

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

GEOVANA ALVES JUSTINO SILVA

**INVESTIGAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DOS TESTES DE
DETECÇÃO DE SANGUE OCULTO FECAL BASEADOS NOS REAGENTES
GUAJAC E BENZIDINA EM CÃES**

UBERLÂNDIA, 2020

GEOVANA ALVES JUSTINO SILVA

**INVESTIGAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DOS TESTES DE
DETECÇÃO DE SANGUE OCULTO FECAL BASEADOS NOS REAGENTES
GUAIIAC E BENZIDINA EM CÃES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a coordenação do curso graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de conclusão de curso II.

Orientadora: Sofia Borin Crivellenti

UBERLÂNDIA, 2020

RESUMO

Os testes de sangue oculto fecal disponíveis para uso em animais, cujas metodologias baseiam-se nos reagentes Benzidina e Guaiac, tratam-se de testes que detectam de maneira inespecífica e subjetiva a presença de hemoglobina em amostras fecais, cuja sensibilidade varia de maneira significativa entre estudos já realizados anteriormente. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo investigar a sensibilidade analítica dos testes de detecção de sangue oculto fecal baseados nos reagentes Guaiac (gTSOF) e Benzidina (bTSOF) em amostras fecais caninas. Foram selecionados seis cães saudáveis, cujas fezes colhidas por defecação espontânea foram laboratorialmente preparadas para conter 1, 5, 10, 20 e 40 µg de hemoglobina/g de fezes e testadas para presença de sangue oculto fecal por ambos os testes. A leitura dos testes foram fotografadas e analisadas por metodologia duplo-cega por 3 patologistas clínicos. Os resultados foram analisados com base em duas classificações, por positividade, ou seja, “ausência vs. presença” de sangue oculto nas fezes (escores 0 e 1, respectivamente) e por intensidade, na qual utilizou-se “ausência vs. intensidade de sangramento oculto fecal fraco, moderadamente e forte positivo” (escores 0, 1, 2 e 3, respectivamente). Concluiu-se que os testes bTSOF e gTSOF foram capazes de detectar concentrações de sangue a partir de 1 µg Hb/g fezes e que, embora o reagente Benzidina tenha apresentado boa sensibilidade analítica para detecção de sangue oculto nas fezes de cães domésticos, o gTSOF apresentou melhor desempenho individual em todos os quesitos analisados, incluindo sensibilidade e praticidade na execução do teste. Os reagentes testados mostraram-se capazes de detectar concentrações de sangue a partir de 1 µg Hb/g fezes e 100% das amostras com ausência de sangue, havendo na intensidade de sangramento um predomínio significativo de classificação moderada pelo teste utilizando guaiac (76%) e forte (74%), pelo teste utilizado benzidina ($p < 0,0001$). Quando feita a avaliação das diferentes concentrações observou-se maior tendência a classificação de intensidade moderada (>50%), e que nenhuma amostra contendo 40 µgHb/g fezes obteve classificação negativa ou fraco positiva ($p < 0,0001$). O gTSOF apresentou desempenho superior ao bTSOF nos quesitos sensibilidade, valores preditivos positivo e negativo, razões de verossimilhanças positiva e negativa e acurácia.

Palavras-chave: amostra fecal, canino, sangramento gastrointestinal oculto, testes rápidos.

ABSTRACT

Fecal occult blood tests available for use in animals, whose methodologies are based on Benzidine and Guaiac reagents, are tests that detect in a nonspecific and subjective manner the presence of hemoglobin in fecal samples, whose sensitivity varies significantly between studies previously conducted. Thus, the present study aimed to investigate the analytical sensitivity of fecal occult blood detection tests based on Guaiac (gTSOF) and Benzidine (bTSOF) reagents in canine fecal samples. Six healthy dogs were selected, whose feces collected by spontaneous defecation were laboratoryally prepared to contain 1, 5, 10, 20 and 40 μg of hemoglobin/g of feces and tested for fecal occult blood by both tests. The reading of the tests was photographed and analyzed by double-blind methodology by 3 clinical pathologists. The results were analyzed based on two classifications, by positivity, meaning, "absence vs. presence" of occult blood in the feces (scores 0 and 1, respectively) and by intensity, in which we used "absence vs. intensity of weak, moderately and positive fecal occult bleeding" (scores 0, 1, 2 and 3, respectively). It was concluded that the bTSOF and gTSOF tests were able to decode blood concentrations from 1 μg Hb/g feces and that, although the Benzidine reagent presented good analytical sensitivity for detection of occult blood in the feces of domestic dogs, gTSOF presented better individual performance in all analyzed questions, including sensitivity and practicality in the performance of the test. The reagents tested were able to detect blood concentrations from 1 μg Hb/g of feces and 100% of the samples with no blood, with a significant predominance of moderate classification by the test using guaiac (76%) and strong (74%), by the test used benzidine ($p < 0.0001$). When the different concentrations were evaluated, the moderate intensity classification ($>50\%$) was observed, and that no sample containing 40 mgHb/g of feces obtained a negative or weakly positive classification ($p < 0.0001$). The gTSOF presented superior performance to bTSOF in the issues sensitivity, positive and negative predictive values, positive and negative likelihood ratios and accuracy.

Keywords: fecal sample, canine, occult gastrointestinal bleeding, quick tests.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo dom da vida, por ser minha força e esperança a cada passo dado.

Agradeço a minha família em especial ao meu pai que não está mais presente mas que sempre me incentivou e me deu total apoio, agradeço a minha mãe Ana Lúcia pelo apoio também, por me acalmar nos momentos difíceis, pelas orações feitas, a minha irmã Gêssica e meu cunhado Breno. Agradeço ainda as minhas tias Maria da Luz e Aracele junto a minha prima Anne Victória.

Agradeço também aos meus amigos de faculdade Maria Luiza, Giulia, Maria Paula, Ana Luísa e Stela. A minha amiga de longa data Lara Luiza. Ao amigo Jian.

