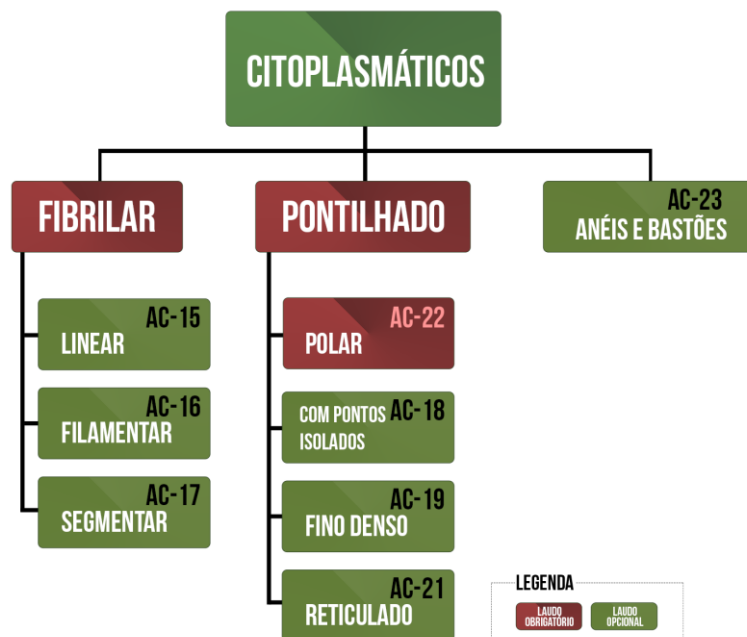
O Consenso Brasileiro foi uma iniciativa pioneira com reconhecimento internacional e que despertou e motivou ações similares de padronização em diferentes países do mundo (DELLAVANCE et al., 2001). Mais recentemente, no ano de 2015, recebeu grande destaque servindo como plataforma para a implementação do ICAP (CHAN et al, 2015), o qual, quando comparado ao Consenso Brasileiro, apresenta correspondência quase que em sua totalidade. Apenas um padrão reconhecido pelo ICAP, AC-28, não é reconhecido pelo Consenso Brasileiro. Para os demais 27 padrões, de AC-1 a AC-27, há a possibilidade de classificação pelo Consenso Brasileiro que ainda reconhece padrões não classificados até o terceiro ICAP.

**Figura 3. Árvore de classificação dos Padrões Nucleares/Nucleolares conforme o V Consenso Brasileiro de FAN, 2016.**



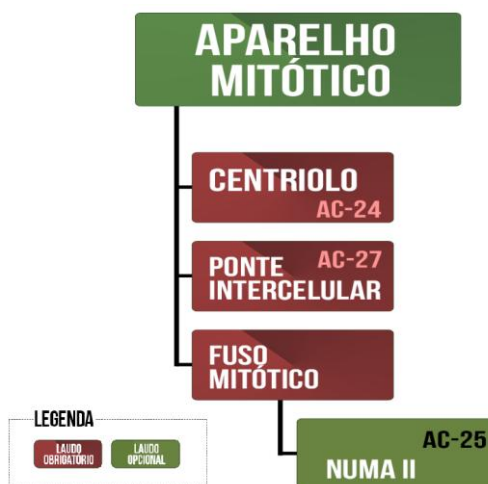
Fonte: (V CONSENSO, 2016)

Figura 4. Árvore de classificação dos Padrões Citoplasmáticos conforme o V Consenso Brasileiro de FAN, 2016.



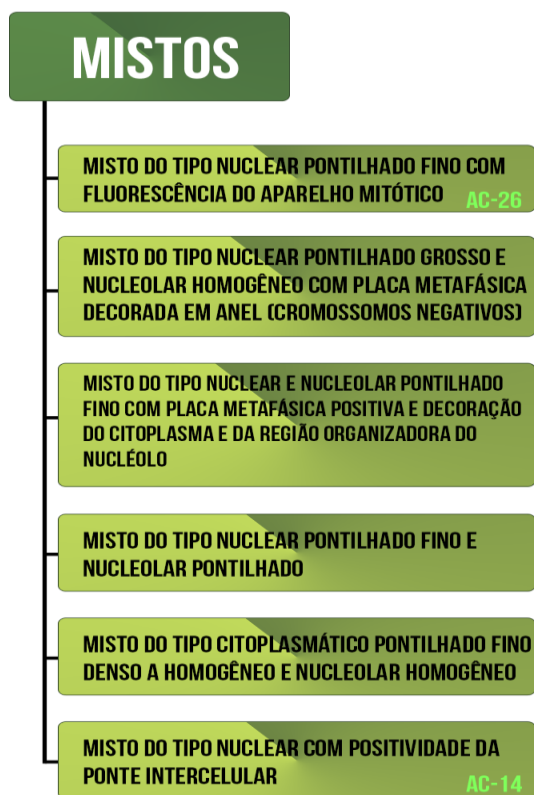
Fonte: (V CONSENSO, 2016)

Figura 5. Árvore de classificação dos Padrões de Aparelho Mitótico conforme o V Consenso Brasileiro de FAN, 2016.



Fonte: (V CONSENSO, 2016)

Figura 6. Árvore de classificação dos Padrões Mistos conforme o V Consenso Brasileiro de FAN, 2016.



Fonte: (V CONSENSO, 2016)

## **2. JUSTIFICATIVA**

Diante de cinco edições do Consenso Brasileiro, surgiu a proposta da presente dissertação, iniciada com intuito de avaliar o reconhecimento e aplicação das recomendações do Consenso nos laboratórios clínicos brasileiros

Ter ciência da proporção de implantação das recomendações nos laboratórios clínicos brasileiros, estimar a adesão às diretrizes e detectar inconformidades ou aspectos a serem trabalhados é de fundamental importância para as ações de planejamento das próximas edições do Consenso Brasileiro.

As ações que contribuem para a padronização do teste de triagem de autoanticorpos - FAN/HEp-2 – beneficiam coletivamente os profissionais de laboratório que realizam o exame, os clínicos que interpretam e conseqüentemente os pacientes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos Gerais**

Avaliar a implementação das diretrizes do Consenso Brasileiro nos laboratórios clínicos que realizam a pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

3.2.1. Avaliar a adesão dos laboratórios brasileiros às recomendações do Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2;

3.2.2. Identificar o perfil de formação dos profissionais que realizam o exame e as especialidades médicas que mais solicitam;

3.2.3. Avaliar a adesão às recomendações técnicas do Consenso Brasileiro no âmbito da realização do teste, classificação do padrão e emissão do laudo;

#### 4. METODOLOGIA

O trabalho ocorreu em plataforma virtual, por meio do acesso ao site <http://www.hep-2.com.br>. No site, o laboratório era direcionado ao questionário, disponível em forma *online* na página do Consenso por todo o período da pesquisa, fevereiro a outubro de 2016. Ao aceitar a participação, o responsável técnico pelo laboratório poderia pausar a resposta quantas vezes fosse necessário, e retomá-la mediante utilização do código de acesso formulado no momento do cadastro. Após o envio e confirmação das respostas o laboratório não teve acesso às respostas confirmadas.

Foi enviado aos laboratórios um convite via e-mail (ANEXO A) para participação da pesquisa, o endereço utilizado para direcionamento dos convites foi [pesquisa.consensohep2@gmail.com](mailto:pesquisa.consensohep2@gmail.com). Os endereços eletrônicos dos laboratórios convidados foram adquiridos mediante solicitações de auxílio na divulgação da pesquisa à órgãos responsáveis e membros do Consenso Brasileiro. Foi solicitado apoio para divulgação aos Conselhos Regionais e Federal de Biomedicina, Conselhos Regionais de Farmácias e redes de divulgação. O estudo foi divulgado em eventos científicos como o 50º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial e no XV Congresso Brasileiro de Biomedicina. A pesquisa foi ainda divulgada via web pela REDELAB, Diagnóstico Clínico, S.A., pela Controllab e pelos Conselhos Regionais e Federal de Biomedicina, estes também enviaram convites via e-mail para os laboratórios registrados em seus serviços.

A participação foi voluntária e antes de responder ao questionário o laboratório participante realizou um cadastro no sistema. No momento do cadastro os participantes inseriram informações referentes à localização e e-mail do responsável técnico do laboratório participante. Após o cadastro, foi gerado um código de acesso servindo como identificação dos participantes.

O sistema foi desenvolvido mediante utilização de linguagem HTML5, CSS3, JQuery e PHP 5, em banco de dados MySQL hospedado em servidor com Sistema Operacional Linux e servidor web Apache 2.2. O questionário foi composto por 25 questões direcionadas à realização da técnica, controle de qualidade, leitura de lâminas e composição de laudos (ANEXO B). Permitindo um mapeamento da execução do teste pelos laboratórios habilitados. Foram excluídos aqueles laboratórios que realizam o teste por terceirização.

O estudo contou com a participação de 53 laboratórios, destes, um não informou o Estado a qual pertence, os demais eram provenientes de 13 Estados Brasileiros e Distrito Federal. Foram dois da Bahia, 13 de São Paulo, três do Rio de Janeiro, seis do Paraná, nove de Minas Gerais, sete do Rio Grande do Sul, três do Distrito Federal, dois do Pará, dois do Goiás, um do Espírito Santo, um do Ceará, um do Pernambuco, um da Paraíba e um de Santa Catarina (**Figura 7**).

Para a análise dos dados foi utilizado método simples de porcentagem pela utilização do programa Microsoft® Excel 2016 e GraphPad Software © 2016..

**Figura 7: Mapa do Brasil. Destaque para os estados dos laboratórios que realizam o teste FAN/Hep-2 participantes no estudo.**



## 5. PUBLICAÇÃO

### 5.1. Artigo

IMPLANTAÇÃO DAS DIRETRIZES DO CONSENSO BRASILEIRO DE FAN/HEp-2 NOS LABORATÓRIOS CLÍNICOS DO BRASIL.

Autores:

Glaucielen Gomes da Silva<sup>A,B</sup>

Clayson Moura Gomes<sup>B</sup>

Paulo Luiz Francescantonio<sup>B</sup>

Alessandra Dellavance<sup>C</sup>

Luís Eduardo Coelho Andrade<sup>C,D</sup>

Wilson de Melo Cruvinel<sup>B</sup>

<sup>A</sup> Faculdade dos Carajás, Marabá, PA, Brasil

<sup>B</sup> Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás), Goiânia, GO, Brasil

<sup>C</sup> Setor de Pesquisa e Desenvolvimento, Grupo Fleury

<sup>D</sup> Disciplina de Reumatologia, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, SP, Brasil

Autor para correspondência: Wilson de Melo Cruvinel

melocruvinel@pucgoias.edu.br

Pontifícia Universidade Católica de Goiás - Escola de Ciências Médicas,  
Farmacêuticas e Biomédicas

Avenida Universitária 1.440, Setor Universitário, Goiânia-GO, CEP: 74605-010



## RESUMO

A pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 representa uma relevante ferramenta para auxílio diagnóstico na investigação de doenças autoimunes especialmente as reumáticas. **Objetivo:** Avaliar, 16 anos após a realização do I Consenso Brasileiro de FAN/HEp-2, a implantação das recomendações nos laboratórios que realizam o ensaio. **Metodologia:** Preenchimento de formulário em plataforma virtual direcionada aos laboratórios clínicos que realizam a metodologia. Os participantes responderam um questionário sobre a adoção das diretrizes do Consenso Brasileiro detalhando os aspectos técnicos, o controle de qualidade, a leitura de lâminas e a emissão de laudos. **Resultados:** Participaram do estudo 53 laboratórios responsáveis por mais de 300.000 testes de FAN/mês sendo que mais da metade (58,5%) informaram adotar integralmente as recomendações do Consenso. A maioria (83,1%) utiliza a diluição 1:80 para triagem e 75,5% dos laboratórios utilizam programas de educação e controle de qualidade. Foi identificado no estudo que apenas 39,6% utilizam mais de uma marca de *kit* para a realização do teste e 32,1% não afirmaram observar todas as fases do ciclo celular na leitura da lâmina. O estudo detectou ainda moderada heterogeneidade entre participantes na identificação de padrões. **Conclusão:** Os resultados evidenciam a adoção das recomendações do Consenso de forma absoluta pela maioria dos laboratórios participantes, bem como a necessidade de aperfeiçoamento dos laboratórios brasileiros em alguns aspectos o que repercutirá em maior qualidade.

Palavras-chave: FAN; HEp-2; Autoimunidade; Autoanticorpos.

