

O SANGUE SECO NO PAPEL DE FILTRO NO ESTUDO DA GLICOSE E A SUA UTILIDADE NOS ESTUDOS DE TRIAGEM DA POPULAÇÃO

THE DRIED BLOOD ON FILTER PAPER IN THE STUDY OF GLUCOSE AND ITS USEFULNESS IN STUDIES OF POPULATION SCREENING

Juan F Bencomo¹, Antonio JW Castro², Jordi Martí³, Marco AO Appolinário¹, Maria Cláudia U Barreto⁴

Departamento e Instituição onde foi realizado o trabalho: Laboratório BioMarc. Instituto Vital Brazil. Rua Maestro José Botelho, 64, Vital Brazil CEP: 24.230-410. Niterói, RJ - Caixa Postal 100.028. ¹ Doutor em Ciências Médicas. Laboratório BioMarc. Instituto Vital Brazil. ² Diretor Presidente do Instituto Vital Brazil. ³ Mestre em Química. DBS Screening. Parque Científico de Barcelona - Baldiri Reixac 10 - 08028 Barcelona. ⁴ Microbiologista. Diretora do Laboratório de Saúde Pública de Niterói Miguelote Viana. Niterói - RJ.

RESUMO

Introdução: A quantidade de glicose no sangue altera todo o metabolismo, variando de acordo com a quantidade de carboidratos consumidos, e ainda depende de alguns fatores psicológicos e fisiológicos que ocorrem no decorrer do dia. A incorporação da atenção primária da saúde nos serviços de epidemiologia evidencia a importância que tem o marcador glicose nos estudos de triagem para a prevenção do diabetes. Nos estudos de triagem, é fator limitante a inexistência de um método de fácil obtenção da amostra para estudo. A glicólise exige passos estratégicos na logística do programa de triagem populacional. **Objetivo:** Incorporar o papel de filtro (PF) para a determinação da glicose na coleta da amostra do sangue e permitir, com os benefícios da etapa pré-analítica, a realização da triagem populacional e sua automatização na fase analítica, facilitando o processo de triagem e prevenção do diabetes. **Métodos:** Amostra de sangue coletado e conservado em PF é submetida a um processo de eluição com álcool-acetona, originando um eluato que contém a estrutura da glicose. O eluato é adicionado em orifício de microplaca (tipo ELISA) e a glicose presente no mesmo reage com o reagente enzimático, formando um complexo corado final que apresenta o máximo de absorção em 492 nm. Os valores de densidade óptica (DO) são obtidos em um espectrofotômetro ELISA e é calculado o valor da glicose com a cotangente na microplaca, com padrões de concentração conhecidos. O procedimento tecnológico foi validado estatisticamente com o estudo de precisão, exatidão, especificidade, sensibilidade, linearidade e estabilidade. **Resultados:** O estudo de precisão não mostra diferença significativa para $P < 0,001$ entre o procedimento de repetibilidade no plasma e no PF. O rechaço da H_0 , no estudo da especificidade pelo processo de Fisher e Student, aceita uma especificidade semelhante à da técnica de glicose clássica no plasma. O teste de recuperação não refere valores acima de 105%. O resultado da sensibilidade para a detecção da glicose demonstrou qualidade até 25 mg% com $CV = 3,9\%$. O resultado do estudo de linearidade para quatro diluições do valor inicial de glicose (150 mg%) mostra que os cálculos da porcentagem de recuperação são menores do que 105% e sua correlação entre o valor esperado e o observado é de $R = 0,999$ ($p < 0,001$). A estabilidade da glicose no PF chega a 56 dias em 4-8°C. **Conclusão:** Os resultados apresentados neste trabalho demonstram a possibilidade, com alta confiabilidade, de usar uma técnica para a determinação da glicose em sangue seco no PF e contribuir, com este procedimento automatizado, para a triagem de populações de risco para diabetes, especialmente na idade pediátrica.

Palavras-chave: glicose, glicose no papel de filtro, diabetes, glicemia

ABSTRACT

Introduction: The amount of glucose in whole blood alters metabolism, varying with the quantity of carbohydrates consumed and also depends on certain psychological and physiological factors which occur during the day. The incorporation of primary health care in the epidemiologic services, is an evidence of the importance of the glucose marker in screening studies in the prevention of diabetes. In screening studies, the limiting factor is not having an easy method of obtaining the sample to study. Glycolysis requires strategic steps on the logistic on the selection of population screening program. **Objective:** To incorporate the filter paper (PF) for the determination of glucose in the blood sample collection and allow, with the benefits of pre-analytical stage, the implementation of population screening and automation in its analytical phase, facilitating the process of screening and prevention of diabetes. **Methods:** Sample of blood was collected and preserved in filter paper, and submitted to a process of elution with alcohol-acetone originating an eluate that contains the structure of the glucose. The eluate was added into a micro plate hole (cell culture type) and the present glucose in the sample was determined with an enzymatic reaction, developing a colored final complex that presents its maximum of absorption to 492 nm. The values of optical density were reader in an ELISA spectrophotometer and the concentration of glucose was calculated with the cotangent obtained using standards of known concentration. The technological procedure has been validated statistically by means of studies of precision, accuracy, specificity, sensibility, linearity and stability. **Results:** The precision study did not show any significant difference for $p < 0.001$ between the procedure of repetitively between samples of plasma and filter paper. The rejection of H_0 in the study of specificity following the process of Fisher and Student accepts a similar specificity with the classic glucose in plasma technology. The test of recovery did not give values over 105%. The result of sensibility for the detection of glucose showed quality up to 25 mg% with $CV = 3.9\%$. The result of the study of linearity for four dilutions with the initial value of glucose (150 mg%) sample showed a recovery percentage minor that 105% and, the correlation between the expected and observed value was $R = 0.999$ ($p < 0.001$). The stability of the glucose in filter paper came to 56 days at 4-8°C. **Conclusion:** The results presented in this work demonstrate the possibility, with a high reliability of using this technology, of determine glucose levels on dry blood collected in paper of filter, contributing to screening, with this automated procedure, of populations in risk of suffering diabetes, especially in pediatric age.

Keywords: glycemia, glucose, dried filter paper blood spots, diabetes

Endereço para correspondência:

JUAN FIDEL BENCOMO GÓMEZ

Laboratório BioMarc. Instituto Vital Brazil
Rua Maestro José Botelho, 64, Vital Brazil, Niterói
CEP: 24.230-410 - Cx Postal: 100.028 - Rio de Janeiro
E-mail: jfbg440114@yahoo.com

Recebido em: 29.08.2012

Aprovado em: 14.09.2012

INTRODUÇÃO

A glicose é um monossacarídeo formado através do metabolismo e constitui o nutriente mais comum na dieta diária das pessoas, sendo usado pelas células como fonte de energia e como componente do metabolismo intermediário. Todos os carboidratos ingeridos pelo organismo são transformados em glicose¹.