Tenho que agradecer também a minha orientadora Prof^ª. Dra Sofia Borin Crivellenti por ter me dado a grande oportunidade de realizar essa pesquisa ao lado dela, obrigada por toda paciência e atenção para comigo, juntamente gostaria de agradecer ao Prof. Dr Leandro Z. Crivellenti pelo apoio e orientações dadas.

Com muito carinho agradeço a mestre Paula Barbosa Costa, a qual foi peça fundamental para execução do projeto, ao Prof. Dr Diego José Zanzarini Delfiol por ter permitido que a pesquisa fosse realizada nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia junto ao Prof. Antônio Mundim que permitiu a realização desse no Laboratório de Patologia Clínica do hospital.

Meu agradecimento também ao Prof. Dr Ednaldo Carvalho Guimarães que auxiliou no desenho experimental da presente pesquisa e a Prof^ª. Dra Natascha Almeida Marques da Silva pelas análises estatísticas feitas com tanta dedicação.

Finalmente, mas não menos importante, agradeço a todos os tutores que aceitaram participar da pesquisa e abraçaram ela permitiindo que essa fosse realizada com êxito. Agradeço também as residentes do setor de Patologia Clínica do HV-UFU, entre elas Thaís, Maria Clara, Marília, Laís e Simone, e também as residentes da Preventiva, Melissa e Fernada, muito obrigada por todo acolhimento e gentileza para comigo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO REFERENCIADA	7
1.1	Justificativa	8
2	METODOLOGIA.....	9
2.1	Comitê de Ética	9
2.2	Animais.....	9
2.3	Fatores de Inclusão e Exclusão dos Animais do Grupo Experimental.....	9
2.4	Delineamento experimental.....	9
2.4.1	Pré-seleção: coleta e análise de amostras biológicas.....	10
2.4.2	Coleta das amostras biológicas para determinação da sensibilidade analítica dos testes de detecção de sangue oculto fecal.....	10
2.4.3	Metodologia para realização do Teste de Benzidina (bTSOF).....	10
2.4.4	Metodologia para realização do Teste de Guaiac (gTSOF)	12
2.4.5	Preparação das amostras de fezes para os testes de sensibilidade.....	12
2.4.6	Testes de Sensibilidade dos bTSOF e gTSOF.....	13
2.5	Análises estatísticas	13
3	RESULTADOS	15
4	DISCUSSÃO	20
5	CONCLUSÃO.....	23
6	REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO REFERENCIADA

A detecção de sangue oculto nas fezes pode ser realizada de diversas maneiras (BEG et al., 2002), dos quais métodos físicos, analíticos, imunoquímicos e químicos estão a disposição para seres humanos (TUFFLI; GASCHEN; NEIGER, 2001) e também para animais (SYED; KHATOON; SILWADI, 2001).

Dentre eles destacam-se os métodos químicos com base na ação da pseudoperoxidação da porção de hematina da hemoglobina (SYED; KHATOON; SILWADI, 2001), como é o caso do Teste do Guaiac. Nestas circunstâncias a hemoglobina irá oxidar os compostos fenólicos do guaiac em quinonas, e a produção de coloração azul após a adição de solução reveladora, é considerada um resultado positivo (RICE; IHLE, 1994).

O fato dos testes baseados no reagente Guaiac serem testes rápidos, simples e que possibilitam sua realização no próprio consultório médico (BEG et al.,2002), os tornam vantajosos. Por outro lado, existem muitos fatores que o desfavorecem, dentre os quais são citados grau de hidratação da amostra fecal, degradação da hemoglobina devido ao armazenamento e restrições alimentares pré-teste (BEG et al., 2002).

De acordo com Tuffli, Gaschen e Neiger (2001), dietas que contenham carne vermelha ou alta atividade de peroxidase, como por exemplo, frutas e vegetais, podem proporcionar resultados falso-positivos, enquanto que dietas que contenham muita vitamina C podem ocasionar resultados falso-negativos.

Embora o teste de Guaiac seja bastante empregado por seu bom custo-benefício, sua sensibilidade e especificidade diagnósticas são variáveis de acordo com a literatura (AHLQUIST et al., 1984; GIBBONS et al., 2005; RUDINSKY; GUILLAUMIN; GILOR, 2017).

Em 1976, Morris e colaboradores observaram que de 27 pacientes humanos positivos ao gTSOF, 63% não apresentavam sangramentos no trato gastrointestinal (TGI). Mais recentemente, outros testes demonstraram variações importantes na sensibilidade do gTSOF, variando de 20% para amostras contendo < 2 mg de hemoglobina/grama de fezes a 90% para concentração de hemoglobina > 25 mg/grama de fezes humanas (BEG et al., 2002).

A tetrametilbenzidina ou benzidina destaca-se como outro teste utilizado rotineiramente para a detecção de sangue oculto fecal. Trata-se de um reagente utilizado a bastante tempo, mais especificamente a cerca de um século (SYED; KHATOON; SILWADI, 2001). O teste de sangue oculto fecal pela Benzidina (bTSOF) é realizado pela adição de gotas de uma solução contendo ácido acético e benzidina à amostra fecal depositada em um papel filme,

seguida da instilação de gotas de peróxido de hidrogênio, cuja formação de halo de coloração azulada é considerada positiva para presença de sangue fecal (RICE; IHLE, 1994, NARITA, et al., 2005).

Rice e Ihle (1994) sugeriram em estudo anterior que os indicadores do tipo benzidina são melhores que os testes de guaiac e que não sofrem interferência ou falsa positividade alimentar em cães, contrapondo estudo anteriormente realizado por Manning (1952), citado por Illingworth (1965), que consideravam que fatores dietéticos seriam capazes de produzir reações falso-positivas no bTSOF. Quanto a sensibilidade do bTSOF, Illingworth (1965), citando Mendeloff (1953), consideraram que indivíduos poderiam consumir até 50 mL de sangue e mesmo assim obter resultados negativos.

Assim, o presente estudo teve por objetivo investigar a sensibilidade analítica dos testes de detecção de sangue oculto fecal baseados nos reagentes Guaiac (gTSOF) e Benzidina (bTSOF) nos cães.