## ABSTRACT

The screening for autoantibodies in HEp-2 cells represents a relevant tool for the diagnosis of autoimmune diseases, especially in systemic autoimmune rheumatic diseases. Along the past 16 years the Brazilian ANA/HEp-2 Consensus Group actively disseminated recommendations for performance and interpretation of the assay, as well as how to report the results. **Objective:** To evaluate the adherence rate of the recommendations in the clinical laboratories that perform the test. **Methodology:** A structured questionnaire form was sent for in a virtual platform to clinical laboratories that carry out the ANA/HEp-2 test across the country. The participants answered 25 questions referent to the recommendations of the Brazilian Consensus detailing the technical principles, quality control, the strategy for reading of slides and how results are reported. **Results:** Fifty-three laboratories returned a completely filled form, and these are responsible for over 300,000 ANA/HEp-2 tests a month. Half (58.5%) of these laboratories reported full compliance to the recommendations of the Consensus. Most (83.1%) use a 1:80 dilution for screening and 75.5% of laboratories use education and quality control programs. Only 39.6% used more than one brand of HEp-2 slide in the routine and 32.1% reported not observing all phases of the cell cycle in reading the slide. The study also detected moderate heterogeneity among participants in pattern identification. **Conclusion:** These results show the adherence to the recommendations by the majority of the participating laboratories, however they also point out the need to improve the Brazilian laboratories in some aspects in order to achieve a higher quality in autoimmunity testing.

Key Words: Antinuclear antibodies, HEp-2 cells, ANA, ANA patterns, Autoantibodies

## INTRODUÇÃO

As doenças reumáticas autoimunes têm se apresentado relativamente comuns na população geral. Estima-se que aproximadamente uma em 12 mulheres e um em 20 homens desenvolverá uma enfermidade dessa natureza ao longo da vida (1). Nas últimas décadas, em decorrência dos avanços metodológicos, grandes foram as mudanças nas técnicas utilizadas para o diagnóstico das doenças autoimunes (2). A pesquisa de células do Lúpus Eritematoso, desenvolvida por Malcolm Hargraves e Robert Morton em 1948 foi considerada como critério para diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico pelo Colégio Americano de Reumatologia - CAR (*American College of Rheumatology*) até 1997 (3,4).

Em 1950 foi desenvolvida a técnica de pesquisa de anticorpos por Imunofluorescência Indireta - IFI (5), que passou a ser utilizada para pesquisa de autoanticorpos em *imprint* de fígado de roedores com apresentação de cinco padrões clássicos de fluorescência (2), usados como auxílio diagnóstico de doenças reumáticas autoimunes (2,6). Tal metodologia foi gradativamente substituída a partir de 1980 pela linhagem de células derivadas de tumor da laringe humana, denominadas células HEp-2 (*American Type Culture Collection CCL-23*) (2), que possuía algumas vantagens como a apresentação de antígenos humanos específicos e geralmente em alta concentração, expressos nas diferentes fases do ciclo celular (interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase), uma melhor relação núcleo/citoplasma em favor do núcleo, exuberância dos nucléolos e das organelas citoplasmáticas (7).

Com a mudança de substrato, para células HEp-2, foi possível o progressivo reconhecimento de outros padrões de fluorescência, que hoje superam duas dezenas (6), o que despertou a necessidade de treinamento, de padronização dos procedimentos metodológicos e de harmonização da nomenclatura até então muito heterogênea no âmbito nacional e internacional (7,8). Sensível à esta demanda, o Brasil foi pioneiro no processo da padronização de uma nomenclatura para a designação de padrões de fluorescência de autoanticorpos, realizando em agosto do ano 2000, em Goiânia (GO), o I Consenso Brasileiro de FAN, com o intuito de harmonizar a nomenclatura, metodologia e critérios de interpretação do teste, contribuindo assim para aprimorar o diagnóstico de doenças autoimunes no País (7). Alguns anos depois, esta iniciativa serviu de referência para a realização do

Consenso Mundial de FAN, denominado *International Consensus on ANA Patterns - ICAP* (8).

O I Consenso foi motivado principalmente pela ausência de parâmetros de leitura da lâmina, pela ausência de organização dos padrões em grupos de classificação e pela inexistência de padronização na nomenclatura dos padrões (7). Várias recomendações foram sugeridas de modo a buscar soluções para tais problemas, conforme demonstrado na **Figura 1** (7).

O II Consenso - 2002 (9), contemplou avanços, como a criação do grupo de padrões mistos e a apresentação das principais relevâncias clínicas apresentadas por padrão (9). No III Consenso - 2007, surgiu necessidade para adequações na terminologia dos padrões mistos e padrão nuclear homogêneo e da atualização das relevâncias clínicas, resultando na criação de diretrizes para o controle da qualidade do ensaio. Foram ainda apresentadas proposições de realização de estudos para incorporação de novos padrões (10).

Em setembro de 2012 foi realizado o IV Consenso, que disponibilizou para a comunidade científica 10 novas recomendações relacionadas à caracterização de padrões, procedimento técnico, controle de qualidade, utilização de métodos alternativos e organização do laudo (11). Em 2016, sob influência do Consenso Internacional de Padrões de FAN (*International Consensus on Ana Patterns - ICAP*), foi realizado o V Consenso com o propósito de harmonizar as diretrizes do Consenso Brasileiro com as Recomendações Internacionais (8,12). Na **Figura 1** estão resumidas as principais recomendações do Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 que deliberou diversas recomendações que contemplam desde os aspectos técnicos da realização do ensaio, o controle de qualidade, a emissão dos laudos, a interpretação dos resultados e as relevâncias clínicas dos diversos padrões (7,9–12).

Ao longo dos anos, observamos, embora de forma não sistemática, que as recomendações do Consenso vinham sendo assimiladas por diversos laboratórios clínicos e até mesmo pelos clínicos envolvidos na lida dos pacientes com enfermidades associadas aos anticorpos antinúcleo. No entanto, não havia uma análise sistematizada e objetiva do grau de aderência dos laboratórios às recomendações do Consenso e muito menos do seu impacto.

RECOMENDAÇÕES / REFERÊNCIA	
<b>I CONSENSO</b> (2000) Goiânia-GO	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diluição de 1/40 com microscópios de menor poder de resolução;</li> <li>- Diluição de 1/160 como critério de diagnóstico clínico;</li> <li>- Definição de título do ensaio: última diluição com fluorescência discernível;</li> <li>- Critérios para leitura da lâmina: Observação do nucleoplasma na interfase, aspecto da célula nas diversas fases da mitose: prófase, metáfase, anáfase e telófase, observação do nucléolo e do citoplasma;</li> <li>- Divisão dos padrões em subgrupos: nucleares, nucleolares, citoplasmáticos e de aparelho mitótico.</li> </ul> <p style="text-align: right;">(7)</p>
<b>II CONSENSO</b> (2002) Goiânia-GO	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Novas recomendações para o teste;</li> <li>- Implantação dos laudos descritivos;</li> <li>- Padrões citoplasmáticos considerados positivos;</li> <li>- Criação do grupo de Padrões Mistos;</li> <li>- Apresentação das principais relevâncias clínicas.</li> </ul> <p style="text-align: right;">(9)</p>
<b>III CONSENSO</b> (2007) Goiânia-GO	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adequação do laudo descritivo do padrão Nuclear Homogêneo;</li> <li>- Adequação da classificação dos Padrões Mistos;</li> <li>- Nota de orientação para padrões não caracterizados ou com características novas;</li> <li>- Orientação sobre programas de controle de qualidade;</li> <li>- Orientação sobre programas educativos;</li> <li>- Recomendação da titulação do conjugado para ajuste do sistema de leitura.</li> </ul> <p style="text-align: right;">(10)</p>
<b>IV CONSENSO</b> (2012) Vitória-ES	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inclusão do padrão citoplasmáticos anéis e bastões;</li> <li>- Inclusão do padrão nuclear <i>quasi</i>-homogêneo;</li> <li>- Inclusão do padrão misto CENP-F;</li> <li>- Nota sobre a identificação do Padrão Misto do tipo anti-DNA topoisomerase;</li> <li>- Recomendação de diluição para triagem em 1/80 e esgotamento do soro até, pelo menos, 1/640 podendo ser liberado como <math>\geq 640</math>;</li> <li>- Alerta quanto a reprodutibilidade dos diversos padrões nas diferentes marcas comerciais;</li> <li>- Alerta quanto a utilização de metodologias alternativas à Imunofluorescência indireta e quanto a escolha dos métodos de detecção de autoanticorpos específicos</li> <li>- Sugestão de que as informações “Padrão” e “Título”, no corpo do laudo, sejam apresentadas como primeira informação.</li> </ul> <p style="text-align: right;">(11)</p>
<b>V CONSENSO</b> (2016) Brasília-DF	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recomendação de definição única para o nome do ensaio: FAN-Pesquisa de autoanticorpos anticélula;</li> <li>- Recomendação da adoção das diretrizes internacionais (<i>International Consensus on Ana Patterns</i> - ICAP);</li> <li>- Apresentação no laudo, sempre que disponível, do código correspondente à classificação internacional do padrão.</li> </ul> <p style="text-align: right;">(12)</p>

Figura 1 - Resumo da Recomendações das cinco edições do Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em Células HEP-2.

## OBJETIVOS

Após 16 anos da realização do processo de padronização nacional, o presente estudo teve como objetivo avaliar o grau de aderência às diretrizes do Consenso Brasileiro pelos laboratórios clínicos brasileiros. Tais informações possibilitarão a realização de ações proativas que ampliem a aderência das diretrizes nacionais nos serviços de patologia clínica brasileiros permitindo também aos laboratórios aprimorar ações no nível técnico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo consistiu em uma pesquisa em formulário direcionada à responsáveis técnicos dos laboratórios clínicos que realizam a avaliação de autoanticorpos em células HEp-2. Foi elaborada uma plataforma virtual, hospedada no site oficial do Consenso Brasileiro ([www.hep-2.com.br](http://www.hep-2.com.br)), que dava acesso ao questionário *online*. Os laboratórios foram convidados a participarem da pesquisa via e-mail, os endereços eletrônicos foram adquiridos mediante pedidos de auxílio na divulgação da pesquisa à órgãos responsáveis e membros do Consenso Brasileiro.

O estudo foi divulgado em eventos científicos como o 50º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial e no XV Congresso Brasileiro de Biomedicina. A pesquisa foi ainda divulgada via web pela REDELAB, Diagnóstico Clínico, S.A., pela Controllab e pelos Conselhos Regionais e Federal de Biomedicina. A participação foi voluntária sendo permitidas as respostas de somente um técnico por laboratório cadastrado, sendo que o profissional foi identificado nos formulários da pesquisa.

O sistema de pesquisa foi desenvolvido utilizando as linguagens HTML5, CSS3, JQuery e PHP 5, banco de dados MySQL, hospedado em servidor com Sistema Operacional Linux e servidor web Apache 2.2. O questionário foi composto por 25 questões direcionadas à realização da técnica, ao controle de qualidade, ao procedimento de leitura das lâminas e à redação dos laudos. Foram excluídos aqueles laboratórios que realizam o teste por terceirização.

Foi realizada a análise descritiva dos resultados, bem como a elaboração de tabelas e gráficos, utilizando-se os programas Microsoft® Excel 2016 e GraphPad Software © 2016.

## RESULTADOS

Participaram do estudo 53 laboratórios, provenientes de 12 Estados Brasileiros e Distrito Federal (apenas um laboratório não informou o Estado de procedência). Foram dois da Bahia, 13 de São Paulo, três do Rio de Janeiro, seis do Paraná, nove de Minas Gerais, sete do Rio Grande do Sul, três do Distrito Federal, dois do Pará, dois de Goiás, um do Espírito Santo, um do Ceará, um de Pernambuco, um da Paraíba e um de Santa Catarina.

Os participantes foram divididos em seis grupos de acordo com a média mensal de testes de FAN/HEp-2 declarada no formulário: 1) G0: laboratórios que não informaram uma média de exames realizados por mês ( $n=2$  3,8%); 2) G1: laboratórios que realizam até 99/mês ( $n=5$ , 9,4%); 3) G2: laboratórios realizam entre 100 e 499 testes/mês ( $n=23$  43,4%); 4) G3: laboratórios que realizam entre 500 e 1.000 testes/mês ( $n=3$  5,7%); 5) G4: laboratórios que informaram média entre 1.000 e 9.999 testes/mês ( $n=14$  26,4%); 6) G5: ( laboratórios que estimaram rotina média maior que 10.000 testes/mês ( $n=6$  11,3%). Baseado nas informações dos 53 laboratórios participantes é possível estimar que os mesmos são responsáveis por mais de 300.000 testes FAN/HEp-2 mensais (**Figura 2**).