A quantidade de glicose no sangue altera todo o metabolismo, variando de acordo com a quantidade de carboidratos

consumidos e, ainda, depende de alguns fatores psicológicos e fisiológicos que ocorrem no decorrer do dia. Trilhões de células do organismo são alimentadas pela glicose, porém, para penetrar nas células, ela precisa de um acompanhante biológico, que é a insulina. A insulina é uma substância química produzida pelo pâncreas; contudo, nos casos do diabetes tipo 1, o pâncreas não produz insulina, e nos casos de diabetes tipo 2, produz uma quantidade insuficiente de insulina^{1,2}.

O marcador ideal para o estudo de prevenção e seguimento do diabetes continua sendo a glicose. A glicose no plasma, no soro e em outros líquidos corporais (urina, líquido cefalorraquidiano, ascite, líquido pleural etc.) é usada para estudar as alterações do metabolismo dos carboidratos. No laboratório analítico, o processo de medição da glicose é realizado através dos métodos de oxidação-redução, condensação e até enzimáticos²⁻⁷.

A incorporação da atenção primária da saúde nos serviços de epidemiologia evidencia a importância do marcador glicose na triagem para a prevenção do diabetes. Nestes estudos de triagem, a falta de um método de fácil obtenção da amostra é uma grande limitação para estabelecer os passos estratégicos na logística da seleção do programa populacional.

A introdução da prática do papel de filtro (PF) nos estudos populacionais foi realizada por Guthrie e Susi, em 1963, quando foi demonstrada sua utilidade no diagnóstico precoce da fenilcetonúria em neonatos⁸, embora suas vantagens no transporte e na logística tivessem sido aproveitadas por autores japoneses na estocagem de amostras de soro⁹. O PF tem se mostrado superior, quando comparado com outros sistemas de coleta, pela facilidade no transporte e conservação simples, que pode ser, inclusive, em temperatura ambiente, sem que seja alterada a qualidade de seus processos técnicos e sua estabilidade⁵⁻¹². Todos estes atributos o fazem um método alternativo altamente confiável e de um custo-benefício favorável na aplicação dos programas de prevenção⁵⁻¹⁷.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi incorporar, na coleta da amostra do sangue, o PF para a determinação da glicose e permitir, com os benefícios da etapa pré-analítica, facilitar a triagem populacional e sua automatização na fase analítica, auxiliando o processo da triagem populacional e a prevenção do diabetes.

MÉTODOS

A aplicação do PF para a prevenção do diabetes utilizando glicose como marcador estabelece a premissa do uso do sangue capilar como amostra biológica. Os capilares são vasos sanguíneos muito finos, localizados entre as artérias e as veias, e sua responsabilidade fisiológica essencial é entregar o oxigênio aos tecidos. O teste de sangue capilar nos dedos é comumente usado para a determinação de glicemia. Estes fatos biológicos e outros, como a possibilidade de edema nos dedos da gestante em períodos avançados da gravidez, poderiam causar discrepância nos valores esperados, por isto, é recomendada a padronização populacional do universo a estudar antes da triagem.

Princípio da técnica da glicose

Amostra de sangue coletado e conservado em PF é submetida a um processo de eluição álcool-acetona, originando um eluato que contém a estrutura da glicose. O eluato é adicionado em orifício de microplaca (tipo ELISA) e a glicose presente no mesmo reage com os reagentes enzimáticos (glicose-oxidase), formando um complexo corado que apresenta o máximo de absorção em 490-520 nm²⁴. Os valores de densidade óptica (DO) são obtidos em um espectrofotômetro ELISA.

Fluxo tecnológico

O método enzimático, amplamente usado no laboratório moderno, tem elevada especificidade devido à ação das enzimas glicose-oxidase ou hexoquinase sobre a glicose, para formar ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, quando ocorre a reação de cor apresentada e específica da reação enzimática^{2,4}. As propriedades do papel de filtro, mantendo a estrutura da glicose e constituindo um meio viável para a coleta das amostras do sangue seco, junto aos atributos das placas ELISA e sua propriedade de processar um número significativo de amostras, enquadram-se na proposta do desenvolvimento do marcador de glicose no PF para aplicação em triagem populacional.

Para aplicação do suporte automatizado e obtenção de êxito da hipótese do estudo, foi necessário avaliar variantes convencionais existentes no laboratório atual, a fim de racionalizar os recursos financeiros e extrair do projeto um novo desenho do suporte instrumental. Esta automatização está aprovada na aplicação dos benefícios obtidos com a microplaca ELISA e os sistemas automatizados integrados de leitura simultânea que, com o auxílio da informática, podem garantir uma formulação rápida, simples e eficiente da tecnologia no PF.

Eluição do componente biológico

Nas técnicas desenvolvidas no PF para estudos de marcadores biológicos, tem sido usado o procedimento por fenômeno de eluição, em que os marcadores biológicos, inclusive os inorgânicos, deverão ser obtidos no líquido coletor chamado eluato. A extração do eluato pode ser feita com diferentes diluentes, dependendo de cada um dos marcadores do sangue. Neste estudo, foi ensaiado um procedimento de seleção num meio orgânico desenvolvido com acetona e etanol.

Análises do papel de filtro

Nos resultados obtidos com diferentes técnicas para determinar marcadores biológicos no PF, têm sido usadas características físicas semelhantes às apresentadas pelas empresas Schleicher & Schuell¹⁸ e Whatman¹⁹, e as apresentadas ultimamente pela empresa Hahnemuehle FineArt²⁰. Depois da comprovação da qualidade e da análise do custo-benefício dos diferentes PF oferecidos no mercado, foi selecionado o papel da empresa Hahnemuehle²⁰. A quantidade coletada no papel de filtro a partir do aporte de uma gota do sangue é de aproximadamente 25 µL de volume, e esta medida foi usada como parâmetro para calcular o tamanho do picotador, que determinará o diâmetro da fração do PF a estudar na reação de extração (eluição).

Especificações do papel de filtro

Empresa: Albert-Hahnemuehle, S.L.; Tipo: BSM0705; Composição: algodão branco; Peso: 186,0 g/m²; Espessura: 0,69 mm; Resistência mecânica: (N/m MD) 5289,0 (N/m CD); Rapidez: 260 mg/min; Permeabilidade Frazier: 64,0 L/m²/s 196 Pa; Resistência molhado: 101,6 cm; Entrelaçado: 22,0 µmol.

Amostra biológica

Pode ser usada a amostra do sangue da punção do dedo, da orelha ou venoso, até mesmo com anticoagulantes como heparina, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), oxalato ou fluoreto. Em todos os casos, o sangue deve ser seco no ar livre, evitando a contaminação. Posteriormente, a amostra pode ser conservada em temperatura ambiente por 1 semana ou 56 dias, quando conservada entre 2 e 8°C (demonstrado posteriormente no estudo de estabilidade).