1.1 Justificativa

Em medicina veterinária a pesquisa de sangue oculto fecal é pouco explorada mesmo diante de fortes indícios de que diversas doenças sistêmicas, limitando-se na maioria das vezes à pacientes com anemia decorrente de doenças do trato gastrointestinal, ou animais que estejam recebendo medicações potencialmente promotoras de hemorragias gastrointestinais.

Vale destacar que os testes de sangue oculto fecal disponíveis para uso em animais, cujas metodologias baseiam-se nos reagentes Benzidina e Guaiac, tratam-se de testes que detectam de maneira inespecífica e subjetiva a presença de hemoglobina em amostras fecais, e cuja sensibilidade varia de maneira significativa entre estudos já realizados anteriormente.

Além disso, os resultados aqui obtidos podem gerar futuras pesquisas na área de terapêutica destas importantes doenças potencialmente causadoras de lesões gastrointestinais.

2 METODOLOGIA

2.1 Comitê de Ética

O experimento foi realizado nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFU) no período compreendido entre julho e setembro de 2020, após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo nº 017/2019).

2.2 Animais

Foram utilizados, após pré-seleção, 6 cães domésticos saudáveis, machos e fêmeas, de diferentes idades e portes físicos (com peso superior a 1 kg), cujo bom estado de saúde foi aquilatado com base nos exames clínicos gerais e laboratoriais de rotina.

2.3 Fatores de inclusão e exclusão dos animais do grupo experimental

Foram incluídos na pesquisa, cães saudáveis, sem quaisquer morbidades pré-diagnosticadas, que obtiveram resultados normais ou dentro dos valores esperados para a espécie canina quando foram submetidos a exame clínico completo (anamnese, exame físico geral e específico) e exame coproparasitológico negativo para parasitos intestinais e/ou melena/hematoquezia e que obtiveram resultados negativos para sangramento oculto fecal por ambas metodologias (Guaiac e Benzidina). Foram excluídos do experimento todos os animais que apresentaram sinais clínicos e físicos de qualquer outra doença após terem sido incluídos, bem como animais que passaram a apresentar sinais clínicos de perda de sangue gastrointestinal (hematoquezia e/ou melena), diarreia, endoparasitas, comorbidades, animais que tiveram que ingerir medicamentos destinados à profilaxia de lesões gastrointestinais (incluindo aglutinantes de fosfato, agentes citoprotetores, antagonistas da histamina dos receptores H₂ e/ou inibidores da bomba de prótons), ou que sejam potencialmente causadoras de erosões ou ulcerações no trato gastrointestinal (incluindo anticoagulantes, salicilatos, anti-inflamatórios não esteroidais, glicocorticoides, antibióticos, prostaglandinas, quimioterápicos) ou condições médicas desfavoráveis a critério do investigador.

2.4 Delineamento experimental

2.4.1 Pré-seleção: coleta e análise de amostras biológicas

Amostras de fezes, originadas de defecação espontânea foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica do HV-UFU para realização de exame coproparasitológico direto e Willis, para detecção de ovos de *Ancylostoma* spp., *Toxocara* spp., *Ascaris* spp., entre outros e a observação de oocistos de protozoários como *Isospora* spp., *Eimeria* spp. e *Giardia* spp.

2.4.2 Coleta das amostras biológicas para determinação da sensibilidade analítica dos testes de detecção de sangue oculto fecal

Para realização dos testes de sensibilidade de sangue oculto fecal utilizando as metodologias baseadas nos reagentes Benzidina (bTSOF) e Guaiac (gTSOF), foram necessárias novas amostras de fezes e amostras de sangue total dos animais pré-selecionados, tanto para constatação da sanidade dos animais, quanto para preparação das amostras fecais contendo as quantidades estipuladas de Hb g/fezes.

Amostras de 3-4 mL de sangue total foram coletadas dos animais por venopunção jugular [(volume não extrapola a quantidade de máxima de 10% do volume sanguíneo circulante recomendada/cão – 7,9-9,0 mL para cães acima de 1 kg (FIOCRUZ, 2008)]. A amostra de sangue foi fracionada e envasada em tubo com e sem anticoagulante. As amostras recolhidas nos tubos com EDTA foram utilizadas para realização do hemograma e do diferencial de leucócitos em esfregaços de sangue no Laboratório de Patologia Clínica do HV-UFU. Após coagulação do sangue transferido para os tubos secos, a amostra foi centrifugada para separação do soro, o qual foi utilizado para realização das análises bioquímicas séricas pertinentes a confirmação da sanidade dos animais (atividade da enzima alanina aminotransferase, concentração de creatinina, proteína total e albumina séricas).

Novas amostras de fezes, foram novamente obtidas por defecação espontânea para realização dos testes de sensibilidade utilizando as metodologias baseadas nos reagentes Benzidina e Guaiac. Salienta-se que, nenhum outro método de coleta de fezes (p.ex. extração manual na ampola retal ou sondagem intestinal) foi empregado neste experimento devido risco de pequeno sangramento na mucosa intestinal durante a manobra e possível alteração no resultado do exame.

2.4.3 Metodologia para realização do Teste de Benzidina (bTSOF)

As amostras de fezes foram distribuídas em um disco de papel e acrescidas de 50 µL de uma solução preparada a partir de 1 mL de ácido acético a 50% e 10 mg de benzidina. A

homogeneização foi feita com auxílio de espátula de madeira, sendo acrescentadas 3 gotas de água oxigenada à cada amostra, cuja formação de halo de cor azulada em qualquer amostra foi considerada reação positiva para presença de sangue nas fezes. O ensaio foi repetido por seis vezes na mesma amostra, utilizando o mesmo método de confecção. A análise foi realizada e graduada de acordo com Narita et al. (2005) e Crivellenti et al. (2017) e a leitura dos resultados foi executada 30 segundos após a aplicação dos reagentes. A interpretação indica que no caso em que não houve nenhuma mudança de coloração observada na superfície manchada, a amostra foi considerada negativa. Ao contrário, no caso em que a mancha na superfície foi azul, o teste foi considerado positivo. A presença e a intensidade de sangue oculto fecal foi então classificadas em 0 quando o sangue oculto nas fezes foi ausente, 1 para fraco positivo, 2 para moderadamente positivo e 3 para forte positivo (NARITA et al., 2005; CRIVELLENTI et al., 2017) (Figura 1).