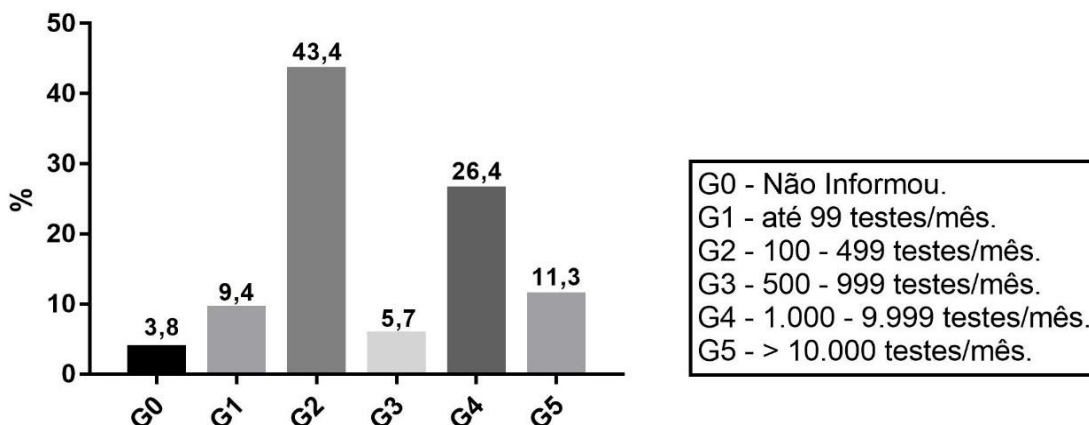


Figura 2 - Distribuição dos laboratórios brasileiros participantes de acordo com a média mensal de testes FAN/HEp-2 estimada, entre fevereiro e outubro de 2016.

Os laboratórios foram questionados quanto às especialidades médicas que mais solicitam a pesquisa de FAN/HEp-2, além da Reumatologia. Foram informados como solicitantes a Clínica Médica (20,1%), Dermatologia (13,4%). Ginecologia (9,4%), Endocrinologia (7,4%), Gastreenterologia (6,0%), Infectologia (5,4%), Hematologia (5,4%) e Ortopedia (5,4%), Cardiologia (4,7%), Neurologia (4,0%),

Pediatria (4,0%), Nefrologia (3,4%), Oftalmologia (3,4%), Oncologia (2,0%), Hepatologia (1,3%), Obstetrícia (1,3%), Pneumologia (1,3%), Geriatria (0,7%), Imunologia (0,7%) e Otorrinolaringologia (0,7%).

Com relação à utilização das recomendações do Consenso, 31 (58,5%) laboratórios afirmaram utilizar integralmente todas as recomendações, destes, 38,7% compõe o grupo G2 e 32,2% estão no grupo G4. Os demais laboratórios (41,5%) afirmaram utilizar as recomendações de forma parcial, e destes, a metade, encontra-se no grupo G2. Outros 5 laboratórios que compõem o G5 afirmaram utilizar as recomendações em sua totalidade.

Quanto à formação acadêmica do profissional responsável pela leitura das lâminas, os participantes relataram diferentes formações. Profissionais bioquímicos/farmacêuticos foram os mais citados, correspondendo a 38,4%, seguidos por biomédicos e biólogos, 22,2% e 17,2%, respectivamente. Outros profissionais foram citados, incluindo o médico patologista (8,6%), médico reumatologista (6,2%) e profissional de nível técnico (7,4%).

Quanto à terminologia utilizada para o ensaio diante das seis opções apresentadas no III Consenso 26,4% dos laboratórios relatou adotar a opção *FAN-HEp2* e 22,6% informou utilizar *Pesquisa de autoanticorpos contra antígenos celulares – FAN* outros 20,8% utilizam *FAN – Pesquisa de autoanticorpo*, 7,6% informou *FAN – Pesquisa de anticorpos contra componentes do núcleo, nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico* e 20,8% optou por *FAN – Fator Antinúcleo*. Um participante (1,8%) não informou a respeito da nomenclatura utilizada.

Questionados sobre a diluição de triagem, 83,1% dos laboratórios afirmaram realizar a diluição 1:80, sendo que sete serviços (13,3%) relataram utilizar a diluição 1:160 e um único laboratório (1,8%) afirmou utilizar 1:40. Quando questionados quanto à potência da lâmpada utilizada, 33 (62,3%) laboratórios participantes, afirmaram utilizar lâmpada de 100 Watts de potência. Os demais participantes relataram utilizar lâmpadas de 20 Watts (3,8%), 30 Watts (1,8%), 50 Watts (5,7%), 120 Watts (1,8%) e 200 Watts (3,8%) e outros 11 laboratórios (20,8%) não souberam informar.

No presente estudo, realizamos uma análise entre a diluição de triagem realizada e a lâmpada de fluorescência utilizada, apresentada na **Figura 3**, sendo



que, 27 (51,0%) laboratórios utilizam lâmpada de 100 Watts com diluição de triagem 1:80.

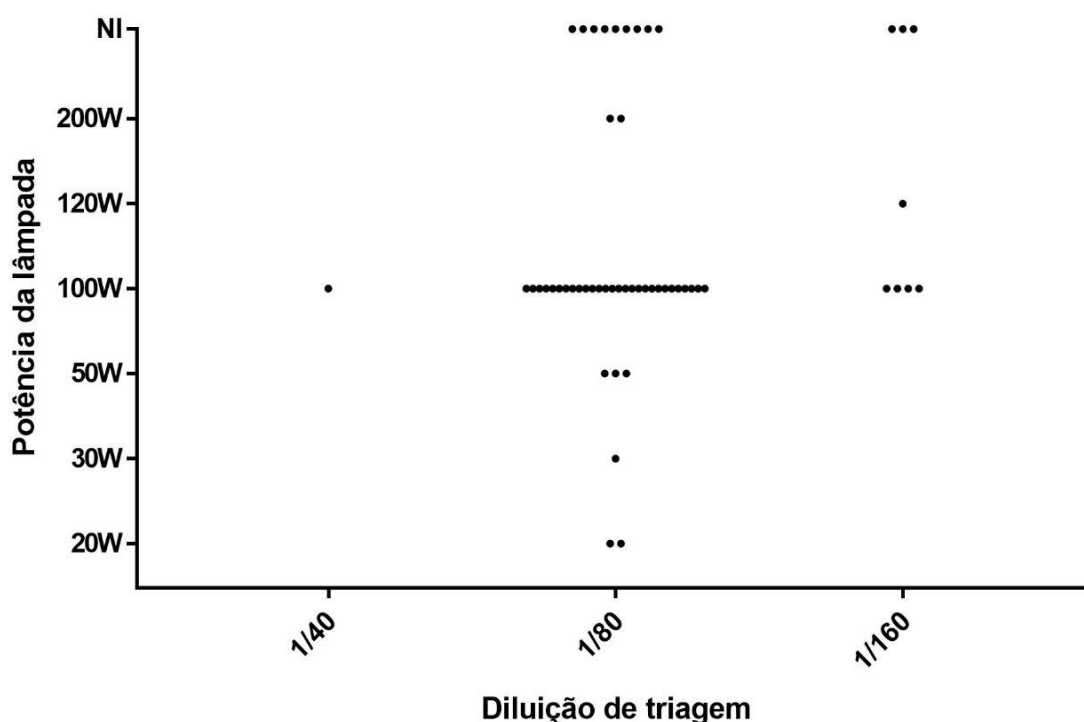


Figura 3 - Relação entre diluição de triagem e potência da lâmpada do microscópio utilizado para leitura das lâminas de fluorescência nos laboratórios brasileiros participantes. NI: Não souberam informar a potência da lâmpada. W: Watts.

Em relação à diluição para esgotamento de título das amostras positivas, 25 (47,3%) laboratórios dos laboratórios participantes afirmaram diluir as amostras positivas até 1:640, sendo, nestes casos, o teste liberado como título  $\geq 640$ . Para 18,8% dos laboratórios a diluição máxima realizada é de 1:1280 e 17,0% informaram realizar a diluição máxima em 1:2560, sendo o resultado liberado como  $\geq 1280$  e  $\geq 2560$ , respectivamente. Oito participantes (15,1%) afirmaram que o soro é diluído até o último título com fluorescência discernível. Um participante (1,8%) não respondeu quanto às diluições de triagem e de esgotamento de título utilizadas.

Os participantes responderam questões relacionadas aos procedimentos técnicos como a titulação do conjugado, disponibilidade de mais de uma marca de kit, manutenção de soroteca para avaliação da capacidade do kit em discriminar diferentes diluições e padrões e sobre a utilização de soro controle com fluorescência mínima. Os resultados deste tópico estão apresentados na **Figura 4A**.

Questionados sobre a leitura de lâminas com objetiva de 40X, 100X ou ambas, os resultados demonstram que 41 (77,4%) laboratórios realizam a leitura das

lâminas utilizando somente a objetiva de 40X, enquanto que 3 (5,7%) utilizam somente objetiva de 100X e 8 (15,1%) realizam a leitura com ambas. Um participante (1,8%) não informou a objetiva utilizada na leitura das lâminas.

Considerando-se as perguntas sobre os critérios de leitura da lâmina, resultados apresentados na **Figura 4B**, 50 (94,3%) participantes relataram observar a fluorescência nos diferentes compartimentos celulares (núcleo, nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico). Um total de 36 (67,9%) laboratórios afirmaram observar as células em todas as fases do desenvolvimento (interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase) e 49 (92,5%) informaram classificar a placa metafásica cromossômica (PMC) em positiva ou negativa

Os laboratórios também foram questionados sobre a elaboração dos laudos, 43 (81,1%) laboratórios afirmaram que, ao redigir o laudo, relata o padrão seguido pelo título e classificação da positividade dos compartimentos celulares, enquanto que 7 (13,2%) participantes afirmaram relatar somente o nome do padrão e título. Outros três laboratórios (5,7%) não informaram. Foi ainda identificado que 67,9% consideram os padrões citoplasmáticos como teste positivo. Em casos de padrões mistos, somente 75,5% dão o título máximo apresentado em cada um dos compartimentos celulares.

Na elaboração dos laudos, 10 (18,9%) laboratórios afirmaram fornecer informações sobre os possíveis autoanticorpos associados ao padrão apresentado e possíveis quadros clínicos compatíveis com os achados.

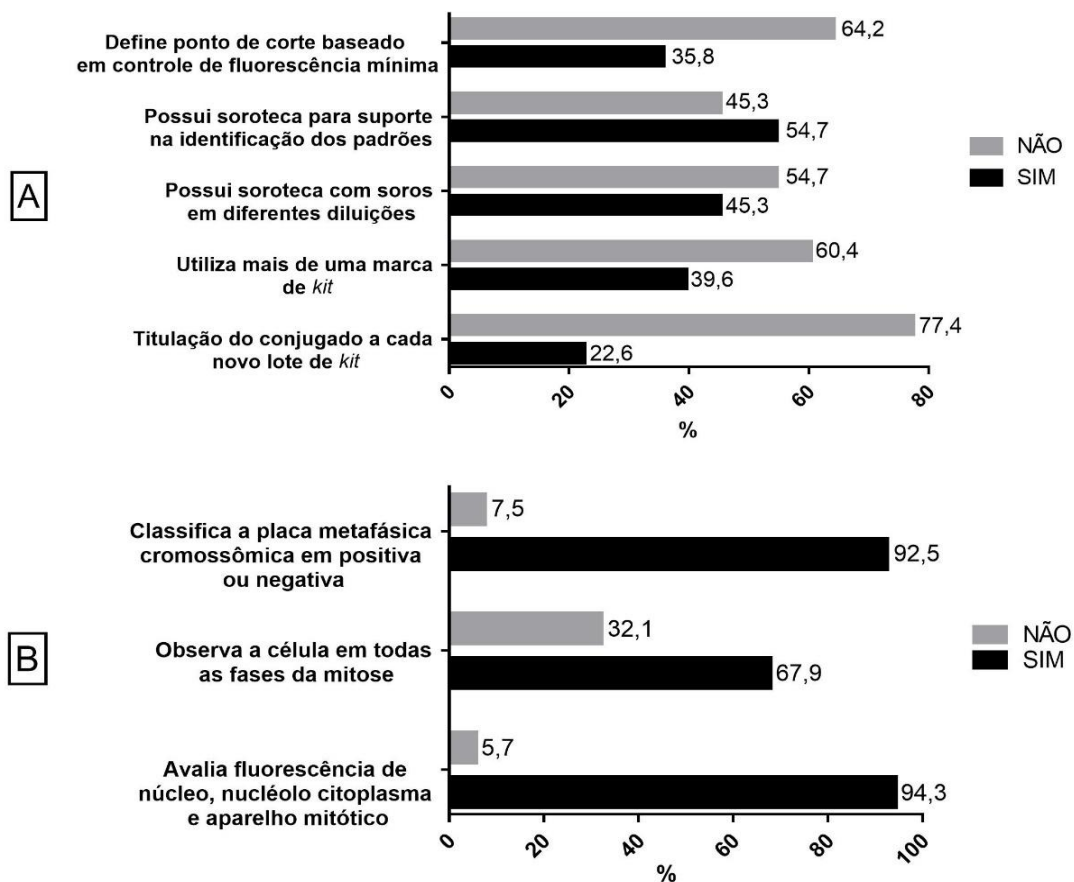


Figura 4 - A: Apresentação de respostas quanto à realização de procedimentos técnicos que influenciam diretamente na qualidade do teste pelos laboratórios brasileiros participantes. B: Apresentação de respostas quanto à utilização de recomendações do consenso para leitura das lâminas de fluorescência nos laboratórios brasileiros participantes.