Esquema do teste

O processo de eluição é realizado colocando 150 µL de solução acetona-etanol "AE" num microtubo com tampa, devidamente sinalizado, e um picote de papel de filtro de 4,7 mm contendo o sangue seco. Deixar em temperatura ambiente por 2 horas, com agitação de 150-200 rpm.

O eluato é dispensado nos orifícios da microplaca ELISA a partir da posição E1 e até H12. Os orifícios A1-A2 são brancos e C1 e D1 são padrões de concentração conhecida para o cálculo da cotangente. Em todos os poços, é colocada a solução de glicose enzimática, sua absorbância será lida numa leitora de placas micro-ELISA no filtro 492 nm e sua concentração será calculada com a cotangente obtida entre a absorbância e a concentração dos padrões (**Tabela 1**).

Qualificação do processo analítico apresentado

Os passos técnicos feitos para quantificar a glicose no sangue seco no PF foram se incorporando sem afetar a reação final do procedimento, embora, como todas as reações bioquímicas, seja necessário aplicar todos os parâmetros estatísticos para que os resultados oferecidos possam estar totalmente livres de erros e insegurança²¹, em que se destacam os erros aleatórios inerentes aos métodos analíticos que alteram os resultados²².

Para obter tal incidência, o laboratório deve ter alta confiabilidade nos métodos usados e contar com a certificação de qualidade dos procedimentos estatísticos necessários²². Isto é responsabilidade dos pesquisadores envolvidos no desenvolvimento tecnológico e dos laboratórios fabricantes de reativos^{23,24}, com os recursos mínimos conferidos pela Confederação Latino-Americana de Bioquímica Clínica (COLABIOCLI)²⁵, as normas do *European Committee for Clinical Laboratory Standards* ECCLES (1987)²⁶, no contexto da aplicação dos testes de Exatidão, Precisão, Sensibilidade, Especificidade, Linearidade e Paralelismo²¹⁻³⁹, e da legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA/MS)^{31,32}.

Tabela 1 – Fluxo tecnológico

Insumos	Amostra (Orifício E1-H96)	Branco (Orifício A1-B1)	Padrão 100 mg% (Orifício C1-D1)
Eluato AE	150 µL		
Picote PF 4,7 mm	1		
Picote PF (Padrão)			1
<i>Incubar a 37°C por 2 horas com rotação de 150-200 rpm</i>			
Eluato	35 µL		
Tampão	165 µL	200 µL	180 µL
<i>Repouso a 37°C por 15 minutos e ler em 490-510 nm</i>			

[A] = Ctg × [DO (amostra) – DO (branco)]

Onde:

[A] = concentração de glicose na amostra

DO (amostra) = densidade óptica da amostra

DOP = média da densidade óptica obtida para os orifícios (B1) e (C1) do padrão no PF

Ctg = Cotangente = DO Padrão/Concentração do padrão no PF

Validação e padronização da técnica colorimétrica proposta

Para se obter os primeiros resultados de confiabilidade e seguir o roteiro do ensaio de padronização e validação da técnica estudada, foi calculada a precisão da técnica, a fim de definir a reprodutibilidade dos resultados e a especificidade. E também como componente estatístico de segurança, para garantir uma reação sem interferências e determinar que seus valores sejam, significativamente, iguais aos de uma técnica padrão-ouro. No procedimento apresentado são usados os reagentes da Empresa MBIolog, de Belo Horizonte-MG, com registro: MS 80047580130⁴⁰.

Influência do hematócrito

Foram selecionados quatro grupos de diferentes valores de hematócrito: 28-32, 33-36, 37-40, 41-44 Vol% e foi estudada a glicose no plasma pela técnica padrão-ouro e no PF pela técnica apresentada. Os quatro grupos de valores foram processados para a comparação das variâncias segundo o teste T.

Análise estatística

Precisão: Foi expressa pelo grau de dispersão entre medições independentes a partir de uma mesma amostra, de amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas, e representada matematicamente pelo coeficiente de variação (CV), que é o valor percentual obtido do quociente do desvio médio (DM), dividido pela média (M) dos valores. A precisão pode ser medida dependendo de seus dois níveis de ensaios: repetitividade e reprodutibilidade^{26,27}.

Especificidade analítica: Nos processos analíticos, expressamente naqueles baseados em princípios bioquímicos, é avaliada a especificidade quando o grupo de valores (n ≥ 25) é comparado com um processo estatístico de comparação de variâncias com valores de outra medição da mesma amostra com um método analítico padrão-ouro (n ≥ 25)²⁸⁻³⁰.

Exatidão: A ANVISA estabelece, para a medição da exatidão, a comparação estatística dos resultados da análise pelo novo método com os resultados teoricamente exatos, e sua forma fica para este estudo, dopando uma matriz branca com o marcador estudado (glicose) para o cálculo da taxa de recuperação das quantidades conhecidas de dopante^{31,32}. A técnica de PF apresentada foi submetida ao cálculo do coeficiente de correlação com os valores teóricos como variáveis independentes com os valores obtidos, com o incremento de quatro alíquotas diferentes. O objetivo foi testar o percentual do incremento com o cálculo percentual de recuperação. Os valores esperados foram 0,5 mg%, 0,75 mg%, 1 mg% e 1,5 mg%, com a técnica de referência (glicose-oxidase).

Sensibilidade analítica: Para os cálculos da sensibilidade para a medição da glicose no procedimento no PF, foi usada uma modificação da técnica de Dharán³⁰ partindo da fórmula que usa, como variável geral, o desvio médio observado (DMO), partindo do cálculo do quociente entre o valor esperado (VE) real da glicose e o valor observado (VO), dividido pelo desvio médio esperado (DME) dos valores.

Linearidade: No ensaio de linearidade foi usado o valor esperado de cada diluição como variável independente na análise de correlação, e o conjunto dos valores foi processado para conhecer o valor de recuperação em cada ponto.

Estabilidade: O kit para a determinação de glicose no plasma ou no soro pela técnica de glicose-oxidase é certificado pela ANVISA (Registro MS 80047580130)⁴⁰ e mantém a qualificação da estabilidade de seus reagentes e componentes no processo técnico. Assim, a estabilidade no processamento apresentado garante a estabilidade da amostra do sangue seco no PF e a confiabilidade do processo tecnológico apresentado para reproduzir seus valores iniciais.

Doadores: Para estes ensaios foram usadas amostras de doadores voluntários selecionadas no contexto da instituição (Instituto Vital Brazil), pessoas sãs, selecionadas no Laboratório Miguelote Viana de Niterói, RJ, e grávidas selecionadas do universo de estudo do projeto para a avaliação dos testes infecciosos de triagem do Programa Pré-Natal do Estado de Rio de Janeiro. Para isso foi assinado o Termo de Consentimento estabelecido de acordo com as normas da ética médica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do hematócrito

Os quatro grupos selecionados com diferentes valores do hematócrito para o estudo da glicose no plasma e no PF são expostos na **Tabela 2**. Os valores de glicose no plasma e no PF em cada grupo foram processados segundo o ensaio estatístico de homogeneização das variâncias (teste T), e não se encontrou diferença significativa ($P < 0,001$).