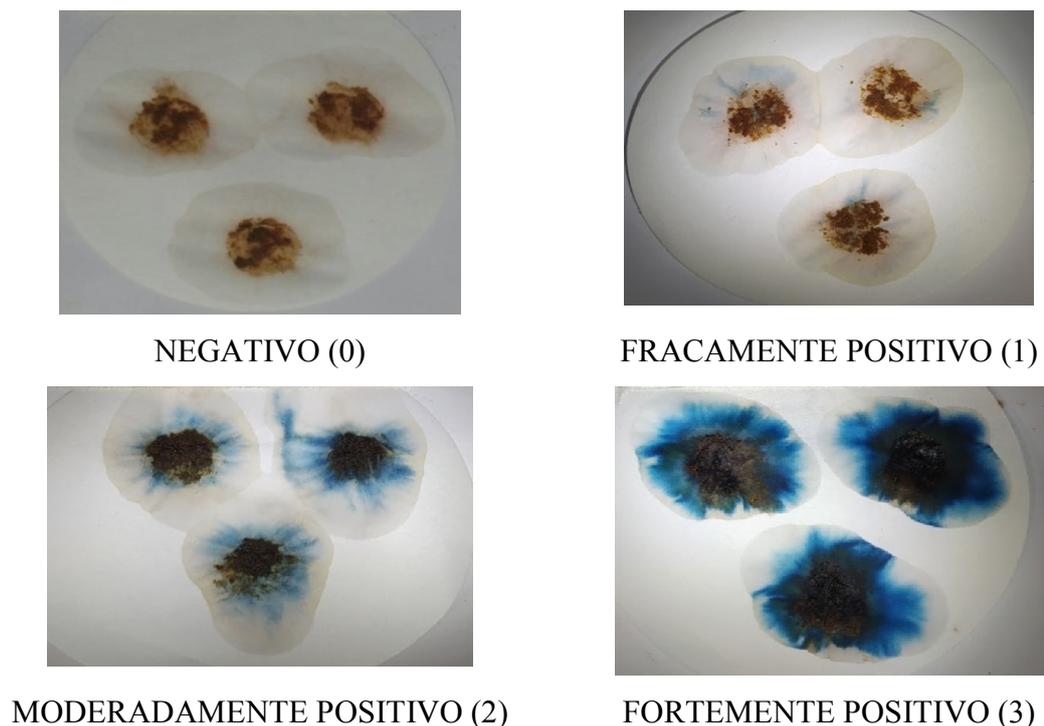
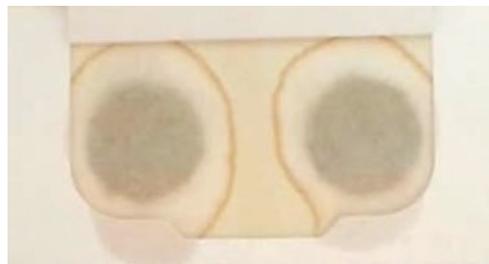


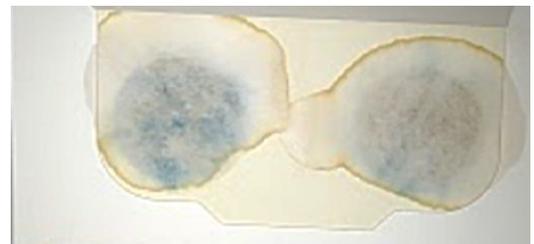
Figura 1. Representação da classificação de acordo com a presença e intensidade de sangue oculto fecal baseado no reagente benzidina. Adaptado de Narita et al. (2005) e Crivellenti et al. (2017).

2.4.4 Metodologia para realização do Teste de Guaiac (gTSOF)

O teste de sangue oculto fecal pelo Guaiac (gTSOF) (Feca-cult® envelope, Inlab Diagnostica, Brasil), foi realizado conforme a bula do fabricante. Com aplicadores diferentes, finas camadas de fezes foram colocadas dentro de cada círculo do envelope próprio do kit comercial. O ensaio foi repetido por seis vezes na mesma amostra, utilizando o mesmo método de confecção. Na parte traseira do envelope, foram instiladas três gotas de solução de desenvolvimento do produto em cada seção e o resultado foi lido após 30 segundos. O aparecimento de traços de cor azul/verde indicou a presença de sangue oculto e foi considerado um resultado positivo. Entretanto, nenhuma indicação de azul/verde verificada, o resultado foi considerado negativo (Figura 2).



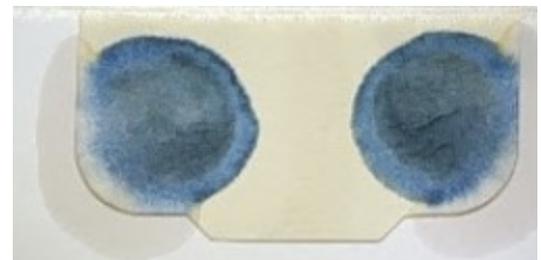
NEGATIVO (0)



FRACAMENTE POSITIVO (1)



MODERADAMENTE POSITIVO(2)



FORTEMENTE POSITIVO (3)

Figura 2. Representação da classificação de acordo com a presença e intensidade de sangue oculto fecal baseado no reagente guaic. Adaptado de Narita et al. (2005) e Crivellenti et al. (2017).

2.4.5 Preparação das amostras de fezes para os testes de sensibilidade

As fezes colhidas por defecção espontânea, foram fracionadas em seis amostras. Uma delas permaneceu em natura, e as demais foram gradualmente adicionadas de quantidades calculadas do sangue total obtido do animal (baseada na concentração de hemoglobina), para obter amostras contendo 1, 5, 10, 20 e 40 µg de hemoglobina por grama de fezes (Hb g/fezes).