Quando questionados sobre a utilização de programas educativos e de controle de qualidade, 75,5% ( $n=40$ ) afirmaram utilizá-los, enquanto que 24,5% ( $n=13$ ) não utilizam programas de controle de qualidade ou educativos.

Conforme pode ser observado na **Figura 5 A-E**, foram solicitados aos laboratórios participantes a análise de cinco figuras provenientes de cinco padrões, sendo Nuclear Homogêneo (AC-1), Citoplasmático em Anéis e Bastões - *Rings and Rods* (AC-23), Aparelho Mitótico tipo Centríolo (AC-24), Nucleolar Homogêneo (AC-8) e Nuclear Pontilhado Fino Denso (AC-2).

A primeira imagem, com padrão AC-1, obteve respostas corretas por 49 (92,5%) participantes, um laboratório (1,8%) classificou como padrão Nuclear *quasi*-homogêneo (NQH), e outro como padrão Nuclear Pontilhado Fino (AC-4). Outros dois não responderam.

A segunda imagem exibiu o padrão AC-23, que foi citado por 47 (88,6%) laboratórios. Outros 3 (5,7%) participantes consideraram o padrão como negativo, um deles informou que o kit utilizado na rotina de seu laboratório não identifica este padrão. Um laboratório (1,8%) classificou como padrão Citoplasmático Polar (AC-22) e dois não responderam.

O padrão AC-24 apresentado na terceira imagem, foi citado por 46 (87,1%) participantes, um laboratório (1,8%) avaliou como padrão Numa (AC-25/26), outro (1,8%) considerou negativo e um (1,8%) sugeriu padrão Misto Fuso Mitótico + Citoplasmático Pontilhado (FM+CP). Um laboratório (1,8%) classificou somente como padrão do Aparelho Mitótico e outros três não responderam.

A quarta imagem apresentava o padrão AC-8, citado por 31 (58,4%) laboratórios, 17 (32,0%) informaram padrão Nucleolar (Nu) e o padrão misto Nuclear Pontilhado Fino associado à Nucleolar foi citado por dois laboratórios e padrão misto AC-8+Nuclear Pontilhado (NP) apontado por um participante. Outros dois não informaram.

A imagem cinco apresentava o padrão AC-2, onde 37 (69,8%) participantes classificaram como tal. Outros sete participantes (13,1%) sugeriram padrão NQH. Dois (3,9%) sugeriram os padrões AC-4 e outros dois sugeriram o padrão AC-1. Um participante definiu como padrão misto AC-1+AC-4. Quatro participantes não responderam.

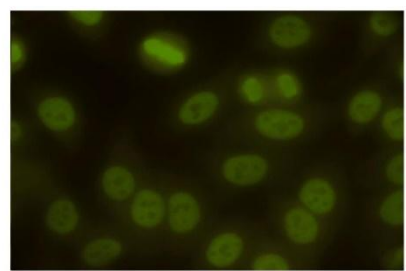
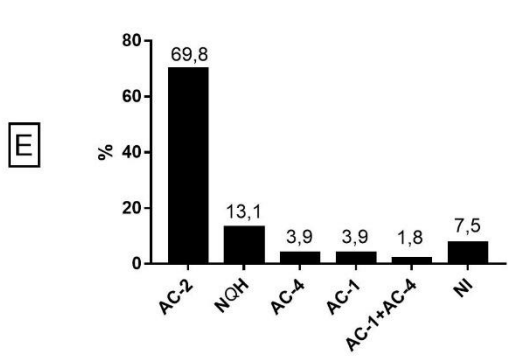
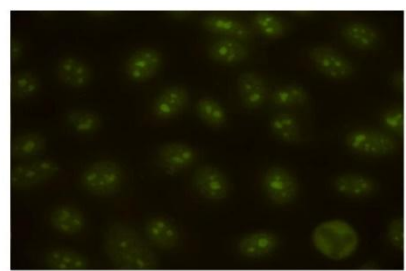
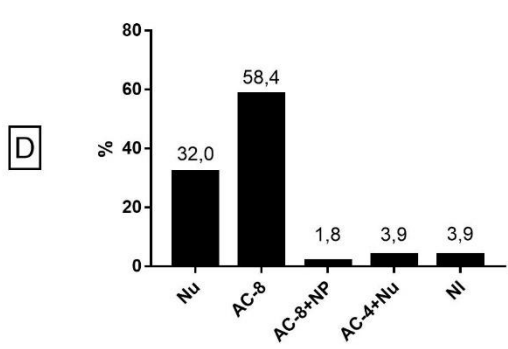
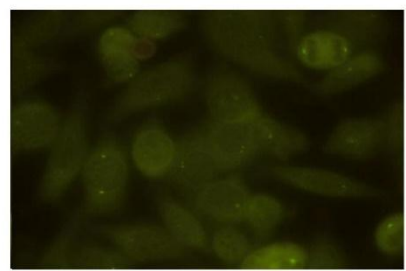
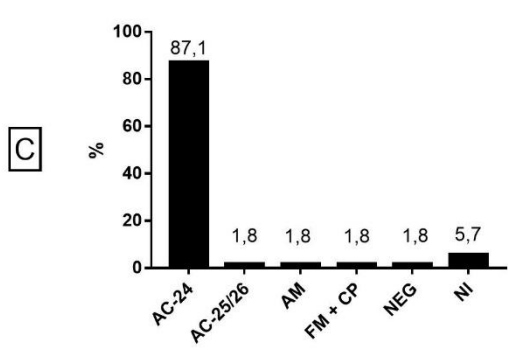
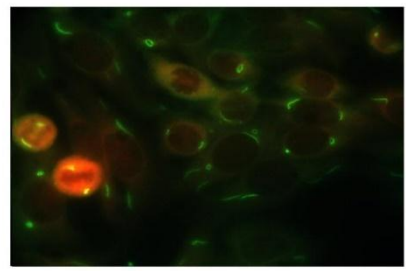
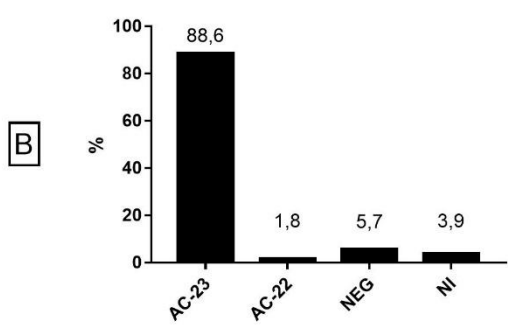
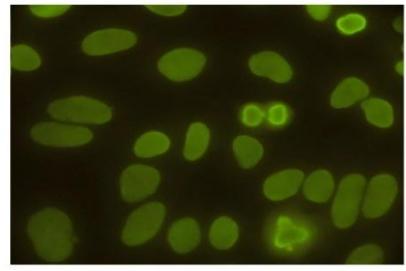
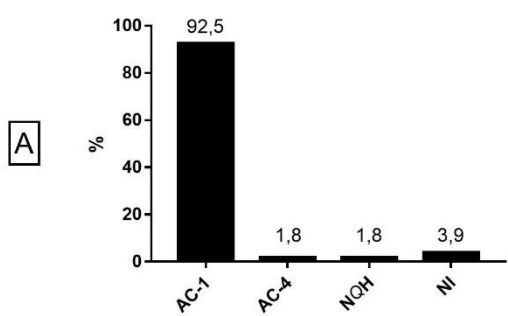


Figura 5 A-E. Padrões apresentados aos participantes do estudo para classificação conforme o Consenso Brasileiro. A - Padrão Nuclear Homogêneo. B- Padrão Citoplasmático em Anéis e Bastões AC-23. C- Padrão Aparelho Mitótico do tipo Centríolo AC-24. D- Padrão Nucleolar Homogêneo AC-8. E- Padrão Nuclear Pontilhado Fino Denso AC-2.

A) AC-1: Nuclear Homogêneo;; AC-4: Nuclear Pontilhado Fino; NQH: Nuclear *quasi*-homogêneo; NI: Não Informou.

B) AC-23: Citoplasmático em Anéis e Bastões; AC-22: Citoplasmático Polar; NEG: Resultados Negativos; NI: Não Informou.

C) AC-24: Aparelho Mitótico tipo Centríolo; AC-25/26: Fuso mitótico tipo NUMA; AM: Aparelho Mitótico; FM+CP: Misto Fuso Mitótico + Citoplasmático Pontilhado;; NEG: Resultados Negativos; NI: Não Informou.

D) Nu: Nucleolar; AC-8: Nucleolar Homogêneo; AC-8+NP: Misto Nucleolar Homogêneo + Nuclear Pontilhado; AC-4+Nu: Nuclear Pontilhado Fino + Nucleolar;; NI: Não Informou.

E) AC-2: Nuclear Pontilhado Fino Denso; NQH: Nuclear *quasi*-homogêneo; AC-4: Nuclear Pontilhado Fino; AC-1: Nuclear Homogêneo;; AC-1+AC-4: Misto Nuclear Homogêneo + Nuclear Pontilhado Fino Denso; NI: Não Informou.

## DISCUSSÃO

Participaram do presente estudo 53 laboratórios provenientes de 12 estados brasileiros e distrito federal, que em conjunto, realizam uma média de 300.000 testes/mês. As melhorias metodológicas no teste de FAN em células HEp-2 induziram um aumento na sensibilidade e conseqüente diminuição da especificidade do teste, o que se evidencia na proporção encontrada de resultados positivos em indivíduos sem enfermidade aparente, definida como Síndrome do Anticorpo Antinúcleo Idiopático (6,10,15). A grande diversidade de especialidades dos médicos que solicitam o exame, como demonstrado em nossos resultados, favorece ainda mais a geração desses falso-positivos, contrapondo-se à recomendação de que a solicitação de teste seja realizada somente na presença de evidência clínicas convincentes de autoimunidade sistêmica (10,11). Em estudos com indivíduos hígidos (597 trabalhadores no Japão e 500 doadores de sangue em São Paulo), obteve-se uma frequência de autoanticorpos de 20,0% e 22,6% respectivamente (17,18), o que reforça a necessidade de cautela na solicitação do exame por parte da comunidade médica. Pois, a pesquisa de anticorpos em células HEp-2 é um teste com demanda crescente, com avanços significativos sob o ponto de vista

metodológico, mas com melhorias que podem ser implementadas pelos laboratórios clínicos brasileiros.

Quase 60% dos participantes do estudo afirmou utilizar integralmente as recomendações do Consenso Brasileiro, demonstrando que uma proporção significativa dos testes é realizada conforme as diretrizes do Consenso.

O Consenso Brasileiro tem cumprido seu papel educativo e fomentando, ao longo de 5 edições a elaboração de vasto material didático na forma de atlas físicos, digitais e website (7, 9-12). No presente estudo, evidenciou-se que diferentes categorias profissionais realizam o ensaio, reforçando a necessidade de discussão desses conteúdos no âmbito dos diferentes cursos de graduação que atuam tecnicamente na Patologia Clínica e Medicina Laboratorial.

Foi evidenciado no presente estudo que não há Consenso em relação à definição adotada para nominar o ensaio o que motivou o estabelecimento pelo V Consenso de terminologia única para o teste a ser adotada por todos serviços que realizam o exame, ficando definida como nomenclatura única: *FAN – Pesquisa de Autoanticorpos Anticélula* (12).