Precisão

O intraensaio com a repetição dos valores da glicose no plasma (doador) com os reagentes da MBIolog foram ($N = 96$) $X \pm DM = 82,6 \pm 1,26$ mg%, para um coeficiente de variação (CV) de 1,5%. Estes resultados na precisão geral conferem-lhe confiabilidade para ser usada como padrão-ouro nos ensaios comparativos com a técnica para a quantificação da glicose no PF³⁵⁻³⁸. No estudo de reprodutibilidade intraplaca no PF com a

Tabela 2 – Valores de glicose no plasma e no PF nos diferentes grupos com valores identificados de hematócrito

Hematócrito (Vol%)	Glicose no Plasma	Glicose no PF
28-32 (N = 8)	86,8 ± 1,8	85,4 ± 1,2
33-36 (N = 10)	78,6 ± 0,9	82,4 ± 1,5
37-40 (N = 7)	68,6 ± 2,5	72,4 ± 2,1
41-44 (N = 6)	88,6 ± 1,9	82,4 ± 1,9

amostra validada no plasma ($X \pm DM = 82,6 \pm 1,26$) resultou um valor de $X \pm DM = 86,2 \pm 3,26$ mg% e um CV = 3,78%. O estudo de comparação das médias por homogeneização das variâncias (teste T) não mostrou diferença significativa para $P < 0,001$ entre o procedimento de repetibilidade no plasma e no PF.

O ensaio da precisão pelo estudo interplaca colocou os valores de glicose no plasma em ($N = 6$) $X \pm DM = 72,6 \pm 2,26$ mg%, para um coeficiente CV de 3,11% e os valores de glicose no PF em ($N = 6$) $X \pm DM = 76,6 \pm 3,36$ mg%, para um CV de 4,38%. O estudo de comparação das médias por homogeneização das variâncias (teste T) não mostrou diferença significativa para $P < 0,001$ entre o procedimento de repetibilidade no plasma e no PF.

Especificidade analítica e exatidão

As análises para comprovar o critério de especificidade da quantificação da glicose no PF do método apresentado foram acompanhadas pelo ensaio de comparação dos valores de glicose no PF e no plasma em um grupo de 60 amostras de sangue de pessoas supostamente sãs, selecionadas do universo atendido no Laboratório Miguelote Viana (Niterói, RJ) e de trabalhadores do Instituto Vital Brazil (IVB), de Niterói, RJ. Foi feito prévio conhecimento e assinatura do Termo de Consentimento por escrito, e as amostras estavam livres de doenças infecciosas.

No procedimento estatístico foi usado o teste T para homogeneização de variâncias, partindo do rechaço da hipótese nula (H_0), já que a especificidade dos métodos é diferente, de se oferecer um ponto inicial de $\alpha = 0,05$. Nestes casos (complemento da H_0), foi medida a probabilidade de que ambos os grupos de dados sejam correlacionados mediante a reta de regressão, também para um ponto inicial de segurança de $\alpha = 0,05$.

O rechaço da H_0 no estudo de homogeneização de variâncias aceita uma especificidade na técnica de glicose no PF semelhante à da técnica de glicose clássica no plasma, considerada no estudo como método padrão-ouro (**Tabela 3**).

Destaca-se no estudo de homogeneização das variâncias uma semelhança entre os resultados da glicose nos dois grupos (plasma e PF), demonstrando que o valor de $P < 0,001$ ($T = 2,258$) rechaça o argumento fixado da H_0 e confirma que a semelhança da especificidade entre ambas as técnicas confere confiabilidade para o uso da técnica do PF.

Mesmo que, na análise anterior, o teste de correlação linear mostrado na **Figura 1** demonstre a semelhança qualitativa com amostras de valores superiores de glicose, esta correlação significativa com valor de $P < 0,001$, ratifica que os valores de ambos os procedimentos têm a mesma exatidão, já que as duas técnicas apresentam especificidade semelhante.

A análise para medir a exatidão do processo analítico para PF (**Tabela 4**) com o teste de recuperação demonstra como

Tabela 3 – Valores de glicose no plasma e no PF pelas duas técnicas estudadas para sua comparação com o teste T de homogeneização das variâncias

Amostras	Plasma	PF	Amostras	Plasma	PF	Amostras	Plasma	PF
1	96	95	21	65	69	41	95	98
2	96	94	22	96	92	42	96	92
3	85	87	23	86	82	43	69	72
4	69	72	24	52	48	44	59	63
5	59	62	25	69	62	45	38	42
6	94	98	26	86	74	46	57	64
7	93	90	27	79	75	47	59	62
8	90	92	28	96	92	48	68	72
9	92	89	29	63	72	49	64	70
10	89	87	30	85	79	50	69	72
11	87	85	31	74	79	51	95	92
12	85	82	32	96	100	52	87	80
13	75	78	33	65	75	53	84	86
14	78	73	34	98	94	54	86	89
15	48	52	35	78	82	55	86	88
16	69	72	36	49	51	56	95	95
17	62	69	37	58	53	57	68	67
18	59	72	38	69	72	58	45	49
19	82	74	39	86	84	59	59	61
20	74	78	40	96	100	60	92	90
X Plasma		76,61			X Plasma		76,83	
SD Plasma		13,7			SD Plasma		12,23	
T (Plasma-PF) = 2,258 sem diferença significativa entre ambos os grupos P < 0,001								

os valores obtidos para as quatro amostras de concentrações adulteradas obtiveram o valor final de: 74,6, 94,6, 114,6 e 154,6 mg%, tendo resultados abaixo dos 15% aceitos pela *Food and Drug Administration* (FDA)⁴² e ANVISA^{31,32,43} para segurança e confiabilidade do procedimento⁴⁴⁻⁴⁶.

Sensibilidade analítica: Os critérios da ECCLS²⁶, ANVISA^{31,32} e *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)³⁴ estabelecem valores confiáveis de sensibilidade no estudo de quantificações baixas do marcador validado baseados no cálculo da precisão no ponto baixo estudado, e o valor de CV

mantém sua posição abaixo do nível admitido para a bioquímica clínica (CV < 10%). Neste caso, os resultados da valoração da precisão no valor mais baixo de glicose neste ensaio (25 mg%) de 3,90% e, os valores de 1,73%, 2,94% e 1,64%, para as concentrações de 50,00 mg%, 75,00 mg% e 100,00 mg%, respectivamente, indicam que o procedimento apresentado (glicose no PF) tem confiabilidade para a detecção de valores em torno de 25 mg%.