Todas as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas com auxílio de espátulas de madeira individualizadas antes de serem testadas.

2.4.6 Testes de sensibilidade dos bTSOF e gTSOF

Baseado nos dados de literatura de que o menor limite de detecção de sangue oculto fecal no teste do Guaiac é de 10 mg de Hb/g de fezes (RICE; IHLE, 1994), e este sendo o teste de maior especificidade que o bTSOF, os testes de sensibilidade foram realizados da seguinte maneira:

- a) Teste da amostra fecal *in natura* (controle negativo);
- b) Teste da amostra fecal adicionada de diferentes concentrações de hemoglobina/g de fezes: 1, 5, 10, 20 e 40 µg de Hb/g de fezes;
- c) Realização dos testes de bTSOF e gTSOF conforme metodologia descrita nos itens 2.4.3 e 2.4.4, com 6 repetições para cada amostra (2 discos contendo 3 repetições do teste utilizando o reagente benzidina cada; e 3 cartelas contendo 2 repetições do teste contendo o reagente guaic).

2.5 Análises estatísticas

Após a obtenção das 486 imagens, foram elaborados códigos aleatórios contendo cinco dígitos (entre letras e números aleatoriamente). A quantidade de códigos gerados foi proporcional ao número de imagens obtidas, e cada código foi utilizado na renomeação de cada imagem, para que assim, as imagens fossem embaralhadas para posterior avaliação pelos três especialistas em patologia clínica veterinária. O aplicativo utilizado para gerar os códigos foi o “Aleatório” versão 1.2 (<https://play.google.com/store/apps/details?id=com.start.devaneio.aleatorio>). Tanto as imagens em formato JPG, quanto o padrão de classificação em escala de azul, baseada na literatura (NARITA et al., 2005; CRIVELLENTI et al., 2017) e proposta pelos pesquisadores (Figuras 1 e 2) foram disponibilizadas aos três avaliadores. Os dados foram então avaliados utilizando dois tipos de classificação; por positividade, ou seja, “ausência vs. presença” de sangue oculto nas fezes (escores 0 e 1, respectivamente) e por intensidade, na qual utilizou-se “ausência vs. intensidade de sangramento oculto fecal fraco, moderadamente e forte positivo” (escores 0, 1, 2 e 3, respectivamente). Foram determinados sensibilidade $[a/(a+b)]$, especificidade $[d/(c+d)]$, valor preditivo positivo $[a/(a+c)]$, valor preditivo negativo $[d/(b+d)]$, razão de probabilidade

positiva [$\text{Sens}/(1-\text{Esp})$], razão de probabilidade negativa [$(1-\text{Sens})/\text{Esp}$] e acurácia [$(a+d)/(a+b+c+d)$], nos quais “a” = valores verdadeiro positivos, “b” = valores falso negativos, “c” = valores falso positivos e “d” = valores verdadeiro negativos (KAWAMURA, 2002). Todas as amostras fecais iniciais foram consideradas verdadeiras negativas, tornando-se verdadeiramente positivas quando adicionadas de qualquer quantidade de sangue (1, 5, 10, 20 ou 40 $\mu\text{gHb/g}$ de fezes). Valores falso positivos foram evidenciados quando amostras iniciais foram classificadas como contendo qualquer quantidade de sangue, e os falso negativos, quando amostras sabidamente adicionadas qualquer quantidade de sangue foram classificadas como negativas.

Os resultados dos três avaliadores foram testados quanto ao grau de concordância pelo método estatístico Kappa (ρ_c , coeficiente de correlação de concordância intraclasse) e intervalo de confiança de 95%. Como a força de concordância resultou significativa ($p < 0,0001$), porém moderada ($\rho_c < 0,90$), utilizou-se a moda pra determinar a classificação de cada amostra e realizar a comparação dos dados pelo teste de Qui Quadrado.

3 RESULTADOS

Obteve-se êxito na realização de todos testes de detecção de sangue oculto, tanto pela metodologia utilizando benzidina, quanto guaiac. Nenhum dos animais apresentou sinais de infecção ou inflamação no local da coleta de sangue para realização tanto das análises hematológicas e bioquímicas sanguíneas, quanto no momento de fornecer a amostra de sangue para preparação das amostras fecais contendo as concentrações pré-estabelecidas de hemoglobina por grama de fezes (Hb/g fezes).

Um total de 486 imagens geradas a partir de amostras fecais dos 6 cães selecionados e 6 diferentes concentrações de Hb/g de fezes foram avaliadas por 3 patologistas clínicos às cegas, sendo 198 imagens referentes aos testes de benzidina (2 repetições) e 288 imagens referentes aos testes de guaiac (3 repetições).

Os dados foram avaliados utilizando dois tipos de classificação, por positividade, ou seja, “ausência vs. presença” de sangue oculto nas fezes (escores 0 e 1, respectivamente) e por intensidade, na qual utilizou-se “ausência vs. intensidade de sangramento oculto fecal fraco, moderadamente e forte positivo” (escores 0, 1, 2 e 3, respectivamente).

Quando classificados de acordo com a intensidade proposta pelos pesquisadores, o coeficiente de Kappa obtido nos testes avaliados conjuntamente foi de 0,477, indicando que existiu uma concordância moderada significativa entre as classificações dos avaliadores ($p < 0.0001$). Já quando classificados conjuntamente por positividade, o coeficiente Kappa aumentou para 0,772 ($p < 0.0001$). Quando analisados separadamente, a concordância entre os avaliadores apresentou quedas significativas quando classificados por intensidade (Kappa = 0,304 para o guaiac e Kappa = 0,298 para a benzidina). Já quando classificados por positividade, obteve-se uma redução da concordância entre os avaliadores para o teste da benzidina (Kappa = 0,639) e aumento para o teste do guaiac (Kappa = 0,881).

Como houve concordância entre os avaliadores, os testes foram comparados a partir dos resultados da moda das classificações por intensidade de sangramento frente aos testes (benzidina vs. guaiac) (Tabela 1), e também frente as diferentes concentração de Hb/g de fezes (0, 1, 5, 10, 20 e 40 μg) para um dos testes individualmente (Tabelas 2 e 3).