Outro aspecto abordado foram as diluições de triagem que podem influenciar diretamente os resultados em falso-positivos ou falso-negativos (10,13,19), servindo como ponto de corte para resultados positivos e negativos, sabendo que uma baixa diluição pode resultar em aumento de falso-positivos, assim como uma alta diluição resultará em falsos-negativos (19). O IV Consenso recomendou a diluição de 1:80 como diluição de triagem (11). Em nossa pesquisa, 83,1% dos laboratórios afirmaram seguir essa recomendação e 13,3% realizam a triagem com diluição em 1:160. A diluição de triagem possui grande valor na definição de resultados, pois um em três indivíduos hígidos terão FAN positivo se realizada triagem em diluição 1:40, porém a positividade será de um em 20 se realizada a diluição de 1:160 (20). Da mesma forma, ainda que seja utilizada a diluição de 1:80, a positividade do FAN pode ser de 12,9% em pacientes hígidos (16). Brito, *et al.* afirmaram que a diluição de triagem ideal é 1:160, pois a mesma produziu uma redução de 53,0% no número de resultados falso-positivos (19). Pacientes hígidos tendem a apresentar título baixos e pacientes que possuem autoimunidade apresentam títulos de moderado à elevado (16). É sabido que na diluição 1:80 os resultados considerados como importantes são aqueles com título superior a 160 (11,16,21). É sugerido que

pacientes que apresentam padrões de fluorescência, porém, em títulos menores, sejam monitorados pelos clínicos quanto ao aparecimento de doença autoimune (22), sendo que já foi descrita a capacidade do teste em preceder o aparecimento dos sintomas do LES, podendo ainda apresentar-se indefinidamente negativo em alguns casos (6,11,23).

A potência da lâmpada exerce um papel relevante na leitura das lâminas de fluorescência (10). Em nosso estudo 62,3% dos participantes afirmaram utilizar lâmpadas de 100W, que é de grande relevância, pois o Consenso enfatiza que quanto maior a potência da lâmpada, menor deverá ser a concentração do conjugado necessária para visualização da reação (10). Portanto, uma baixa diluição associada a uma alta potência pode ocasionar um elevado número de casos falso-positivos, de outro modo, uma alta diluição associada a uma baixa potência irá produzir resultados falso-negativos. Foi relatado entre os participantes do estudo a utilização de lâmpada de 100W com diluição de triagem de 1:40 o que aumenta a chance de falsos positivos ou ainda a utilização de diluição de triagem em 1:80 com lâmpada de 20W o que potencializa a ocorrência de falso negativos. Tais situações devem ser avaliadas pelos serviços com base nas recomendações do Consenso (10).

No esgotamento de título o Consenso recomenda que a amostra positiva seja diluída, no mínimo, em 1:640, podendo o teste ser liberado como título >640, ou diluído a maiores diluições para diferenciação de padrões mistos (11). Os resultados demonstram que quase metade dos participantes adotam essa recomendação e os demais aplicam diluições ainda maiores, atendendo em plenitude este parâmetro.

No III Consenso e IV Consenso foi recomendada aos participantes a realização de estratégias de garantia da qualidade do teste (10,11). Um dos pontos fundamentais para assegurar o controle de qualidade de um serviço é a avaliação do sistema óptico considerando-se a potência da lâmpada, a qualidade do Kit e a titulação do conjugado como ferramenta para equilibrar o sistema (10,11). Recomenda-se a titulação do conjugado a cada novo kit de lote diferente (10). Nos resultados apresentados, somente 22,6% dos laboratórios informaram realizar a titulação do conjugado a cada novo kit, sendo que os demais participantes informaram utilizar conjugado pronto para uso. Porém, o Consenso afirma que em casos de kits do mesmo lote, a manutenção da titulação deve ocorrer mediante



utilização de controles de baixa intensidade (10). Em resposta à recomendação dada no III Consenso, avaliamos que 35,8% dos participantes possuem soroteca com amostras de reatividade mínima para controle (10). O aspecto relativo à padronização do sistema óptico de acordo com a potência da lâmpada e com a qualidade do kit permanece como foco de melhorias para os laboratórios clínicos avançarem no que diz respeito ao aperfeiçoamento da metodologia.

É recomendado, desde o I Consenso, que seja realizada uma leitura estratificada de todos os compartimentos celulares, em decorrência da existência de padrões nucleares, nucleolares, citoplasmáticos e de aparelho mitótico (7,10,11,13). Verificamos em nossos resultados que apenas 5,7% dos participantes não seguem essa diretriz e outros 7,5% não realizam visualização de reatividade na placa metafásica cromossômica. Um total de 32,1% não confirmou realizar a leitura de todas as fases da divisão celular embora esta seja de grande importância para o reconhecimento de padrões do aparelho mitótico, além de auxiliar na classificação e diferenciação de alguns padrões nucleares (10,11). Embora em pequena parcela, tal aspecto aponta para a necessidade de oferta de treinamentos e programas de aperfeiçoamento para profissionais que respondem tecnicamente pela realização do ensaio.

Seguindo as normas de estrutura dos laudos, 81,1% dos laboratórios afirmou emitir laudos com o nome do padrão, título do autoanticorpo e logo abaixo uma apresentação de reatividade dos diferentes compartimentos celulares, conforme foi recomendado pelo Consenso (11).

Quando convidados a emitir o laudo descritivo de cinco figuras representativas de padrões com base nas recomendações do Consenso Brasileiro e Internacional (7-12), a maioria dos laboratórios demonstrou-se capaz de reconhecer e classificar os padrões de fluorescência.

A primeira imagem era compatível com presença de anticorpos anti-DNA nativo, anti-histona e anticromatina, marcadores de LES (10,24,25), classificado nacionalmente como Nuclear Homogêneo e internacionalmente como AC-1. A grande maioria dos laboratórios optou por essa classificação. Um laboratório participante classificou a imagem como padrão Nuclear *quasi*-homogêneo (NQH), padrão que foi adicionado à árvore de classificação no IV Consenso (11), e outro, como padrão Nuclear Pontilhado Fino (AC-4).

Na segunda imagem o padrão Citoplasmático em Anéis e Bastões (AC-23) foi reconhecido por 88,6% dos laboratórios. Trata-se de um padrão relacionado ao tratamento contra o Vírus da Hepatite C (HCV) com Interferon alfa e Ribavirina (11,29,30). Foi integrado à árvore de classificação do IV Consenso por não possuir similaridade morfológica com nenhum outro grupo de padrão citoplasmático (11). O IV Consenso chamou atenção de que as proteínas responsáveis pela apresentação do padrão não estão presentes em alguns substratos comerciais (11) e esta afirmação foi considerada por um de nossos participantes que relatou negatividade do padrão pois o kit usado no seu laboratório não o detectaria. É recomendado informar no laudo que o padrão AC-23 é substrato dependente (11).

A terceira imagem suscitou maior controvérsia em relação à classificação do padrão. Foi apresentada uma figura representativa do padrão de Aparelho Mitótico do tipo Centríolo (AC-24), reconhecido pela maioria dos laboratórios. Trata-se de um padrão expresso na presença do anticorpo antialfa-enolase (10) e com relevância clínica apenas em altos títulos (31).

Na árvore de classificação o Consenso estratifica alguns padrões como obrigatórios ou opcionais. Em relação aos nucleolares, padrão representado na quarta figura, a diferenciação em Nucleolar Homogêneo (AC-8), Nucleolar Aglomerado (AC-9) ou Nucleolar Pontilhado (AC-10) é opcional (10–12). Nos resultados, de cerca de 90,4% dos participantes citaram padrão Nucleolar. Tais resultados demonstram boa qualidade técnica dos laboratórios participantes no reconhecimento desse grupo de padrões.

A quinta imagem corresponde à representação do padrão Nuclear Pontilhado Fino Denso (11). Em suas respostas, os laboratórios consideraram a imagem como de padrões NQH, Nuclear Pontilhado Fino Denso (AC-2), Pontilhado Fino (AC-4) e Homogêneo (AC-1), por 13,1%, 69,8%, 3,9% e 3,9%, respectivamente. Também foi citado por um dos participantes o padrão Misto Nucleolar e Nuclear Pontilhado Fino. Os resultados demonstram maior dificuldade em diferenciar esse padrão por parte dos laboratórios o que é esperado uma vez que o padrão encontra-se no guia opcional de classificação do Consenso Brasileiro (11). Deve-se salientar que o Consenso Internacional (ICAP) classifica este padrão como obrigatório em função da relevância clínica do seu reconhecimento. Portanto, esta é uma oportunidade de

melhoria que temos, no sentido de divulgar e capacitar o maior número de analistas no reconhecimento do padrão Nuclear Pontilhado Fino Denso.

As análises das cinco imagens demonstram que a maioria dos laboratórios participantes tem boas condições técnicas de reconhecimentos dos padrões, mas que a educação continuada deve ser constante e progressiva, o que assegurará maior equiparação e harmonização entre os resultados emitidos e a capacitação dos diferentes profissionais que atuam tecnicamente na realização do exame, visto que o não reconhecimento e classificação do padrão compromete a interpretação médica e prejudica o paciente.

As divergências apresentadas apontam para a necessidade de cursos e programas para aperfeiçoamento e eliminação de dúvidas tanto na adoção de medidas de controle de qualidade quanto na definição de padrões. Permanece como foco para o Consenso Brasileiro estimular a proporção de 24,5% dos laboratórios que não utilizam programas de educação e controle de qualidade, a buscarem implementar tais ações em suas rotinas.

Em relação ao número de laboratórios participantes, deve-se levar em consideração que o presente estudo foi destinado à serviços que realizam a técnica, sendo que aqueles que afirmaram terceirizar o teste foram excluídos de nossos resultados. Os laboratórios brasileiros que realizam o ensaio foram convidados a participar do estudo. Deve-se ressaltar que, somadas as médias de testes FAN/HEp-2 mensais, informada por cada participante, o estudo consolidou informações sobre laudos, leitura de lâminas, controle de qualidade de mais de 300.000 testes/mês.

O presente estudo é a primeira avaliação de impacto do Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em Células HEp-2 na prática laboratorial. Os resultados confirmam avanços alcançados na última década e definem focos de atenção para a necessidade de implementação de programas educativos e de controle de qualidade para os laboratórios brasileiros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Crowson CS, Matteson EL, Myasoedova E, et al. The Lifetime Risk of Adult-Onset Rheumatoid Arthritis and Other Inflammatory Autoimmune Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheum.* 2011;63(3):633–9. PubMed PMID: 21360492.
2. Dellavance A, Andrade LEC. Das células LE às células HEp-2: perspectiva histórica e avaliação crítica do teste de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos antinúcleo. *Rev Bras Med [Internet].* 2008;1(1):07–21. Disponível em:  
[http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id\\_materia=3500&fase=imprime](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=3500&fase=imprime).
3. Hasehick JH, Bortz DW. Normal bone marrow inclusion phenomena induced by Lupus Erythematosus Plasma. *J Invest Dermatol.* 1949;13:47–9. PubMed PMID: 18134649.
4. Altit G, Brochu P, Jacob S V, Buithieu M. LE cells in pleural fluid. *J Clin Rheumatol.* 2012;18(5):273–4. PubMed PMID: 22832304.
5. Coons AH, Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med.* 1950;91:1–13. PubMed PMID: 15395569.
6. Dellavance A, Andrade LEC. Como interpretar e valorizar adequadamente o teste de anticorpos antinúcleo. *J Bras Patol Med Lab.* 2007;43(3):157–68.
7. Dellavance A, Júnior AG, Cintra AFU, et al. I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN HEp-2 The first Brazilian Consensus for Standardization of ANA in HEp-2 Cells. *J Bras Patol e Med Lab.* 2001;38(3):207–16.
8. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, et al. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014-2015. *Front Immunol [Internet].* 2015 Jan;6:412. Disponível em:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4542633&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
9. Dellavance A, Gabriel Junior A, Cintra AFU, et al. II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-2. *Rev Bras Reum.* 2003;43(3):129–40.
10. Francescantonio PLC, Andrade LEC, Cruvinel WDM, et al. III Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em Células HEp-2: perspectiva histórica, controle de qualidade e associações clínicas. *J Bras Patol e Med*