O resultado da sensibilidade para a detecção quantitativa do marcador glicose é apresentado na **Tabela 5**, aportando

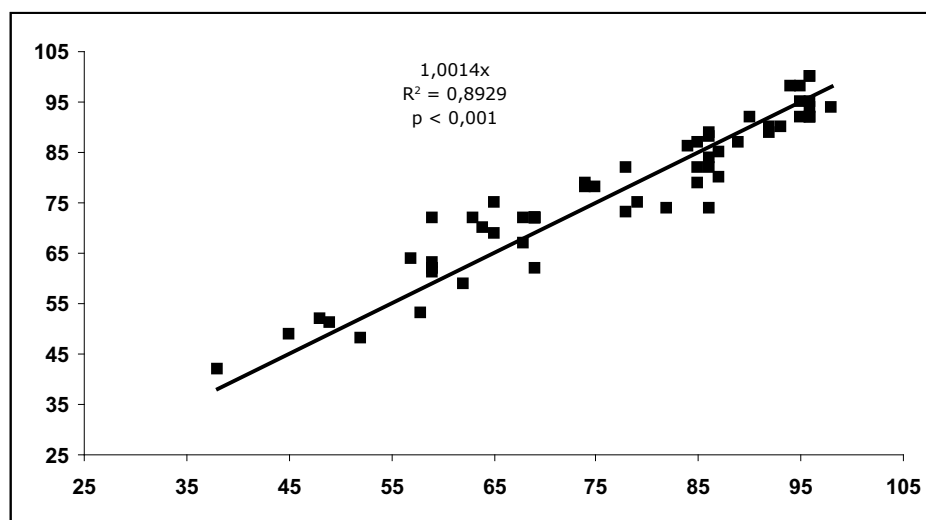


Figura 1 – Correlação entre os valores da glicose na técnica do plasma padrão-ouro e no PF em pessoas supostamente sãs do Laboratório Miguelote Viana.

Tabela 4 – Representação do resultado do estudo de recuperação para medir a exatidão da técnica de glicose no PF

Valor inicial	Valor da amostra para agregar	Volume agregado	Concentração final	Número de repetições	Concentração obtida	Porcentagem de recuperação
100 µL 82 mg%	60 mg%	50 µL	74,6 mg%	N = 5	78,2 mg%	104,8%
100 µL 82 mg%	60 mg%	100 µL	94,6 mg%	N = 5	89,8 mg%	96,2%
100 µL 82 mg%	60 mg%	150 µL	114,6 mg%	N = 5	116,2 mg%	101,3%
100 µL 82 mg%	60 mg%	250 µL	154,6 mg%	N = 5	156,8 mg%	102,7%

uma informação no processo de padronização da qualidade da técnica da glicose no PF proposta na hipótese do estudo. Os valores da DMO são sinais de confiabilidade nos valores mais baixos estudados no processo de repetitividade e confirmam a possibilidade de que o uso da placa de ELISA para o formato tecnológico é possível no esquema de um desenho automatizado para estudos de triagem.

Depois dos ensaios que demonstram precisão, especificidade, exatidão e sensibilidade, o processo de validação inicia uma etapa para medir dois fatores na aplicação de uma tecnologia com boas práticas de qualidade: a *linearidade* e a *estabilidade* do procedimento das amostras a estudar.

Linearidade: No resultado do estudo de linearidade para quatro diluições do valor inicial de glicose (150 mg%) são mostrados os cálculos da percentagem de recuperação (**Tabela 6**) com valores menores que os limites aceitos para os ensaios de exatidão em bioquímica clínica ($R < 110\%$)^{25,26,31,32,34,47,48}. Do mesmo modo, os valores encontrados no coeficiente de correlação demonstram uma segurança no critério da exatidão entre os VE e os VO do ensaio com um valor de $R = 0,999$ ($p < 0,001$).

A análise do ensaio feito para demonstrar a linearidade no procedimento apresentado para a glicose no PF comprova a reprodução dos valores do marcador estudado e confere-lhe, no ordenamento do processo técnico, uma propriedade de

confiabilidade para estudos de concentrações elevadas e baixas de glicose. A curva de calibração mostrada na **Figura 2** demonstra como é possível ter uma constante de absorvância para o procedimento apresentado com comprimento de onda (λ) = 472 nm.

Estabilidade: A **Tabela 7** apresenta o primeiro tempo do estudo desde o momento inicial do seguimento até o momento 9, que representa, aproximadamente, o dia 56 do início do estudo de estabilidade. Destaca-se que em todos os momentos foi praticado um ensaio de comparação de médias com o teste de Student e Fischer (teste T P > 0,05) e não foi detectada variação nas concentrações dos pares de valores centrais, quando foram comparados com o valor inicial ($98,8 \pm 2,58$ mg%) que foi usado em todo o ensaio de estabilidade como ponto de referência.

Para demonstrar os resultados obtidos no seguimento longitudinal, representados na **Figura 3**, visualmente se observa uma tendência dos valores de glicose, no PF conservado em temperaturas entre 2-8°C, ficarem em torno do seu valor inicial até 56 dias após o início do estudo longitudinal. Nesta representação são colocados oito momentos da variável tempo e, nas ordenadas, os valores em mg% da glicose nos diferentes momentos do estudo.

Tabela 5 – Representação dos valores obtidos no estudo de sensibilidade (Dharán)³⁰ com os ensaios de repetitividade de valores de glicose.

Estudo da sensibilidade com a reprodutibilidade dos padrões de glicose confirmados com a técnica padrão-ouro						
Nº	0,00 mg%	25 mg%	50 mg%	75 mg%	100 mg%	
1	0,00	24,50	51,30	76,00	102,00	
2	0,00	25,00	52,00	75,80	101,00	
3	0,00	24,50	50,00	73,80	100,50	
4	0,00	23,50	50,20	74,50	105,20	
5	0,00	26,00	51,60	74,90	100,80	
6	0,00	23,20	52,30	76,50	98,50	
7	0,00	23,60	50,60	76,20	97,50	
8	0,00	25,20	52,60	78,50	94,50	
9	0,00	26,00	50,20	74,20	100,00	
10	0,00	24,20	49,20	79,50	105,00	
11	0,00	23,90	48,90	74,20	102,00	
12	0,00	24,20	50,25	73,20	103,00	
13	0,00	24,20	50,25	73,20	103,00	
14	0,00	25,90	49,30	77,50	98,00	
15	0,00	23,90	52,80	79,20	99,00	
VO	0,00	24,61	50,83	75,88	100,73	
VE	0,00	25,00	50,00	75,00	100,00	
DME	0,00	0,52	0,65	1,50	1,48	
DMO	0,00	0,96	0,88	2,23	1,65	
CV	0,00	3,90	1,73	2,94	1,64	

Tabela 6 – Representação dos valores da glicose no estudo da linearidade onde o valor inicial de 150 mg% é submetido a diluições contínuas.