Tabela 1. Comparação das classificações por intensidade de sangramento e frente as diferentes concentrações de Hb g/fezes frente aos testes de benzidina e guaiac.

	INTENSIDADE DE SANGRAMENTO				
	Ausente (0)	Fraco (1)	Moderado (2)	Forte (3)	Total
TESTE					
Benzidina	6 (09%)	3 (05%)	8 (12%)	49 (74%)	66 (100%)
Guaiac	6 (06%)	15 (16%)	73 (76%)	2 (02%)	96(100%)
Total	12	18	81	51	165
CONCENTRAÇÃO					
(µg Hb/g fezes)					
0	12 (100%)	0	0	0	12 (100%)
1	0	11(37%)	15 (50 %)	4 (13%)	30 (100%)
5	0	3 (10 %)	16 (53%)	11 (37%)	30 (100%)
10	0	1 (03%)	18 (60%)	11 (37%)	30 (100%)
20	0	3 (10%)	15 (50 %)	12 (40%)	30 (100%)
40	0	0	17 (57 %)	13 (43%)	30 (100%)
Total	12	18	81	51	162

Ambos os testes foram capazes de identificar 100% das amostras com ausência de sangue, havendo na intensidade de sangramento um predomínio significativo de classificação moderada pelo teste utilizando guaiac (76%) e forte (74%), pelo teste utilizando benzidina ($p=7,78636 \times 10^{-22}$). Quando avaliadas as diferentes concentrações, observou-se maior tendência a classificação de intensidade moderada (>50%), e que nenhuma amostra isenta de sangue foi classificada como positiva, bem como nenhuma contendo 40 µg Hb/g fezes obteve classificação fraco positiva ($p=1,88853 \times 10^{-32}$).

Tabela 2. Comparação das classificações por intensidade de sangramento frente as diferentes concentrações pelo teste de benzidina.

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g Hb/g}$ fezes)	INTENSIDADE DE SANGRAMENTO				Total
	Ausente (0)	Fraco (1)	Moderado (2)	Forte (3)	
0	6 (100%)	0	0	0	6 (100%)
1	0	3 (25 %)	5 (42%)	4 (33%)	12 (100%)
5	0	0	2 (17%)	10 (83%)	12 (100%)
10	0	0	1 (08%)	11 (92 %)	12 (100%)
20	0	0	0	12 (100%)	12 (100%)
40	0	0	0	12 (100%)	12 (100%)
Total	6	3	8	49	66

Tabela 3. Comparação das classificações por intensidade de sangramento frente as diferentes concentrações pelo teste de guaiac.

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g Hb/g}$ fezes)	INTENSIDADE DE SANGRAMENTO				Total
	Ausente (0)	Fraco (1)	Moderado (2)	Forte (3)	
0	6 (100%)	0	0	0	6 (100%)
1	0	8 (44,5 %)	10 (55,5%)	0	18 (100%)
5	0	3 (17 %)	14 (78%)	1 (05%)	18 (100%)
10	0	1 (05 %)	17 (95%)	0	18 (100%)
20	0	3 (17%)	15 (83%)	0	18 (100%)
40	0	0	17 (95%)	1 (05 %)	18 (100%)
Total	6	15	73	2	96

Quando o desempenho dos testes foi avaliado separadamente para classificar a intensidade de sangramento nas diferentes concentrações de Hb nas amostras fecais, observou-se que a partir de 5 $\mu\text{gHb/g}$ de fezes houve maior tendência a classificação de intensidade moderada (>78%) pelo teste utilizando guaiac ($p=7,26686 \times 10^{-14}$) e de intensidade forte positiva (>83%) pelo teste utilizando benzidina ($p=1,65365 \times 10^{-17}$). Vale ressaltar que, da mesma maneira que a análise feita frente aos testes, nenhuma amostra isenta de sangue foi classificada como positiva, bem como nenhuma amostra contendo 40 $\mu\text{g Hb/g}$ fezes obteve classificação fraco-positiva. Entretanto, esta análise adicional permitiu verificar que o teste de benzidina classificou todas as amostras com concentrações superiores a 20 $\mu\text{g Hb/g}$ de fezes

como forte-positivas, enquanto o guaiac classificou apenas 5% das amostras contendo 40 μg Hb/g fezes como forte positivas.

Os dados das análises epidemiológicas estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Dados das análises epidemiológicas dos testes de detecção de sangue oculto fecal pelos métodos benzidina e guaiac em amostras de fezes caninas contendo as concentrações pré-estabelecidas de hemoglobina por grama de fezes (Hb/g fezes).

	BENZIDINA	GUAIIAC
Sensibilidade	78%	94%
Especificidade	99%	99%
VPP	93%	94%
VPN	98%	99%
RVP	77%	94%
RVN	22%	6%
Acurácia	97%	99%

*Legenda: VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo; RVP, razão de verossimilhança positivo; RVN, razão de verossimilhança negativo.

O melhor desempenho foi evidenciado pelo teste de guaiac, com 94% de sensibilidade e 99% de especificidade. O teste de benzidina também apresentou a mesma eficiência em especificidade (99%), porém moderada sensibilidade (78%). Embora tenha havido menor desempenho da benzidina em detectar os verdadeiros positivos dentro das amostras fecais que continham sangue, este fato não afetou importante os valores preditivos positivos, nem os valores preditivos negativos deste teste. A proporção total de resultados corretos foi significativamente elevada em ambos os testes, refletindo precisão tanto da benzidina, quanto do guaiac em identificar amostras fecais contendo sangue oculto (acurácia de 97% e 99%, respectivamente). No que diz respeito as razões de probabilidade positivas e negativas, ambos os testes tiveram bons desempenhos, com maiores resultados de RVP e menores valores de RVN.