- Lab. 2009;45(3):185–99.
11. Francescantonio PLC, Cruvinel W de M, Dellavance A, et al. IV Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2. *Rev Bras Reum.* 2013;54(1):44–50.
  12. V Consenso Brasileiro de FAN HEp-2 [Internet]. 2016. Disponível em: [www.hep-2.com.br](http://www.hep-2.com.br).
  13. Dellavance A, Nuccitelli B, Taliberti BH, et al. II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-2 (\*) II Brazilian Consensus on Antinuclear Antibodies in HEp-2 Cells nucleolus , cytoplasm and mitotic apparatus , as well as its clinical associations. *Rev Bras Reumatol.* 2003;43(3):129–40.
  14. Dellavance A, Leser PG, Andrade LEC. Análise crítica do teste de anticorpos antinúcleo (FAN) na prática clínica. *Rev Bras Reumatol [Internet].* 2007 Aug;47(4):265–75. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0482-50042007000400005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042007000400005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt).
  15. Lora PS, Laurino CCF, Freitas AE, Brenol JC, Montecielo O, Xavier RM. Padrões de Imunofluorescência do Fator Antinuclear (FAN) em Células HEp-2 de Soros Reagentes para Anti-SSA/Ro. *Rev Bras Reum.* 2007;47(1):4–9.
  16. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LEC. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum [Internet].* 2011 Jan ;63(1):191–200. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.30084>.
  17. Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, et al. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. *Arthritis Rheum [Internet].* 2004 Mar ;50(3):892–900. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.20096>.
  18. Fernandez SAV, Lobo AZC, Oliveira ZNP de, Fukumori LMI, Prigo AM, Rivitti EA. Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo [Internet].* 2003;58(6):315–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762490>
  19. Brito FA, Santos SME, Ferreira GA, et al. Detecção de anticorpos antinucleares por imunofluorescência indireta em células HEp-2: definindo a diluição de triagem adequada para o diagnóstico das doenças reumáticas

- autoimunes. *Rev Bras Reumatol* [Internet]. 2013;54(21):13–20. Disponível em: [www.reumatologia.com.br](http://www.reumatologia.com.br).
20. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol*. 2000 Jun;53(6):424–32. PubMed Central: PMC1731203.
  21. Vance DE. Prevention, Rehabilitation, and Mitigation Strategies of Cognitive Deficits in Aging with HIV: Implications for Practice and Research. *ISRN Nurs* [Internet]. 2013 Jan;2013:297173. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23431469>.
  22. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, et al. Guidelines for the Laboratory Use of Autoantibody Tests in the Diagnosis and Monitoring of Autoimmune Rheumatic Diseases. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2002;117:316–24. Disponível em: <http://ajcp.oxfordjournals.org.sci-hub.cc/content/117/2/316.long>.
  23. Bohan A. Seronegative systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* [Internet]. 1979;6(5):534–40. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/93147>.
  24. Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, et al. Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: Antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2000;43(1):76–84. PubMed PMID: 10643702.
  25. Wagner A, De Souza S, Keusseyan SP, et al. Anticorpos antinucleossomo e síndrome antifosfolipídica: estudo observacional. *Rev Bras Reum*. 2012;52(3):357–65.
  26. Franca NR, Dellavance A, Rodrigues SH, Perazzio SF, Silva NP, Andrade LEC. Quasi-Homogeneous ANA-HEp-2 Pattern Reflects An Autoantibody Profile Intermediate To The Homogeneous And Dense Fine Speckled Nuclear Patterns. *Arthritis & Rheumatism* [Internet]. 2011;63:2307. Disponível em: <http://www.blackwellpublishing.com/acrmeeting/abstract.asp?MeetingID=781&id=97047>.
  27. Barcellos KSA, Nonogaki S, Enokihara MMSS, Teixeira MS, Andrade LEC. Differential expression of Ro/SSA 60 kDa and La/SSB, but not Ro/SSA 52 kDa, mRNA and protein in minor salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* [Internet]. 2007 Jun;34(6):1283–92. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17552056>.

28. Andrade LEC, Leser PG. Auto-Anticorpos na Esclerose Sistêmica (ES) Autoantibody in the Systemic Sclerosis (SS). *Rev Bras Reumatol.* 2004;44(3):215–23.
29. Felisberto M, Jorge AS, Menolli RA, Gnutzmann LV, Nesi V. Indução do padrão citoplasmático em forma de “bastões e anéis” através do tratamento da hepatite C: relato de caso. *Rev Bras Reumatol.* 2015;55(4):181-4.
30. Carcamo WC, Satoh M, Kasahara H, et al. Induction of cytoplasmic rods and rings structures by inhibition of the CTP and GTP synthetic pathway in mammalian cells. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(12):e29690. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22220215>.
31. Dellavance A, et al. Pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2. Apud: III Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em Células HEP-2: perspectiva histórica, controle de qualidade e associações clínicas. Ed UCG. 2008.
32. Dellavance A, Viana VST, Leon EP, Bonfa ESDO, Andrade LEC, Leser PG. The clinical spectrum of antinuclear antibodies associated with the nuclear dense fine speckled immunofluorescence pattern. *J Rheumatol* [Internet]. 2005 Nov;32(11):2144–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16265692>.
33. Dellavance A, Leser PG, Andrade LEC. Importância do Padrão de Fluorescência na Interpretação do teste FAN - O caso do Padrão Pontilhado Fino Denso. *Rev Assoc Med Bras.* 2007;53(5):439–45.

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo teve como objetivo primário avaliar a adesão às diretrizes do Consenso Brasileiro na prática laboratorial. Consideramos os resultados encontrados de significativa relevância na perspectiva de que permitirão a adoção de ações nos âmbitos individual e coletivo o que permitirá mais avanços e aprimoramentos na utilização do teste como auxílio diagnóstico das doenças reumáticas autoimunes. Avaliamos que a adoção das recomendações do Consenso por todos os laboratórios participantes se dá de forma absoluta ou parcial. Contudo, alguns aspectos aqui evidenciados poderão ser considerados metas para serem trabalhadas nas próximas ações do Consenso Brasileiro. Neste contexto, destacam-se como conclusões:

- Os laboratórios reconhecem as recomendações do Consenso Brasileiro e a maioria dos serviços busca adotar tais diretrizes;
- Há grande heterogeneidade em relação aos laboratórios que realizam a metodologia sob o ponto de vista das rotinas e do perfil dos profissionais;
- Há grande diversidade de especialidades médicas solicitando o ensaio;
- Embora em pequena parcela, são necessários esforços para realização de ajustes nos procedimentos técnicos que harmonizem a diluição de triagem, a potência da lâmpada e a qualidade dos kits com foco em aprimorar a qualidade do exame no que diz respeito à avaliação semi-quantitativa;
- Há limitação de reconhecimento de padrões em pequena parcela dos laboratórios clínicos o que não pode ser ignorado e precisa ser trabalhado;

Constatamos a necessidade de oferecimento de cursos que visem proporcionar o aperfeiçoamento da técnica de pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 nos laboratórios a partir da constatação de que os programas de educação e controle de qualidade não estão acessíveis a alguns laboratórios. Nossos resultados apontam para a necessidade de maiores ações do Consenso e demais instituições relacionadas, para insistir em ações educativas sob o procedimento técnico nos laboratórios, assim como ações junto aos clínicos não reumatologistas para que busquem maior formação específica.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTIT, G.; BROCHU, P.; JACOB, S. V.; BUIHIEU, M. LE cells in pleural fluid. **J Clin Rheumatol**, v. 18, n. 5, p. 273–274, 2012.
- ARBUCKLE, M. R.; MCCLAIN, M. T.; RUBERTONE, M. V.; et al. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 16, p. 1526–1533, 2003.
- BARCELLOS, K. S. A.; NONOGAKI, S.; ENOKIHARA, M. M. S. S.; TEIXEIRA, M. S.; ANDRADE, L. E. C. Differential expression of Ro/SSA 60 kDa and La/SSB, but not Ro/SSA 52 kDa, mRNA and protein in minor salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome. **The Journal of rheumatology**, v. 34, n. 6, p. 1283–92, 2007.
- BRITO, F. A.; SANTOS, S. M. E.; FERREIRA, G. A.; et al. Detecção de anticorpos antinucleares por imunofluorescência indireta em células HEp-2: definindo a diluição de triagem adequada para o diagnóstico das doenças reumáticas autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, n. 21, p. 13–20, 2013.
- CARRILLO-ESPER, R.; ROSILLO, F. J.; GIRÓN-RAMÍREZ, V.; et al. Fenómeno de las células de lupus eritematoso (LE): reporte de un caso. **Rev Invest Med Sur Mex** **Rev Invest Med Sur Mex Julio-Septiembre**, v. 19, n. 193, p. 190–192, 2012.
- CHAN, E. K. L.; DAMOISEAUX, J.; CARBALLO, O. G.; et al. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014-2015. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 412, 2015.
- COONS, A. H.; KAPLAN, M. H. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. **J Exp Med**, v. 91, p. 1–13, 1950.
- CROWSON, C. S.; MATTESON, E. L.; MYASOEDOVA, E.; et al. The Lifetime Risk of Adult-Onset Rheumatoid Arthritis and Other Inflammatory Autoimmune Rheumatic Diseases. **Arthritis Rheum**, v. 63, n. 3, p. 633–639, 2011.
- DAVIDSON, A.; DIAMOND, B. Autoimmune Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 5, p. 340–350, 2001.
- DELLAVANCE, A.; ANDRADE, L. E. C. Como interpretar e valorizar adequadamente o teste de anticorpos antinúcleo. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 3, p. 157–168, 2007.
- DELLAVANCE, A.; ANDRADE, L. E. C. Das células LE às células HEp-2:

perspectiva histórica e avaliação crítica do teste de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos antinúcleo. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 1, n. 1, p. 07–21, 2008.

DELLAVANCE, A.; JÚNIOR, A. G.; CINTRA, A. F. U.; et al. I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN HEp-2 The first Brazilian Consensus for Standardization of ANA in HEp-2 Cells. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 3, p. 207–216, 2001.

DELLAVANCE, A.; LESER, P. G.; ANDRADE, L. E. C. Importância do Padrão de Fluorescência na Interpretação do teste FAN - O caso do Padrão Pontilhado Fino Denso. **Rev Assoc Med Bras**, v. 53, n. 5, p. 439–445, 2007a.

DELLAVANCE, A.; LESER, P. G.; ANDRADE, L. E. C. Análise crítica do teste de anticorpos antinúcleo (FAn) na prática clínica. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 4, p. 265–275, 2007b.

DELLAVANCE, A.; NUCCITELLI, B.; TALIBERTI, B. H.; et al. II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-2 (\*) II Brazilian Consensus on Antinuclear Antibodies in HEp-2 Cells nucleolus , cytoplasm and mitotic apparatus , as wel as its clinical associations. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 3, p. 129–140, 2003.

FELETAR, M.; IBAÑEZ, D.; UROWITZ, M. B.; GLADMAN, D. D. The impact of the 1997 update of the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus: What has been changed? **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 7, p. 2067–2069, 2003.

FERNANDEZ, S. A. V.; LOBO, A. Z. C.; OLIVEIRA, Z. N. P. DE; et al. Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 58, n. 6, p. 315–9, 2003.

FRANDESCANTONIO, P. L. C.; ANDRADE, L. E. C.; CRUVINEL, W. D. M.; et al. III Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em Células HEp-2: perspectiva histórica, controle de qualidade e associações clínicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 3, p. 185–199, 2009.

FRANDESCANTONIO, P. L. C.; CRUVINEL, W. DE M.; DELLAVANCE, A.; et al. IV Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2. **Rev Bras Reumatol**, v. 54, n. 1, p. 44–50, 2013.

GHIRARDELLO, A.; BASSI, N.; PALMA, L.; et al. Autoantibodies in polymyositis and

dermatomyositis. **Current rheumatology reports**, v. 15, n. 6, p. 335, 2013.

HASEHICK, J. H.; BORTZ, D. W. Normal bone marrow inclusion phenomena induced by Lupus Erythematosus Plasma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 13, p. 47–49, 1949.

HEPBURN, A. L. The LE cell. **Rheumatology**, v. 40, p. 826–827, 2001.

HILÁRIO, M. O. E.; LEN, C. A.; ROJA, S. C.; et al. Frequency of antinuclear antibodies in healthy children and adolescents. **Clinical pediatrics**, v. 43, n. 7, p. 637–42, 2004.

HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 40, n. 9, p. 1725, 1997.

LERNER, A.; JEREMIAS, P.; MATTHIAS, T. The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. **International Journal of Celiac Disease**, v. 3, n. 4, p. 151–155, 2015.

NOTMAN, D. D.; KURATA, N.; TAN, E. M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. **Annals of Internal Medicine**, v. 83, n. 4, p. 464, 1975.

PARK, J. Y.; MALIK, A.; DUMOFF, K. L.; GUPTA, P. K. Case report and review of lupus erythematosus cells in cytology fluids. **Diagnostic Cytopathology**, v. 35, n. 12, p. 806–809, 2007.

SANTOS, L. M.; MOREIRA, K. E. C. S.; RODRIGUES, S. H.; et al. Prevalência e valor prognóstico de anticorpos antinucleares em indivíduos idosos. **Rev. bras. reumatol**, v. 37, n. 6, p. 323–6, 1997.