Valor esperado 1	X	DM	CV	Recuperação
VE = 150 mg%	(N = 10) 150,5	0,09	0,0598	100,00%
Diluição = 25%				
Valor esperado 2	X	DM	CV	Recuperação
VE = 112,5 mg%	(N = 10) 114,3	1,75	0,02	101,60%
Diluição = 50%				
Valor esperado 3	X	DM	CV	Recuperação
VE = 75 mg%	(N = 10) 77,5	2,25	2,90	101,60%
Diluição = 75%				
Valor esperado 4	X	DM	CV	Recuperação
VE = 37,5 mg%	(N = 10) 38,6	1,15	2,90	101,60%

VE = valor esperado

VO = valor obtido

DM = desvio médio

CV = coeficiente de variação

O processo tecnológico usando a reação bioquímica clássica da glicose-oxidase, a praticidade das microplacas de 96 posições tipo ELISA para apoiar a automatização e as novidades tecnológicas do PF para conservar os componentes biológicos no sangue seco colocaram a hipótese do surgimento de uma inovação tecnológica, ao se obter um componente químico que extraia o marcador glicose do PF. A associação de acetona e etanol consegue realizar esta proeza, ao estabelecer uma solução capaz de retirar o monossacarídeo do sangue seco no PF.

Nos estudos de estruturas bioquímicas de composição proteica, a seleção do eluato tem como limitante a estabilidade da força iônica e os parâmetros estabelecidos para as soluções isotônicas. Este preceito é considerado porque os estudos de proteínas específicas, em sua maioria, são realizados por procedimentos imunoenzimáticos (ELISA), que precisam de alta especificidade na reação antígeno-anticorpo, e para isso é necessária a conservação intacta dos pontos (epítipo) de união entre as duas estruturas. Este não é o caso.

As soluções alcoólicas têm sido utilizadas para o processo de extração de compostos biológicos das amostras de sangue seco

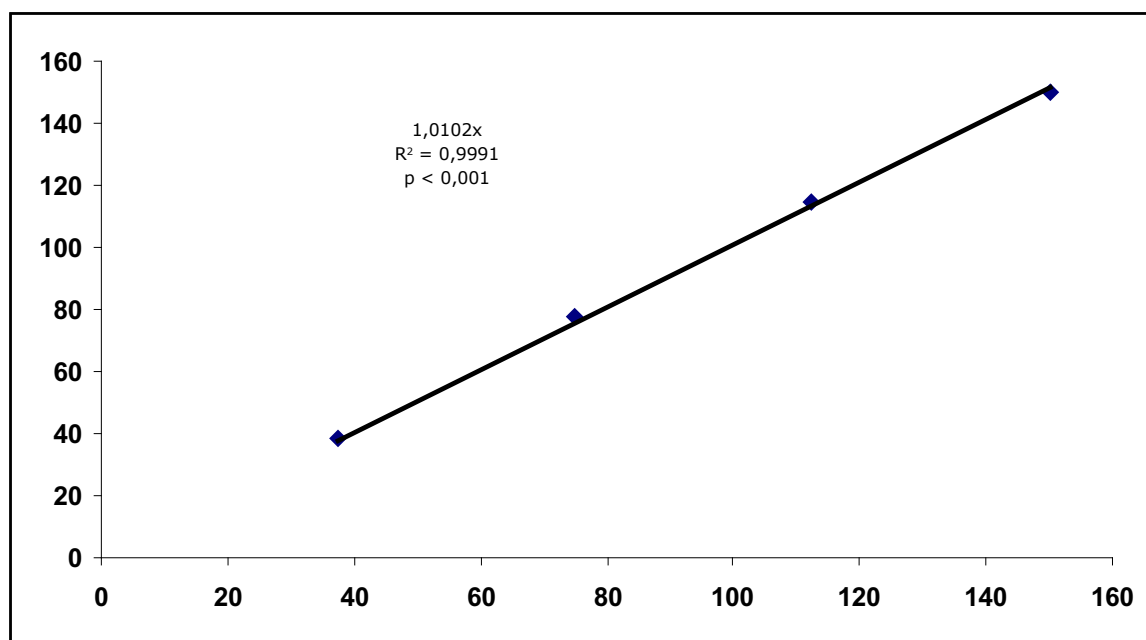


Figura 2 – Representação gráfica da correlação do ensaio de linearidade entre os VE colocados como variáveis independentes e VO como variáveis dependentes.

Tabela 7 – Representação do estudo de estabilidade para a técnica da glicose no PF com os valores de um marcador no PF nos oito momentos do seguimento longitudinal a partir da amostra inicial.

Indicadores estatísticos	Glicose de referência Papel de filtro	Valores de glicose no PF em diferentes momentos do estudo longitudinal							
		1	2	3	4	5	6	7	8
N	54	7	8	9	5	10	6	8	9
X	98,8	97	96	98	102	96	95	96	102
DM	2,58	1,25	1,58	2,5	2,8	1,25	0,58	2,5	1,89
CV	2,61	1,29	1,65	2,55	2,75	1,30	0,61	2,6	1,85

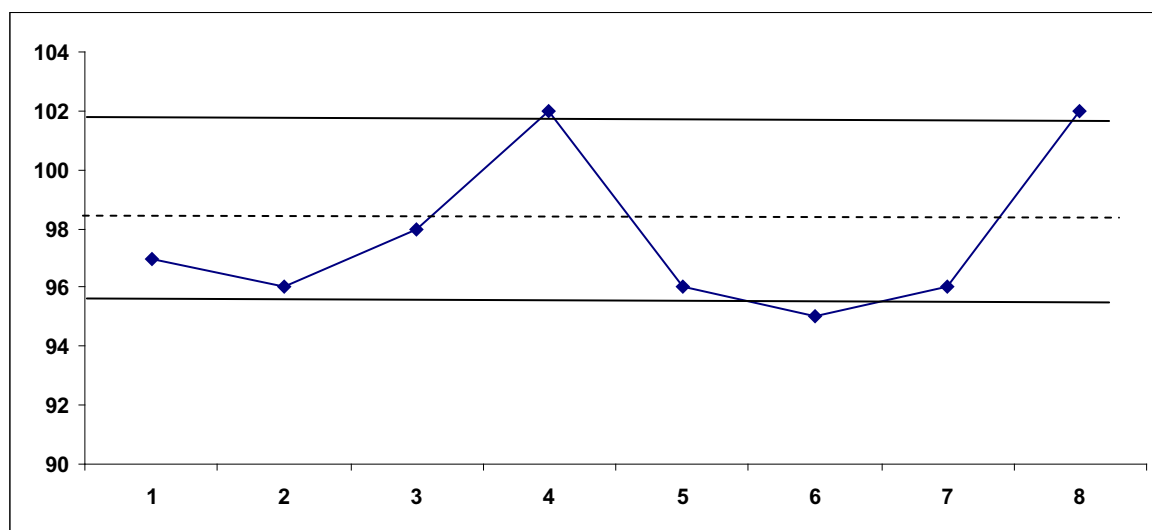


Figura 3 – Representação gráfica dos valores obtidos no estudo longitudinal com as amostras do sangue seco no PF a partir do valor inicial e até 56 dias depois da primeira determinação.

no PF^{8,12,49-54}. Dentro destes casos, as soluções com base de metanol foram usadas para a eluição de galactose em estudos quantitativos^{13,55-57} e para o estudo de colesterol e triglicérides contidos no sangue seco no PF^{50,58,59}. O etanol em concentrações elevadas (70%) é usado na extração da fenilalanina, para a triagem de PKU, doença causada pela deficiência da atividade da enzima fenilalanina-hidroxilase^{8,10,12}.