Quando o desempenho dos testes foi avaliado individualmente de acordo com as concentrações de Hb/g de fezes observou-se que a sensibilidade não se alterou para nenhum deles, permanecendo 78% para a benzidina, e 94% para o guaiac. A especificidade, por sua vez, apresentou-se reduzida na concentração de 1 μg Hb/g de fezes (de 99% para 97% na

benzidina, e 98% no guaiac) e atingiu seu máximo de eficiência (100% tanto para benzidina, quanto para o guaiac) nas concentrações de sangue acima de 5 µg Hb/g de fezes.

4 DISCUSSÃO

Diante da indicação de pesquisa de sangue oculto fecal em diversas doenças potencialmente causadoras de distúrbios vasculares e/ou de coagulação em pequenos animais, tais como ulcerações gastroduodenais de origem neoplásica e não neoplásicas (STATOON; BRIGHT, 1989; CARIU et al., 2009), doença renal crônica (CRIVELLENTI et al., 2017; IRIS, 2019), trombocitopenia imunomediada (WALDROP et al., 2003), hipercortisolismo iatrogênico (ROHRER et al., 1999), entre outras; a determinação de qual reagente é mais sensível e/ou específico, bem como se os escores propostos por parte dos referidos pesquisadores (NARITA et al., 2005; CRIVELLENTI et al., 2017) realmente são úteis e necessários, motivou a presente pesquisa.

Os resultados do presente trabalho corroboraram os dados da literatura que utilizaram os reagentes benzidina e guaiac para detecção de sangramento oculto fecal (ILLINGWORTH, 1965; MORRIS et al., 1976; AHLQUIST et al., 1984; BEG et al., 2002; GIBBONS et al., 2005), demonstrando que ambos são capazes de identificar quantidades inclusive inferiores às informadas na bula do produto comercial humano, Fecca Cult[®], que é de 10 µg Hb/g fezes (INLAB DIAGNOSTICA, 2000).

Pode-se notar na Tabela 1 que nas fezes *in natura* (contendo 0 µg Hb/g fezes) nenhum avaliador encontrou sangue nas amostras, ressaltando a utilização dos referidos testes para descartar a ocorrência de sangramentos ocultos fecais. Por outro lado, a maior parte dos avaliadores classificou as amostras sabidamente contendo sangue, de maneira geral, como fortemente positivas (escore 3) pelo teste utilizando reagente benzidina (74%) e como moderadamente positivas (escore 2) pelo teste utilizando guaiac (76%), demonstrando uma tendência à superestimação e/ou a subestimação das quantidades de sangue oculto fecal, quando avaliados pelos testes, respectivamente.

Quando os testes foram analisados conjuntamente, nenhuma amostra contendo quatro vezes o valor de detecção (40 µg Hb/g fezes) foi classificada como falso-negativa e todas as amostras contendo concentrações inferior ao limite de detecção testado de 10 µg Hb/g fezes foram classificadas como positivas, variando de fraca a até fortemente-positivas. Notavelmente na concentração de 5 µg Hb/g fezes, 53% das amostras foram classificadas como moderada e 37% como forte-positivas, sendo o teste de benzidina responsável por 83% (Tabela 2) dos resultados forte-positivos, contra apenas 5% (Tabela 3) de contribuição do guaiac. Diante destes resultados, pondera-se sobre a sensibilidade de detecção do reagente benzidina de reais sangramentos de origem gastrointestinais, já que este aparentemente reage

fortemente a poquíssimas quantidades de sangue, as quais poderiam ocorrer durante o próprio ato de defecação, ou mesmo serem originados de dieta rica em proteína de origem animal (RICE; IHLE, 1994; TUFFLI; GASCHEN; NEIGER, 2001).

O teste baseado no reagente guaiac apresentou desempenho superior ao da benzidina em todos os quesitos. Alta sensibilidade e especificidade demonstram que numa população de cães que estão apresentando sangramento gastrointestinal oculto, o guaiac consegue identificar 94% dessa, da mesma forma que numa população de cães que não apresentam sangramento gastrointestinal oculto, o mesmo consegue detectar 99%, respectivamente (Tabela 4) (ROUQUAYROL; ALMEIDA, 1999).

Embora teste baseado no reagente benzidina não apresentou uma alta sensibilidade como o teste baseado no guaiac, esse, por sua vez, apresentou 78% de sensibilidade, uma sensibilidade moderada, entretanto o Valor Preditivo Positivo (VPP) e o Valor Preditivo Negativo (VPN), apresentaram valores altos, o que significa que a probabilidade de um cão com um resultado do teste benzidina positivo ter verdadeiramente sangramento gastrointestinal oculto é de 93%, enquanto que a probabilidade de um cão com um resultado do teste benzidina negativo não possuir sangramento gastrointestinal oculto é de 98%. Dessa maneira, podemos atribuir a sensibilidade moderada encontrada, a um erro na análise duplo-cega feita pelos avaliadores da pesquisa (ROUQUAYROL; ALMEIDA, 1999).

Em relação a Razão de Verossimilhança Positiva (RVP), essa varia de 1 a infinito (FERREIRA; PATINO, 2018). Uma razão de verossimilhança com o valor maior que 1, que é o caso da presente pesquisa que possui 77% de RVP no teste benzidina e 94% no teste guaiac, corrobora a presença da doença, o que significa que quanto maior a RVP, maior é a probabilidade de que o resultado positivo do teste aumente a probabilidade de sangramento gastrointestinal oculto se o resultado do teste for positivo. Quanto a Razão de Verossimilhança Negativa (RVN) essa varia de 1 a 0, como os valores encontrados na pesquisa são 22% (teste benzidina) e 6% (teste guaiac), valores que são próximos de 0, pode-se afirmar que menor é a probabilidade de sangue oculto fecal na presença de resultado negativo no teste.

A acurácia, medida utilizada para avaliar a proporção total de resultados corretos (ROUQUAYROL; ALMEIDA, 1999), foi alta. Tais resultados demonstram que ambos os testes são altamente capazes de diagnosticar a condição para a qual eles foram criados, ou ainda, capazes em acertar o diagnóstico da condição testada, que, na atual circunstância trata-se do sangue oculto nas fezes de cães.