SCHMIDT-ACEVEDO, S.; PÉ REZ-ROMANO, B.; RUIZ-ARGÜ, A. “LE Cells” Result from Phagocytosis of Apoptotic Bodies Induced by Antinuclear Antibodies. **Journal of Autoimmunity**, v. 15, p. 15–20, 2000.

SOLOMON, D. H.; KAVANAUGH, A. J.; SCHUR, P. H. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. **Arthritis and rheumatism**, v. 47, n. 4, p. 434–444, 2002.

SOUZA, A. W. S. DE; KEUSSEYAN, S. P.; SILVA, N. P. DA; SATO, E. I.; ANDRADE, L. E. C. Anticorpos antinucleossomo e síndrome antifosfolipídica: estudo observacional. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 3, p. 357–365, 2012.

TARGOFF, I. N. Autoantibodies in polymyositis. **Rheumatic diseases clinics of**

**North America**, v. 18, n. 2, p. 455–82, 1992.

V CONSENSO. V Consenso Brasileiro de FAN HEp-2. Disponível em: <[www.hep-2.com.br](http://www.hep-2.com.br)>. Acesso em: 15/02/2017.

WATANABE, A.; KODERA, M.; SUGIURA, K.; et al. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 3, p. 892–900, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principles and methods for assessing autoimmunity associated with exposure to chemicals. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2006.

## **8. ANEXO A – TEXTO INTRODUTÓRIO ENVIADO PARA CONVITE DOS LABORATÓRIOS**

### **OS CONSENSOS PARA PESQUISA DE AUTOANTICORPOS EM CÉLULAS HEP-2 (FAN HEP-2): IMPLANTAÇÃO DAS DIRETRIZES NOS LABORATÓRIOS CLÍNICOS BRASILEIROS**

É com satisfação que o convidamos a participar da pesquisa "**OS CONSENSOS PARA PESQUISA DE AUTOANTICORPOS EM CÉLULAS HEP-2 (FAN HEP-2): IMPLANTAÇÃO DAS DIRETRIZES NOS LABORATÓRIOS CLÍNICOS BRASILEIROS**", sob a Coordenação dos pesquisadores Wilson de Melo Cruvinel, Paulo Luiz Carvalho Francescantonio, Luis Eduardo Coelho Andrade e Alessandra Dellavance.

#### **FINALIDADE DA PESQUISA E IMPORTÂNCIA DE SUA PARTICIPAÇÃO:**

A avaliação de autoanticorpos em células HEP-2 tornou-se uma relevante ferramenta na investigação de doenças autoimunes. Tal metodologia, ao longo dos últimos anos, passou por um intenso processo de padronização por influência dos Consensos Brasileiros. Surgiu então a necessidade de observar como essas mudanças vem sendo adotadas na rotina dos laboratórios. Nesse contexto, a presente pesquisa tem por objetivo avaliar o grau de implantação das diretrizes do Consenso Brasileiro nos Laboratórios do Brasil, o que norteará as ações futuras do Consenso para pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2 e a pauta do próximo encontro brasileiro.

#### **DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA, DÚVIDAS E CONFIDENCIALIDADE:**

O estudo está sendo realizado em parceria entre a Pontifícia Universidade Católica de Goiás e Universidade Federal de São Paulo. Qualquer dúvida sobre o estudo, os pesquisadores poderão ser contatados a qualquer momento por email ou telefone. Ao responder o questionário, identificaremos o laboratório por meio de um código de identificação cujo objetivo é assegurar que cada laboratório participe uma única vez do estudo. A pesquisa tem caráter sigiloso e em momento algum o nome do laboratório será citado. Todos os dados coletados serão analisados estatisticamente de modo automático pelo sistema. A participação dos laboratórios é totalmente voluntária, podendo o laboratório negar-se a participar. Não haverá despesas ou danos pela participação, apenas no tempo investido para preenchimento do

questionário por parte do responsável pela realização da técnica e emissão dos laudos. Vale ressaltar que a sua participação será de grande importância no que diz respeito às melhorias na técnica para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 (FAN-HEp-2).

**CADASTRO:**

Pedimos que realizem o cadastro antes de iniciarem o questionário, A partir da realização do cadastro será gerado um código de acesso. O código servirá para garantir que cada laboratório responderá somente uma vez, dessa forma, não haverá repetição de dados.

**CONTATO:**

**Contato Geral:** hep-2@gmail.com

**Wilson de Melo Cruvinel:** melocruvinel@gmail.com

**Luiz Eduardo Coelho Andrade:** luis.andrade@unifesp.br

**Alessandra Dellavance:** alessandra.dellavance@fleury.com.br

**Paulo Luiz Carvalho Francescantonio:** paulo\_luiz1@hotmail.com

**Clayson Moura Gomes:** claysonmoura10@gmail.com

**Glaucielen Gomes da Silva:** glaucyelen@hotmail.com

## 9. ANEXO B – QUESTIONÁRIO APLICADO AOS LABORATÓRIOS PARTICIPANTES

RESPONDA AS PERGUNTAS ABAIXO E CLIQUE NO BOTÃO "ENVIAR RESPOSTAS"

1 - O Laboratório realiza a técnica de Imunofluorescência Indireta em células HEp-2?

- Sim, realiza no próprio laboratório
- Realiza por meio de terceirização
- Não realiza

2 - Se este exame é terceirizado, veja se uma das opções abaixo justifica a terceirização:

- Dificuldade técnica na realização e leitura
- Baixa demanda de exames
- Alta demanda de exames
- Falta de profissional qualificado
- Outro

3 - Qual a média de exames realizados mensalmente?

4 - O laboratório utiliza as recomendações dos Consensos Brasileiros para Pesquisa de Autoanticorpos em células HEp-2?

- Sim, integralmente
- Sim, utiliza a maior parte das recomendações
- Parcialmente, pois utiliza algumas recomendações
- Não adota recomendações

5 - Além dos reumatologistas, quais outras especialidades solicitam o exame?

6 - Qual é a denominação para o teste adotada no laboratório?

- FAN Hep-2

- FAN
- Anticorpo antinúcleo
- FAN - Pesquisa de anticorpos contra componentes do núcleo, nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico
- FAN - Pesquisa de autoanticorpo
- Pesquisa de autoanticorpos (FAN e citoplasmáticos)
- Pesquisa de anticorpos contra componentes do núcleo (FAN), nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico
- Pesquisa de autoanticorpos contra antígenos intracelulares (FAN)

7 - Qual formação acadêmica do responsável pela leitura das lâminas de HEp-2?

- Médico (Reumatologista)
- Médico (Patologista)
- Médico (Outra especialidade)
- Farmacêutico / Bioquímico
- Biomédico
- Biólogo
- Nível Técnico

8 - Qual a diluição de triagem utilizada pelo laboratório?

- 1/20
- 1/40
- 1/80
- 1/160
- 1/320
- Como o exame é terceirizado, não temos essa informação
- outro

9 - Considerando os resultados positivos, qual a maior diluição em que o teste é realizado:



- Resultados positivos o título é esgotado até a última diluição com fluorescência discernível
- Resultados positivos são titulados até 1/160, sendo liberados como > 1/160
- Resultados positivos são titulados até 1/320, sendo liberados como > 1/320
- Resultados positivos são titulados até 1/640, sendo liberados como > 1/640
- Resultados positivos são titulados até 1/1280, sendo liberados como >1/1280
- Resultados positivos são titulados até 1/2560, sendo liberados como >1/2560
- Como o exame é terceirizado, não temos essa informação
- outro

10 - Em relação ao procedimento técnico, marque as opções abaixo quando o serviço realiza tais procedimentos na sua rotina:

*Marque todas as que julgar pertinentes*

- O conjugado não é titulado uma vez que já é disponível pronto para uso
- O conjugado é titulado a cada novo kit
- O laboratório trabalha com uma única marca de kit
- O laboratório trabalha com pelo menos duas marcas de kits
- O laboratório mantém soroteca com soros de diversas diluições fluorescentes
- O laboratório mantém soroteca para testar a capacidade do kit em reproduzir os diferentes padrões
- O laboratório realiza controles de padrões com fluorescência mínima para definição de ponto de corte abaixo do qual são considerados os resultados negativos (indicador de sistema instável)
- Como o exame é terceirizado, não temos essa informação

11 - Qual a potência da lâmpada do microscópio de fluorescência?

- 20 Watts
- 50 Watts
- 100 Watts

- 200 Watts
- Não sabe informar
- Como o exame é terceirizado, não temos essa informação
- outro

12 - Em relação ao procedimento de leitura das lâminas, marque as opções abaixo que se enquadram na rotina:

*Marque todas as que julgar pertinentes*

- Leitura de lâmina com objetiva de 40x
- Leitura de lâmina com objetiva de 100x
- Leitura de lâmina com objetiva de 40 e 100x
- Observação da fluorescência do núcleo, nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico
- Observação do aspecto da célula nas diversas fases da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase)
- Classificação da placa metafásica em positiva ou negativa
- Como o exame é terceirizado, não temos essas informações

13 - Em relação à emissão de laudos, marque as opções abaixo que se enquadram na rotina:

*Marque todas as que julgar pertinentes*

- O laudo contempla o nome do padrão e o título
- O laudo contempla o nome do padrão, seguido do título e logo abaixo a caracterização de fluorescência das diferentes regiões celulares
- Padrões citoplasmáticos são considerados positivos
- Padrões citoplasmáticos são considerados negativos
- O laudo contempla o nome do padrão e título em cada compartimento celular (no caso de padrões mistos)
- O laudo contém um campo que fornece informações sobre os possíveis

autoanticorpos associados e quadros clínicos compatíveis com os achados

Como o exame é terceirizado, não temos essa informação

14 - O laboratório utiliza algum programa educativo ou de controle de qualidade para a pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2?

*NÃO ou SIM. Se SIM, qual(is) o(s) programa(s)*

Não

Sim

15 - Com quais Consensos Brasileiros você possui maior familiaridade em relação às recomendações:

Primeiro Consenso (2000)

Segundo Consenso (2003)

Terceiro Consenso (2009)

Quarto Consenso (2013)

Desconheço todos os Consensos

16 - Em uma escala de 1 a 10, como você avaliaria as contribuições dos Consensos Brasileiros de Pesquisa de Autoanticorpos em Células HEp-2?

*Considerando 1 como nada satisfeito e 10 como muito satisfeito*

1

2

3

4

5

6

7

8

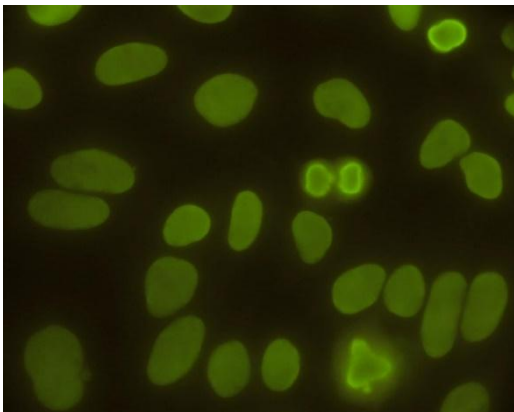
9

10

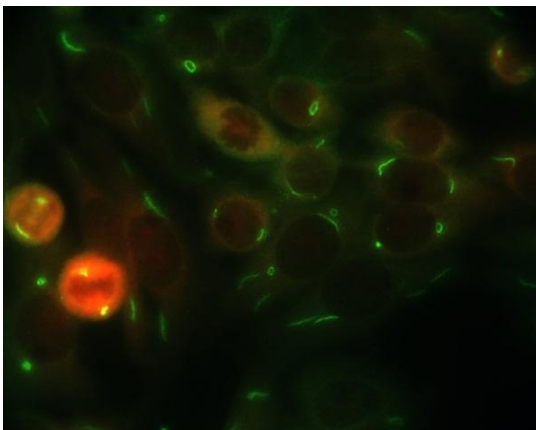
17 - Liste os principais pontos positivos dos Consensos Brasileiros para Pesquisa de Auto anticorpos em Células HEp-2:

18 - Liste os principais pontos negativos dos Consensos Brasileiros para Pesquisa de Auto anticorpos em Células HEp-2