A hipótese teórica de usar álcoois de baixo peso molecular, como o etanol e metanol, como diluentes na extração de componentes biológicos do sangue seco contido no PF, surgiu pela facilidade que suas estruturas têm de formar pontes de hidrogênio entre si. Esta característica de ter um átomo de hidrogênio unido a um de oxigênio tem como consequência o compartilhamento dos elétrons. Estes são mais atraídos pelo oxigênio que pelo hidrogênio, provocando uma leve carga negativa sobre o oxigênio e outra positiva no hidrogênio.

A mistura de acetona com etanol poderia provocar um fenômeno de desnaturação do etanol por ação da acetona, como acontece com o fenômeno da desnaturação do etanol pelo metanol⁵⁹, o que favorece ainda mais sua propriedade como eluente, especialmente daquelas substâncias que têm origens orgânicas, como as monoestruturas dos carboidratos (monossacarídeos), os monopeptídeos (alguns aminoácidos) e muitas das monoestruturas do catabolismo da creatinina e dos grupos nitrogenados, como é o caso da creatinina e da ureia, respectivamente. Aliás, a propriedade dos dois álcoois para quebrar o enlace C–OH ou O–H origina a mistura do etanol com o metanol e, neste caso, com a acetona, uma característica especial para a extração e dissolução de componentes mono e biorgânicos (especialmente) no sangue seco, que fortalece sua característica como eluente de excelência.

CONCLUSÃO

Os resultados teóricos, práticos e estatísticos apresentados e analisados neste trabalho demonstram que existe a possibilidade de usar com alta confiabilidade uma técnica para a

determinação da glicose no sangue seco no PF, e contribuir para estudar, com um procedimento automatizado, a triagem de populações em risco de diabetes, especialmente na idade pediátrica.

Conflito de interesses

Os autores são funcionários contratados do laboratório Bio-Marc, do Instituto Vital Brazil, órgão ligado à SESDEC (Secretaria de Estado de Saúde e Defesa Civil) do Rio de Janeiro. O projeto foi financiado totalmente pela SESDEC, como projeto-piloto no Programa de Proteção à Gestante do Estado do Rio de Janeiro (Pró-Mãe).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of Diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993;329:977-986.
2. Fon KH, Miller K, Henry A, Steven AM, Allen B, Illivian C et al. Updates about several methods use in diabetics for determination of glucose and paraprotein. *Emb journal*. 2004;12:725-8.
3. Campbell AM. Enzymatic assay using specific antibodies for determination of haemoglobin glycosylated in diabetic patient. 2004;24(Suppl 3):20-5.
4. Harlow E, Lare E. Laboratory test for exploration of metabolism disorder. *J Biol Chem*. 2003;100:525-50.
5. Winocour PH, McKinnon GA, McMurray JR, Anderson DC. Evaluation of the measurement of blood glucose levels on dried filter paper blood spots *Diabet Med*. 1985;2(4):269-71.
6. Burrin JM, Price CP. Performance of three enzymic methods for filter paper glucose determination *Ann Clin Biochem*. 1984;21(Pt 5):411-6..
7. Taylor RP, Penneck CA. A comparison of three methods for the estimation of capillary blood glucose in filter paper spots *Ann Clin Biochem*. 1982;19(Pt 1):22-5
8. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1963;32:338-343.
9. Arkray Inc. 57 Nishi Aketa-Cho, Higashi-Kujo, Minami-Ku, Kyoto 601-8045, Japan Tel: +81-75-662-8967 FAX: +81-75-662-8973 URL <http://www.arkray.co>. (Acessado em: 20 mai 2012.)
10. Hannon WH, Aziz KJ, Collier FC, Fisher DA, Fafara CE, Knight WS et al. Blood collection on filter paper for neonatal screening pro-