Finalmente, ao se comparar todos resultados encontrados no teste baseado no reagente benzidina com os resultados encontrados no teste baseado no reagente guaiac, pode-se notar

que este último apresentou melhor desempenho individual que o primeiro. Crê-se que tal superioridade possa estar relacionada ao fato deste reagente apresentar-se comercialmente na forma do teste Fecca cult[®], o que geraria, a princípio, não somente praticidade na realização dos testes, mas menos interferências operador-dependentes, já que para utilização da benzidina, fazem-se necessárias várias etapas pré-analíticas a cada novo teste, incluindo pesagem do reagente, preparação de solução de ácido acético a 50% e da solução de benzidina, propriamente dita, a partir de dois componentes. Ademais, o reagente benzidina mostra-se potencialmente cancerígeno (SYED; KHATOON; SILWADI, 2001).

Vale ressaltar que este estudo piloto utilizou amostras fecais de animais clinicamente saudáveis e, portanto, novos estudos em populações de animais portadores de doenças sabidamente causadoras de lesões do TGI, bem como envolvendo diagnósticos específicos como endoscopia do TGI ou até mesmo dados de necropsia para confirmação de lesões vasculares serão cruciais para validação dos resultados aqui demonstrados.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que os testes bTSOF e gTSOF foram capazes de detectar concentrações de sangue a partir de 1 µg Hb/g fezes e que, embora o reagente Benzidina tenha apresentado boa sensibilidade analítica para detecção de sangue oculto nas fezes de cães domésticos, o gTSOF apresentou melhor desempenho individual em todos os quesitos analisados, incluindo sensibilidade e praticidade na execução do teste.

6 REFERÊNCIAS

AHLQUIST, D. A.; MCGILL, D. B.; SCHWARTZ, S.; TAYLOR, W. F.; ELLEFSON, M.; OWEN, R. A. HemoQuant, a new quantitative assay for fecal hemoglobin. **Annals of Internal Medicine**, v.101, n.3, p.297-302, 1984.

BEG, M; SINGH, M; SARASWAT, MK; REWARI, BB. Occult Gastro-intestinal Bleeding: Detection, Interpretation, and Evaluation. **Journal, Indian Academy of Clinical Medicine**, v.3, n.2, p.153-8, 2002.

CARIOU, M.; LIPSCOMB, V.J; BROCKMAN, D.J; GREGORY, S.P; BAINES, S.J; Spontaneous gastroduodenal perforations in dogs: a retrospective study of 15 cases. **Vet Rec**. v.165, p.436-441, 2009.

CRIVELLENTI, L. Z; BORIN-CRIVELLENTI, S.; FERTAL, K.L; CONTIN, C.M; MIRANDA, C.M.J; SANTANA, A.E. Occult gastrointestinal bleeding is a common finding in dogs with chronic kidney disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v.46, n.1, p.132-137, 2017.

CEUA. **Manual de utilização de animais/fiocruz**. Rio de Janeiro, 2008.

FERREIRA, J. C; PATINO, C. M. Entendendo os testes diagnósticos. Parte 3. **J Bras Pneumol**. v.44, p.4-4, 2018.

GIBBONS, P. M; TELL, L. A; KASS,P. H; CHRISTOPHER,M. M. Evaluation of the sensitivity and specificity of four laboratory tests for detection of occult blood in cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) excrement. **American Journal of Veterinary Research**, v.6 , n.8, p.1326-32, 2005.

ILLINGWORTH, D. G. The choice of Occult Blood tests in General Practice. **The Journal of the College of General Practitioners**, v.9, n.1, p. 33-44, 1965.

INLAB DIAGNOSTICA 2000 bula do produto Fecca Cult® Teste para “Pesquisa de sangue oculto nas fezes” eletronicamente disponível no site: www.interlabdist.com.br

International Renal Interest Society. IRIS Staging of CKD (modified 2019) - (PDF). Available at: http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf. Acesso em 29 de dezembro de 2020.

MORRIS DW; HANSELL JR; OSTROW JD; LEE CS. Reliability of chemical tests for fecal occult blood in hospitalized patients. **The American journal of digestive diseases**, v.21, n.10, p.845-52, 1976.

NARITA, T; TOMIZAWA, N; SATO, R; GORYO, M; HARA, S. Effects of long-term oral administration of ketoprofen in clinically healthy beagle dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.67, n.9, p.847-853, 2005.

RICE, J. E; IHLE, S. L. Effects of Diet on Fecal Occult Blood Testing in Healthy Dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.58, n.2, p.134-137, 1994.

ROHRER, C. R; HILL, R. C; FISCHER, A; FOX, L. E; SCHAER, M; GINN, P. E; CASANOVA, J. M; BURROWS, C. F. Gastric hemorrhage in dogs given high doses of methylprednisolone sodium succinate. **Am J Vet Res**. v.60, p.977-981, 1999.

ROUQUAYROL, M. Z; ALMEIDA N. **Epidemiologia e Saúde 5ª edição**. Rio de Janeiro: Medsi, 1999.

RUDINSKY, A. J; GUILLAUMIN, J; GILOR, C. Sensitivity of fecal occult blood testing in the cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.19, n.6, p.603-608, 2017.

STANTON, M.E; BRIGHT, R.M. Gastroduodenal ulceration in dogs. Retrospective study of 43 cases and literature review. **J Vet Intern Med**. v.3, p.238-244, 1989.

SYED, A. A; KHATOON, B. A; SILWADI, M. F. New reagentes for detection of faecal occult blood. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.24, n.4, p.581-586, 2001.

TUFFLI, S. P; GASCHEN, F; NEIGER, R. Effect of dietary factors on the detections of fecal occult blood in cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, n.2, p.177-179, 2001.

TAKAO KAWAMURA. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica. Eficiência de um teste. **Arq Bras Cardiol**, v.79, n.4, p.437-41, 2002.

WALDROP, J. E; ROZANSKI, E. A; FREEMAN, L. M; RUSH, J. E. Packed red blood cell transfusions in dogs with gastrointestinal hemorrhage: 55 cases (1999-2001). **J Am Anim Hosp Assoc**, v.39, p.523-527, 2003.