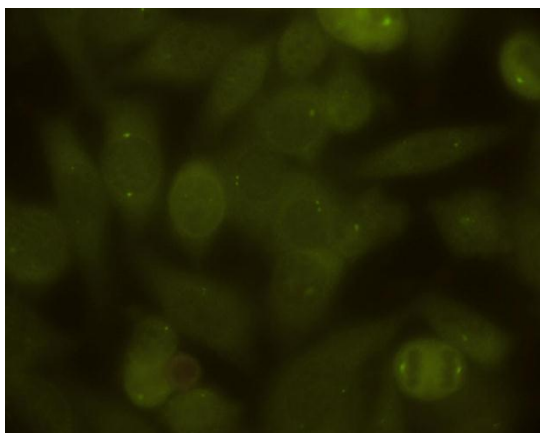
19 - Figura 1: Emita o laudo padrão abaixo, considere fluorescência até a diluição 1/1280



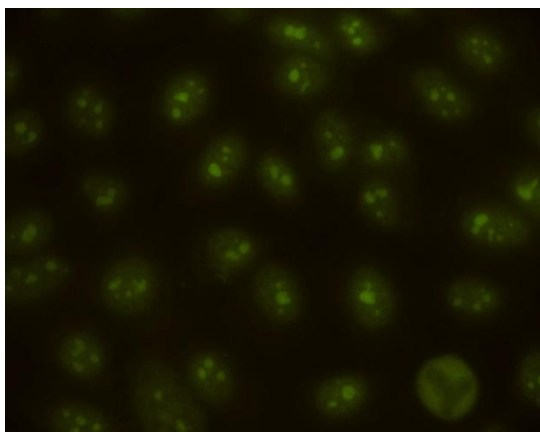
20 - Figura 2: Emita o laudo do padrão a baixo, considere fluorescência até a diluição 1/640



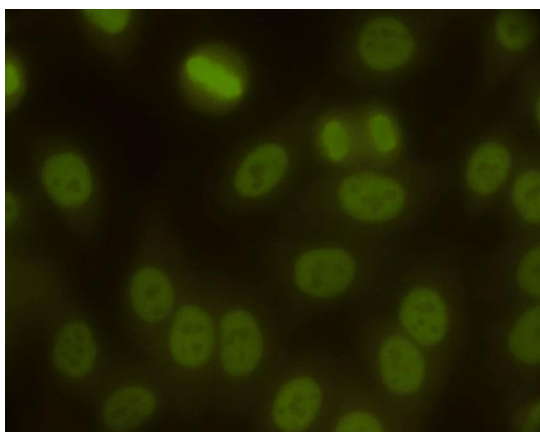
21 - Figura 3: Emita o laudo do padrão abaixo considerando fluorescência até a diluição 1/320



22 - Figura 4: Emita o laudo da padrão abaixo, considere fluorescência até a diluição 1/320



23 - Figura 5: Emita o laudo do padrão abaixo, considere fluorescência até a diluição 1/640



24 - Este campo é aberto caso você queira apresentar sugestões para o V Consenso Brasileiro de FAN.

## **10. ANEXO C – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DO JORNAL BRASILEIRO E PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL**

O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML), continuação do Jornal Brasileiro de Patologia, de periodicidade bimestral (fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro), é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML), da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) e da Sociedade Brasileira de Citopatologia (SBC). É indexado no Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), no Periodica e no Chemical Abstracts e é integrante da base de dados Scientific Electronic Library Online (SciELO). Destina-se à publicação de trabalhos científicos que contribuam para o desenvolvimento da área de Medicina Laboratorial e aceita as seguintes categorias: artigos originais, de revisão, de atualização, experimentais, relatos de caso, comunicações breves e cartas aos editores. Os trabalhos podem ser submetidos nos idiomas português, inglês ou espanhol, mas o texto completo será publicado apenas em inglês, com resumo em português ou espanhol.

### **ANÁLISE DOS TRABALHOS**

O manuscrito recebido será enviado para, pelo menos, dois avaliadores independentes, pares científicos, de renome e com conhecimento específico na área contemplada pelo artigo. Após análise pelos avaliadores, o editor-chefe do JBPMML entrará em contato com o autor principal comunicando os passos a serem seguidos na aceitação do trabalho para publicação ou sua eventual rejeição.

### **ÉTICA**

Estudos realizados com seres humanos, incluindo órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Quando pertinente, o trabalho deverá ter aprovação do comitê de ética da instituição onde foi realizada a pesquisa, em consonância com a Declaração de Helsinki, atualizada em 2008. Nos trabalhos experimentais envolvendo animais, devem ser respeitados os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as normas estabelecidas no Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C., atualizada em

2011). As drogas e substâncias químicas eventualmente utilizadas na realização do trabalho devem ser identificadas com precisão. Não devem ser utilizados nomes ou iniciais do paciente nem informados nomes comerciais, de empresas e/ou registros de hospitais.

### **RESPONSABILIDADE DA AUTORIA E CONFLITO DE INTERESSES**

De acordo com as diretrizes elaboradas pelo International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), atualizada em 2013, a autoria deve ser validada para: a) concepção e projeto do trabalho ou aquisição, análise e interpretação dos dados; b) redação inicial do artigo ou revisão crítica do seu conteúdo; c) aprovação final da versão para publicação; d) responsabilidade para todos os aspectos do trabalho, garantindo que questões relacionadas à acurácia ou integridade de qualquer parte do trabalho sejam adequadamente investigadas e analisadas. Todos os autores listados no artigo devem preencher os quatro critérios de validação de autoria para serem designados como tal. Os participantes do trabalho que não preencherem os quatro critérios devem ser incluídos na secção de Agradecimentos (Acknowledgements). O autor principal deve especificar a contribuição de cada um nas diferentes etapas do estudo. Do mesmo modo, o autor principal deve declarar ou negar a existência de possíveis conflitos de interesse. Caso exista algum conflito, ele deve ser especificado como nota no final do artigo.

### **RESUMOS E UNITERMOS**

Independentemente do idioma no qual o trabalho foi escrito, devem constar dois resumos: um em português (Resumo) e outro em inglês (Abstract). Os resumos devem identificar os objetivos, os procedimentos e as conclusões do trabalho (máximo de 250 palavras para artigos originais, artigos de revisão e artigos de atualização; e máximo de 100 palavras para relatos de caso e comunicações breves). Caso o trabalho tenha sido escrito em espanhol, deverá haver um resumo também nesse idioma. Os unitermos, palavras que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de três a seis, utilizando o vocabulário controlado Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da BIREME, acrescidos de outros termos, quando necessário. Devem ser apresentados em português e inglês. Caso o trabalho tenha sido escrito em espanhol, deverá haver descritores também nesse idioma.

### **AGRADECIMENTOS**

Devem ser breves, diretos e dirigidos apenas à pessoa ou à instituição que contribuiu substancialmente para a elaboração do trabalho. Devem ser incluídos após as conclusões e antes das referências bibliográficas.

## **ESTRUTURA DO TEXTO**

### **Artigos originais**

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original que possam ser replicados. Os artigos podem conter até 4 mil palavras. A sua estrutura formal deve seguir o esquema de apresentação do texto para esse tipo de artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

O uso de subtítulos é recomendado, particularmente na Discussão. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser claramente apontadas. Sugere-se o detalhamento do tópico Material e Método. Para esses artigos, exige-se a apresentação de resumos estruturados em português e inglês, com cabeçalhos obedecendo à apresentação formal do artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. O Abstract (resumo em inglês) deve ser precedido pelo título em inglês. As referências bibliográficas devem aparecer no final do texto, obedecendo às normas especificadas a seguir

### **Comunicações breves**

São relatos curtos que devem apresentar: 1) dados de estudos preliminares com achados sugestivos que garantam uma investigação mais definitiva; 2) estudos de replicação; e 3) estudos negativos de tópicos importantes. Esses artigos devem ter até 1.500 palavras, incluir resumo não estruturado e, no máximo, uma tabela ou figura, além das referências bibliográficas.

### **Artigos de revisão**

Serão aceitos apenas mediante convite.

Avaliações críticas sistematizadas da literatura sobre determinado assunto, devem incluir conclusões e ter até 5 mil palavras. A organização do texto, com exceção de Introdução, Discussão e Conclusão, fica a critério do autor. Para esses artigos, exige-se um resumo estruturado no idioma do texto e outro em inglês. Uma lista extensa de referências bibliográficas deve aparecer no final do texto.



### **Relatos de caso**

São trabalhos de observações clinicolaboratoriais originais, acompanhados de análise e discussão. Devem conter até 1.500 palavras. A estrutura deve apresentar, no mínimo, os seguintes tópicos: Introdução, Relato(s) dos(s) caso(s) e Discussão. Incluir um resumo não estruturado no idioma do texto e outro em inglês.

### **Cartas aos editores**

Inclui cartas que visam a discutir artigos recentes publicados na revista ou a relatar pesquisas originais ou achados científicos significativos. Cartas breves, com no máximo 500 palavras (incluindo referências, sem tabelas ou figuras), serão consideradas se estiver explícita a frase “para publicação”.

### **REFERÊNCIAS**

As referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, e ser numeradas sucessivamente pela ordem em que são mencionadas pela primeira vez no texto. Devem seguir as normas do Estilo Vancouver. Os títulos dos periódicos deverão ser referidos na forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se a lista de referências não seguir a norma adotada, os trabalhos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados, quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas; apenas mencionados no texto ou em nota de rodapé. A lista de referências deve seguir o estilo dos exemplos abaixo.

#### **Exemplos:**

- **Artigos de periódicos (um só autor)**

Fry PH. O significado da anemia falciforme no contexto da ‘política racial’ do governo brasileiro 1995-2004. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2005; 12: 347-70. PubMed PMID: 16353330.

- **Artigos de periódicos (até seis autores)**

Barbosa AJA, Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Lima GF Jr, Oliveira CA. Immunocytochemical identification of *Campylobacter pylori* in gastritis and correlation

with culture. Arch Pathol Lab Med. 1988 May; 112(5): 523-5. PubMed PMID: 3282485.

- **Artigos de periódicos (mais de seis autores)**

Rocha GA, Queiroz DM, Mendes EN, et al. Indirect immunofluorescence determination of the frequency of anti-H. pylori antibodies in Brazilian blood donors. Braz J Med Biol Res. 1992; 25(7): 683-9. PubMed PMID: 1342599.

- **Artigo de periódico on-line**

Polgreen PM, Diekema DJ, Vandenberg J, et al. Risk factors for groin wound infection after femoral artery catheterization: a case-control study. Infect Control Hosp Epidemiol [Internet]. 2006 Jan; 27(1): 34-7. Disponível em: <http://www.journals.uchicago.edu/ICHE/journal/issues/v27n1/2004069/2004069web.pdf>.

- **Livros no todo (dois autores)**

Eyre HJ, Lange DP. Informed decisions: the complete book of cancer diagnosis, treatment, and recovery. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; 2002.

- **Capítulos ou parte de livro editado por outro autor**

Mendeenhall WM. Treatment of head and neck cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. Cancer: principles and practice of oncology. 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 729-80.

- **Parte de livro em meio eletrônico**

São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: São Paulo (Estado). Entendendo o meio ambiente. São Paulo; 1999. v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>.

- **Evento em meio eletrônico**

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editores. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.

- **Tese ou dissertação**

Silva MAL. Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com doença falciforme. 2008. [dissertação]. Programa de pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.

- **Citações no texto**

Devem ser identificadas por algarismos arábicos (números-índice). Podem também ser acrescentados o nome do autor e o ano. As referências com mais de um autor devem conter o sobrenome do autor seguido da expressão et al., como, por exemplo, Higashi et al.

**Tabelas e figuras**

As tabelas deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas por seu título, recomendando-se a não repetição dos mesmos dados em gráficos. Na montagem das tabelas, seguir as normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicadas pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993).

As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos etc.) deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras. Devem ser suficientemente claras para permitir sua produção. Os gráficos deverão vir preparados em programa processador de gráficos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto onde as ilustrações serão intercaladas como figuras.

O SGP aceita a importação de tabelas, imagens e gráficos em arquivo eletrônico nos seguintes formatos: jpg, gif, psd, tif e png, e com resolução de no mínimo 300 dpi.

O direito à privacidade do paciente não deve ser infringido. Imagens que eventualmente permitam a identificação pessoal somente poderão ser utilizadas com consentimento por escrito do paciente ou responsável, quando da submissão do manuscrito

**Abreviações e nomes de medicamentos**

As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. Empregar o nome genérico de medicamentos e indicar a fonte de componentes não disponíveis para prescrição.

As unidades de medida, inclusive suas abreviaturas, devem ser expressas no sistema métrico decimal e, quando o autor assim o desejar, também no Sistema Internacional (SI) entre parênteses.

**Contato com a secretaria do JBPML**

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

Tel.: +55 (21) 3077-1400

e-mail: [jbpml@sbpc.org.br](mailto:jbpml@sbpc.org.br)