- grams. NCCLS document LA4-A2. 2nd ed. Pennsylvania: NCCLS; 1992;12(13).
11. Addisson GM. How should screening programs choose the optimum collection filter paper. The UK experience (version on CD-ROM). EG & G Wallac producers. ISNS Quality assurance and standardization meeting. June 11-12;1999.
 12. Frómata A, Marrero N, González E, Lugo E, Fernández I, Domenech MB. Estudio comparativo de los tres papeles de filtro en los ensayos UMEELISA para tamización neonatal de HC y fenilcetonuria. *Rev Biomed*. 2002;13:241-7.
 13. Levy HL, Simmons JR, McCready RA. Stability of aminoacids and galactose in the newborn screening filter paper blood specimen. *J Pediatr*. 1985;107:757-60.
 14. Dezateaux C. Evaluating newborn screening programmes based on dried blood spots: future challenges. *Br Med Bull*. 1998;54(4):877-90.
 15. Lalitha P, Ravichandran M, Suba S, Kaliraj P, Narayanan RB, Jayaraman K. Quantitative assessment of circulating antigens in human lymphatic filariasis: a field evaluation of monoclonal antibodybased ELISA using blood collected on filter strips. *Tropical Medicine & International Health*. 1998;3(1):41-5.
 16. Frómata A, Lechuga MF, Pérez PL, Marrero N, Urquiza HD, Coto R et al. Desenvolvimento do UMEELISA TSH Neonatal para dosagem de TSH em sangue coletado em papel filtro. *Rev Bras An Clin*. 1996;28:202-4.
 17. Vieira Neto E, Urquiza HD. Valores normales de fenilalanina en muestras de sangre seca en papel de filtro en la pesquisa neonatal de la ciudad de Rio de Janeiro. En: Cornejo V, Raimann E, Colombo M, editores. Resúmenes, II Congreso de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal 1999, 24-27 de octubre; Santiago de Chile, Chile. Caupolicán: Servicios Gráficos; 1999. p. 88.
 18. Schleicher & Schuell BioScience, Inc. Schleicher & Schuell BioScience, Inc. Profile, Disponível em: www.biosciregister.com/Schleicher_Schuell_BioScience_Inc/Supplier/sid1276.htm - 55k. (Acessado em: 20 mai 2012.)
 19. Whatman Group Disponível em: <http://www.whatman.com/FilterPapers.aspx> <http://www.whatman.com/FilterPapers.aspx>. (Acessado em: 20 mai 2012.)
 20. Special Paper Hahnemuehle. Disponível em: www.albet-hahnemuehle.com. Alemanha. (Acessado em: 20 abr 2012.)
 21. Mc Mahonm. Analytical Instrumentation: A Guide to Laboratory, Portable and Miniaturized Instruments. USA, Editora Wiley 2007 pp 37-121
 22. Skoog D, West DY, Holle, F. Química Analítica. México: Editorial McGraw-Hill; 1995. p. 3, 52-56, 69, 92-94.
 23. Carey RY, Garber C. Evaluación de métodos. In: Kaplan L, Pesce A. Química Clínica. Teoría análisis y correlación. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1990. p. 332-416.
 24. Ali A, Mihás C, Campbell J. Interferences of O-raninose Cross-Liked. Hemoglobin in three methods for serum creatinine. *Clin Chem*. 1997;43(9):1.738-1.743.
 25. COLABIOCLI. Mejoría continua de la calidad. Guía para los laboratorios clínicos de América Latina. México: Editorial Médica Panamericana; 1996. 314p.
 26. European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS). Guidelines for a user laboratory to evaluate and select a kit for its own use. Quantitative test; 1987.
 27. Kerrigan S, Brooks D. Indirect enzyme linked immunosorbent assay for the quantitative estimation of Lysergic acid diethylamide in urine. *Clin Chem*. 1998;44(5):985-990.
 28. Baffi R. The role of assay validation in specification development. In: Brown F, Fernandez J, eds. Development of specifications for Biotechnology pharmaceutical products. *Dev Biol Stand Basel Karger*. 1997;91:105-113.
 29. Genaro M, Abrigo C, Marengo E, Baldin C, Martelletti M. Determination of creatinine in human serum. *Statistical Intercalibration of Methods Analyst*. 1995;120:47-51.
 30. Dharán M. Control de calidad en los laboratorios clínicos. Barcelona: Editorial Reverté S.A.; 1983. 312p.
 31. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Validação e Incerteza na Medição Analítica. Ministério da Saúde. ANVISA/GGLAS; 2006.
 32. ICH - Q2A - Text on Validation of Analytical Procedures - 03/95. Guia para validação de métodos analíticos - jan/2002 - ANVISA. 7. ICH - Q2B - Validation of Analytical Methodology - 11/96.
 33. Bowers LD, Wong ET. Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações Kinetic serum creatinine assays. A critical evaluation and review. *Clin Chem*. 1980;26:555-61.
 34. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Guideline for investigating clusters of health events. *MMWR*. 1990;39:1-23.
 35. Rodríguez N, Velásquez Y, González E, Lorente A. Precision and Accuracy of an enzymatic method for Total Cholesterol determination. *Mem Inst Investig Cienc Salud*. 2007;5(2).
 36. Heinegard D, Tiderstrom G. Kinetic Enzymatic Method for Determining Serum Creatinine. *Clin Chem Acta*. 1973;43:305.
 37. Fabiny DL, Ertinghausen G. Automated reaction-rate method determination of serum creatinine with the Centri Chem. *Clin Chem*. 1971;17:696.
 38. García MR, Soriano BC, Del Pino SO, García LF, Pacheco AJR. Variante para la determinación automática y manual de creatinina sin interferencia por bilirrubina y su importancia en leptospirosis, septicemia y pacientes sometidos a tratamientos dialíticos *Bioquímica*. 1997;22(2):665-670.
 39. Pfohl M, Pfeiffer A, Schatz H. Spot glucose measurement in epidermal interstitial fluid--an alternative to capillary blood glucose estimation? *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000;108(1):1-4.
 40. MBIOLÓG. Bula Creatinina CEPA: MBIolog Diagnósticos Ltda Rua Gama, 337- Villa Paris - Contagem - MG CEP 32372-120.
 41. Bert L, Andrew W. Clinical chemistry: interpretation and techniques. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. 514 p.
 42. FDA. Disponível em: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/default.htm>. USA 2010. (Acessado em: 5 out 2011.)
 43. Morel P. Validação e incerteza na medição analítica. ANVISA GGLAS. Validação_incertezas_pierre2.2.pdf- Adobe Reader. 2004.
 44. DiGiorgio J. Clinical Chemistry - Principles and Techniques. Henry RJ et al., eds. Hagerstown: Harper & Row; 1974. p. 549-550.
 45. Tausky HH. Standard Methods of Clinical Chemistry. Vol 3. Seligson D, ed. New York: Academic Press; 1966, p. 99.
 46. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1999.
 47. Skoog D, West D, Holler F. Química Analítica. México: Editorial McGraw-Hill; 1995. p. 3, 52-56, 69, 92-94.
 48. S Rekkha Chemistry and Molecular Aspects of Drug Design and Action. Editora: CRC - 2008 pp105-152
 49. Klotzsch S, McNamara JR. Triglycerides measurements: a review of methods and interferences. *Clin Chem*. 1990;36:1605-13.
 50. Lakshmy R, Reddy KS, Jaikhani BL. Measurement of cholesterol and triglycerides in dried serum and the effect of storage. *Clin Chem*. 2001;47:1113-15.
 51. Addisson GM. How should screening programs choose the optimum collection filter paper. The UK experience (version on CD-ROM). EG & G Wallac producers. ISNS Quality assurance and standardization meeting. June 11-12;1999.
 52. Levy HL, Simmons JR, McCready RA. Stability of amino acids and galactose in the newborn screening filter paper blood specimen. *J Pediatr*. 1985;107:757-60.
 53. Dezateaux C. Evaluating newborn screening programmer based on dried blood spots: future challenges. *Br Med Bull*. 1998;54(4):877-90.
 54. Carey R, Garber C. Evaluación de métodos. In: Kaplan L, Pesce A. Química Clínica. Teoría análisis y correlación. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1990. p. 332-416.
 55. Won GN, Kawamura M, Donnell GN. Galactosemia screening: Methodology and outcome from worldwide data collection. In: Therrell BL, ed. *Advances in Neonatal Screening*. New York: Elsevier Science Publishers; 1987. p. 243-249.
 56. Paigen K, Pacholec F, Levy H. A new method of screening for inherited disorders of galactose metabolism. *J Clin Lab Med*. 1982;99:895.
 57. Ramakrishnan L, Reddy KSL, Jaikhani BL. Measurement of Cholesterol and Triglycerides in Dried Serum and the Effect of Storage *Clinical Chemistry*. 2001;47:1113-1115.
 58. Quraishi R, Lakshmy R, Prabhakaran D, Mukhopadhyay KA, Jaikhani B. Use of filter paper stored dried blood for measurement of triglycerides. *Lipids in Health and Disease*. 2006;5:20.
 59. Fraga AR, Paranhos ME, Souto Maior A. Metanol e Etanol como Solventes na Extração de Óleo de Mamona. <www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/agricultura/Metanol.pdf>. (Acessado em: 14 dez 2011.)